

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL Unidad Sinaloa



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD-SINALOA**

**“CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE LA
MORA *Maclura tinctoria* EN EL SISTEMA INMUNE DEL CAMARÓN
BLANCO *Litopenaeus vannamei* BAJO CONDICIONES DE CULTIVO”.**

JOSÉ SATURNINO DÍAZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

GUASAVE, SINALOA, ENERO DE 2017



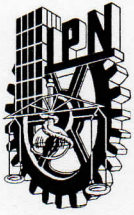
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa, México el día 5 del mes de Diciembre del año 2016, el (la) que suscribe José Saturnino Díaz alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro A120315, adscrito a Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-SINALOA), manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Héctor Abelardo González Ocampo y la Dra. Norma Almaraz Abarca y cede los derechos del trabajo intitulado “Capacidad Antioxidante de los Extractos de la Mora *Maclura tinctoria* en el Sistema Inmune del Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei* Bajo Condiciones de Cultivo”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones jsdiaz_24@hotmail.com, hgocampo@yahoo.com, noralab@yahoo.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M.C. José Saturnino Díaz



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

Guasave, Sinaloa; a 25 de Noviembre del 2016

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Sinaloa en su sesión Ordinaria No. 11 celebrada el día 04 del mes de Noviembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Apellido paterno: DIAZ Apellido materno: JOSÉ SATURNINO
Nombre (s): JOSÉ SATURNINO
Con registro:

A	1	2	0	3	1	5
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

- 1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado: "Capacidad Antioxidante de los Extractos de la Mora *Maclura tinctoria* en el Sistema Inmune del Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei* Bajo Condiciones de Cultivo".

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

Capacidad antioxidante, concentraciones y contenido fenólico de los extractos de la Mora *Maclura tinctoria*, proceso de microencapsulación y posterior evaluación de su aporte al sistema de defensa antioxidante del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* bajo condiciones controladas.

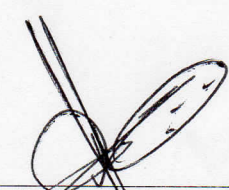
- 2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores: Dr. Héctor Abelardo González Ocampo y Dra. Norma Almaraz Abarca

- 3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en: CIIDIR Sinaloa, CIIDIR Durango y Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

- 4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

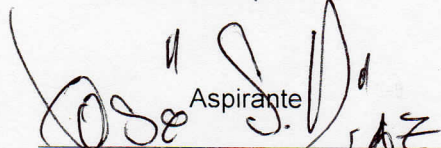
Directores de Tesis




Dr. Héctor Abelardo González
Ocampo



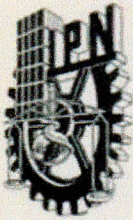
Dra. Norma Almaraz Abarca



Aspirante
M.C. José Saturnino Díaz



Presidente del Colegio
Dra. Diana Cecilia Escobedo Urías



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 13 horas del día 18 del mes de septiembre del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA para examinar la tesis titulada:

“CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE LA MORA *Maclura tinctoria* EN EL SISTEMA INMUNE DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei* BAJO CONDICIONES DE CULTIVO”

Presentada por el alumno:

DÍAZ

JOSÉ SATURNINO

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

A	1	2	0	3	1	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

DR. HÉCTOR ABELARDO
GONZÁLEZ OCAMPO
(11960-ED-16)

DRA. NORMA ALMARAZ
ABARCA (10931-EE-15)

Tutor

DRA. NORMA ELENA LEYVA
LÓPEZ (9905-EE-13)

Tutor

DR. ANTONIO LUNA GONZÁLEZ
(10593-ED-15)

Tutor

DR. GERARDO RODRÍGUEZ
QUIROZ (10594-EF-15)

Suplente

DR. WENCESLAO VALENZUELA
QUINÓNEZ (10458-EF-14)

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DRA. DIANA CECILIA ESCOBEDO URÍAS
(CIIDIR SINALOA)



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION

FINANCIAMIENTO

Ésta tesis fue desarrollada gracias al apoyo del Instituto Politécnico Nacional, a través de la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP-IPN) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), mediante el financiamiento de los proyectos de investigación dirigidos por el Dr. Héctor Abelardo González Ocampo:

FOMIX 144280 Propuesta para la elaboración del plan de ordenamiento ecológico costero del estado de Campeche.

SIP 1452 Análisis del impacto ambiental de las actividades productivas del valle de Guasave sobre la zona costera del municipio de Guasave.

SIP 20120079 y SIP 20130398 Determinación de plaguicidas organoclorados en peces de consumo frecuente en el municipio de Guasave, Sinaloa.

CIBNOR-IPN 194637 Investigación integral de las necesidades, problemáticas y oportunidades ambientales, económicas y sociales en áreas naturales protegidas de México: Un enfoque integral, multiinstitucional e interdisciplinario para el desarrollo sustentable.

20131918 Uso de extractos fenólicos para la estimulación del sistema inmune en el cultivo acuícola del camarón.

SIP 20141606 Determinación de fuentes de contaminación por metales pesados y OCPs mediante trazadores de fuentes orgánicas en lagunas costeras mexicanas.

SIP 20140036 Plaguicidas organoclorados en tejido muscular de jaiba del complejo lagunar Navachiste, Sinaloa, México.

PROINNOVA LLAOS-CIIDIR SINALOA 215574 Planta piloto experimental para evaluación y validación de procesos innovadores para el manejo y control de agentes infecciosos de origen viral y bacteriano.

CONACyT 279540 Red Temática de Áreas Naturales Protegidas.

DEDICATORIA

A mi madre Doña Silvia Díaz un ser extraordinario;;

A mis hermanos Manuel, María, Manuela y Saúl;;

A mis hijos María José, Marco Antonio y José Daniel;;

A Daniela, mi compañera en las buenas y en las malas;;

A mi Alma Mater la Universidad Autónoma de Sinaloa. SURSUM VERSUS;;

A mi generoso CIIDIR IPN Unidad Sinaloa. HUELUM;;

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Héctor Abelardo González Ocampo por su generosidad y por todo el apoyo económico y anímico, así como por su constante impulso para salir adelante con el arduo trabajo.

A la Dra. Norma Almaraz Abarca por su apoyo constante y sus siempre acertadas observaciones.

A la Dra. Liliana Alamilla Beltrán por aceptarme como su alumno de estancia tiempo en el cual compartí conocimientos y muchos momentos agradables con ella y sus alumnos de doctorado.

Al Dr. Antonio Luna González por sus acertadas observaciones y por siempre estar disponible para apoyar en el momento en que se le requiere.

A los M. C. Pedro Zamora Crescencio y Celso Gutiérrez Báez del Herbario UCAM del Centro de Investigaciones Históricas y Sociales de la Universidad Autónoma de Campeche por el su gran apoyo para la identificación de los especímenes colectados y la obtención de los materiales de *Maclura tinctoria* en el estado de Campeche, Campeche.

A la Dra. Diana Escobedo Uriás, Directora del CIIDIR Sinaloa, por su generoso apoyo y su amistad.

Al Dr. José Antonio Reyes, director del CIIDIR Durango, por su apoyo para llevar a cabo estancias de investigación en su prestigiado centro de investigaciones.

Al Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez, Coordinador del área de ingeniería en alimentos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN, por su apoyo y aceptación para llevar a cabo dos estancias en el laboratorio de Ingeniería de alimentos.

A la Dra. Norma Leyva López por sus excelentes cuestionamientos que mucho aportaron para el desarrollo de la presente tesis.

Al Dr. Gerardo Quiroz por sus atinadas observaciones y consejos para el desarrollo de la presente tesis.

A la M.C. Amanda Delgado, investigadora del CIIDIR Durango IPN, así como a los Dres. Gerardo Barriada Bernal, Roberto Medina Medrano, Alfonso Reyes Martínez y René Torres Ricario por su amistad y su apoyo en la asesoría para los análisis y cálculos de concentración y composición fenólica, así como de capacidad antioxidante.

A los M.C. Alí Ituriel Villanueva y Alejandro Orona Meza por su apoyo constante en los muestreos y colecta de los materiales vegetales, así como su generosidad al brindarme hospedaje durante varios meses en la ciudad de Durango.

A la Dra. Josefina Porras Saavedra, M.C. Jaime Jiménez Guzmán y M.C. Fidel Villalobos Castillejos del Laboratorio de Ingeniería en Alimentos de la ENCB del IPN entrañables y generosos amigos, por su apoyo para llevar a cabo la obtención de las microcápsulas y los diferentes análisis de las mismas.

A la Dras. María de Jesús Perea, Mayahuel Ortega Avilés, M. C. Luis Alberto Moreno Ruiz e Ing. Alberto Peña Barrientos del Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnología del IPN por su apoyo para llevar a cabo los análisis de microscopía SEM de las microcápsulas.

Al M.C. César Romero Higareda, catedrático de la Escuela de Biología de la UAS, por su apoyo y sus consejos para llevar a cabo los análisis estadísticos de los resultados de la presente tesis.

Al Dr. Píndaro Álvarez Ruíz, a los M. C. Arturo Fierro Coronado, Jesús Tomás Moreno, Blanca Ofelia Partida Aranguré, Sarai Miranda Saucedo y a los Biol. Teodoro Ruíz Rosas y Arturo Rubio Castro del CIIDIR Sinaloa IPN por su apoyo para llevar a cabo el bioensayo con camarón, las extracciones de muestras y los análisis de los diferentes parámetros enzimáticos.

A la M.C. Carmen Estela Fierros Pérez, ex directora de la Escuela de Biología UAS por su apoyo inicial para llevar a cabo esta empresa.

Al Dr. Jorge Sánchez Zazueta director de la Escuela de Biología UAS por su apoyo para cumplir con la meta anhelada.

Al CONACyT por otorgarme beca de posgrado para llevar a cabo diversas actividades fundamentales para poder cumplir en tiempo y forma con este proyecto de investigación.

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP-UAS-SEP) por la beca económica para poder llevar a cabo los estudios que respaldan la presente tesis.

Al Instituto de Apoyo a la Investigación e Innovación del Gobierno del Estado de Sinaloa (INAPI-Sinaloa) por su apoyo económico para realizar estancia en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN en México, Distrito Federal.

Índice

Abreviaturas.....	ii
Índice de tablas.....	iv
Índice de figuras.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1. <i>Maclura</i>	6
2.2. <i>Maclura tinctoria</i> (L.) Steud.	6
3. JUSTIFICACIÓN	8
4. HIPÓTESIS.....	8
5. OBJETIVOS.....	9
5.1. Objetivo General.....	9
5.2. Objetivos específicos.....	9
6. MATERIALES Y MÉTODOS	9
6.1. Material vegetal	9
6.2. Contenido de fenoles totales (CFT).....	10
6.3. Contenido de flavonoides totales (CFLT).....	11
6.4. Contenido de taninos condensados (CT)	11
6.5. Composición fenólica.....	12
6.6. Capacidad antioxidante por reducción del DPPH*	12
6.7. Capacidad antioxidante total (CAT).....	13
6.8. Poder antioxidante por reducción de hierro (FRAP).....	14
6.9. Encapsulado mediante secado por aspersión	14
6.9.1 Materiales encapsulantes	14
6.9.2 Morfología y tamaño de las microcápsulas	15
6.9.3 Actividad de agua (aw).....	15
6.9.4 Contenido de Humedad	15
6.9.5 Tiempo de Humectación	16
6.9.6 Tiempo de disolución	16
6.9.7 Higroscopicidad.....	16
6.9.8 Densidad aparente y densidad empacada	17
6.9.9 Índice de Carr (Compresibilidad y Fricción)	17
6.9.10. Cociente de Hausner (Fluidez)	17
6.9.11. Ángulo de Reposo.....	18
6.10. Bioensayo con <i>Litopenaeus vannamei</i>	18
6.10.1. Obtención de muestras.....	19
6.10.2. Análisis de la Actividad Fenoloxidasa (Po) en Plasma y SLH.....	19
6.10.3. Ensayo de la actividad Anión superóxido	20
6.10.4. Análisis de proteína	20
6.10.5. Tasa de Crecimiento Específico	20
6.10.6. Porcentaje de sobrevivencia	21
6.11. Análisis estadístico	21
7. RESULTADOS.....	21
7.1 Concentraciones de fenoles y flavonoides totales, taninos condensados.....	21

7.1.1.	Composición fenólica.....	22
7.1.2.	Pruebas de capacidad antioxidante.....	25
7.2.	Microcápsulas	26
7.2.1.	Concentración de fenoles totales.....	26
7.2.2.	Capacidad antioxidante.....	27
7.2.3.	Morfología y tamaño de las microcápsulas.....	27
7.2.4.	Contenido de humedad y actividad de agua.....	29
7.2.5.	Humectación, Disolución e Higroscopicidad.....	29
7.2.6.	Propiedades de flujo.....	30
7.2.7.	Ángulo de reposo.....	30
7.3.	Bioensayo con <i>Litopenaeus vannamei</i>.....	31
7.3.1.	Supervivencia, TCE, Proteína en Plasma y en SLH.....	31
7.3.2.	Proteína.....	31
7.3.3.	Actividad Anión Superóxido, Profenoloxidasa y Fenoloxidasa.....	32
7.3.4.	Parámetros Fisicoquímicos: Salinidad, pH, Temperatura y OD.....	33
7.3.5.	Parámetros de la calidad del agua: Amonio, Nitritos y Nitratos.....	34
8.	DISCUSIÓN GENERAL.....	35
8.1.	Concentración de fenoles y flavonoides totales y taninos condensados.....	35
8.2	Composición fenólica.....	36
8.3	Capacidad antioxidante.....	37
8.4	Microencapsulados.....	38
8.5.	Bioensayo con <i>Litopenaeus vannamei</i>.....	42
9.	CONCLUSIONES GENERALES.....	44
10.	LITERATURA CITADA.....	47
11.	ANEXOS.....	57

Abreviaturas

BE Extracto de corteza

CAT Capacidad antioxidante total

CC Corteza de Campeche

CFLT Contenido de flavonoides totales

CFT Contenido de fenoles totales

CS Corteza de Sinaloa

CT Contenido de taninos

DE 10 Equivalentes de dextrosa

DPPH* 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil.

EC₅₀ Concentración efectiva máxima al 50%

EFO25 Microcápsulas de extracto de corteza y 25 mL/L de aceite de pescado

EFO50 Microcápsulas de extracto de corteza y 50mL/L de aceite de pescado

ES Microcápsulas de extracto de corteza

FMS Frutos maduros de Sinaloa

FRAP Potencial antioxidante por reducción de fierro

FVC Frutos verdes de Campeche

FVS Frutos verdes de Sinaloa

HC Hojas de Campeche

HIV Virus de inmunodeficiencia humana

HPLC-DAD Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de arreglo de diodos.

HS Hojas de Sinaloa

IC₅₀ Concentración inhibitoria máxima media

LSH Lisado sobrenadante de hemocitos

mgEAA/mL Miligramos equivalentes de ácido ascórbico por mililitro

mgEAG/g Miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo

mgEAG/mL Miligramos equivalentes de ácido gálico por mililitro

mgECA/g Miligramos equivalentes de catequina por gram

mgEQ/g Miligramos equivalentes de catequina por gramo

mgEQ/mL Miligramos equivalentes de quercetina por mililitro

OD Oxígeno disuelto

pH Potencial de Hidrógeno
FO Fenol oxidasa
ProFO Profenol oxidasa
RT Tiempos de retención
SEM Microscopía electrónica de barrido
SO Anión Superóxido
TCE Tasa de crecimiento específico
UV Ultravioleta

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de los tratamientos en el bioensayo.....	18
Tabla 2. Concentración de fenoles totales (CFT), flavonoides totales (CFLT), y taninos condensados (CT) en los extractos metanólicos de frutos verdes (FV), frutos maduros (FM), corteza (C) y hojas (H) de las poblaciones de <i>M. tinctoria</i> de Sinaloa (S) y Campeche (C). Los valores representan la media±DE. Diferentes superíndices en una misma columna indican diferencias significativas ($p\leq 0.05$).....	22
Tabla 3. Valores promedio±DE de capacidad antioxidante por reducción de DPPH*, reducción de Fe^{+} (FRAP) y reducción de molibdato (CAT) de los extractos metanólicos de frutos verdes (FV), frutos maduros (FM), corteza (C) y hojas (H) de <i>M. tinctoria</i> de poblaciones de Campeche (C) y Sinaloa (S). Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p\leq 0.05$).....	25
Tabla 4. Correlación de Pearson entre las concentraciones de Fenoles Totales (CFT), Flavonoides Totales (CFLT), Taninos Condesados (TC) y la capacidad antioxidante por CAT, DPPH* y FRAP. * $p\leq 0.05$, ** $p\leq 0.01$, ns=no significativa.....	26
Tabla 5. Valores promedio±DE de las concentraciones de CFT, CFLT y CT. BE).- Extracto de corteza; microcápsulas SE).- Extracto solo; 2).- EFO25 Extracto+Aceite de pescado 25%; 3).- EFO50 Extracto+Aceite de pescado 50%. Los superíndices muestran diferencias significativas.....	26
Tabla 6. Propiedades relacionadas con el agua en las tres microcápsulas. Estadísticos descriptivos (Media±DE). Los superíndices indican grupos homogéneos a partir de un análisis de varianza.....	30
Tabla 7. Estadísticos descriptivos de las propiedades de flujo de las microcapsulas Valores promedio±DE. Los superíndices indican grupos homogéneos a partir de un análisis de varianza.....	30
Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos del bioensayo con <i>Litopenaeus vannamei</i> : Salinidad, pH, Temperatura y Oxígeno disuelto.....	34
Tabla 9. Parámetros de la calidad del agua del bioensayo con <i>Litopenaeus vannamei</i> : Amonio, Nitritos y Nitratos.....	34

Índice de figuras

- Figura 1.** Espectros UV, λ_{\max} , y tiempos de retención (RT (min)) de los compuestos 1-15 encontrados en los diferentes tejidos de *Maclura tinctoria* de Sinaloa y Campeche. BC: Corteza de Campeche, BS: Corteza de Sinaloa, LC Hojas de Campeche, LS: Hojas de Sinaloa, GFC: Frutos verdes de Campeche, GFS: Frutos verdes de Sinaloa.....23
- Figura 2.** Espectros UV, λ_{\max} , y tiempos de retención (RT (min)) de los compuestos 16-30 encontrados en diferentes tejidos de *Maclura tinctoria* de Sinaloa y Campeche. BC: Corteza de Campeche, BS: Corteza de Sinaloa, LC Hojas de Campeche, LS: Hojas de Sinaloa, GFC: Frutos verdes de Campeche, GFS: Frutos verdes de Sinaloa.....23
- Figura 3.** Espectros UV, λ_{\max} , y tiempos de retención (RT (min)) de los compuestos 31-33 encontrados en diferentes tejidos de *Maclura tinctoria* de Sinaloa y Campeche. BC: Corteza de Campeche, BS: Corteza de Sinaloa, LC Hojas de Campeche, LS: Hojas de Sinaloa, GFC: Frutos verdes de Campeche, GFS: Frutos verdes de Sinaloa.....24
- Figura 4.** Cromatogramas obtenidos a 260 nm mediante análisis HPLC-DAD de diferentes tejidos de *Maclura tinctoria* de Sinaloa y Campeche. El número de compuestos corresponde a aquellos de las Figuras 1-3. BC: Corteza de Campeche, BS: Corteza de Sinaloa, LC Hojas de Campeche, LS: Hojas de Sinaloa, GFC: Frutos verdes de Campeche, GFS: Frutos verdes de Sinaloa.....24
- Figura 5.** Valores promedio \pm DE de capacidad antioxidante mediante CAT (a) y FRAP (b) en A).- Extracto de corteza; B).- Aceite de pescado; Microcápsulas 1).- ES Extracto Solo; 2).- EFO25 Extracto+Aceite de pescado 25%; 3).- EFO50 Extracto de corteza+Aceite de pescado 50%. Los superíndices muestran diferencias significativas $p \leq 0.05$27
- Figura 6.** Micrografías SEM mostrando la estructura externa de las microcápsulas a 500x, 1000x y 3000x. a).- ES; b).- EFO25 y c).- EFO50.....28
- Figura 7.** Tasa de crecimiento específico (TCE Diario).....31
- Figura 8.** Concentraciones de proteína en plasma y Sobrenadante Lisado de Hemocitos (SLH) ($\mu\text{g/mL}$). Los superíndices indican diferencias significativas.....32
- Figura 9.** Parámetros del bioensayo con *Litopenaeus vannamei*: Anión superóxido (a), ProFO LSH (b), FO Plasma (c) y FO Total (e). Los superíndices muestran diferencias significativas.....33

RESUMEN

Maclura tinctoria (L.) D. Don ex Steud. es un árbol medicinal del bosque tropical seco de Sinaloa y Campeche, México. De extractos metanólicos de los polvos macerados de frutos, cortezas y hojas se determinó el contenido de fenoles totales (CFT) cuyo valor más alto (414.1 mgEAG/g) se encontró en frutos verdes de plantas de Sinaloa. La mayor concentración de flavonoides totales (CFLT) fue de 93.4 mgECA/g en el extracto de hojas de plantas de Campeche y la concentración más alta de taninos condensados (CT), se observó en el extracto de los frutos maduros de Sinaloa (41.3 mgECA/g). Así mismo, se determinó la capacidad bloqueadora de DPPH* cuyo valor más alto fue para el extracto de corteza de Sinaloa ($IC_{50}=11.06$ mgEQ/mL), el valor más alto de poder reductor de hierro (FRAP) lo mostró el extracto de hojas de Campeche ($EC_{50}= 4.04$ mgEAA/mL), y la mayor capacidad antioxidante total por reducción de molibdato (CAT) la presentó el extracto de hojas de Campeche (24.1 mgEAG/mL). Mediante análisis de HPLC-DAD se determinó la presencia de ácidos fenólicos, flavonas, flavonoles y dihidroflavonoides. Se encapsuló el extracto de corteza de Sinaloa y aceite de pescado con maltodextrina y goma arábica como materiales de pared. Se obtuvieron tres tipos de microcápsulas: 1).- ES extracto solo, 2).- EFO25 extracto más 25 mL/L de aceite de pescado y 3).- EFO50 extracto más 50 mL/L de aceite de pescado. Los valores mayores de contenido de humedad (4.72 g/Kg), higroscopicidad (15.31 %), tiempo de humectación y disolución (56 y 110 min) se observaron en EFO25, y los mayores contenidos de CFT, CFLT and CT y capacidad antioxidante por FRAP y CAT, se obtuvieron en EFO50. Las microcápsulas ES se mezclaron con camaronina para evaluar su efecto en el sistema de defensa oxidativa del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Los mayores resultados del análisis de la actividad de las enzimas fenoloxidasa (FO), profenoloxidasa (ProFO) y la producción del radical libre anión superóxido se observaron en los tratamientos I, II y II, respectivamente. El mayor porcentaje de sobrevivencia (100%) se observó en los tratamientos III y IV. La mayor tasa de crecimiento específico 3.71 se observó en el tratamiento IV y la mayor producción de proteína en SLH y plasma 1.34 mg/mL y 155.8 mg/mL estuvo en los tratamientos II y IV. El extracto de *M. tinctoria* mostró buena actividad antioxidante antes y durante el bioensayo y el análisis reológico indica que las microcápsulas son muy estables y mantienen su contenido en condiciones óptimas durante periodos prolongados de tiempo.

ABSTRACT

Maclura tinctoria (L.) D. Don ex Steud. it's a medicinal tree from dry tropical forests of Sinaloa and Campeche, Mexico. In methanol extracts of fruits, bark and leaves the content of total phenols (TPC) was determined and the highest value (414.1 mgEAG/g) was found in green fruits of plants from Sinaloa. The highest concentration of total flavonoids (TFLC) was 93.4 mgECA/g in the extract of leaves of Campeche and the highest concentration of condensed tannins (CT) was observed in the extract of the ripe fruits of Sinaloa (41.3 mgECA/g). Also, the blocking ability of DPPH* was determined and the highest value was for the bark extract from Sinaloa ($IC_{50}=11.06$ mgEQ/mL), the highest value of reducing power of iron (FRAP) was found in the leaf extract from Campeche ($EC_{50}=4.04$ mgEAA/mL), and the total antioxidant capacity by molybdate reduction (TAC) presented the higher value in Campeche leaves extract (24.1 mgEAG / mL). By HPLC-DAD the presence of phenolic acids, flavones, flavonols and dihydroflavonoides was determined. Bark extract from Sinaloa and fish oil were encapsulated using maltodextrin and gum arabic as wall materials. Three types of microcapsules were obtained: 1).-ES extract alone, 2).-EFO25 extract plus 25 mL/L of fish oil and 3).-EFO50 extract plus 50 mL/L of fish oil. The highest values of moisture content (4.72 g / Kg), hygroscopicity (15.31%), wetting and dissolution time (56 and 110 min) were observed in EFO25, while the highest contents of TPC, TFLC and CT, and antioxidant capacity by FRAP and TAC, were obtained in EFO50. The ES microcapsules were mixed with shrimp feed to evaluate its effect on the enzyme system associated with oxidative defense of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The highest results of phenol oxidase (PO) and prophenoloxidase (ProPO) activity were found in treatments I and II, respectively; and the free radical superoxide anion production was higher in treatment II. Besides the highest percentage of survival (100%) was observed in treatments III and IV. The highest specific growth rate 3.71 was observed in treatment IV and an increased production of protein in HLS and plasma -1.34 mg/mL y 155.8 mg/mL, respectively- was found in treatments II and IV. The *M. tinctoria* extract depicted good antioxidant activity before and during the bioassay and the rheological analysis of the microcapsules shows that they are highly stable and maintain their contents in good condition for long periods of time.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en los procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, a los que se denomina como metabolitos secundarios (Ávalos-García y Pérez-Urría, 2009). Algunos tienen función protectora frente a predadores, actuando como disuasivos o tóxicos, porque proporcionan a las plantas sabores amargos y propiedades indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas y germicidas naturales (Taiz y Zeiger, 2006).

Entre los metabolitos secundarios destacan los fenoles que son principalmente producidos por las plantas; éstos son compuestos orgánicos con al menos un anillo aromático y uno o más grupos hidroxilos y derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. (Tsimidou, 1998). Se conocen más de 10.000 compuestos fenólicos, algunos de los cuales son solubles en solventes orgánicos y otros en agua como los glicósidos o los fenoles acilados (con ácidos orgánicos carboxílicos o con ácidos inorgánicos), mientras que otros son polímeros muy grandes e insolubles; de acuerdo con Dey y Harborne (1989) los tres grupos más importantes de compuestos fenólicos son los ácidos fenólicos y los flavonoides.

Los flavonoides son moléculas que tienen dos anillos bencénicos unidos a través de un anillo heterocíclico de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono se les denominan como compuestos $C_6C_3C_6$. La mayoría de los flavonoides son de color amarillo, pero los hay incoloros o bien de color rojo, violeta y azul. Los más de 4000

flavonoides naturales se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta el anillo heterocíclico central C3. De acuerdo con esto los flavonoides se clasifican en: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, dihidroflavonoides, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, y chalconas. La mayoría de las veces se les encuentra ligados a moléculas de carbohidratos por lo que se les denomina glicósidos, y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidratos se las denomina agliconas flavonoides (Martínez, 2005).

Los flavonoides poseen características antioxidantes ya que son moléculas nucleofílicas que se comportan como compuestos muy susceptibles para que los oxiden las especies reactivas (electrofílicas); es decir, ofrecen electrones a las especies reactivas para evitar que éstas ataquen a las macromoléculas nucleofílicas necesarias para la función y estructura celular (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos). Una vez que los radicales libres reaccionan con los antioxidantes se reducen parcialmente o se unen en forma de aductos, reduciendo su reactividad y oxidando al antioxidante (Quintanar-Escorza y Calderón-Salinas, 2009).

Debido a que los compuestos fenólicos son altamente sensibles a la luz y al calor, una de las mejores formas de brindarles protección es transformándolos en microcápsulas, de esta manera se disminuye el contenido de agua resultando un producto con propiedades fisicoquímicas mejoradas, más manejable y con una mayor vida útil (Gharsallaoui et al., 2007). Así mismo, el aceite de pescado cuyos beneficios a la salud se basan en la presencia de altas concentraciones de ácidos grasos n-3 poliinsaturados y cuya incorporación en los alimentos procesados es algo limitada debido a su baja solubilidad en la mayoría de los sistemas alimenticios y a su excesiva sensibilidad a la oxidación (Drusch et al., 2006) han encontrado en la técnica de

microencapsulación una solución a ésta problemática, ya que permite que sólidos, líquidos y gases puedan ser encerrados en cápsulas selladas que pueden liberar su contenido a tasas controladas bajo condiciones específicas (Klaypradit y Huang, 2008; Fang y Bhandari, 2010). Entre las principales razones para la encapsulación están el aislamiento del material núcleo de los efectos dañinos del oxígeno y retardar la evaporación de volátiles, además de controlar la tasa de liberación del material, mejorar las propiedades de manejo y diluir el material núcleo en pequeñas cantidades cuando se requiera (Shahidi y Han, 1993; Gharsallaoui et al., 2007). Además, en el caso de la encapsulación de lípidos bioactivos Matsuno y Adachi (1993) y McClements (2004) han reportado una serie de ventajas incluyendo baja autooxidación, mejoramiento de la estabilidad y enmascaramiento del sabor y aroma de los ingredientes lipídicos.

El secado por aspersión ha sido considerado como una solución a los problemas convencionales del secado de alimentos debido a que el proceso ha demostrado ser no solo eficiente sino también una de las técnicas más comunes y económicas para la obtención de productos alimenticios encapsulados si se le compara, por ejemplo, con el secado en frío cuyos costos son entre un 30 a 50% más caros (Desobry et al., 1997). Entre los materiales más comúnmente empleados para la encapsulación mediante secado por aspersión se incluyen la maltodextrina, la cual provee una buena estabilidad oxidativa a los encapsulados con aceite, pero en cambio exhibe una pobre capacidad de emulsificación y retención de aceite (Kenyon, 1995), mientras que el uso de la goma arábiga es más aceptado como material de pared en la encapsulación de lípidos que la maltodextrina debido a que produce emulsiones estables con la mayoría de los aceites con un amplio rango de pH y también porque forma una película visible en la interfase de aceite (Beristáin y Vernon-Carter, 1995).

En las células, la producción de los radicales libres que se dan constantemente “*in vivo*” y su incremento se denominan estrés oxidativo. El uso de medicamentos presenta efectos colaterales en el metabolismo como el aumento en el daño oxidativo causado por el exceso de radicales libres, que producen daño celular. El organismo ante el estrés oxidativo, responde con una defensa antioxidante extra, sin la cual el estrés oxidativo severo puede causar la muerte de la célula (Martínez-Lazcano et al., 2010). Los mecanismos naturales de defensa antioxidante, como medios de protección se dan a través de la producción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que remueve el O_2 convirtiéndolo en H_2O_2 , el cual es transformado por las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa en agua (Mayor-Oxíliá, 2010).

El cultivo del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei* Boone 1931) se ha constituido como una de las principales actividades económicas en México y otros países; actualmente la mitad del suministro mundial de camarón es producido por esta actividad (Goarant et al., 2006) en la que el país se ubica como el sexto productor después de China, Tailandia, Indonesia, Brasil y Ecuador. Para el año 2008, en México el camarón de cultivo representó el 66.33 % de la producción total en peso vivo; del cual, el estado de Sinaloa aportó el 28.73 %, ubicándose como el segundo productor en el país (CONAPESCA, 2008), mientras que en el 2011 la entidad registró una producción histórica de 50 mil toneladas, colocándose como la principal productora del crustáceo acuícola a nivel nacional (CONAPESCA, 2012). Sin embargo, el cultivo de camarón frecuentemente se ha visto obstaculizado por epizootias muy graves causadas por patógenos como hongos, bacterias y virus, principalmente (Gómez-Gil et al., 2001). El desarrollo de estas enfermedades no solo se debe al aumento en la intensidad del cultivo de la especie, sino también a problemas microbianos, alteraciones en el medio ambiente y desequilibrios nutricionales (Kautsky et al., 2000; González-Ocampo, 2010).

Actualmente, la principal amenaza para el desarrollo de la industria camaronera son las enfermedades infecciosas, especialmente las causadas por virus como el de la Mancha Blanca (WSSV) (Lightner, 1996; Flegel, 1996) y diferentes vibriosis provocadas por diversas especies de bacterias del género *Vibrio* (Gómez-Gil et al., 2001; Aguirre-Guzmán et al., 2005; Toranzo et al., 2009).

Cuando los microorganismos irrumpen al interior del camarón blanco, éste activa su sistema de defensa liberando hemocitos los cuales los ingieren, en ese momento se generan una serie de sustancias microbicidas que inhiben al microorganismo o lo digieren completamente. Entre estas sustancias se incluyen ROS de alta capacidad reactiva como anión superóxido (O_2^-), peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), iones hidróxido (OH^-), oxígeno singlete (O^1_2), mieloperoxidasa (MPO) y enzimas digestivas (Song y Hsie, 1994) que pueden afectar las células del camarón. La eliminación rápida y efectiva de ROS se vuelve esencial para mantenerlos en buen estado de salud y garantizar su supervivencia. Debido a eso, el crustáceo ha desarrollado defensas antioxidante, incluyendo mecanismos enzimáticos como la producción de ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa y peroxidasa las cuales eliminan el peróxido de hidrógeno celular, mientras que la superóxido dismutasa posee la capacidad de dismutar el anión superóxido y volverlo inocuo al dar como subproductos agua y peróxido de hidrógeno (Homblad y Söderhäll, 1999).

Es por eso que en los últimos quince años se han intensificado los esfuerzos destinados a la búsqueda de compuestos que favorezcan el estado de salud del camarón blanco reforzando su sistema de defensa enzimático. Para ello se han desarrollado diversas investigaciones con extractos de origen vegetal ricos en flavonoides, terpenoides y aceites esenciales (Citarasu et

al., 2001, 2002, 2010; Sivaram et al., 2004) para determinar su aporte al sostenimiento del estado de salud del camarón.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Maclura*

El género *Maclura* de la familia Moraceae está constituido por alrededor de 12 especies distribuidas en regiones tropicales de América, Asia y África. Incluye especies arbóreas y especies arbustivas trepadoras con espinas agudas, con hojas alternas con los márgenes dentados o lobados. Las flores pueden ser estaminadas en espigas o cabezuelas globosas, las pistiladas son capítulos subglobosos. El fruto es una baya agregada globosa, con el perianto carnososo.

2.2. *Maclura tinctoria* (L.) Steud.

Árboles hasta de 30 m de alto, a veces arbustos, con espinas axilares solitarias o en pares. Hojas elípticas a oblongas a veces subcordiformes o lanceoladas de 1.5 a 15 cm de largo por 0.8 a 7 cm de ancho, con el ápice acuminado o subagudo, la base truncada o cordada, margen subentero a crenado-serrado-dentado. Flores unisexuales, las estaminadas muy pequeñas y apétalas, dispuestas en espigas laxas de 2 a 13 cm de longitud, con 3 a 4 estambres. El fruto es una baya agregada, esférica, de 1 a 1.5 cm de ancho, carnososa, de color morado y sabor dulce en la madurez. Se distribuye en toda la América tropical desde México hasta Argentina y Bolivia; y desde Paraguay a Brasil y Venezuela, así como en algunas islas del Caribe como Cuba, República Dominicana y Jamaica (Berg, 2001). En México es común desde el Sur de Sonora, pasando por Sinaloa hasta Chiapas, Campeche y Yucatán, hasta la región de la huasteca (Pennington y Sarukhán, 2005). En su rango de distribución la especie es muy apreciada por su madera de alta calidad, así como por sus frutos comestibles. Además la corteza, de la que se

extraen tintes y resinas, se utiliza para diversos cocimientos empleados en la medicina tradicional para el tratamiento de algunos padecimientos que van desde dolor de muelas, infección de la garganta (Berg, 2001, Yetman y Van Devender, 2002; Pennington y Sarukhán, 2005; Matson-Robles et al., 2015).

Una serie de estudios sobre la composición fenólica en los extractos de la corteza de *Maclura tinctoria* han mostrado la presencia de flavonoides, xantonas, flavonas y glicósidos de chalcona (Cioffi et al., 2003). Algunos de los compuestos identificados presentan actividad anti-VIH (Groveiss et al., 2000), antifúngica (El-Sohly et al., 1999) y capacidad antioxidante equivalente a trolox y β - caroteno (Cioffi et al., 2003).

El-Sohly et al. (2001) aislaron 5 flavonoides y un nuevo compuesto a partir de extractos de hojas de *M. tinctoria*. El nuevo compuesto fue caracterizado como 2',4', 4,2"-tetrahidroxi-3'-[3"-metilbut-3"-enil]chalcona. Los 4 compuestos conocidos fueron identificados como: 1.- 2',4',4-trihidroxi-3'-[3"-metilbut-3"-enil]chalcona (isobavachalcona), 2.- 4,2'-dihidroxi-2"-[1-hidroxi-1-metiletil] 2",3" dihidrofurano [4",5":3',4'] chalcona (bakuchalcona), 3.- 4,4',5"-trihidroxi-6",6" dimetildihidropirano [2",3",5',6"] chalcona (bavachromanol), y 4.- 5,7,3',4'-tetrahidroxi-6,8-diprenilisoflavona (6,8-diprenilorobol). Todos los compuestos aislados fueron evaluados contra los patógenos micóticos oportunistas relacionados con el SIDA, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* mostrando actividad el compuesto 2 contra ambas especies de levaduras.

Lamounier et al. (2012) realizaron un análisis químico de los fenoles de la corteza y madera de *M. tinctoria*, determinando su capacidad antioxidante y efecto contra las bacterias aerobias *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *S. mitis* (ATCC 49456), *S. mutans* (ATCC 25175), así como contra las bacterias anaerobias *Prevotella nigrescens* (ATCC 33563), *Actinomyces*

naeslundii (ATCC 19039) y *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) obteniendo actividad contra estos microorganismos.

En un estudio sobre consumidores de frutos silvestres del bosque tropical caducifolio de Sinaloa, Chihuahua y Durango se obtuvo que los de *M. tinctoria* son consumidos, por su sabor, pero también para tratar problemas de tipo estomacal (Díaz et al., 2010).

Los mayos del norte de Sinaloa y sur de Sonora consumen los frutos de la planta y elaboran un té con la corteza para eliminar amibas intestinales (Yetman y Van Devender, 2002).

Compuestos de origen vegetal como los fenoles, alcaloides, quinonas, terpenoides, lectinas y polipéptidos han mostrado ser alternativas muy efectivas como antibióticos en lugar de compuestos sintéticos en la industria acuícola (Citarasu, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

Los problemas ocasionados por enfermedades virales y bacterianas en los sistemas de cultivo de camarón son considerados como los principales causantes de mortalidades en granjas acuícolas de todo el mundo (Lightner y Redman, 1998).

En la acuicultura el uso de antibióticos de amplio impacto y capacidad residual afecta severamente las poblaciones naturales de microorganismos benéficos para la actividad acuícola (Gómez-Gil, et al., 2001). Por lo que promover el empleo de sustancias de origen natural impactaría positivamente en el ambiente en el cual se desarrolla el camarón de cultivo, disminuyendo los factores de estrés que merman su crecimiento.

4. HIPÓTESIS

Los extractos de frutos, hoja y corteza de *M. tinctoria* de Sinaloa y Campeche contienen compuestos fenólicos con capacidad antioxidante cuya dosificación en el alimento del camarón blanco bajo condiciones de cultivo pueden reforzar algunas actividades del sistema inmune.

5. OBJETIVOS

5.1. *Objetivo General*

Evaluar la concentración y la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos en los extractos de fruto, hojas y corteza de *M. tinctoria* y su aporte en el sistema de defensa antioxidante del camarón blanco (*L. vannamei*) bajo condiciones de cultivo.

5.2. *Objetivos específicos*

Determinar la composición cualitativa y cuantitativa de compuestos fenólicos y el potencial antioxidante de los extractos de frutos, hoja y corteza de *M. tinctoria* de dos regiones geográficas de México (Sinaloa y Campeche).

Evaluar el efecto de un extracto fenólico microencapsulado de *M. tinctoria* en el sistema enzimático de defensa oxidativo del camarón blanco (*L. vannamei*), bajo condiciones de cultivo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. *Material vegetal*

Las muestras de corteza, hojas y frutos se obtuvieron en agosto del año 2012, a partir de 20 individuos adultos, 10 provenientes del bosque tropical subperenifolio de la comunidad de Hampolol en el estado de Campeche (19° 56' 32" N y 90° 22' 32" O) y de otros 10 del bosque tropical caducifolio en la comunidad de Arroyo del Agua, municipio de Culiacán, Sinaloa (24° 52' 42.39" N y 107° 17' 47.53" O). Los respectivos ejemplares de referencia ("voucher") se depositaron en el Herbario CIIDIR, del CIIDIR IPN Durango (números curatoriales 36564, 36565 y 36566). Personal especializado del herbario del Centro de Investigaciones Históricas y Sociales de la Universidad Autónoma de Campeche (UCAM) y de la Escuela de Biología de la Universidad Autónoma de Sinaloa corroboraron la identificación de la especie. Después de su colecta, las muestras fueron transportadas en recipientes fríos, protegidas de la luz para evitar

su oxidación. Posteriormente, en el laboratorio, las muestras fueron deshidratadas, protegidas con papel periódico, en una secadora botánica. Las muestras secas fueron pulverizadas con la ayuda de una licuadora doméstica (Sunbeam, USA) y 5.5 g de cada muestra se maceraron en 50 mL de metanol (Baker®) al 80% (v/v) durante 24 h, a temperatura ambiente, en oscuridad. Los extractos resultantes se centrifugaron (8000 rpm durante 10 min) y se recuperaron los sobrenadantes. Las pastillas obtenidas de la centrifugación se reextractaron con metanol al 20% (v/v) de la manera ya descrita (Almaraz et al., 2007). Este último procedimiento también se llevó a cabo con las microcápsulas obtenidas, las cuales fueron diluidas en metanol (1g/50 mL). Se tomaron alícuotas de los diferentes extractos para determinar el contenido de fenoles totales (CFT), flavonoides totales (CFLT), taninos condensados (CT), así como las propiedades antioxidantes evaluadas por la capacidad bloqueadora de DPPH*, el potencial reductor de hierro (FRAP), y la capacidad antioxidante total por reducción de molibdato (CAT). Los restos de cada extracto se concentraron a sequedad para determinar los perfiles fenólicos por medio de un método en gradiente de HPLC-DAD.

6.2 Contenido de fenoles totales (CFT)

El contenido de fenoles totales (CFT) se determinó por el método Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999), mezclando 250 μL de extracto crudo, 2500 μL de agua deionizada, 125 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma®) y 375 μL de Na_2CO_3 (Fermont®). La mezcla se agitó y dejó reaccionar en oscuridad por dos horas. Posteriormente se registraron los valores de absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Optizen® POP UV/VIS, Spectra Services Inc.). Se preparó una curva estándar ($A_{760}=0.0472-0.1167$ [ácido gálico], coeficiente correlación $r=0.9945$), construida con ácido gálico (Sigma®) a diferentes concentraciones (0.5, 1.0, 1.5, 3.0, and 4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los valores de absorbancia de las muestras fueron sustituidos en la ecuación y los resultados obtenidos fueron ajustados de acuerdo al factor de dilución utilizado y

expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico en el extracto (mgEGA/g). Un microencapsulado de corteza se analizó de la misma manera.

6.3. Contenido de flavonoides totales (CFLT)

El contenido de flavonoides totales se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Chang et al. (2002). Se mezclaron 50 μ L de extracto crudo con 900 μ L de metanol y 60 μ L de una solución de AlCl_3 al 5% (p/v). La mezcla fue agitada y su absorbancia fue leída inmediatamente a 425 nm. Se elaboró una curva de calibración ($A_{425}=0.0414-0.0119$ [quercetina], coeficiente de correlación $r=0.9995$) con diferentes concentraciones de quercetina (Sigma®) (0.625, 1.25, 2.50, 5.0 y 10 μ g/mL). Los valores de absorbancia de las muestras fueron sustituidas en la ecuación. Los resultados fueron ajustados de acuerdo al factor de dilución empleado y se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina por gramo de extracto. Un microencapsulado de corteza se analizó de la misma manera (mgEQ/g).

6.4. Contenido de taninos condensados (CT)

El contenido de taninos condensados se determinó por el método de Julkunen-Tiitto (1985), mezclando 50 μ L de extracto crudo con 1.5 mL de vainillina al 4% (Técnica Química, Mexico) preparada en metanol y 750 μ L de HCl concentrado (Baker®). La mezcla fue agitada y se puso a reaccionar a temperatura ambiente y en oscuridad por 20 min. Posteriormente, la absorbancia de las muestras se leyó a 500 nm. Se elaboró una curva de calibración ($A_{500}=0.0128-0.0327$ [catequina], coeficiente de correlación $r=0.9946$) con diferentes concentraciones de catequina (Sigma®) (0.50 a 10 μ g/mL). Los valores de absorbancia de las muestras fueron substituidos en la ecuación y los resultados se ajustaron de acuerdo al factor de dilución utilizado y se expresaron como miligramos equivalentes de catequina por gramo de extracto (mgECA/g). Un microencapsulado de corteza se analizó de la misma manera.

6.5. Composición fenólica

La composición fenólica se determinó empleando alícuotas de 100 μL de cada extracto concentrado a sequedad y redissuelto en 5 mL de metanol grado HPLC (J. T. Baker $\text{\textcircled{R}}$), aplicando un método de gradiente (Campos y Markham, 2007) de HPLC-DAD (Perkin Elmer Series 200). Se utilizó una columna Perkin Elmer Brownlee Analytical C18 (4.6×250 mm, 5 μm). Los solventes de la fase móvil fueron agua acidificada (Baker TM) a pH 2.5 con ácido ortofosfórico (solvente A) y acetonitrilo (J. T. Baker $\text{\textcircled{R}}$) (solvente B). El gradiente utilizado fue el siguiente: inicio con el solvente A al 100%, disminución al 91% en los siguientes 12 min, a 87% en los siguientes 8 min, a 67% los siguientes 12 min, a 57% en los siguientes 10 min, permaneciendo en este nivel hasta los 60 min de análisis. Los cromatogramas se registraron a 260 nm y los espectros de cada compuesto resuelto se obtuvieron entre 200 y 400 nm, con un detector de arreglo de diodos (Perkin Elmer Series 200). La información estructural de los compuestos resueltos en los cromatogramas fue obtenida por comparación de los tiempos de retención los espectros UV de cada compuesto con los de los siguientes estándares obtenidos en Apin Chemicals Limited (Abingdon, Oxon, UK): ácido caféico (RT: 53.13, λ_{max} : 239sh, 295sh, 318), ácido p-coumarico (RT: 37.2, λ_{max} : 293sh, 308), quercetina (RT: 47.05, λ_{max} : 255, 268sh, 299sh, 370), quercitrina (quercetin-3-O-rhamnosido, RT: 38.54, λ_{max} : 255, 264sh, 295sh, 348), morina (RT: 45.4, λ_{max} : 254, 264sh, 298sh, 354), hesperidina (RT: 39.34, λ_{max} : 284, 335sh) y naringenina (RT: 52.25, λ_{max} : 289, 335sh). Información estructural también fue obtenida de las compilaciones de datos espectrales de compuestos fenólicos de Mabry et al. (1970) y Campos y Markham (2007).

6.6. Capacidad antioxidante por reducción del DPPH*

Esta determinación se realizó de acuerdo a Brand-Williams et al. (1995), diluyendo 0.0062 g de DPPH* en polvo (Sigma $\text{\textcircled{R}}$) en 100 mL de metanol. Alícuotas de 1000, 990, 960, 900, 850,

820, 800, 750, and 700 μL del reactivo fueron complementadas con alícuotas de 0, 10, 40, 100, 150, 180, 200, 250, y 300 μL de extracto, respectivamente. Las mezclas fueron incubadas bajo agitación, mantenidas en oscuridad durante 30 min y su absorbancia se leyó a 523 nm. La cantidad de flavonoides necesarios en cada extracto para disminuir al 50% la concentración inicial de DPPH* (IC_{50}) fue obtenida mediante la comparación de las concentraciones de DPPH* en un rango entre 10.0 a 100 $\mu\text{g/mL}$ contrastadas con las concentraciones de flavonoides de los extractos empleando la curva de calibración de la prueba de flavonoides totales ($A_{523}=0.119-0.0414$ [quercetina] coeficiente de correlación $r=0.9976$). Los resultados fueron reportados como miligramos equivalentes de quercetina por mililitro de extracto (mgEQ/mL) y miligramos equivalentes de quercetina por gramo de microcápsulas (mgEQ/g).

6.7. Capacidad antioxidante total (CAT)

Fue determinada por el método de reducción del molibdato VI a molibdato V, siguiendo el procedimiento descrito por Prieto et al. (1999). Para ello se mezclaron 100 μL de muestra con 1000 μL de solución de molibdato, luego se incubaron en termoblock (Thermolyne® Dry Bath DB28125) durante 90 min a 95 °C. Después de que las muestras se enfriaron hasta alcanzar la temperatura ambiente (en oscuridad), se registró la absorbancia a 695 nm. Se preparó una curva de calibración ($A_{695}=0.0729-0.0747$ [ácido gálico], coeficiente de correlación $r=0.9947$) con diferentes concentraciones de ácido gálico entre 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 mg/mL). Los valores de absorbancia de las muestras fueron substituidos en la ecuación y los resultados se ajustaron al factor de dilución empleado y se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por mililitro de extracto (mgEGA/mL) y miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de microcápsulas (mgEGA/g).

6.8. Poder antioxidante por reducción de hierro (FRAP)

Se determine por el método de Oyaizu (1986) con algunas modificaciones. Muestras de 0, 5, 25, y 50 μL fueron complementadas con 75, 70, 50 y 25 μL de metanol, respectivamente. Después se adicionaron a cada tubo 550 μL de buffer de fosfato (0.2 M, pH 6.6) y 1250 μL 30 mM de ferrocianuro de potasio (Fermont®) y se incubaron las mezclas durante 20 min a 50 °C. Posteriormente fueron enfriadas a temperatura ambiente en oscuridad, se les adicionaron 1250 μL 0.6 M de ácido tricloroacético (Monterrey®) y se centrifugaron (Hermle® Z216MK Labortechnik, Alemania) por 10 min a 2800 rpm y 25 °C. Después se tomaron 625 μL del sobrenadante y se mezclaron con 625 μL de agua desionizada y 125 μL cloruro férrico (Merck®) 6 mM. Se leyó la absorbancia a 700 nm y se preparó una curva de calibración ($A_{700}=0.0711-0.1057$ [Ácido ascórbico], coeficiente de correlación $r=0.9963$) con cuatro concentraciones diferentes de ácido ascórbico (10, 20, 30 y 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Los resultados se expresaron como la concentración de extracto requerida para alcanzar un valor de absorbancia de 0.5 EC_{50} (concentración efectiva al 50%) en miligramos equivalentes de ácido ascórbico por mililitro de extracto (mgEAA/mL) y miligramos equivalentes de ácido ascórbico por gramo de microcápsulas (mgEAA/g).

6.9. Encapsulado mediante secado por aspersión

6.9.1 Materiales encapsulantes

Los materiales encapsulados fueron extracto de corteza de *M. tinctoria* y aceite de pescado (Pescadería Mora, S. A. de C. V., Tuxpan, Veracruz, México), así como goma arábiga E 414 grado alimenticio (Alfred L. Wolf S. A. de C. V. México, D. F.) y maltodextrina DE 10 (Chemistry LEFE S. A. de C.V. México, D. F.) como materiales de pared.

Las muestras de las microcápsulas obtenidas directamente del ciclón se guardaron en bolsas de aluminio con cierre hermético y se depositaron en el desecador para su posterior análisis y uso.

6.9.2 Morfología y tamaño de las microcápsulas

La morfología de las microcápsulas se determinó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM-FIB, 3D Quanta FEG™, FEI Co. USA) empleando muestras no cubiertas, a bajo vacío; luego se seleccionaron las imágenes obtenidas a 500x, 1000x and 3000x (Bozzola et al., 1998): El tamaño promedio de las microcápsulas se determinó mediante el tratamiento de 1 g de muestra húmeda en el analizador de partículas (Cilas™ particle Size analyzer 1090, USA) acoplado al software Size Expert V933™.

6.9.3 Actividad de agua (aw)

Se determinó en el AQUALAB 4TE (Decagon Devices Inc., USA) utilizando 1 g de cada una de las muestras de microcápsulas obtenidas. Las muestras se colocaron dentro de la cámara de medición, en la cual se localiza un ventilador, un termómetro infrarrojo y un sensor de punto de rocío. El sensor de punto de rocío toma la temperatura del aire presente en la cámara y el termómetro infrarrojo la temperatura de la muestra en este punto. A partir de estas mediciones se establece la relación entre las presiones de saturación del vapor del aire de la cámara y el de la muestra en el punto de rocío para obtener la actividad de agua que tiene la muestra en este punto (Placido y Alemán, 2002).

6.9.4 Contenido de Humedad

Se realizó en una estufa de vacío utilizando 1 g de cada uno de los microcápsulas a una temperatura de 70°C durante 24 horas (método 925.09 de la AOAC). Este método es recomendado para productos deshidratados con un alto contenido de azúcares. El contenido de humedad se determinó mediante la fórmula de Mendanha et al. (2009):

$$C\%=100(W1-W2)/W2 \quad (1)$$

Donde **C** es el porcentaje de contenido de humedad, **W1** es el peso inicial de la muestra y **W2** el peso final de la misma muestra.

6.9.5 Tiempo de Humectación

Las propiedades de humectación de los encapsulados se determinaron por medio de su humedad estática por el método FIL (1985) utilizando 1 g de muestra que se depositó en la superficie de 10 mL de agua destilada contenida en un vaso de precipitado de 100 mL. El tiempo requerido para que todas las partículas se sumerjan en el agua se registró y determinó como tiempo de humectación (Gaiani et al., 2010).

6.9.6 Tiempo de disolución

Se determinó agregando 2 g de muestra en un vaso de precipitado con 100 mL de capacidad y un volumen de 50 mL de agua destilada a temperatura de 24 ° C. La mezcla se agitó a 700 rpm sobre un agitador magnético utilizando una barra magnética de 2mm x 10 mm para registrar el tiempo en el que la muestra se disolvió en el medio líquido (Goula y Adamopoulos, 2005).

6.9.7 Higroscopicidad

Se determinó dispersando 1 g de cada uno de los tres tipos de microcápsulas en la superficie de cajas Petri para permitir el contacto con el aire. Las muestras fueron colocadas en un desecador a 23 ° C y una humedad relativa de 76% empleando una solución de NaCl (Cai y Corke, 2000). Después de una semana las muestras fueron pesadas y se calculó el porcentaje de higroscopicidad mediante la ecuación de Jaya y Das (2004):

$$H\% = (b/a + W_i) / (1 + b/a) \quad (2)$$

Donde **H%** es el porcentaje de higroscopicidad, **a** es la cantidad de muestra en gramos, **b** es la humedad de las muestras antes de exponerse a la humedad relativa (en gramos) y **W_i** es el incremento en el contenido de humedad de las muestras (en gramos).

6.9.8 Densidad aparente y densidad empacada

La densidad aparente (P_a) se determinó a partir de la masa de las muestras de microcápsulas y el volumen ocupado por cada muestra sin compactar en una probeta de 10 mL. La densidad empacada (P_e) se determinó mediante el golpeteo del material 100 veces consiguiendo su compactación en una probeta de 10 mL. El cálculo de las densidades se realizó registrando el peso del material y el volumen ocupado sin compactar y compactado, para posteriormente dividir la cantidad de muestra entre el volumen ocupado por la misma. Ambas densidades fueron reportadas en g/mL (Jumah et al., 2002; León-Martínez et al., 2010). A partir de los datos obtenidos de P_a and P_e se calcularon el Índice de Carr y el Cociente de Hausner para evaluar compresibilidad, fricción y fluidez en las microcápsulas (Barbosa-Cánovas et al., 2005; Ganesan et al., 2008; Gallo et al., 2011).

6.9.9 Índice de Carr (Compresibilidad y Fricción)

Por medio de este índice se evalúa la capacidad de flujo de los microcápsulas (compresibilidad y fricción) comparando la densidad de un polvo al verterlo (P_a) con la densidad del polvo empacado (P_e) (Barbosa-Cánovas et al., 2005; Ganesan et al., 2008; Gallo et al., 2011).

$$100(P_e - P_a) / P_e \quad \text{Índice de Carr} \quad (3)$$

6.9.10. Cociente de Hausner (Fluidez)

Está relacionado con la fricción interna de las partículas que conforman a los microcápsulas y se calcula a través de la relación del cociente entre la densidad empacada y la densidad aireada del polvo al verterlo (Barbosa-Cánovas et al., 2005; Ganesan et al., 2008, Gallo et al., 2011).

$$(P_e) / (P_a) * 100 \quad \text{Cociente de Hausner} \quad (4)$$

6.9.11. Ángulo de Reposo

El ángulo de reposo es una característica relacionada con la fricción entre las partículas y su resistencia al movimiento y a medida que su valor disminuye su fluidez se incrementa y viceversa (Ileleji y Zhou, 2008). El ángulo formado por las microcápsulas con respecto a una superficie horizontal se determinó colocando en un embudo 5 gramos de cada una de ellas a una altura de 10 cm sobre una superficie plana, se les dejó caer libremente y su flujo fue calculado con la ecuación de Moreira et al. (2009):

$$\theta = \tan^{-1} A/r \quad (5)$$

Donde r es el radio y A es la altura del cúmulo formado por las microcápsulas.

6.10. Bioensayo con *Litopenaeus vannamei*

Se determinó el aporte de las microcápsulas a base de extracto de corteza en la producción de enzimas antioxidantes del sistema inmune del camarón empleando para ello 10 individuos por tina con capacidad de 80 L de agua marina 34-35% filtrada y con aireación constante, aportándoles una dieta alimenticia consistente de una mezcla de alimento más las microcápsulas de extracto de corteza en diferentes proporciones, de acuerdo con el diseño de la Tabla 1.

Tabla 1. Descripción de los tratamientos en el bioensayo.	
Tratamientos	Características
I)	Alimento solo
II)	Alimento + Microcápsulas (0.5 g/kg de alimento)
III)	Alimento + Microcápsulas (1.0 g/kg de alimento ⁻¹)
IV)	Alimento + Microcápsulas (2.5 g/kg de alimento ⁻¹)

La alimentación se realizó 2 veces al día, a las 9:00 y 17:00 horas con alimento comercial (Purina 35% de proteína) considerando un porcentaje de alimentación del 7% del peso medio corporal de los camarones.

6.10.1. Obtención de muestras

Para el análisis de la actividad enzimática de los camarones se les extrajo hemolinfa de la región ventral con jeringas (27G x 13 mm) cargadas con solución isotónica para camarón y ácido etilendiaminotetraacético como anticoagulante (SIC-EDTANa₂) a 4 °C en una proporción de 450 mM NaCl, 10 Mm KCl, 10 mM Hepes, y 10 mM EDTA, Na₂ con un pH de 7.3 (Vargas-Albores et al., 1993). Posteriormente se llevó cabo la separación y el conteo de hemocitos. Luego se separaron los hemocitos del plasma centrifugando a 3000 x g por 3 min a 4 °C, así como el plasma de paquete celular centrifugando a 60000 x g por 120 min a 4 °C y se colectó el sobrenadante (Vargas-Albores et al., 1993). Luego se lavaron las células con 1 mL de SIC y se centrifugaron a 3000 x g por 3 min a 4 °C y se resuspendió el paquete celular en 600 µL de cacodilato de sodio 10 mM (pH 7), luego se guardó a -70 °C, para después centrifugar a 15000 g durante 5 min a 4 °C para obtener el contenido celular (SLH: Sobrenadante Lisado de Hemocitos).

6.10.2. Análisis de la Actividad Fenoloxidasa (Po) en Plasma y SLH

En plasma (PL): se incubaron alícuotas de 50 µL más 50 µL de buffer de cacodilato (10 mM, pH7) a las que se adicionaron 50 µL de L-DOPA (3 mg mL⁻¹ en agua destilada) a 37 °C por 10 minutos, más 800 µL de buffer de cacodilato.

En el sobrenadante de lisado de hemocitos (SLH): se incubaron alícuotas de 50 µL con tripsina (0.1 mg mL⁻¹) como activador 30 min 37°C y se adicionaron 50 µL de L-DOPA (L-Hidroxifenilalanina) más 800 µL de buffer de cacodilato y se incubaron por 10 min a 37 °C.

Las muestras se analizaron en el espectrofotómetro registrando la formación de dopacromo producido de la L-DOPA. La densidad óptica se midió a 492 nm. La L-DOPA más el buffer de cacodilato fueron utilizados como control negativo. La actividad se expresó como las variaciones en la absorbancia después de 10 minutos (Hernández-López et al., 1996).

6.10.3. Ensayo de la actividad Anión superóxido

La actividad de anión superóxido se cuantificó mediante la metodología de Song y Hsieh (1994). Se tomaron 100 µL de hemolinfa de cada grupo y se centrifugó a 800 g por 5 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y los hemocitos se lavaron tres veces con búfer SIC-EDTA y se tiñeron con 100 µL de una solución NBT (0,3%) durante 30 min a 37°C. La reacción de tinción se finalizó mediante la eliminación de la solución NBT por centrifugación y la adición de 100 µL de metanol absoluto. Después de tres lavados con metanol al 70%, los hemocitos se secaron al aire durante 30 min y luego se añadieron 120 µL de KOH más 140 µL de DMSO para disolver el formazán citoplasmático. La densidad óptica del formazán disuelto se leyó a 630 nm en un espectrofotómetro para comparar los efectos de los diferentes tratamientos en la generación del anión.

6.10.4. Análisis de proteína

La concentración de proteína se determinó de acuerdo al método descrito por Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino para construir una curva estándar. Como muestra se utilizó el sobrenadante del lisado de hemocitos y el plasma.

6.10.5. Tasa de Crecimiento Específico

La tasa de crecimiento específico (TCE) a los treinta días de duración del bioensayo se calculó con la fórmula de Ziaei-Nejad et al. (2006):

$$TCE = 100 (\ln W_2 - \ln W_1) t^{-1} \quad (6)$$

Donde: \ln es el logaritmo natural, W_2 es el peso final, W_1 el peso inicial y t corresponde a los días de cultivo.

6.10.6. Porcentaje de sobrevivencia

Se determinó a partir de la contabilidad final de los organismos sobrevivientes y se expresó como porcentaje de sobrevivencia.

6.11. Análisis estadístico

Los resultados de los análisis del contenido de fenoles totales (CFT), flavonoides totales (CFLT), taninos condensados (CT) y capacidad antioxidante por reducción de DPPH*, FRAP y CAT en los extractos y en las microcápsulas, así como en la tasa de crecimiento específico (TCE), concentraciones de proteína en plasma y SLH, actividad anión superóxido y actividad ProFO y FO se expresaron como media \pm desviación estándar y se analizaron por medio de una prueba ANDEVA de una vía, utilizando el software SPSS® (ver. 20.0). La discriminación de medias se realizó con una prueba post hoc SNK. Las diferencias en medias con una $p \leq 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas. Las correlaciones entre el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y taninos condensados contra la capacidad antioxidante por reducción de DPPH, potencial antioxidante por reducción de hierro y la capacidad antioxidante total por reducción de molibdato se determinaron mediante la prueba de correlación de Pearson.

7. RESULTADOS

7.1 Concentraciones de fenoles totales, flavonoides totales y taninos condensados

Las diferencias entre los tres tipos de compuestos (fenoles totales, flavonoides totales y taninos condensados) fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$, Tabla 2) con respecto a su fuente de extracción. La concentración promedio de los fenoles totales fue mayor en los frutos verdes de Sinaloa (FVS) 404.1 ± 1.6 mgEGA/g peso seco y en los frutos verdes de Campeche (FVC)

306.2 ± 0.9, mientras que el extracto de corteza de Campeche (CC) mostró la concentración promedio más baja (165.4±1.0). La mayor concentración de flavonoides totales se encontró en el extracto de hojas de Campeche (HC) 93.5 ± 0.9 mgEQ/g peso seco, mientras que el extracto de frutos maduros de Sinaloa (FMS) arrojó la concentración más baja (43.2±0.7). Con respecto a los taninos condensados, el extracto de frutos maduros de Sinaloa (FMS) mostró la mayor concentración (41.3 ± 0.5 mgECA/g peso seco), mientras que en el extracto de hojas de Sinaloa (HS) se observó la concentración más baja (19.1±0.7 mg/g peso seco).

Tabla 2. Concentración de fenoles totales (CFT), flavonoides totales (CFLT), y taninos condensados (CT) en los extractos metanólicos de frutos verdes (FV), frutos maduros (FM), corteza (C) y hojas (H) de las poblaciones de *M. tinctoria* de Sinaloa (S) y Campeche (C). Valores promedio±DE. Diferentes superíndices en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Fuente	CFT (mgEGA/g)	CFLT (mgEQ/g)	CT (mgECA/g)
FVS	404.16 ± 1.54 ^a	53.09 ± 1.45 ^f	27.28 ± 0.31 ^c
FVC	306.19 ± 0.99 ^b	54.78 ± 0.45 ^e	26.60 ± 0.58 ^c
HC	265.26 ± 1.47 ^c	93.54 ± 0.97 ^a	28.44 ± 1.66 ^b
CS	215.72 ± 1.34 ^d	90.18 ± 0.68 ^b	24.38 ± 0.48 ^d
HS	195.52 ± 1.60 ^e	86.01 ± 1.00 ^c	19.11 ± 0.72 ^f
FMS	168.47 ± 1.13 ^f	43.28 ± 0.76 ^g	41.33 ± 0.45 ^a
CC	165.14 ± 1.04 ^g	72.63 ± 0.98 ^d	22.16 ± 0.84 ^e

7.1.1. Composición fenólica

A partir del análisis mediante HPLC-DAD se encontraron al menos 33 compuestos fenólicos. Los espectros UV de cada uno de ellos se presentan en las Figuras 1-3. De acuerdo a los datos espectrales nueve fueron ácidos fenólicos, nueve flavonoles (entre ellos dos metilquercetin-3-glicósidos, dos canferol-3-O-glicósidos y cuatro quercetin-3-O-glicósidos); cuatro fueron dihidroflavonoides, y cuatro fueron flavonas (un glicósido de apigenina, dos luteolin glicósidos, y un crisoeriol glicósido) además de otros siete compuestos fenólicos que no pudieron ser identificados. Los cromatogramas de todas las muestras se observan en la Figura 4.

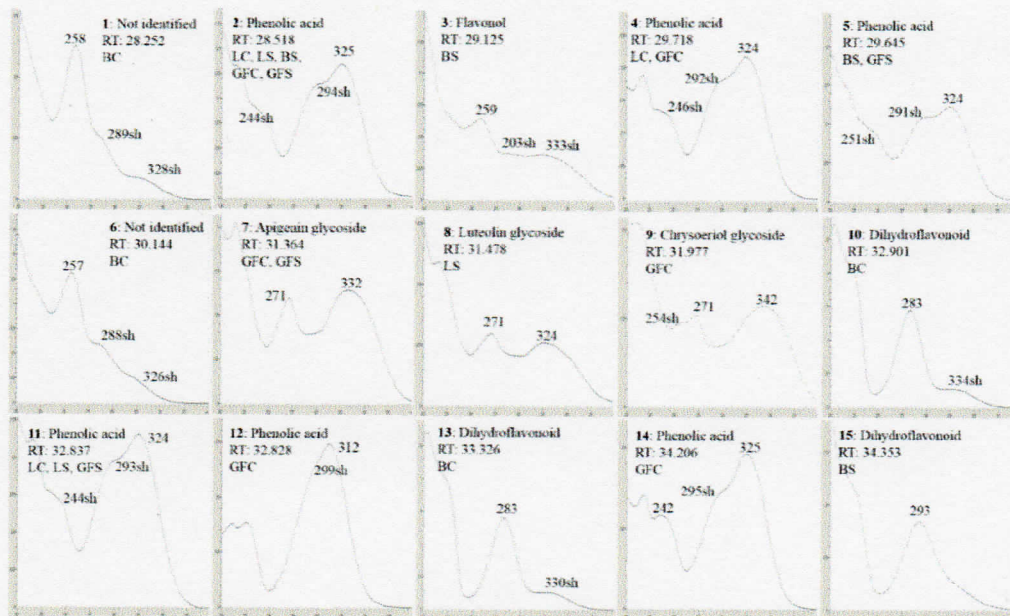


Figura 1. Espectros UV, λ_{max} y tiempos de retención (RT (min)) de los compuestos 1-15 encontrados en los diferentes tejidos de *Maclura tinctoria* de Sinaloa y Campeche. BC: Corteza de Campeche, BS: Corteza de Sinaloa, LC Hojas de Campeche, LS: Hojas de Sinaloa, GFC: Frutos verdes de Campeche, GFS: Frutos verdes de Sinaloa.

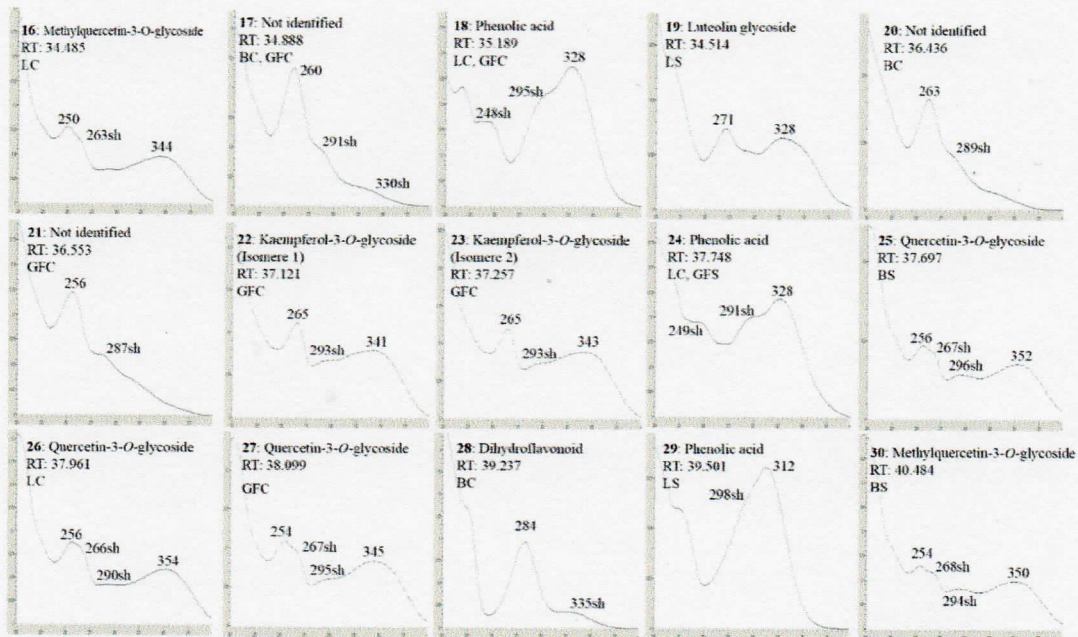


Figura 2. Espectros UV, λ_{max} y tiempos de retención (RT (min)) de los compuestos 16-30 encontrados en diferentes tejidos de *Maclura tinctoria* de Sinaloa y Campeche. BC: Corteza de Campeche, BS: Corteza de Sinaloa, LC Hojas de Campeche, LS: Hojas de Sinaloa, GFC: Frutos verdes de Campeche, GFS: Frutos verdes de Sinaloa.

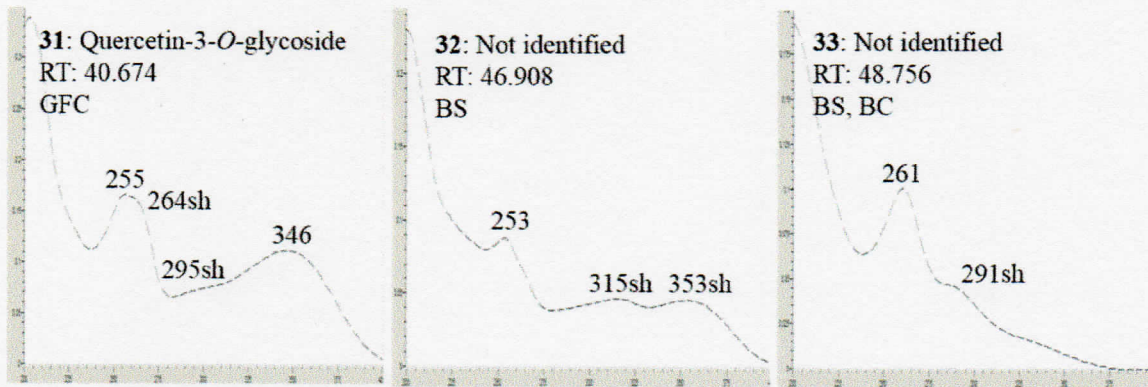


Figura 3. Espectros UV, λ_{max} y tiempos de retención (RT (min)) de los compuestos 31-33 encontrados en diferentes tejidos de *Machura tinctoria* de Sinaloa y Campeche. BC: Corteza de Campeche, BS: Corteza de Sinaloa, LC Hojas de Campeche, LS: Hojas de Sinaloa, GFC: Frutos verdes de Campeche, GFS: Frutos verdes de Sinaloa.

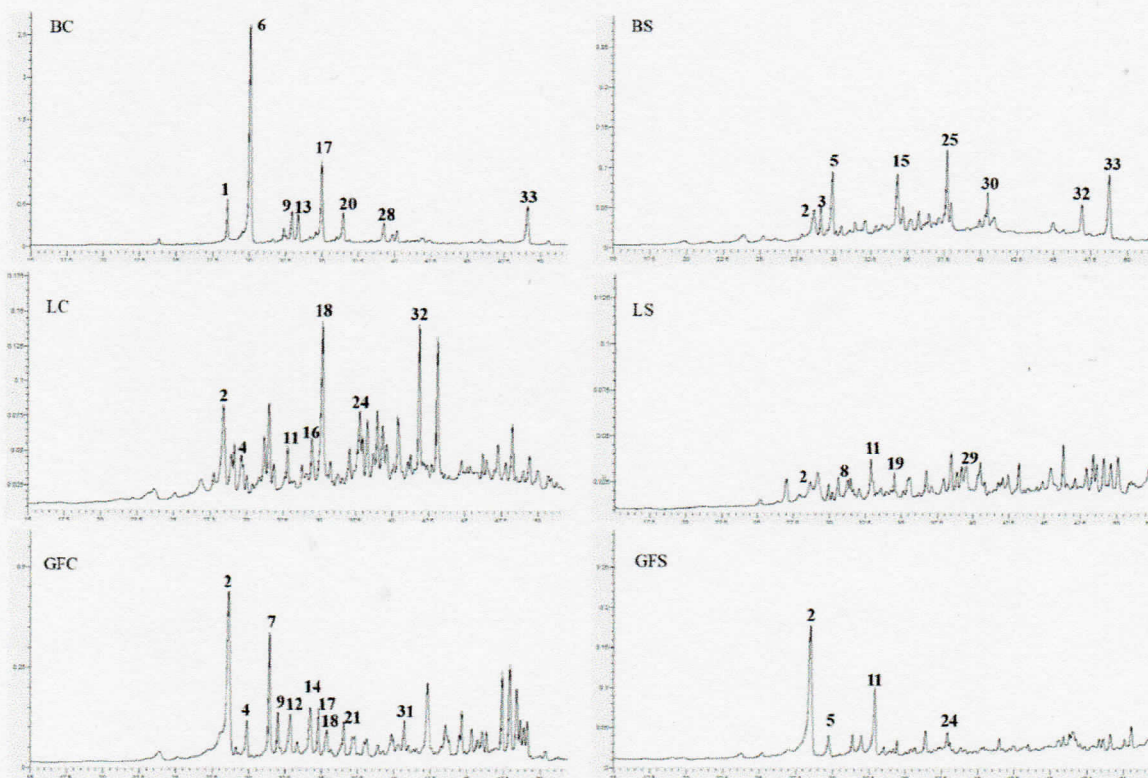


Figura 4. Cromatogramas obtenidos a 260 nm mediante análisis HPLC-DAD de diferentes tejidos de *Machura tinctoria* de Sinaloa y Campeche. El número de compuestos corresponde a aquellos de las Figuras 1-3. BC: Corteza de Campeche, BS: Corteza de Sinaloa, LC Hojas de Campeche, LS: Hojas de Sinaloa, GFC: Frutos verdes de Campeche, GFS: Frutos verdes de Sinaloa.

7.1.2.. Pruebas de capacidad antioxidante

La mayor capacidad antioxidante (IC_{50}) por el método de reducción del DPPH* correspondió al extracto de corteza de Sinaloa (CS) ($IC_{50} = 11.06 \pm 0.15$ mgEQ/mL), y la menor se observó en el extracto de frutos verdes de Sinaloa (FVS) ($IC_{50} = 67.03 \pm 0.66$) (Tabla 2). La capacidad antioxidante por reducción de DPPH* mostró el siguiente orden creciente: CS<CC<HC<FMS<FVC<HS<FVS. El extracto de hojas de Campeche (HC) tuvo la mayor capacidad antioxidante (EC_{50}) por el método del Potencial Reductor de Fierro ($EC_{50} = 4.64 \pm 0.80$ mgEAA/mL) mientras que la menor capacidad se observó en el extracto de frutos verdes de Sinaloa ($EC_{50} = 70.40 \pm 2.50$) (Tabla 3). El orden creciente de la capacidad antioxidante por la evaluación del potencial reductor de fierro fue: HC<FMS<CC<FVC<CS<HS<FVS. La mayor capacidad antioxidante por reducción de molibdato (CAT) correspondió al extracto de hojas de Campeche (HC) (24.13 ± 0.43 mgEGA/mL), y la menor capacidad al extracto de corteza de Campeche (CC) (7.04 ± 0.45 mgEGA/mL) (Tabla 3). El orden creciente de la capacidad antioxidante por el método CAT fue: HC<FMS<FVS<FVC<HS<CS<CC. Las diferencias de capacidad antioxidante evaluada por los tres métodos de análisis (DPPH*, FRAP, CAT) entre los diferentes tipos de tejidos y poblaciones de *M. tinctoria* fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

Tabla 3. Valores promedio \pm DE de capacidad antioxidante por reducción de DPPH*, reducción de Fe⁺ (FRAP) y reducción de molibdato (CAT) de los extractos de frutos verdes (FV), frutos maduros (FM), corteza (C) y hojas (H) de *M. tinctoria* de Campeche (C) y Sinaloa (S). Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Extracto	DPPH* IC_{50} (mgEQ/mL)	FRAP EC_{50} (mgEAA/mL)	CAT (mgEAG/mL)
CS	11.06 \pm 0.15 ^g	39.0 \pm 3.44 ^e	10.96 \pm 0.24 ^d
CC	22.73 \pm 0.31 ^f	14.53 \pm 2.62 ^e	7.04 \pm 0.45 ^f
HC	23.45 \pm 0.16 ^e	4.64 \pm 0.80 ^g	24.13 \pm 0.43 ^a
FMS	26.44 \pm 0.89 ^d	11.06 \pm 2.37 ^f	21.81 \pm 1.22 ^b
FVC	41.53 \pm 0.32 ^c	23.31 \pm 1.09 ^d	10.24 \pm 0.27 ^e
HS	46.46 \pm 0.90 ^b	68.07 \pm 3.33 ^b	11.04 \pm 0.28 ^d
FVS	67.03 \pm 0.66 ^a	70.40 \pm 2.50 ^a	19.05 \pm 0.71 ^c

La concentración de taninos condensados (CT) y la capacidad antioxidante total (CAT), mostraron una correlación positiva significativa ($r=0.68$), así como entre la concentración de fenoles totales y la capacidad antioxidante por reducción del DPPH* ($r=0.72$), mientras que el resto de las pruebas no revelaron correlación (Tabla 4).

Tabla 4. Correlación de Pearson entre las concentraciones de Fenoles Totales (CFT), Flavonoides Totales (CFLT), Taninos Condensados (TC) y la capacidad antioxidante por CAT, DPPH* y FRAP. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ns=no significativa.

	CFT	CFLT	CT
CAT	0.28*	-0.15 ns	0.68**
DPPH*	0.72**	-0.44**	-0.12 ns
FRAP	0.43**	0.02 ns	-0.46**

7.2. Microcápsulas

7.2.1. Concentración de fenoles totales

Las diferencias entre las concentraciones de fenoles totales (CFT), flavonoides totales (CFLT) y taninos condensados (CT) en el extracto de corteza y las tres microcápsulas fueron estadísticamente significativas (ANOVA $p \leq 0.05$, Tabla 5) con respecto a su fuente de extracción. Los valores promedio de las concentraciones fueron mayores en EFO50 y EFO25, y menores en ES. Inclusive ES muestra una ligera disminución en CFT y CFLT con respecto al extracto original, sin embargo, mostró un ligero incremento en la concentración de CT con respecto a dicho extracto.

Tabla 5. Valores Promedio \pm DE de las concentraciones de CFT, CFLT y CT. BE).- Extracto de corteza; microcápsulas SE).- Extracto solo; 2).- EFO25 Extracto+Aceite de pescado 25%; 3).- EFO50 Extracto+Aceite de pescado 50%. Los superíndices muestran diferencias significativas.

	BE	ES	EFO25	EFO50
CFT (mgEAG/g)	215.72 \pm 1.34 ^a	198.05 \pm 5.59 ^b	198.94 \pm 4.55 ^d	253.35 \pm 3.75 ^e
CFLT (mgEQ/g)	90.18 \pm 0.68 ^a	78.57 \pm 1.80 ^b	81.42 \pm 2.43 ^d	98.63 \pm 2.98 ^e
CT (mgECA/g)	24.37 \pm 0.48 ^a	29.51 \pm 2.6 ^b	62.95 \pm 5.37 ^d	99.49 \pm 3.11 ^e

7.2.2. Capacidad antioxidante

Las diferencias en los valores medios de la capacidad antioxidante entre los dos métodos de análisis (FRAP, CAT) con respecto a su fuente de extracción fueron estadísticamente significativas (ANOVA $p \leq 0.05$). Los valores de capacidad antioxidante total (TAC) estuvieron entre 28.32 ± 0.33 a 47.55 ± 1.04 mgEAA/mL (Fig. 5a). La secuencia de menor a mayor capacidad antioxidante por CAT fue: ES < EFO25 < EFO50. Mientras que la capacidad antioxidante por potencial reductor de hierro (FRAP) mostró valores de EC_{50} entre 7.1 ± 0.1 mgEAA/mL a 10.9 ± 0.44 (Fig. 5b). La secuencia de menor a mayor capacidad antioxidante fue la siguiente: ES < EFO25 < EFO50.

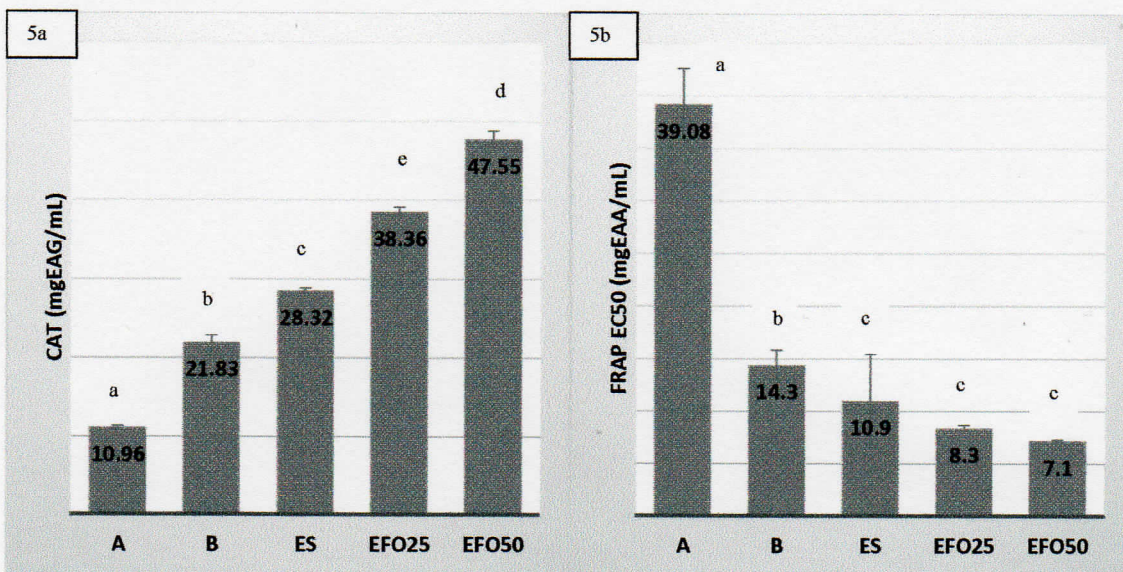


Figura 5. Valores Promedio \pm DE de capacidad antioxidante mediante CAT (a) y FRAP (b) en A.- Extracto de corteza; B).- Aceite de pescado; Microcápsulas 1).- ES Extracto Solo; 2).- EFO25 Extracto+Aceite de pescado 25%; 3).- EFO50 Extracto de corteza+Aceite de pescado 50%. Los superíndices muestran diferencias significativas $p \leq 0.05$.

7.2.3. Morfología y tamaño de las microcápsulas

En las micrografías SEM (Figs. 6a, 6b y 6c) se observa que las tres microcápsulas tienen forma esférica con la superficie suave en algunas y rugosas en otras, así mismo se muestra una pequeña cantidad de fragmentos y puntos de aglomeración, específicamente en EFO25 y

EFO50. El tamaño promedio de las microcápsulas estuvo entre 21.77 ± 0.89 para ES, 4.81 ± 0.20 en EFO25 y 4.21 ± 0.49 μm en EFO50.

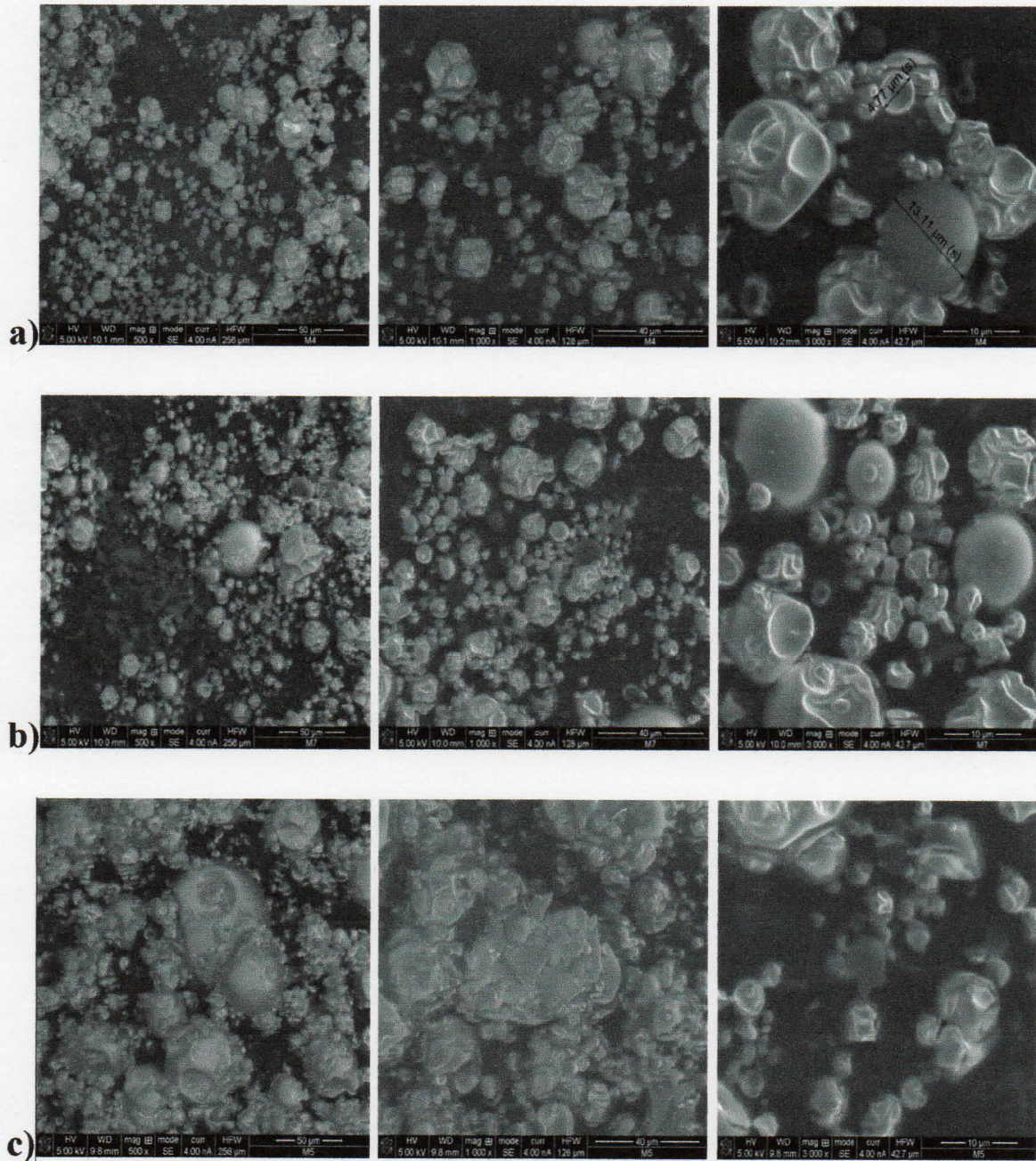


Figura 6. Micrografías SEM mostrando la estructura externa de las microcápsulas a 500x, 1000x y 3000x. a).- ES; b).- EFO25 y c).- EFO50.

7.2.4. Contenido de humedad y actividad de agua

El contenido de humedad y la actividad de agua son parámetros importantes en las microcápsulas debido a que determinan la estabilidad de los compuestos alimenticios bioactivos por lo que es importante tener un buen control de estos parámetros durante el procesamiento y almacenamiento de los encapsulados. En la tabla 4, el contenido de humedad en las muestras varió de 4.13% a 4.72%, en base seca. No se observaron diferencias significativas en la actividad de agua ($p \geq 0.05$) y los valores promedio estuvieron entre 0.15 and 0.19.

7.2.5. Humectación, Disolución e Higroscopicidad

La absorción de agua es un factor crítico para mantener estables las microcápsulas debido a que cuando se humectan éstas cambian su estructura física y su función (Aguilera et al., 1995; Bhandari y Howes, 1999). Uno de los principales aspectos de los productos en polvo es la dificultad para hidratarlos y para ser funcionales deben de ser completa y rápidamente humectado, hundirse en el líquido en lugar de flotar en su superficie, además de dispersarse o disolverse en un corto periodo de tiempo sin que se formen grumos. Los tiempos de humectación observados en el presente estudio oscilaron entre 3379.8 s y 2340 s mismos que son considerados como bajos, así como los tiempos de disolución, los cuales estuvieron entre 6639.6 s y 3960 s (Tabla 6). En ambos casos los valores más bajos se presentaron en ES, los más altos ocurrieron en EFO25 y los intermedios en EFO50.

Tabla 6. Propiedades relacionadas con el agua en las tres microcápsulas. Estadísticos descriptivos Promedio±DE. Los superíndices indican grupos homogéneos a partir de un análisis de varianza.

Parámetro/Muestra	ES	EFO25	EFO50
Humedad (%)	4.64±0.25 ^b	4.72±0.22 ^b	4.13±0.16 ^a
Actividad de agua (_a w)	0.15±0.003 ^a	0.18±0.001 ^c	0.19±0.008 ^b
Humectación (s)	2340±103.8 ^a	3379.8±150 ^c	2980.2±69 ^b
Disolución (s)	3960±60 ^a	6639.6±91.2 ^c	4320±60 ^b
Higroscopicidad (%)	14.19±1.50 ^a	15.31±1.06 ^b	14.35±1.22 ^a

7.2.6. Propiedades de flujo

Las propiedades de las tres microcápsulas se muestran en la Tabla 7. Los valores de Índice de Carr variaron de 38.56 ± 2.21 a 50.43 ± 1.28 lo cual caracteriza a las tres microcápsulas como de pobre fluidez, mientras que los valores de Cociente de Hausner estuvieron entre 1.61 ± 0.05 a 2.02 ± 0.05 .

Tabla 7. Estadísticos descriptivos de las propiedades de flujo de las microcapsulas Valores promedio±DE. Los superíndices indican grupos homogéneos a partir de un análisis de varianza.

Muestras	Densidad (g/cm ³)		Índice de Carr (%) Compresibilidad	Cociente de Hausner Fluidez
	Aparente	Empacada		
ES	2.90±0.04 ^a	4.72±0.09 ^a	38.56±2.21 ^a	1.62±0.05 ^a
EFO25	2.96±0.03 ^{bc}	5.65±0.07 ^c	47.58±0.42 ^b	1.91±0.02 ^c
EFO50	3.00±0.03 ^{ab}	6.05±0.09 ^b	50.43±1.28 ^b	2.02±0.05 ^b

7.2.7. Ángulo de reposo

El ángulo de reposo es una característica relacionada con la fricción entre partículas y la resistencia al movimiento (Ileleji y Zhou, 2008) y a medida que su valor disminuye la fluidez se incrementa y viceversa (Carr, 1965). Los valores de ángulo de reposo (arctang) observados

en el presente estudio oscilan entre $23.28^{\circ}\pm 1.31$ para ES, $19.29^{\circ}\pm 0.82$ en EFO25 y $14.83^{\circ}\pm 1.64$ en EFO50.

7.3. Bioensayo con *Litopenaeus vannamei*

7.3.1. Supervivencia, Tasa de Crecimiento Específico (TCE), Proteína en Plasma y en SLH

La supervivencia en el ensayo fue del 100% para los tratamientos III y IV, mientras que para los tratamientos I y II fue del 96.6%. En cuanto a la Tasa de Crecimiento Específico ésta varió de 3.71 ± 0.39 para el tratamiento IV hasta 2.80 ± 0.28 en el tratamiento II (Figura 6).

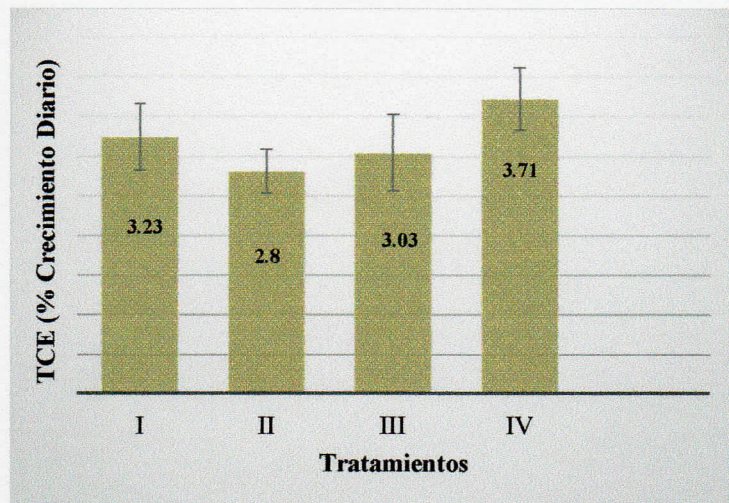


Figura 7. Tasa de crecimiento específico (TCE Diario).

7.3.2. Proteína

Las concentraciones de proteína en SHL oscilaron de $1.34 \mu\text{g/mL}$ en el tratamiento II a $0.598 \mu\text{g/mL}$ en el tratamiento III. Mientras que las concentraciones de proteína en plasma, donde no se observaron diferencias significativas, variaron de $155.8 \mu\text{g/mL}$ para el tratamiento IV a $129.5 \mu\text{g/mL}$ en el tratamiento III (Figuras 7a y 7b). La mayor concentración de proteínas totales se observó en el tratamiento IV ($156.429 \mu\text{g/mL}$) y la menor en el tratamiento III ($130.098 \mu\text{g/mL}$).

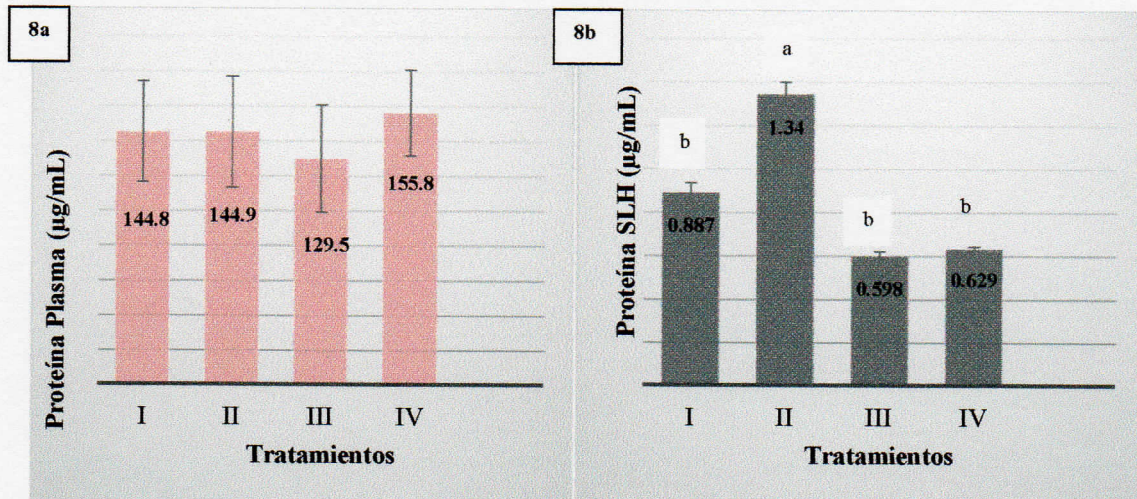


Figura 8. Concentraciones de proteína en plasma y Sobrenadante Lisado de Hemocitos (SLH) ($\mu\text{g/mL}$). Los superíndices indican diferencias significativas.

7.3.3. *Actividad Anión Superóxido, Profenoloxidasa (ProFO) y Fenoloxidasa (FO)*

Los resultados de la actividad del anión superóxido mostraron diferencias significativas, siendo mayor en el tratamiento II, seguido por el tratamiento III. La actividad ProFO en LSH fue significativamente mayor en el tratamiento II en comparación con el resto de los tratamientos. En cuanto a la actividad FO en plasma, donde no se observaron diferencias estadísticas, ésta fue mayor en el tratamiento I, seguido por el tratamiento III. La mayor actividad FO Total se observó en el tratamiento II, seguido por el tratamiento I (Figuras 8a, 8b, 8c, 8d).

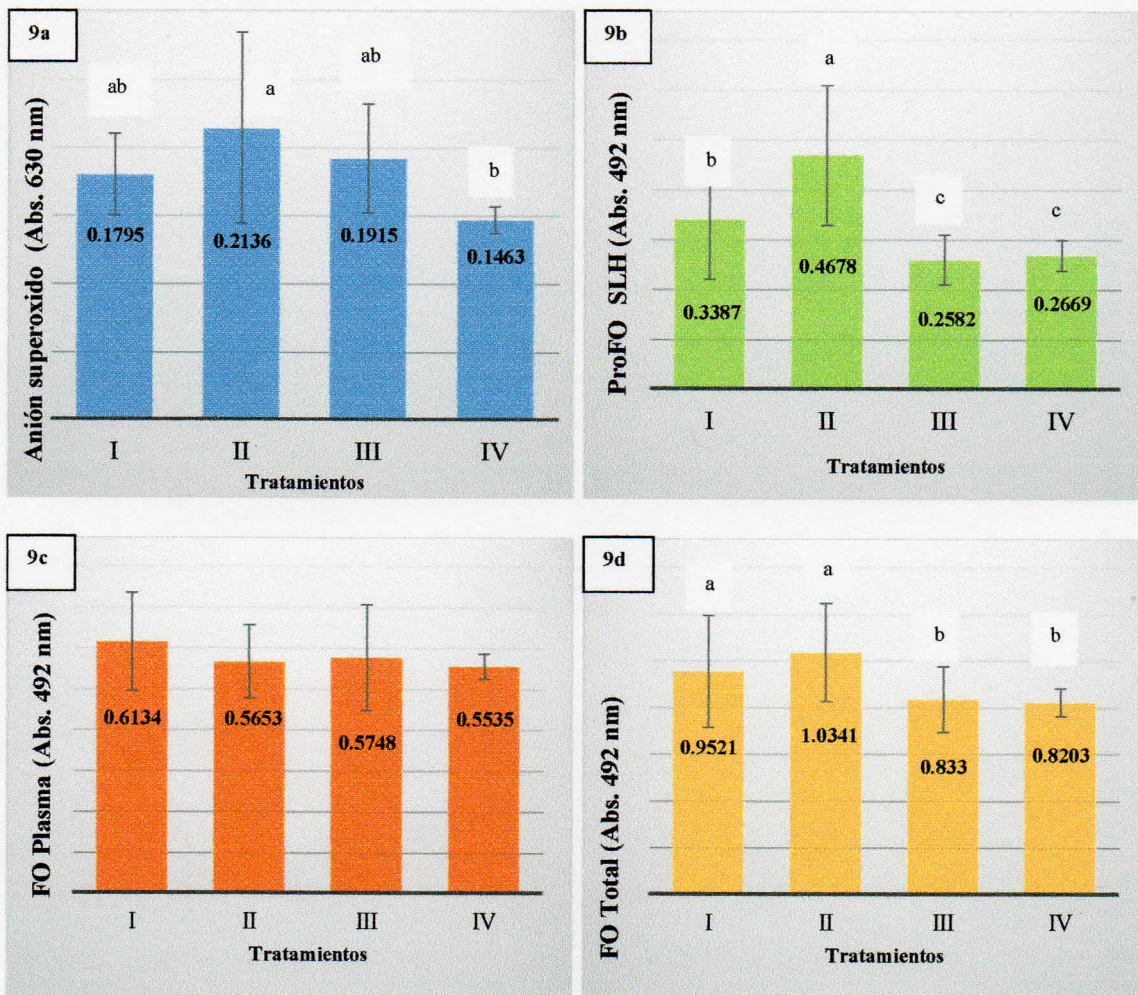


Figura 9. Parámetros del bioensayo con *Litopenaeus vannamei*: Anión superóxido (a), ProFO LSH (b), FO Plasma (c) y FO Total (e). Los superíndices muestran diferencias significativas.

7.3.4. Parámetros Físicoquímicos: Salinidad, pH, Temperatura y Oxígeno Disuelto

Los parámetros físicoquímicos del agua fueron mantenidos dentro de los niveles óptimos de acuerdo con Brock y Main (1994) durante los 30 días de duración del bioensayo (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos del bioensayo con *Litopenaeus vannamei*: Salinidad, pH, Temperatura y Oxígeno disuelto.

Tratamientos	Parámetros			
	Salinidad (‰)	pH	Temperatura (°C)	O. D. (mg/L)
I	34.16±0.93	8.18±0.3	29.29±0.77	4.75±0.075
II	34.16±0.83	8.26±0.21	29.18±0.40	4.96±0.55
III	34.0±0.73	8.16±0.28	29.13±0.53	5.04±0.33
IV	34.16±0.57	8.17±0.17	29.94±0.35	5.10±0.72
Intervalo óptimo (Brock y Main, 1994)	15-35	8.1-9.0	23-30°	4.0-10.0

7.3.5. Parámetros de la calidad del agua: Amonio, Nitritos y Nitratos.

En la calidad del agua (Tabla 9) los valores de las concentraciones de Amonio, Nitritos y Nitratos se encontraron en los niveles óptimos para el cultivo de *L. vannamei* de acuerdo a lo sugerido por Boyd y Tucker (1998).

Tabla 9. Parámetros de la calidad del agua del bioensayo con *Litopenaeus vannamei*: Amonio, Nitritos y Nitratos.

Tratamientos	Parámetros		
	Amonio (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Nitratos (mg/L)
I	0.71±0.011	0.02±0.004	0.60±0.016
II	0.77±0.088	0.04±0.005	0.71±0.017
III	0.81±0.122	0.03±0.007	0.66±0.042
IV	0.80±0.112	0.03±0.006	0.69±0.053
Intervalo óptimo (Boyd y Tucker, 1998)	0.1-1.0	<0.5	0.4-0.8

8. DISCUSIÓN GENERAL

8.1 Concentración de fenoles totales, flavonoides totales y taninos condensados

Los compuestos fenólicos son a menudo producidos y acumulados en los tejidos subepidérmicos de las plantas expuestas al estrés y al ataque de patógenos. Su concentración en los tejidos depende de la estación, además de su distribución geográfica y puede cambiar durante los diferentes estadios de desarrollo (Thomas y Ravindra 1997; Ozyigit et al. 2007). La concentración de fenoles totales en el extracto de corteza de *M. tinctoria* de Sinaloa fue 6 veces mayor que la reportada por Lamournier et al. (2012) en extracto agua-metanol de corteza de la misma especie en Brasil; mientras que en el extracto de corteza de *M. tinctoria* de Campeche la diferencia fue de 4.7 veces, lo que revela la influencia de diferentes condiciones ambientales en la acumulación de fenoles totales dentro de una misma especies. La influencia del contenido de taninos sobre el contenido de fenoles totales es muy relevante, ya que su concentración en las cortezas de las poblaciones de Sinaloa y Campeche fueron mayores en más de 8 veces que las reportadas en la corteza para la misma especie en Brasil (Lamournier et al., 2012). La concentración de fenoles totales en *M. tinctoria* es mayor que la reportada para algunas especies de plantas cultivadas, tales como *Salvia tomentosa* y *Citrus sinensis* (Zulkifli et al., 2012; Dincer et al., 2013) y otras silvestres como *Acacia farnesiana* y *Solanum nigrum* (Ramli et al., 2011; Alam et al. 2012) y aún más alta que algunas especies de mangle como *Kandelia candel* y *Rhizophora mangle* (Zhang et al., 2010), las cuales son notables por su alta concentración de polifenoles.

La alta concentración de fenoles totales en los frutos verdes de *M. tinctoria* concuerda con los resultados reportados por Jakopi et al. (2009) en *Juglans regia*, y por Labbé et al. (2010) en *Punica granatum*. De acuerdo con Kim et al. (2002), esto se debe a la alta concentración de

taninos en los estadios iniciales de desarrollo como una estrategia empleada por las plantas para hacer menos atractivos sus frutos a los depredadores (Jordano 2000). Estudios previos han mostrado que la magnitud de irradiación solar influye en la concentración de flavonoides y taninos condensados en las plantas (Close y McArthur, 2002; Agati y Tattini, 2010; Babu et al., 2003; Detrés et al., 2001). Los extractos de *M. tinctoria* provenientes de Sinaloa muestran altas concentraciones de fenoles totales, lo cual podría estar relacionado con una mayor radiación UV-B en la región con respecto al estado de Campeche (Solartronic, 2003). Las mayores concentraciones de flavonoides totales se obtuvieron en los extractos de hojas y cortezas de Campeche y Sinaloa, destacando en este sentido el extracto de corteza de Sinaloa. Esta característica se debe al hecho de que las plantas concentran principalmente este tipo de compuestos en células de hojas y cortezas como una medida de protección en las que los flavonoides vacuolares constituyen un sistema antioxidante secundario que se activa bajo condiciones de estrés (Agati et al., 2012; Ingersoll et al., 2010), tales como alta radiación UV y ataque de patógenos (Hertog et al., 1993; Agati et al., 2012; Agati et al., 2013; Agati y Tattini, 2010). Por otro lado, la alta concentración de compuestos fenólicos en tejidos jóvenes es dada por la presencia de flavonoides que se acumulan en hojas y cortezas (Siddhuraju et al., 2003). Sin embargo, se requieren estudios enfocados al papel fisiológico de los flavonoides en *M. tinctoria*, dado que ésta presenta concentraciones similares a diferentes latitudes y valores de radiación solar.

8.2 Composición fenólica

En el presente trabajo los dihidroflavonoides se encontraron solo en el extracto de corteza tanto de Sinaloa como de Campeche, esto concuerda con los resultados de Cioffi et al. (2003), quienes reportaron la presencia de tres dihidroflavonoides en el extracto de corteza de la misma especie. Siete flavonoides, tres flavonas y cuatro dihidroflavonoides fueron también

encontrados en el extracto de corteza de *M. tinctoria* por El-Sohly et al. (1999). Los resultados del presente estudio sugieren que la composición fenólica en la corteza de ésta especie es más compleja y que además de dihidroflavonoides y flavonas, se acumulan algunos ácidos fenólicos y quercetin-3-*O*-glicósidos. Los ácidos fenólicos y las flavonas están acumulados principalmente en frutos verdes y hojas, encontrándose diferencias notables en la composición fenólica de las muestras de Sinaloa y Campeche. Los perfiles fenólicos se han reportado como importantes quimiomarcadores a niveles específico e intraespecífico (Veit et al., 1995; Almaraz-Abarca et al., 2013), por lo que las diferencias encontradas entre las muestras de Sinaloa y Campeche, que corresponden a la misma especie de acuerdo con bases morfológicas, sugieren que podrían representar dos quimiotipos diferentes.

La variación en la capacidad antioxidante encontrada en los diferentes tejidos de *M. tinctoria* proveniente de diferentes orígenes geográficos podría estar asociada a la variación en la composición fenólica además de las diferentes concentraciones en los fenoles y flavonoides, como se ha reportado para otras especies de plantas (Barriada-Bernal et al., 2014).

8.3 Capacidad antioxidante

Los compuestos fenólicos poseen capacidad antioxidante y es muy probable que la actividad en los diferentes extractos se deba a este tipo de compuestos (Tepe et al., 2006). Esta actividad se debe a sus propiedades redox, la cual desempeña un papel importante en la absorción y neutralización de los radicales libres descomponiendo el peróxido y transformando el oxígeno singlete a un estado triplete (Zheng y Wang, 2001). El método DPPH* es una de las pruebas más frecuentemente empleadas debido a su sencillez y por aportar información sobre la actividad de los extractos contra radicales libres estables; éste método se basa en la medición de la capacidad reductora de los antioxidantes sobre el DPPH* (Prior et al., 2005). La mayor capacidad antioxidante representada por el extracto de corteza de Sinaloa mediante la reducción

de DPPH* coincide con los resultados encontrados por Lamounier et al. (2012) en la corteza de *M. tinctoria*, así como en otras especies tropicales maderables (Siddhuraju y Becker, 2003; Wang et al., 2004). La capacidad antioxidante de *M. tinctoria* se ha relacionado directamente con las concentraciones de fenoles totales (Agoramoorthy et al., 2008) lo cual se ha reportado también para otras especies de los trópicos (Wang et al., 2004; Siddhuraju y Becker, 2003). En el presente trabajo, la actividad antioxidante determinada por el método DPPH* se correlaciona moderadamente ($r=0.848$) con la concentración de fenoles totales, pero no con la concentración de flavonoides totales y taninos condensados. Se ha reportado que la capacidad antioxidante por reducción del potencial de fierro (FRAP) y reducción de molibdato (TAC) están relacionados con altas concentraciones de flavonoides totales y taninos condensados en los extractos de hojas (Aberoumand y Deokule, 2010; Zhang and Lin, 2008) así como con el contenido de flavonoides totales y fenoles totales (Aberoumand y Deokule, 2010; Beyhan et al., 2010; Nambiar et al., 2013). La capacidad antioxidante de los extractos depende de la estructura química de los compuestos fenólicos presentes en dichos extractos, tales como el número y localización de los grupos hidroxilos en los anillos de los flavonoides y fenoles (Rice-Evans et al., 1996; Lien et al., 1999; Heim et al., 2002). Además, las altas concentraciones de flavonoides mejoran la capacidad de las plantas para quelar iones metálicos (Symonowicz y Kolanek, 2012).

8.4 Microencapsulados

En las tres microcápsulas el orden de concentración de CFT, CFLT y CT mostró una secuencia ascendente con respecto al contenido de aceite de pescado en la formulación: ES<EFO25<EFO50, lo que indica que el aceite de pescado contribuye a conservar una concentración inicial de los compuestos monitoreados. Más aún, de acuerdo con Guadarrama-Lezama et al. (2012) la ausencia de fracturas en las microcápsulas, probablemente debido a las

bajas temperaturas empleadas, así como a las propiedades de viscoelasticidad y formación de película que tiene la goma arábiga permitieron una mejor protección física y una retención del extracto de corteza y el aceite de pescado.

De acuerdo con Hogan et al. (2001) el incremento de la capacidad antioxidante en las tres microcápsulas con respecto al extracto original se puede deber a las altas eficiencias obtenidas en las concentraciones de CFT y CT, además a la estructura química de ácidos fenólicos y flavonoides presentes en el extracto como el quercetin-3-*O*-glicósido y el metilquercetin-3-*O*-glicósido, los cuales poseen tres sitios posibles de quelación: 3-hidroxicromona, 5-hidroxicromona y el grupo 3',4'-dihidroxi (Cornard y Merlin, 2002) lo que le aporta una alta capacidad antioxidante (Rice-Evans et al., 1996; Saxena et al., 2012). En el caso particular de EFO25 y EFO50 la actividad antioxidante puede verse influenciada por la presencia de pequeños azúcares característicos del aceite de pescado (Faraji y Lindsay, 2005).

Las características morfológicas en las microcápsulas EFO25 y EFO50 indican una fuerte relación con el contenido de aceite superficial. Las arrugas en la superficie de las microcápsulas han sido reportadas en algunas elaboradas con maltodextrina (Moreau y Rosenberg, 1993; Kagami et al., 2003), goma arábiga (Jiménez-Avalos et al., 2005) y aceite de pescado como elemento a encapsular (Jafari et al., 2008; Pourashouri et al., 2014) y se ha atribuido que son resultado de estrés mecánico inducido por un secado desigual en diferentes partes de las gotas durante las fases iniciales de secado (Klinkesorn et al., 2006), el movimiento de la humedad durante el periodo de saturación no superficial (Walton, 2000) y el efecto de la tensión superficial impulsado por un flujo viscoso (Sheu y Rosenberg, 1998). Las microcápsulas obtenidas en el presente estudio mostraron una superficie continua lisa y no porosa, lo que indica que no hubo degradación de ésta durante el secado lo que asegura su integridad (López-Hernández et al., 2010). También, las formas esféricas con superficie lisa sin poros ni grietas

protegen al aceite de pescado de la oxidación y de su liberación hacia la superficie de las microcápsulas (Aghbashlo et al., 2013). De acuerdo con Alamilla-Beltrán et al. (2005) cuando se encapsula a bajas temperaturas, como en el presente caso, se observa un alto grado de contracción y el tamaño promedio de las microcápsulas tiende a ser menor que el de aquellas obtenidas a altas temperaturas. El tamaño reducido en EFO25 y EFO50 es una característica importante en un alimento ya que partículas con un tamaño mayor a 100 μm crean un desagradable sabor de boca debido a que son lo suficientemente grandes para ser detectadas por el sentido del gusto (Truelstrup-Hansen et al., 2002).

Los valores de contenido de humedad obtenidos en las tres microcápsulas son característicos de las microcápsulas cuya pared está constituida de maltodextrina (Robert et al., 2003). Se observa también, que la composición de la formulación no afecta sustancialmente el contenido de humedad. Kim et al. (2009) mencionan que a bajas temperaturas de secado, se evapora una cantidad substancial de agua antes de que se forme la coraza, los componentes tardan más tiempo para migrar a la superficie de la gota y formarse la partícula. Mientras que a temperaturas altas de secado por aspersión y con la alimentación a temperatura ambiente el sellado de la partícula es muy rápido. Este sellado en la partícula actúa como barrera y evita la migración de humedad del núcleo hacia la superficie de la partícula y al ambiente dentro del secador. Los valores de contenido de humedad obtenidos en el presente estudio son similares a los de Aghbashlo et al. (2013) quienes encapsularon aceite de pescado con otros materiales de pared. De acuerdo con Bhandari (2008), el contenido de humedad de un polvo óptimo debe de ser menor al 5% con valores de actividad de agua de 0.15 a 0.20. En los ensayos llevados a cabo se encontró una actividad de agua entre 0.15 a 0.19 lo que indica una alta estabilidad y mínimas reacciones químicas en las microcápsulas (Roos, 1998; Rahman, 2010). Reineccius (2004) reportó que cuando el contenido de humedad se incrementa por encima de un 7%, la

difusión de agua a través de la matriz de las microcápsulas decrece lo que reduce el efecto de la humedad sobre las características físicas y químicas del aceite microencapsulado al evitar el acceso de oxígeno a través de la red interna de poros. Por otra parte, valores bajos de actividad de agua están asociados con un decremento en la degradación de los componentes de los polvos. En el presente estudio, los resultados indican que en las tres microcápsulas la disponibilidad de agua para conducir las reacciones de degradación químico-enzimática es baja y, consecuentemente, la degradación de sus componentes también será baja.

En cuanto a los valores de los tiempos de humectación y disolución se observa un incremento cuando se integró aceite de pescado a la formulación. Este aspecto es consistente con lo reportado por Gaiani et al. (2010) y Murrieta-Pazos et al. (2012) quienes encontraron que los polvos con alto contenido de proteínas y lípidos toman más tiempo para humectarse debido a su alta densidad relativa con respecto al agua, así como por su naturaleza hidrofóbica lo que provoca que las microcápsulas tiendan a flotar, formar agregados y en ocasiones adherirse a las paredes de los recipientes. La goma arábica posee la propiedad de crear una fuerte película protectora alrededor de las gotas de aceite (Krishnan et al., 2005), resultado de la estructura arabinogalactana-proteína altamente ramificada la cual desarrolla sus propiedades proteicas y polisacáridas, permitiendo que los polipéptidos hidrofóbicos pueden anclarse en la superficie de las gotas de aceite y la agregación de carbohidratos previene que las cadenas hidrofílicas formen una capa gruesa. De acuerdo con Nakamura et al. (2006) y Kim y Morr (1996) muy pocos sistemas polisacárido-proteína poseen mecanismos de estabilización comparables con la goma arábica. Los valores obtenidos de higroscopicidad fueron similares en las tres microcápsulas y no se observaron diferencias con respecto al contenido de aceite de pescado en la formulación. En este contexto las similitudes pueden ser explicadas por la estructura química de los materiales de pared. La goma arábica posee un alto número de ramificaciones con

grupos hidrofílicos los cuales fácilmente se enlazan a moléculas de agua, mientras que la maltodextrina DE 10, que es un almidón hidrolizable, también muestra las mismas ramificaciones con grupos hidrofílicos los cuales contribuyen a la absorción de agua.

Los valores de densidad aparente y empacada observados en las microcápsulas del presente estudio son los típicos para este tipo de formulaciones (Onwulata et al., 1996). De acuerdo a la clasificación de fluidez de los polvos (Turchiuli et al., 2005) poseen propiedades de manejo situadas entre pobres y muy pobres las cuales son similares a otras microcápsulas aceitosas obtenidas mediante secado por aspersión (Onwulata et al., 1996 Turchiuli et al., 2005, Fuchs et al., 2006). Un mayor Cociente de Hausner significa que los polvos son cohesivos y menos libres para fluir esta característica se ha observado en las microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión y/o secado en frío, a pesar de la disminución del Cociente de Hausner y el Índice de Carr (Fuchs et al., 2006).

En cuanto a los valores de ángulo de reposo observados y de acuerdo con Santomaso et al. (2003) las microcápsulas obtenidas se clasifican como de excelente flujo (10° - 30°) o libre flujo de acuerdo de acuerdo con Barbosa-Canovas et al. (2005). En este estudio y de acuerdo con Juliano et al. (2006), se observa una dependencia del ángulo de reposo con respecto al contenido de aceite de pescado en la mezcla ya que la cohesión y fricción entre las partículas que componen los grupos de microcápsulas muestran una reducción en EFO25 y EFO50, mientras que en ES cuya formulación no incluye aceite de pescado, se observa un incremento, por lo tanto se infiere que la adición de aceite de pescado en la mezcla incrementa la fluidez en los materiales de pared.

8.5. Bioensayo con *Litopenaeus vannamei*

En el bioensayo realizado con camarón blanco la tasa de supervivencia estuvo entre 100% y 96% sin mostrar diferencias significativas entre los cuatro tratamientos. Por otro lado, en la tasa

de crecimiento específico (TCE) no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos siendo la más baja en el tratamiento II y la más alta para el tratamiento IV. Durante el bioensayo se observaron los parámetros fisicoquímicos dentro de los intervalos propuestos por Brock y Main (1994) para el cultivo del camarón blanco, por lo que se puede afirmar que el bioensayo se llevó a cabo en las condiciones adecuadas. Las plantas poseen sustancias naturales generadas durante el metabolismo secundario como mecanismo de defensa; sin embargo, en ocasiones éstas sustancias pueden funcionar como factores antinutricionales, afectando la digestión y la absorción de nutrientes por los organismos (Osagie 1998; De Dios-Elizalde et al., 2009) lo que pudiera constituir un factor perjudicial en su salud y crecimiento. En el presente trabajo, el uso del extracto vegetal microencapsulado no afectó el crecimiento ni la tasa de supervivencia de *L. vannamei* lo cual coincide con otros trabajos que han empleado plantas medicinales en los bioensayos con camarón (Citarasu et al., 2006; Luna-González et al., 2012; Medina-Beltrán et al., 2012).

Las concentraciones de proteína en plasma coinciden con los resultados obtenidos en otros trabajos en los que también se emplearon extractos y polvos de origen vegetal (Downs et al., 2001, Beltrán et al., 2012, Luna et al., 2012). El incremento de proteína en la hemolinfa se relaciona con el aumento de algunas inmunoproteínas las cuales promueven un buen estado de salud en el crustáceo y están asociadas a un valor alto en la concentración de proteínas presentes en los hemocitos y la hemolinfa relacionados con el estado inmune del camarón (Laria et al., 2008).

Los resultados del análisis bioquímico indican un leve aumento del anión superóxido en el tratamiento II con respecto al control, mostrando influencia en cuanto a la participación del extracto adicionado en el alimento en forma de microcápsulas. Esto es relevante ya que su producción durante el proceso de fagocitosis tiene acción bactericida (Muñoz et al., 2000), de

ahí que se constituya como un parámetro importante para determinar el estado de salud del camarón bajo condiciones de cultivo (Luna-González et al., 2013). Los valores de absorbancia obtenidos del análisis de la producción de ProFO muestran que ésta es mayor en el tratamiento II (0.4678) con respecto al control (0.3387), tendencia encontrada por Luna et al. (2012), Peraza-Gómez et al. (2011) y Citarasu et al. (2006), quienes emplearon, de manera respectiva el carbohidrato inulina extraído del agave, una mezcla de polvo de plantas y una serie de extractos vegetales en la dieta del camarón para evaluar su aporte en la respuesta inmune del camarón. El sistema ProFO es clave en la respuesta inmune humoral del camarón ya que es uno de los mecanismos de defensa fundamentales del crustáceo (Söderhäll y Cerenius, 1992; Sung et al., 1996), al generar moléculas muy tóxicas como las quinonas, hemiquinonas y radicales libres de oxígeno destinados a eliminar patógenos agresores (Cerenius y Söderhäll, 2004) cuya función debe de ser debidamente regulada por el sistema enzimático antioxidante respaldado por suplementos antioxidantes como los adicionados en el presente trabajo.

9. CONCLUSIONES GENERALES

Las mayores concentraciones fenólicas se encontraron en los materiales provenientes de Sinaloa.

Todos los extractos mostraron un cierto nivel de capacidad antioxidante, sin embargo los extractos de Campeche mostraron los valores mayores.

Solo se observó correlación entre la capacidad antioxidante por DPPH* y la concentración de fenoles totales, así como entre CAT y la concentración de taninos condensados.

Los principales compuestos fenólicos en los extractos fueron ácidos fenólicos, seguidos por flavonas y flavonoles.

La mayor cantidad de compuestos se encontraron en los tejidos de las poblaciones de Campeche y el tejido con mayor cantidad de compuestos fue el de los frutos verdes de Campeche (GFC).

Las microcápsulas muestran una mayor capacidad antioxidante y concentración de fenoles totales, flavonoides totales y taninos condensados con respecto al extracto original. En ese sentido, constituyen un excelente vector para emplearse como dosificador de extractos vegetales.

El tamaño y composición de las microcápsulas resultaron ser muy eficaces para la conservación, dotación y enmascaramiento del extracto de corteza de *M. tinctoria*.

Los resultados del análisis reológico de las microcápsulas muestran que éstas son estructuras con alta estabilidad y que permiten mantener en condiciones óptimas y por largo tiempo su contenido.

Los tiempos de disolución observados en las microcápsulas empleadas en los bioensayos se ajustan perfectamente al tiempo promedio de digestión de los camarones, además, mimetizan el desagradable sabor de los extractos permitiendo su ingestión por los camarones.

La calidad del agua y los diferentes parámetros físico-químicos se mantuvieron dentro de niveles aceptables aportando un ambiente adecuado para el buen desarrollo del camarón durante el tiempo que duró bioensayo.

Los tratamientos que incluyeron microcápsulas en cantidades de 0.5 gr/kg alimento en la formulación de dietas para el camarón mostraron mejores resultados con respecto al testigo ya que se observó un aumento en la producción de proteína en HSL, así como la de anión superóxido y la actividad ProFO.

Como resultado del trabajo realizado se logró obtener la patente de un producto microencapsulado con potencial de uso en la industria acuícola, mismo que fue respaldado por los resultados obtenidos en el presente trabajo.

10. LITERATURA CITADA

- Aberoumand, A., Deokule, S. S. 2010. Total phenolic contents of some plant foods as a antioxidant compound. *Journal of Food Technology*, 8, 131-133.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76.
- Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., Tattini, M. 2013. Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 35-45.
- Agati, G., Tattini, M. 2010. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist*, 186, 786-793.
- Aghbashlo, M., Mobli, H., Madadlou, A., Rafiee, S. 2013. Fish oil microencapsulation as influenced by spray dryer operational variables. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 1707-1713.
- Aghbashlo, M., Mobli, H., Madadlou, A., Rafiee, S. 2013. Influence of wall material and inlet drying air temperature on the microencapsulation of fish oil by spray drying. *Food Bioprocess Technol.*, 6, 1561-1569.
- Agoramoorthy, G., Chen, F. A., Venkatesalu, V., Kuo, D. H., Shea, P. C. 2008. Evaluation of Antioxidant Polyphenols from Selected Mangrove Plants of India. *Asian Journal of Chemistry*, 20, 1311-1322.
- Aguilera, J. M., del Valle, J. M., Karel, M. 1995. Caking phenomena in amorphous food powders. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 149-155.
- Aguirre-Guzmán, G., Ascencio, F., Saulnier, D. 2005. Pathogenicity of *Vibrio penaeicida* for white shrimp *Litopenaeus vannamei*: a cysteine protease-like exotoxin as a virulence factor. *Diseases of Aquatic Organisms*, 67, 201-207.
- Alam, M. N., Roy, S., Anisuzzaman, S., Rafiquzzaman, M. 2012. Antioxidant activity of the ethanolic extracts of leaves, stems and fruits of *Solanum nigrum*. *Pharmacognosy Communications*, 2, 67-71.
- Alamilla-Beltrán, L., Chanona-Pérez, J. J., Jiménez-Aparicio, A. R., Gutiérrez-López, G. F. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering*, 67, 179-184.
- Almaraz-Abarca, N., González-Elizondo, M. S., Campos, M. G., Ávila-Sevilla, Z. E., Delgado-Alvarado, E. A., Ávila-Reyes, J. A. 2013. Variability of the foliar phenol profiles of the *Agave victoriae-reginae* complex (Agavaceae). *Botanical Sciences*, 91:3, 295-306.
- Ashrady, R. 1993. Microcapsules for food. *Journal of Microencapsulation*, 10(14), 413-435.
- Ávalos-García, A., Pérez-Urría, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3), 119-145.
- Babu, T. S., Akhtar, T. A., Lampi, M. A., Tripuranthakam, S., Dixon, D. G., Greenberg, B. M. 2003. Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *Lemna gibba*: Implication of reactive oxygen species as common signals. *Plant and Cell Physiology*, 44, 1320-1329.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., Yan, H. 2005. *Food Powders. Physical Properties, Processing, and Functionality*. 1st ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. Pp 271-304.
- Barriada-Bernal, L. G., Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E. A., Gallardo-Velázquez, T., Ávila-Reyes, J. A., Torres-Morán, M. I., González-Elizondo, M. S., Herrera-Arrieta,

- Y. 2014. Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of *Agave durangensis* (Agavaceae). *CyTA-Journal of Food*, 12, 105-114.
- Berg, C., 2001. Moreae, Artocarpeae, and *Dorstenia* (Moraceae): With Introductions to the Family and *Ficus* and With Additions and Corrections to Flora Neotropica Monograph 7 (Flora Neotropica Monograph No. 83). The New York Botanical Garden Press. New York, USA. 346 pp.
- Beristáin, C. I., Vernon-Carter, E. J. 1995. Studies on the interaction of Arabic (*Acacia senegal*) and mesquite (*Prosopis juliflora*) gum as emulsion stabilizing agent for spray-dried encapsulated orange peel oil. *Drying Technology*, 13(1/2), 455-461.
- Beyhan, Ö., Elmastaş, M., Gedikli, F. 2010. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of leaf, dry fruit and fresh fruit of feijoa (*Acca sellowiana*, Myrtaceae). *Journal of Medicinal Research*, 4, 1065-1072.
- Bhandari, B. 2008. Spray drying and food powder properties. In: *Food Drying Science and Technology Microbiology, Chemistry, Applications*. Y. H. Hui, C. C. Clairry, M. M. Farid, O. O. Fosina, A. Noomhorm and J. Welte-Chanes (Eds). U. S. A: Destech Publications Inc.
- Bhandari, B. R., Howes, T. 1999. Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *Journal of Food Engineering*, 40, 71-79.
- Boyd, C. E., Tucker, C. S. 1998. Pond aquaculture water quality management. Kluwer Academic Publishers. Boston, MA. USA. 155 pp.
- Bozzola, J. J., Russell, L. D. 1998. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. 2nd edition. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA, USA. 670 pp.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier M. E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Brock, J., Main, K. L. 1994. *A guide to the common problems and diseases of cultured Penaeus vannamei*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 242 pp.
- Cai, Y. Z., Corke, H. 2000. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Science* 65: 1248-1252.
- Campos, M. G., Markham, K. R. 2007. *Structure information from HPLC and online measured absorption spectra: Flavones, Flavonols and Phenolic Acids*. Coimbra University Press. Portugal.
- Cerenius, L., Söderhäll, K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*. 198, 116-126.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 178-182.
- Cioffi, G., Morales-Escobar, L., Braca, A., De Tommasi, N. 2003. Antioxidant chalcone glycosides and flavanones from *Maclura (Chlorophora) tinctoria*. *Journal of Natural Products*, 66 (8), 1061-1064.
- Citarasu T, Ramalingam, K., Raja Jeya Sekar, R., Babu, M., Marian, M. P. 2003. Influence of the antibacterial herbs, *Solanum trilobatum*, *Andrographis paniculata* and *Psoralea corylifolia* on the survival, growth and bacterial load of *Penaeus monodon* post larvae. *Aquaculture International*, 11, 583-595.

- Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Rout, N., Murugan, V. 2006. Influence of selected indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. *Fish and Shellfish Immunology*, 21, 372–384.
- Citarasu, T. 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18, 403–414.
- Close, D. C., McArthur, C. 2002. Rethinking the role of many plant phenolics – protection from photodamage not herbivores?, *Oikos*, 99(1), 166-172.
- CONAPESCA. 2008. Anuario estadístico de acuicultura y pesca. SAGARPA, México.
- CONAPESCA. 2012. Anuario estadístico de acuicultura y pesca. SAGARPA, México.
- Cornard, J. P., Merlin, J. C. 2002. Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92:19–27.
- De Dios-Elizalde, A., Porrilla, Y. P., Chaparro, D.C.C. 2009. Factores antinutricionales en semillas. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 7(1), 45-54.
- Desobry, S. A., Netto, F. M., Labuza, T. B. 1997. Comparison of spray-drying, drum drying and freeze-drying for (1-3, 1-4)- β -carotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science*, 62, 1158-1162.
- Detrés, Y., Armstrong, R. A., Connelly, X. M. 2001. UV-induced responses in two species of climax tropical marine macrophytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 62, 55–66.
- Dey, P. M., Harborne, J. B. 1989. *Methods in Plant Biochemistry: Plant Phenolics*. Academic Press. 608 pages.
- Díaz, J., Beltrán-Magallanes, J., Lerma-Arredondo, C. 2010. Frutos Silvestres Comestibles del Bosque Tropical Caducifolio en los Municipios Colindantes de Sinaloa, Chihuahua y Durango. Resúmenes del VII Simposio Internacional Sobre Flora Silvestre en Zonas Áridas. Universidad de Sonora. Pag. 135.
- Dincer, C., Tontul, I., Cam, I. B., Ozdemir, K. S., Topuz, A., Sahin-Nadeem, H., Tugrul, S., Gokturk, R. S. 2013. Phenolic composition and antioxidant activity of *Salvia tomentosa* Miller: effects of cultivation, harvesting year, and storage. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37, 561-567.
- Downs, C., Fauth, J. E., Woodley, C. M. 2001. Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarkers system. *Marine Biotechnology*, 3, 380-397.
- Drusch, S., Serfert, Y., Van Den Heuvel, A., Schwarz, K. 2006. Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil encapsulated in an amorphous matrix containing trehalose. *Food Research International*, 39, 807-815.
- El-Sohly, H. N., Joshi, A., Li, X. C., Ross, S. A. 1999. Flavonoids from *Maclura tinctoria*. *Phytochemistry*, 52 (1), 141-145.
- El-Sohly, H. N., Joshi, A., Nimrod A. C., Walker L. A., Clark A.M. 2001. Antifungal chalcones from *Maclura tinctoria*. *Planta Medica*, 67(1):87-9.
- Fang, Z., Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols-A review. *Trends in Food Science & Technology*, 21 (10), 510-523.
- Faraji, H., Lindsay, R. C. 2005. Antioxidant protection of bulk fish oils by dispersed sugars and polyhydric alcohols. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53 (3), 736-44.
- FIL (Fédération Internationale Laitière, Brussels, Belgium). 1985. Détermination de la dispersibilité et de la mouillabilité, No. V04-364.

- Flegel, T.W. 1996. A turning point for sustainable aquaculture: The white spot virus in Asian shrimp culture. *Aquaculture Asia*, 1, 29-34.
- Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M. N., Dumoulin, E. 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 75, 27-35.
- Gaiani, C., Morand, M., Sánchez, C., Arab-Tehrany, E., Jacquot, M., Schuck, P., Jeantet, R., Scher, J. 2010. How surface composition of high milk proteins powders is influenced by spray-drying temperature. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 377-384.
- Gallo, L., Llabot, J. M., Allemandi, D., Bucala, V., Pinã, J. 2011. Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. *Powder Technology*, 208, 205-214.
- Ganesan, V., Rosentrater, K. A., Muthukumarappan, K. 2008. Flowability and handling characteristics of bulk solids and powders—a review with implications for DDGS. *Biosystems Engineering*, 101, 425-435.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambon, O., Voilley, A., Saurel, R., 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 1107-1121.
- Goarant, C., Reynaud, Y., Ansquer, D., Decker, S., Saulnier, D., Le Roux, F. 2006. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 570-580.
- Gómez-Gil, B., Roque, A., Flores, A. L. 2001. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. En: O. F. Páez (Ed.) *Camaronicultura y medio ambiente*. PUALICMYL- El Colegio de Sinaloa. México. 328-334 pp.
- González-Ocampo, H. A. 2010. Efectos ambientales producidos por la camaronicultura en el norte de Sinaloa, México. *Ra Ximhai*, 6 (1), 9-16.
- Goula, A. M., Adamopoulos, K. G. 2005. Stability of lycopene during spray drying of tomato pulp. *LWT-Food Science Technology*, 38, 479-487.
- Groweiss, A., Cardellina, J. H., Boyd, M. R. 2000. HIV-Inhibitory prenylated xanthenes and flavones from *Maclura tinctoria*. *Journal of Natural Products*, 63 (11), 1537-1539.
- Guadarrama-Lezama, A. Y., Dorantes-Álvarez, L., Jaramillo-Flores, M. E., Pérez-Alonso, C., Niranjana, K., Gutiérrez-López, G. F., Alamilla-Beltrán, L. 2012. Preparation and characterization of non-aqueous extracts from chilli (*Capsicum annum* L.) and their microencapsulates obtained by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 112, 29-37.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Vargas-Albores, F. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113C, 61-66.
- Hogan, S. A., McNamee, N. F., O'Riordan, E. D., O'Sullivan, M. 2001. Emulsification and microencapsulation properties of sodium caseinate/carbohydrate blends. *International Dairy Journal*, 11, 137-144.
- Homblad, T., Söderhäll, K. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative roles in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*, 172:111-123.

- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Kromhout, D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342(8878), 1007-11.
- Ileleji, K. E., Zhou, B. 2008. The angle of repose of bulk corn stover particles. *Powder Technology*, 187, 110-118.
- Ingersoll, C. M., Niesenbaum, R. A., Weigle, C. E., Lehman, J. H. 2010. Total phenolics and individual phenolic acids vary with light environment in *Lindera benzoin*. *Botany*, 88, 1007-1010.
- Jafari, M. S., Assadpoor, E., Bhandari, B., He, Y., 2008. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Research International*, 41, 172-183.
- Jakopi, J., Veberi, R., Tampar, F. 2009. Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. *Acta Agriculturae Slovenica* 93(1): 11-15.
- Jaya, S., Das, H., 2004. Effect of maltodextrin, glycerol monostearate and tricalcium phosphate on vacuum dried powder properties. *Journal of Food Engineering*, 63, 125-134.
- Jiménez-Ávalos, H. A., Ramos-Ramírez, E. G., Salazar-Montoya, J. A. 2005. Viscoelastic characterization of gum arabic and maize starch mixture using the Maxwell model. *Carbohydrate Polymers*, 62, 11-18.
- Jordano, P. 2000. Fruits and frugivory. In: Fenner M (ed) *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. CABI, Wallingford, UK, pp 125-166.
- Juliano, P., Muhunthan, B., Barbosa-Cánovas, G. V. 2006. Flow and shear descriptors of preconsolidated food powders. *Journal of Food Engineering*, 72, 157-166.
- Julkunen-Tiitto, R. 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 213-217.
- Jumah, R. Y., Tashtoush, B., Shaker, R. R., Zraiy, A. F. 2000. Manufacturing Parameters and Quality Characteristics of Spray Dried Jameed. *Drying Technology*, 18, 967-984.
- Kagami, Y., Sugimura, N., Fujishima, N., Matsuda, K., Kometani, T., Matsumura, Y. 2003. Oxidative stability, structure and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. *J. Food Sci.*, 68, 2248-2255.
- Kautsky, N., Rönnback, P., Tedengren, M., Troell, M., 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture*, 191, 145-161.
- Kenyon, M. M. 1995. Modified starch, maltodextrin, and corn syrup as wall materials for food encapsulation. In S. J. Risch, & G. A. Reineccius (Eds.), *Encapsulation and controlled release of food ingredients* (pp. 42-50). ACS symposium series 590, Washington DC: American Chemical Society.
- Kim, S. K., Oh, J. R., Shim, W. J., Lee, D. H., Yim, U. H., Hong, S. H., Shin, Y. B., Lee, D. S. 2002. Geographical distribution and accumulation features of organochlorine residues in bivalves from coastal areas of South Korea. *Mar. Pollut. Bull.*, 45, 268-279.
- Kim, E. H., Chen, D. X., Pearce, D. 2009. Surface composition of industrial spray-dried milk powders. 2. Effects of spray drying conditions on the surface composition. *Journal of Food Engineering*, 94, 169-181.
- Kim, Y. D., Morr, C. V. 1996. Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: Spray-dried orange oil emulsion particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1314-1320.
- Klaypradit, W., Huang, W. 2008. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *LWT-Food Sci. Technol.*, 41, 1133-1139.

- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E. A., McClements, D. J. 2006. Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Research International*, 39, 449-457.
- Krishnan, S., Bhosale, R., Singhal, R. S. 2005. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*, 61, 95-102.
- Labbé, M., Peña, A., Sáenz, C. 2010. Antioxidant capacity and phenolic composition of juices from pomegranates stored in refrigeration. Paper presented at the International Conference on Food Innovation 2010, Valencia, Spain, 25-29 October 2010.
- Laria, R. E., Cruz, Y., Silveira, R., Martínez, M., González, N. 2008. Effects of formalin on total hemocytes count and histopathological changes in the shrimp *Litopenaeus smithii* (Pérez-Farfante & Kensley 1997). *Aquaculture Research* 39:1316-1321.
- Lamounier, K. C., Cunha, L. C., de Morais, S. A., de Aquino, F. J., Chang, R., do Nascimento, E. A., de Souza, M. G., Martins, C. H., Cunha, W. R., 2012. Chemical analysis and study of phenolics, antioxidant activity, and antibacterial effect of the wood and bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012:7.
- León-Martínez, F. M., Méndez-Lagunas, L. L., Rodríguez-Ramírez, J. 2010. Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): Effects on powder properties and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 81 (4), 864-870.
- Lien, E. J., Ren, S., Bui, H. H., Wang, R. 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 285-294.
- Lightner, D.V., Redman, R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164, 201-220.
- Lightner, D.V. 1996. A Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Soc., Baton Rouge, USA. 26 pp.
- López-Hernández, O. D. 2010. Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia*, 44 (3), 381-389.
- Luna-González, A., Moreno-Herrera, J. T., Campa-Córdova, A. I., González-Ocampo, H. A., Fierro-Coronado, J. A., Álvarez-Ruiz, P., Bueno-Ibarra, M. 2013. Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 41(5): 898-907.
- Luna-González, A., Almaraz-Salas, J. C., Fierro-Coronado, J. A., Flores-Miranda, M. C., González-Ocampo, H. A., Peraza-Gómez, V. 2012. The prebiotic inulin increases the phenoloxidase activity and reduces the prevalence of WSSV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. *Aquaculture* 362-363, 28-32.
- Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. B. 1970. The systematic identification of flavonoids. Springer. 368 pages.
- Martínez, A. 2005. Flavonoides. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 76 páginas.
- Martínez-Lazcano, J. C., Boll-Woehrlén, M. C., Hernández-Melesio, M. P. A., Rubio-Osornio, M., Sánchez-Mendoza, M. A., Ríos, C., Pérez-Severiano, F. 2010. Radicales libres y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. *Mensaje Bioquímico*, XXXIV, 43-59.

- Matson-Robles, A., Herrera-Herrera, A., Díaz-Caballero, A. 2015. In vitro antibacterial activity of *Maclura tinctoria* and *Azadirachta indica* against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 7(74), 291-298.
- Matsuno, R., Adachi, S. 1993. Lipid encapsulation technology—techniques and applications to food. *Trends in Food Science and Technology*, 4, 256-261.
- Mayor-Oxilia, R. 2010. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*, 5(2), 23-29.
- McClements, D. J. 2004. Food emulsions: Principles, practice, and techniques (2nd edn). CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 632 pages.
- Medina-Beltrán, V., Luna-González, A., Fierro-Coronado, J. A., Campa-Córdova, A. I., Peraza-Gómez, V., Flores-Miranda, M. C., Gutiérrez Rivera, J. N. 2012. *Echinacea purpurea* and *Uncaria tomentosa* reduce the prevalence of WSSV in witheleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. *Aquaculture* 358-359, 164-169.
- Mendanha, D. V., Molina-Ortiz, S. E., Favaro-Trindade, C. S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., Thomazini, M. 2009. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*, 42 (8), 1099-1104.
- Moreau, D. L., Rosenberg, M. 1993. Microstructure and fat extrability in microcapsules based on whey proteins or mixtures of whey proteins and lactose. *Food Struct.* 12, 457-468.
- Moreira, G. E., Costa, M. G., Souza, A. C., Brito, E. S., Medeiros, M. F., Azeredo, H. M. 2009. Physical properties of spray dried acerola pomace extract as affected by temperature and drying aids. *Food Science and Technology*. 42: 641-645.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Van der Knaap, W. P. W., Mialhe, E., Bachère, E. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocyte of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191: 89-107.
- Murrieta-Pazos, I., Gaiani, C., Galet, L., Scher, J. 2012. Composition gradient from surface to core in dairy powders: Agglomeration effect. *Food Hydrocolloids*, 26, 149-158.
- Nakamura, A., Yoshida, R., Maeda, H., Corredig, M. 2006. Soy soluble polysaccharide stabilization at oil–water interface. *Food Hydrocolloids*, 20, 277-283.
- Nambiar, V., Matela, H., Baptist, A. 2013. Total antioxidant capacity using ferric reducing antioxidant power and 2, 2-diphenyl-1 picryl hydrazyl methods and phenolic composition of fresh and dried drumstick (*Moringa oleifera*) leaves. *International Journal of Green Pharmacy*, 7 (1), 66-72.
- Onwulata, C. I., Konstance, R. P., Holsinger, V. H., 1996. Flow properties of encapsulated milkfat powders as affected by flow agent. *Journal of Food Science*, 61 (6), 1211-1215.
- Osagie, A. U., 1998. Antinutritional factors. *Nutritional Quality of Plant Food*, 221-244.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 474, 307-315.
- Ozyigit, I. I., Kahraman, M. V., Ercan, O. 2007. Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 6, 003-008.
- Pennington, T. D., Sarukhán, J. 2005. Árboles Tropicales de México Manual para la identificación de las principales especies. 3ra Ed. UNAM/Fondo de Cultura Económica. 523 p.
- Peraza-Gómez, V., Luna-González, A., Campa-Córdova, A. I., Fierro-Coronado, J. A., González-Ocampo, H., Sainz-Hernández, J. C. 2011. Dietary microorganism and plant

- effects on the survival and immune response of *Litopenaeus vannamei* challenged with the white spot syndrome virus. *Aquaculture Research*, 42, 559-570.
- Placido, M., Alemán, M. P. 2002. Método higrométrico rápido para determinar actividad de agua. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 3 (49), 229-235.
- Pourashouri, P., Shabanpour, B., Razavi, S. H., Jafari, S. M., Shabani, A., Aubourg, S. P. 2014. Impact of wall materials on physicochemical properties of microencapsulated fish oil by spray drying. *Food Bioprocess Technol.*, 7, 2354-2365.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochemistry*, 269, 337-341.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290-4302.
- Quintanar-Escorza, M. A., Calderón-Salinas, J. V. 2009. La capacidad antioxidante total: Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28 (3), 89-101.
- Rahman, M. S. 2010. Food stability determination by macro-micro region concept in the state diagram and by defining a critical temperature. *J. Food Eng.*, 99, 402-416.
- Ramli, S., Harada, K., Ruangrunsi, N. 2011. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity activities of *Acacia farnesiana* (L.) Willd. leaves ethanolic extract. *Pharmacognosy Journal*, 3, 50-58.
- Reineccius, G. A. 2004. The spray drying of food flavors. *Drying Technology*. 22 (6), 1289-1324.
- Rice-Evans, C., Miller, N. J., Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (7), 933-956.
- Robert, P., Carlsson, R. M., Romero, N., Masson, L. 2003. Stability of spray-dried encapsulated carotenoid pigments from *Rosa Mosqueta* (*Rosa rubiginosa*) oleoresin. *JAACS*, 80 (11), 1115-1120.
- Roos, Y. H. 1998. Phase transitions and structure of solid food matrices. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 3, 651-656.
- Santomaso, A., Lazzaro, P., Canu, P. 2003. Powder flowability and density ratios: the impact of granules packing. *Chem. Eng. Sci.*, 58, 2857-2874.
- Saxena, M., Saxena, J., Pradhan, A. 2012. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 16: 130-134.
- Shahidi, F., Han, X. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 33, 501-547.
- Sheu, T. Y., Rosenberg, M. 1998. Microstructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates. *Journal of Food Science*, 63, 491-494.
- Siddhuraju, P., Becker, K. 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2144-2155.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Lester P (ed) *Methods in Enzymology*. Academic Press, 299, 152-178.
- Sivaram, V., Babu, M. M., Citarasu, T., Immanuel, G., Murugadass, S., Marian, M. P. 2004. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with

- herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture*, 237, 9–20.
- Söderhäll, K., Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1: 2-21.
- Song, Y. L., Hsieh, Y. T. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Developmental & Comparative Immunology*, 18, 201-209.
- Solartronic, S. A. de C. V. 2003. Global, direct and diffuse irradiance on horizontal and inclined surfaces and DNI for the Mexican Republic [Irradiancia global, directa y difusa en superficies horizontales e inclinadas, así como radiación directa normal para la república Mexicana]. Cuernavaca, Morelos, México.
- Sung, H., Yang, Y., Song, Y. 1996. Enhancement of microbicid activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. *J. Crust. Biol.*, 16:278-284.
- Symonowicz, M., Kolanek, M. 2012. Flavonoids and their properties to form chelate complexes. *Biotechnology and Food Sciences*, 76, 35-41.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2006. *Plant Physiology*. 4th edition. Sinauer Associates, Inc. 700 pp. Sunderland MA, USA.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., Sokmen, A. 2006. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*, 95, 200-204.
- Thomas, P., Ravindra, M. B. 1997. Shoot tip culture of mango, influence of media, genotype, explant factors, season, and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. *Journal of Horticultural Science*, 72, 713–22.
- Toranzo, A. E., Romalde, J. L., Magariños, B., Barja, J. L. 2009. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. *Options Méditerranéennes*, 86, 155-176.
- Truelstrup-Hansen, L., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y. L., Paulson, A. T. 2002. Survival of Calcium alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19, 35-45.
- Tsimidou, M. 1998. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Italian Journal of Food Science*, 2 (10), 99-116.
- Turchiuli, C., Fuchs, M., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M. N., Dumoulin, E. 2005. Oil encapsulation by spray drying and fluidised bed agglomeration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6 (1), 29-35.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, M. A., Ochoa, J. L. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106A, 299–303.
- Veit, M., Beckert, C., Höhne, C., Bauer, K., Geiger, H. 1995. Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. *Phytochemistry*, 38, 881-891.
- Walton, D. E. 2000. The morphology of spray-dried particles a qualitative view. *Drying Technology*, 18, 1943-1986.
- Wang, S. Y., Wu, J. H., Cheng, S. S., Lo, C. P., Chang, H. N., Shyur, L. F., Chang, S. T. 2004. Antioxidant activity of extracts from *Calocedrus formosana* leaf, bark, and heartwood. *Journal of Wood Science*, 50, 422-426.
- Wang, K. H., Tseng, C., Lin, H., Chen, I., Chen, Y., Chen, T., Yang, H. 2010. RNAi knock-down of *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. *Developmental and Comparative Immunology*, 34, 49-58.

- Yetman, D., Van Devender, T. 2002. Mayo ethnobotany: Land, history, and traditional knowledge in Northwest Mexico. University of California Press, 372 pp.
- Zhang, L., Lin, Y. 2008. Tannins from *Canarium album* with potent antioxidant activity. Journal of Zhejiang University Science, B 9, 407-415.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaeib, M. H., Takamic, G. A., Lovettd, D. L., Mirvaghefia, A., Shakourie, M. 2006. The effect of Bacillus spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp Fenneropenaeus indicus. Aquaculture, 252, 516- 524.
- Zhang, L. L., Lin, Y. M., Zhou, H. C., Wei, S. D., Chen, J. H. 2010. Condensed tannins from mangrove species Kandelia candel and Rhizophora mangle and their antioxidant activity. Molecules, 15, 420-431.
- Zheng, W., Wang, S. Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 5165-5170.
- Zulkifli, K. S., Noriham, A., Aminah, A., Nurain, A., Saidatul, K., Wan, S. 2012. Bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of selected fruit peels. International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental, 49, 66-70.

11. ANEXOS

Solicitud de Patente



<p><input checked="" type="checkbox"/> Solicitud de Patente <input type="checkbox"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad</p> <p><input type="checkbox"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál: <input type="checkbox"/> Modelo Industrial <input type="checkbox"/> Dibujo Industrial</p> <p><small>Antes de tener la forma lea las consideraciones generales al reverso</small></p>	<p>Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI</p> <p>Sello</p> <p>Folio de entrada</p> <p>Fecha y hora de recepción</p>	<p style="text-align: center;">INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL Dirección Divisional de Patentes</p> <p>Solicitud Expediente: MX/E/2016/007505 Fecha: 9/JUN/2016 Hora: 12:38:31 Folio: MX/E/2016/003666 843457</p>																									
I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)																											
<p>El solicitante es el inventor <input type="checkbox"/> El solicitante es el causahabiente <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>1) Nombre (s): INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL</p> <p>2) Nacionalidad (es): MEXICANA</p> <p>3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: EDIFICIO DE LA DIRECCION GENERAL, AV. LUIS ENRIQUE ERRO S/N, UNIDAD PROFESIONAL "ADOLFO LOPEZ MATEOS", COLONIA ZACATENCO, C.P. 07738</p> <p style="text-align: center;">Población, Estado y País: DELEGACION GUSTAVO A. MADERO, CIUDAD DE MEXICO, MEXICO</p> <p style="text-align: center;">4) Teléfono (clave): 55 57290000 EXT. 51971 y 51975 5) Fax (clave): 55 51193245</p>																											
II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)																											
<p>6) Nombre (s): HECTOR ABELARDO GONZALEZ OCAMPO, NORMA ALMARAZ ABARGA, LILIANA ALAMILA BELTRÁN, JOSÉ SATURNINO DÍAZ</p> <p>7) Nacionalidad (es): MEXICANA</p> <p>8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: GENARO SOTO S/N, COL. CALLEJONES DE GUASAVITO</p> <p style="text-align: center;">Población, Estado y País: GUASAVE, SINALOA, MEXICO</p> <p>9) Teléfono (clave): 57296000 EXT. 87809 10) Fax (clave):</p>																											
III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO (S)																											
<p>11) Nombre (s): LIC. CLAUDIA ALEJANDRA BLANCO SALAZAR 12) R.G.P.: 27491</p> <p>13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: EDIFICIO DE LA DIRECCION GENERAL, AV. LUIS ENRIQUE ERRO S/N, UNIDAD PROFESIONAL "ADOLFO LOPEZ MATEOS", COLONIA ZACATENCO, C.P. 07738</p> <p style="text-align: center;">Población, Estado y País: GAM, CIUDAD DE MEXICO, MEXICO 14) Teléfono (clave): 55 57290000 EXT. 51971 y 51975 15) Fax (clave): 55 51193245</p> <p>16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones: CARLOTA MARTÍNEZ MARTÍN</p>																											
<p>17) Denominación o Título de la invención: ADITIVO BIOTECNOLÓGICO ANTIOXIDANTE PARA ALIMENTOS ACUÍCOLAS Y SU PROCESO DE OBTENCIÓN</p>																											
<p>18) Fecha de divulgación previa</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>Día</th> <th>Mes</th> <th>Año</th> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </table>		Día	Mes	Año				<p>19) Clasificación internacional uso exclusivo del IMPI</p>																			
Día	Mes	Año																									
<p>20) Divisional de la solicitud</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>Número</th> <th>Figura jurídica</th> <th>Día</th> <th>Mes</th> <th>Año</th> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </table>		Número	Figura jurídica	Día	Mes	Año						<p>21) Fecha de presentación</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>Día</th> <th>Mes</th> <th>Año</th> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </table>	Día	Mes	Año												
Número	Figura jurídica	Día	Mes	Año																							
Día	Mes	Año																									
<p>22) Prioridad Reclamada:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th rowspan="2">País</th> <th rowspan="2">Día</th> <th rowspan="2">Mes</th> <th rowspan="2">Año</th> <th rowspan="2">No. de serie</th> </tr> <tr> <th>Día</th> <th>Mes</th> <th>Año</th> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </table>			País	Día	Mes	Año	No. de serie	Día	Mes	Año																	
País	Día	Mes						Año	No. de serie																		
			Día	Mes	Año																						
Lista de verificación (uso interno)																											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>No. Hojas</th> <th>Comprobante de pago de la tarifa</th> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> 2</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> 12</td> <td>Descripción y reivindicación (es) de la invención</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> 3</td> <td>Dibujo (s) en su caso</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> 1</td> <td>Resumen de la descripción de la invención</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> 1</td> <td>Documento que acredite la personalidad del apoderado</td> </tr> </table>	No. Hojas	Comprobante de pago de la tarifa	<input checked="" type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> 12	Descripción y reivindicación (es) de la invención	<input checked="" type="checkbox"/> 3	Dibujo (s) en su caso	<input checked="" type="checkbox"/> 1	Resumen de la descripción de la invención	<input checked="" type="checkbox"/> 1	Documento que acredite la personalidad del apoderado	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>No. Hojas</th> <th>Documento de cesión de derechos</th> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> 4</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Constancia de depósito de material biológico</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Documento (s) de prioridad</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Traducción</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>TOTAL DE HOJAS</td> </tr> </table>	No. Hojas	Documento de cesión de derechos	<input checked="" type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Constancia de depósito de material biológico	<input type="checkbox"/>	Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa	<input type="checkbox"/>	Documento (s) de prioridad	<input type="checkbox"/>	Traducción	<input type="checkbox"/>	TOTAL DE HOJAS
No. Hojas	Comprobante de pago de la tarifa																										
<input checked="" type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/>																										
<input checked="" type="checkbox"/> 12	Descripción y reivindicación (es) de la invención																										
<input checked="" type="checkbox"/> 3	Dibujo (s) en su caso																										
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Resumen de la descripción de la invención																										
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Documento que acredite la personalidad del apoderado																										
No. Hojas	Documento de cesión de derechos																										
<input checked="" type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/>																										
<input type="checkbox"/>	Constancia de depósito de material biológico																										
<input type="checkbox"/>	Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa																										
<input type="checkbox"/>	Documento (s) de prioridad																										
<input type="checkbox"/>	Traducción																										
<input type="checkbox"/>	TOTAL DE HOJAS																										
<p>Observaciones: HOJA DEL 60% DE DESCUENTO (1) 24</p>																											
<p>Bajo protesta se declara verídica la información que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.</p> <p>LIC. CLAUDIA ALEJANDRA BLANCO SALAZAR CIUDAD DE MEXICO, A 9 DE JUNIO DE 2016</p> <p style="text-align: center;">Nombre y firma del solicitante o su apoderado Lugar y fecha</p>																											

Redacción de la patente adjunta a la solicitud al IMPI

1

ADITIVO BIOTECNOLÓGICO ANTIOXIDANTE PARA ALIMENTOS ACUÍCOLAS Y SU PROCESO DE OBTENCIÓN.

5

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

Esta invención recae en el campo de la biotecnología acuícola, más específicamente esta invención describe una formulación a base de microencapsulados de extractos vegetales de *Maclura tinctoria* para emplearse como aditivo antioxidante en alimentos acuícolas, específicamente alimento para camarones y otros animales en acuicultura. Su objetivo principal es estimular el sistema antioxidante de los camarones u otros animales en acuicultura.

ANTECEDENTES

15

Maclura tinctoria (L.) Steud. (Moraceae), abarca especies de hoja caduca, semideciduo y hasta especies arbóreas perennes. Es característico de las regiones tropicales secas y húmedas, y se puede encontrar desde México hasta Argentina (Berg 2001).

20 *M. tinctoria* se utiliza como madera y su corteza, hojas y frutos se utilizan como material de construcción, extracción de colorantes, medicamentos y alimentos en las zonas rurales (Balick and Arvigo 2015; Yetman et al. 2002). También se utiliza en la medicina tradicional para eliminar enfermedades de la garganta y boca, parásitos intestinales, infección y dolor de muelas (Hajdu and Hohmann 2012).

25 Las plantas contienen compuestos químicos y biológicos que ejercen actividades definidas efectos fisiológicos en las células y entre estos compuestos están los polifenoles que son metabolitos secundarios con actividad antioxidante (Atanassova et al. 2011; Banerjee et al. 2008; Solovchenko 2010; Symonowicz and Kolanek 2012).

30 Los compuestos bioactivos en las plantas como los compuestos fenólicos pertenecen a las principales clases de metabolitos secundarios, derivados de la fenilalanina. Existen derivados fenólicos, como el fenol mismo, fenilpropanoides, derivados del ácido benzoico, flavonoides, taninos, lignanos y ligninas (Shahidi and Zhong 2015).

Los flavonoides son pigmentos naturales que protegen a la planta del daño producido por agentes oxidantes (Aherne and O'Brien 2002).

Los compuestos fenólicos son esenciales para el crecimiento y reproducción de plantas, como antipatógenos, pigmentación y como atrayentes de polinizadores, protegen a las plantas de la luz UV y son antioxidantes naturales (Shahidi 2000). En acuicultura los alimentos acuícolas son adicionados con microorganismos y polvo de plantas medicinales para combatir enfermedades virales y bacterianas en camarón bajo cultivo ((Apún-Molina et al. 2009; Flores-Miranda et al. 2014a; Flores-Miranda et al. 2011; Flores-Miranda et al. 2014b; Isidro Campa-Cordova et al. 2011; Leyva-Madrigal et al. 2011; Luna-González et al. 2012; Luna-González et al. 2013; Peraza-Gomez et al. 2011; Peraza-Gómez et al. 2009; Peraza-Gómez et al. 2014).

El registro US20080073470 (Ferreira 2009) se refiere a la capacidad como colorante de *M. tinctoria*.

En *M. tinctoria* se ha determinado la presencia y tipo de flavonoides presentes en su corteza (El-Sohly et al. 1999).

En *M. tinctoria* se ha demostrado la capacidad antioxidante de sus chalconas glicosídicas y flavonas (Cioffi et al. 2003a), como antibacteriana (Lamounier et al. 2012; Cioffi et al. 2003b) y como antifúngico (El-Sohly et al. 2001).

Dentro del género como *M. pommifera* presenta actividad antioxidante en sus isoflavonasy compuestos fenólicos (Fatnassi et al. 2009; Teixeira et al. 2009),

Pero a diferencia, en la presente invención se propone la invención de microencapsulados con extractos alcohólicos de compuestos fenólicos de *Maclura tinctoria* como aditivos antioxidantes en el alimento de camarón no limitándoles a otras especies de cultivos acuícolas.

La aplicación de los microencapsulados incluye su administración mediante soluciones, suspensiones, líquidos, extracto seco, gotas, puntos, elixires, polvos, comprimidos, cápsulas, pastillas, tiras de película, jarabes, cremas, inyecciones, pomadas y geles.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Ilustración de las características del polvo (1a y 1b) y morfológicas (1c y 1d) de las microcápsulas de corteza de *M. tinctoria*.

Fig. 2. Diagrama del proceso para el procesamiento de pulverización, secado y caracterización del perfil fenólico de los materiales vegetales de *M. tinctoria*.

Figura 3. Micrografías de barrido electrónico (SEM) mostrando la estructura externa de las microcápsulas a 500x, 1000x y 3000x. 3a).- ES; 3b).- EFO25 y 3c).- EFO50.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a microencapsulados a base de extractos alcohólicos de compuestos fenólicos de *Maclura tinctoria* mediante secado por aspersion, y su uso como aditivos antioxidante en alimentos acuícolas de camarón y no limitado a otras especies acuícolas bajo cultivo o ganadera.

10

Dichos microencapsulados se caracterizan porque se comprenden de extractos de material vegetal comprendido del grupo de frutos maduros, frutos verdes, hojas, raíces y cortezas (tallos), o una combinación de al menos dos de estos, preferentemente corteza (tallos) y hojas, de *Maclura tinctoria*, con tamaño de partícula entre 3 y 23 μm . Dichos microencapsulados se caracterizan por tener una concentración de Fenoles Totales (CFT) de 165.14 ± 1.04 a 404.16 ± 1.54 (mgEGA/g dw), una concentración de flavonoides totales (CFT) de 53.09 ± 1.45 a 93.54 ± 0.97 (mgEQ/g dw), de taninos totales de 19.11 ± 0.72 a 28.44 ± 1.66 (mgECA/g dw).

15

Dichos microencapsulados se caracterizan porque se comprenden de extractos de material vegetal comprendido del grupo de frutos maduros, frutos verdes, hojas, raíces y cortezas (tallos), o una combinación de al menos dos de estos, preferentemente corteza (tallos) y hojas, de *Maclura tinctoria*. Dichos microencapsulados presentan un contenido de humedad de 4 a 5%, una humectación de 1s a 5000s, un tiempo de disolución de 1s a 5000s, actividad en el agua menor a 18_sW), una higroscopicidad menor al 15%, una fluidez (índice de Hausner) de 1.5 a 2.5, una compresibilidad (índice de Carr) de 35 a 52% y un densidad de empaque de 4.5 a 6.5 (g/cm^3)

20

Dichos microencapsulados se caracterizan porque se comprenden de extractos de material vegetal comprendido del grupo de frutos maduros, frutos verdes, hojas, raíces y cortezas (tallos), o una combinación de al menos dos de estos, preferentemente corteza (tallos) y hojas,

25

(tallos), o una combinación de al menos dos de estos, preferentemente corteza (tallos) y hojas,

30

de *Maclura tinctoria*. Dichos microencapsulados presentan una actividad antioxidante menores a 12 DPPH IC_{50} ($mgEQ \cdot mL^{-1}$), 5 PFRAP EC_{50} ($mgEAA \cdot mL^{-1}$) y 7.5 TAC ($mgEAG \cdot mL^{-1}$).

Los extractos fenólicos de *Maclura tinctoria* fueron obtenidos a través del proceso que se describe a continuación, dicho proceso consta de las siguientes etapas:

1. Obtención del extracto

Los extractos del material vegetal se obtienen en consistencia cruda sin procesar, seca, triturado o pulverizado después de un secado. Las muestras secas se pulverizan con una licuadora doméstica. Con 5.5 g de cada muestra se maceran en 10-80 mL de metanol (50-90%, v/v) de 12 a 24 h a temperatura ambiente y en obscuridad total. Los extractos resultantes se centrifugan entre 6000 y 10000 rpm de 1 a 20 min) y se recuperan los sobrenadantes. Las pastillas de la centrifugación se reextractan con metanol (10-30%, v/v) (Almaraz-Abarca et al. 2007) (Fig. 1).

Posteriormente se resuspendieron y almacenaron en obscuridad alícuotas de cada extracto en etanol para llevar a cabo seis distintas pruebas por triplicado: concentración de fenoles totales, flavonoides totales y taninos condensados; además de capacidad antioxidante por reducción del radical DPPH, reducción de molibdato y reducción de hierro (FRAP).

Los sobrenadantes de cada extracto se concentraron a sequedad para llevar a cabo la determinación de los perfiles fenólicos y sus concentraciones, mediante la obtención de información estructural e identificación de compuestos fenólicos en el equipo HPLC-DAD (da Graça Campos and Markham 2007; Almaraz-Abarca et al. 2007; Mabry et al. 1970). El polvo fue analizado y se obtuvieron los valores óptimos de Actividad de agua (aW), Contenido de Humedad, Tiempo de Disolución, Tiempo de Humectación, Higroscopicidad, Densidad aparente y densidad empacada, Índice de Carr, Cociente de Hausner y Ángulo de Reposo. Estos últimos para determinar la viabilidad en el manejo, transporte, almacenaje y vida media como aditivos antioxidantes en el alimento (Fig 2).

2. Preparación de la suspensión

Las microcapsulas de extractos fenólicos *Maclura tinctoria* se mezclan como componentes de 100 a 200g de polvo de corteza diluida en 0.5 a 1.5 L de etanol al 20-80%, se agita de 12 a 24 horas y se remueven los sólidos. Se filtra con un tamiz analítico con una apertura de 50-95 μm y se resguardan en frascos ámbar.

Se prepararon las emulsiones homogenizando, con un secador por aspersión ultraturax a una velocidad de 15000 a 28000 rpm, 0.5 a 1.5 L de extracto de corteza de 80 a 130 g de maltodextrina, de 1 a 140 g de goma arábica, y de 0 a 70 mL de aceite de pescado.

3. Microencapsulación

- 5 Con un secador por aspersión ULTRATURAX®, en un rango de temperatura de entrada de 100° a 120°C y de salida de 70° a 90°C, a una presión de automatización en un rango de bares de 0.5 a 1.1 bares y una velocidad promedio de alimentación de 10 a 20 mL·min⁻¹ proporcionada por una bomba peristáltica, con un arreglo en paralelo y una boquilla de aspersión de doble fluido con un diámetro interno en un rango de 1 a 3 mm, y una velocidad
- 10 de 5000 a 15,000 rpm.
- La presente invención de dichos microencapsulados de extractos fenólicos de *Maclura tinctoria* tienen un contenido de humedad entre 4 y 5%, humectación entre 33 y 50 min, tiene tiempos de disolución entre 50 y 100 min, una fluidez (índice de Hausner) entre 1 y 2.5, un ángulo de reposo entre 13° y 25° en base seca.
- 15 La presente invención de dichos microencapsulados de extractos fenólicos de *Maclura tinctoria* tienen una concentración de Fenoles Totales entre 11 y 68 mgGAE g⁻¹ (Ácido gálico), de flavonoides totales (CFT) entre 11 y 71 mgEQ g⁻¹ (miligramos equivalentes de quercetina) y Taninos condensados entre 7 y 11 mgECA g⁻¹ (miligramos equivalentes de catequina).
- 20 La presente invención de dichos microencapsulados de extractos fenólicos de *Maclura tinctoria* tienen una capacidad antioxidante entre 11 y 68 mgEQ mL⁻¹ (reducción de 1,1-difenil-2-picrilhidracil ó DPPH IC50), entre 11 y 71 gEAA mL⁻¹ (Potencial Reductor de Hierro, ó PRRAP EC50) y entre 7 y 11 mgEAG mL⁻¹ (Actividad antioxidante total ó TAC).
- 25 Los microencapsulados a base de extractos fenólicos de *Maclura tinctoria* se caracterizan porque se usan como aditivo antioxidante en al menos el alimento para camarón cultivado, más no limitado a otras especies acuáticas cultivadas o ganadera, además de ser aplicado a la necesidad del mismo pudiendo ser aplicado, más no limitado, en soluciones, suspensiones, líquidos, extractos secos, gotas, puntos, elixires, polvos, comprimidos, cápsulas, nanocapsulas,
- 30 pastillas, tiras de película, jarabes, cremas, inyecciones, pomadas y geles.

Opcionalmente, los extractos del material vegetal se obtienen en consistencia cruda sin procesar, seca, triturado o pulverizado después de un secado. Preferentemente, se sugiere usar productos fabricados triturados o pulverizados, después de secar.

REIVINDICACIONES

Habiendo descrito suficiente mi invención, considero como una novedad y por lo tanto reclamo como de mi exclusiva propiedad, lo contenido en las siguientes cláusulas:

1. Microencapsulados a base de extractos fenólicos de *Maclura tinctoria* mediante secado por aspersión

Los microencapsulados a base de extractos fenólicos de *Maclura tinctoria* caracterizado porque los microencapsulados son de extractos de material vegetal comprendido del grupo de frutos maduros, frutos verdes, hojas, raíces y cortezas, o una combinación de al menos dos de estos, preferentemente corteza y hojas de *Maclura tinctoria*, con tamaño de partícula de 3 a 23 μm . Los microencapsulados a base de extractos fenólicos de *Maclura tinctoria* de la presente invención tienen un contenido de humedad entre 4 y 5%, humectación entre 33 y 50 min, tiene tiempos de disolución entre 50 y 100 min, una fluidez (índice de Hausner) entre 1 y 2.5, un ángulo de reposo entre 13° y 25° en base seca, una concentración de Fenoles Totales entre 11 y 68 $\text{mgGAE}\cdot\text{g}^{-1}$ (Ácido gálico), de flavonoides totales (CFT) entre 11 y 71 $\text{mqEQ}\cdot\text{g}^{-1}$ (miligramos equivalentes de quercetina) y Taninos condensados entre 7 y 11 $\text{mgECA}\cdot\text{g}^{-1}$ (miligramos equivalentes de catequina) y una capacidad antioxidante entre 11 y 68 $\text{mgEQ}\cdot\text{mL}^{-1}$ (reducción de 1,1-difenil2-picrilhidracil ó DPPH IC50), entre 11 y 71 $\text{gEAA}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Potencial Reductor de Fierro ó PRRAP EC50) y entre 7 y 11 $\text{mgEAG}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Actividad antioxidante total ó TAC).

2. Los microencapsulados a base de extractos fenólicos de *Rhizophora mangle* de la presente invención son caracterizados porque la conformación estructural de los microencapsulados se realiza de manera preferencial al mezclar los extractos fenólicos de *Maclura tinctoria* con aceite de pescado ultrapuro en rangos de concentraciones entre 0.1 hasta 70%, goma arábica y maltodextrina a una concentración entre 80g/L y 150g/L. La fabricación de las microcapsulas se realiza mediante secado por aspersión con un equipo ULTRATURRAX®, en un rango de temperatura de entrada entre 90 y 120°C y de salida entre 70 a 90°C, a una presión de automatización entre 0.5 y 1.1 bares y una velocidad promedio de alimentación entre 10 a 20mL/min proporcionada por una bomba peristáltica, con un arreglo en paralelo y una boquilla de aspersión de doble fluido con un diámetro interno entre 1mm y 3 mm, y una velocidad entre 5000 rpm a 15,000 rpm.

3. Los microencapsulados a base de extractos fenólicos de *Maclura tinctoria* de la presente invención están caracterizados porque se usan como aditivo antioxidante en alimentos para camarón an acuicultura, aunque no limitado a otras especies bajo cultivo acuícola o la ganadera, de acuerdo a la necesidad del mismo pudiendo ser aplicado, más no limitado, mediante soluciones, suspensiones, líquidos, extracto seco, gotas, puntos, elixires, polvos, comprimidos, cápsulas, nanocápsulas, pastillas, tiras de película, jarabes, cremas, inyecciones, pomadas y geles.
4. Los microencapsulados a base de extractos fenólicos de *Maclura tinctoria*, de conformidad con la reivindicación 2, están caracterizados porque, opcionalmente los extractos del material vegetal se obtienen en consistencia cruda sin procesar, seca, triturado o pulverizado después de un secado. Preferentemente productos fabricados triturados o pulverizados, después de secar.
5. Uso de los microencapsulados a base de extractos fenólicos de *Maclura tinctoria*, de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 6, como aditivos antioxidantes en alimentos acuícolas de camarón, más no limitado a otras especies de cultivos acuícolas o ganadera.
6. Uso de los microencapsulados a base de extractos fenólicos de *Maclura tinctoria*, de conformidad con las reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizado porque son aditivos antioxidante preferentemente en alimentos acuícolas de camarón, más no limitado a otras especies de cultivos acuícolas o ganadera.
7. Uso de los microencapsulados a base de extractos fenólicos de *Maclura tinctoria*, de conformidad con las reivindicaciones de la 7 y 8, caracterizado porque se usan como aditivo antioxidante en al menos el alimento del camarón en acuicultura.
- 8.

RESUMEN

La actual invención describe la formulación farmacéutica de mediante la microencapsulación de extractos fenólicos de *Maclura tinctoria* y su capacidad antioxidante como aditivo en los alimentos acuícolas. Las microcápsulas de extracto fenólico de *Maclura tinctoria*, se pueden administrar como aditivo antioxidante en forma de líquido, pulverizado, gel o diluido en solventes o agua directamente en los en los alimentos acuícolas para incrementa la capacidad antioxidante de los organismos cultivados por acuicultura.

10

- Aherne SA, O'Brien NM (2002) Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18 (1):75-81. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0899-9007\(01\)00695-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0899-9007(01)00695-5)
- 15 Almaraz-Abarca N, da Graça Campos M, Avila-Reyes JA, Naranjo-Jimenez N, Corral JH, Gonzalez-Valdez LS (2007) Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis* 20 (2):119-124
- 20 Apún-Molina JP, Santamaría- Miranda A, Luna-González A, Martínez-Díaz SF, Rojas-Contreras M (2009) Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. *Aquaculture Research* 40 (8):887-894
- Atanassova M, Georgieva S, Ivancheva K (2011) Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 46 (1):81-88
- 25 Balick MJ, Arvigo R (2015) *Messages from the Gods: A Guide to the Useful Plants of Belize*. Oxford University Press,
- Banerjee D, Chakrabarti S, Hazra AK, Banerjee S, Ray J, Mukherjee B (2008) Antioxidant activity and total phenolics of some mangroves in Sundarbans. *African J Biotech* 7 (6):805-810
- 30 Berg CC (2001) *Moreae, Artocarpeae, and Dorstenia* (Moraceae): with introductions to the family and *Ficus* and with additions and corrections to *Flora Neotropica*. *Flora neotropica*; Monograph no. 83. Organization for Flora Neotropica by the New York Botanical Garden, Bronx, N.Y.
- Cioffi G, Escobar LM, Braca A, De Tommasi N (2003a) Antioxidant Chalcone Glycosides and Flavanones from *Maclura (Chlorophora) tinctoria*. *Journal of Natural Products* 66 (8):1061-1064. doi:10.1021/np030127c
- 35 Cioffi G, Morales Escobar L, Braca A, De Tommasi N (2003b) Antioxidant chalcone glycosides and flavanones from *Maclura (Chlorophora) tinctoria*. *J Nat Prod* 66 (8):1061-1064. doi:10.1021/np030127c
- da Graça Campos M, Markham KR (2007) Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: flavones, flavonols and phenolic acids. *Imprensa da Univ. de Coimbra*,
- 40 El-Sohly HN, Joshi A, Li XC, Ross SA (1999) Flavonoids from *Maclura tinctoria*. *Phytochemistry* 52 (1):141-145
- El-Sohly HN, Joshi AS, Nimrod AC, Walker LA, Clark AM (2001) Antifungal chalcones from *Maclura tinctoria*. *Planta Med* 67 (1):87-89. doi:10.1055/s-2001-10621

- Fatnassi S, Chatti S, Nehdi I, Zarrouk H Chemical Composition, Phenolic Profile and Antioxidant Activity of *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider Seeds Oil. In: International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants-SIPAM2009 853, 2009, pp 383-390
- 5 Ferreira EL (2009) Manufacturing process of vegetable colorant extracts from residues generated in the extraction and processing of wood from tropical forest of colorful heartwood Brassil Patent,
- 10 Flores-Miranda Md, Luna-González A, Cortés-Espinosa D, Álvarez-Ruiz P, Cortés-Jacinto E, Valdez-González F, Escamilla-Montes R, González-Ocampo H (2014a) Effects of diets with fermented duckweed (*Lemna sp.*) on growth performance and gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture International:1-15. doi:10.1007/s10499-014-9835-x
- 15 Flores-Miranda MdC, Luna-González A, Campa-Córdova AI, González-Ocampo HA, Fierro-Coronado JA, Partida-Arangure BO (2011) Microbial immunostimulants reduce mortality in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio sinaloensis* strains. Aquaculture 320 (1-2):51-55. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.08.005
- 20 Flores-Miranda MdC, Luna-González A, Cortés-Espinosa DV, Cortés-Jacinto E, Fierro-Coronado JA, Álvarez-Ruiz P, González-Ocampo HA, Escamilla-Montes R (2014b) Bacterial fermentation of *Lemna sp.* as a potential substitute of fish meal in shrimp diets. African Journal of Biotechnology 8 (15):1516-1526
- 25 Hajdu Z, Hohmann J (2012) An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paraguá Indian Reservation, Bolivia. Journal of Ethnopharmacology 139 (3):838-857
- 30 Isidro Campa-Cordova A, Luna-Gonzalez A, Manuel Mazon-Suastegui J, Aguirre-Guzman G, Ascencio F, Abelardo Gonzalez-Ocampo H (2011) Effect of probiotic bacteria on survival and growth of Cortez oyster larvae, *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae). Revista De Biología Tropical 59 (1):183-191
- 35 Lamounier KC, Cunha LCS, de Morais SAL, de Aquino FJT, Chang R, do Nascimento EA, de Souza MGM, Martins CHG, Cunha WR (2012) Chemical Analysis and Study of Phenolics, Antioxidant Activity, and Antibacterial Effect of the Wood and Bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012:7. doi:10.1155/2012/451039
- 40 Leyva-Madrigal KY, Luna-González A, Escobedo-Bonilla CM, Fierro-Coronado JA, Maldonado-Mendoza IE (2011) Screening for potential probiotic bacteria to reduce prevalence of WSSV and IHNV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental conditions. Aquaculture 322-323:16-22
- 45 Luna-González A, Almaraz-Salas JC, Fierro-Coronado JA, Flores-Miranda MDC, González-Ocampo HA, Peraza-Gómez V (2012) The prebiotic inulin increases the phenoloxidase activity and reduces the prevalence of WSSV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. Aquaculture 362-363:28-32
- 50 Luna-González A, Moreno-Herrera JT, Campa-Córdova AI, González-Ocampo HA, Fierro-Coronado JA, Álvarez-Ruiz P, Bueno-Ibarra MA (2013) Immune response and gene expression of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) induced by microbial immunostimulants. Latin American Journal of Aquatic Research 41 (5):898-907
- 55 Mabry T, Markham K, Thomas M (1970) The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag New York
- Peraza-Gomez V, Luna-Gonzalez A, Campa-Cordova AI, Fierro-Coronado JA, Gonzalez-Ocampo HA, Sainz-Hernandez JC (2011) Dietary microorganism and plant effects on the survival and immune response of *Litopenaeus vannamei* challenged with the white spot syndrome virus. Aquaculture Research 42 (4):559-570. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02651.x
- Peraza-Gómez V, Luna-González A, Campa-Córdova AI, López-Meyer M, Fierro-Coronado JA, Álvarez-Ruiz P (2009) Probiotic microorganisms and antiviral plants reduce mortality and prevalence of WSSV in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. Aquaculture Research 40 (13):1481-1489
- Peraza-Gómez V, Luna-González A, González-Prieto JM, Fierro-Coronado A, González-Ocampo HA (2014) Protective effect of microbial immunostimulants and antiviral plants against WSSV in *Litopenaeus vannamei* cultured under laboratory conditions. Aquaculture 420-421:160-164
- Shahidi F (2000) Antioxidants in food and food antioxidants. Food/Nahrung 44 (3):158-163

- Shahidi F, Zhong Y (2015) Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. doi:10.1016/j.jff.2015.01.047
- Solovchenko A (ed) (2010) *Photoprotection in Plants: Optical Screening-based Mechanisms*, vol 14. Springer PG, Berlin, Germany
- 5 Symonowicz M, Kolanek M (2012) Flavonoids and their properties to form chelate complexes. *Biotechnology and Food Sciences* 76 (1):35-41
- Teixeira DM, Canelas VC, do Canto AM, Teixeira JMG, Dias CB (2009) HPLC-DAD Quantification of Phenolic Compounds Contributing to the Antioxidant Activity of *Maclura pomifera*, *Ficus carica* and *Ficus elastica* Extracts. *Analytical Letters* 42 (18):2986-3003.
- 10 doi:10.1080/00032710903276646
- Yetman D, Van Devender T, Van Devender TR (2002) *Mayo Ethnobotany: Land, History, and Traditional Knowledge in Northwest Mexico*. University of California Press,

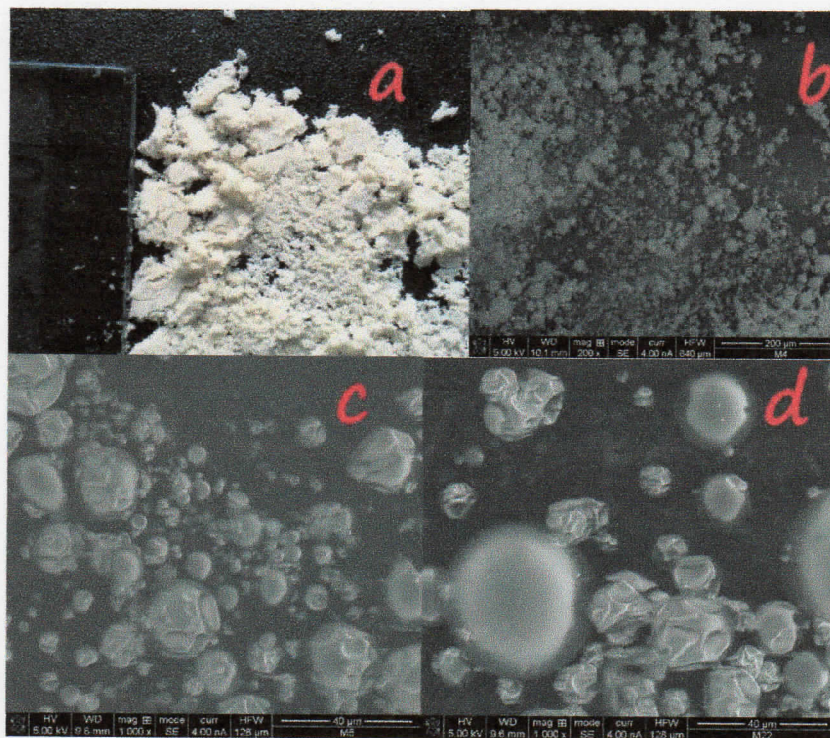


FIGURA 1

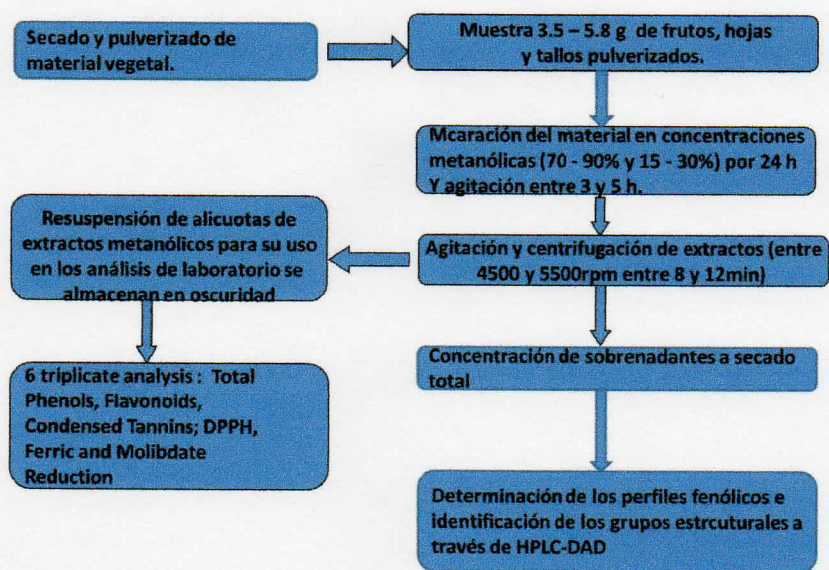


FIGURA 2

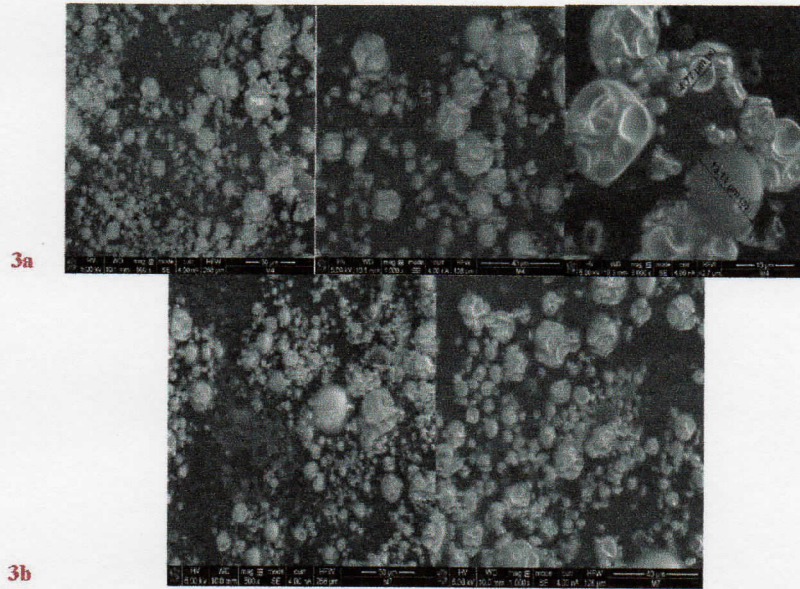


FIGURA 3



EFFECT OF LATITUDE IN PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF *Morinda tinctoria* (L.) Steud. (MORACEAE) FROM THE TROPICAL DECIDUOUS FOREST

Journal	Journal of Plant Ecology
Manuscript ID	1741
Manuscript Type	Original Article
Date Submitted by the Author	17/6
Complete List of Authors	Carla Jossi, Universidad Autónoma de Sinaloa, Ponguipichil, José Luis Ortiz de Domínguez 974, Cd. Universidad, Erizos de Sinaloa, Ciudad Guzmán, Durango, Sinaloa, 47120 P.O. Box 12 de Agosto II, C.P. 46200, Uruapan, Michoacán, México, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Químicas, UNAM, Ciudad de México, México, Instituto Politécnico Nacional, CIQEP, Unidad Ciudad de México
Keywords	Secondary metabolites, antioxidants, medicinal plants, phytochemistry, plant diversity

http://mc.manuscriptcentral.com/jpe

**1 EFFECT OF LATITUDE IN PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT CAPACITY
2 OF *Morinda tinctoria* (L.) Steud. (MORACEAE) FROM THE TROPICAL DECIDUOUS
3 FOREST**

4
5 José Shannon Díaz, Norma Álvarez-Arce¹, Antonio Luna-Ozceda² and Hector Alvarado
6 González-Ocampo^{3*}
7 Universidad Autónoma de Sinaloa, Erizos de Sinaloa, Ponguipichil, José Luis Ortiz de Domínguez
8 974, Cd. Universidad, C.P. 46200, Uruapan, Michoacán, México. *E-mail: hector.alvarado@uadys.mx

9
10 ¹ Instituto Politécnico Nacional (CITEP-EURASPO), Sigua #119 P.O. Box 20 de Noviembre II
11 Domingo Egan, México, C.P. 44200, +52(291)4 2091, instituto@instituto.mx
12 Instituto Politécnico Nacional, CITEP-QUIMICA, Juan de Dios Hurtado Paredes #670, Durango,
13 Sinaloa, +52(291) 391 36, instituto@instituto.mx
14 *Corresponding author: hectoralvarado@uadys.mx

15 Abstract

16 The interest in the search of vegetal origin antioxidant compounds has been increasing since their
17 compounds exhibit the possibility of low-toxicity natural products and provide protection against diverse
18 pathogenic bacteria. *Morinda tinctoria* is a species that has been considered an aromatic, medicinal, colorant
19 dye and food. However, no work has been performed to show whether these activities depend on the type of
20 bank, the phenolic concentration or the type of flavonoid compound. We studied the total phenolic content
21 (TPC), total flavonoid content (TFC), condensed tannin (CT) and antioxidant capacity of extracts from fruit, leaf,
22 and flowers of 84 samples and we assessed if these values are correlated with the plant structure or the
23 location. The TPC, TFC and CT contents ranged from 14.16 and 165.14 mg GAE/g dry weight (DW), 33.54
24 and 43.28 mg CE/g DW, 41.33 and 18.11 mg CE/g DW, respectively. A 33 phenolic compounds were found
25 and lignans were detected and significant relationships were observed. The total phenolic content
26 values for 2,3-dibenzyl-5-hydroxybenzoic acid (DBHBA) ranged from 11.96 to 67.03 mg CE/g DW. The polyphenol

http://mc.manuscriptcentral.com/jpe

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

27. Interquartile reduction power (IPRAQ), the value of E₀ ranged from 4.44 to 70.40 mgAA/h, whereas
 for AC the values ranged from 21.13 to 7.04 mgAA/h. A Correlation between TPC and CT were found
 with respect to the AC measured through CPBE and TAC. *M. leucosticta* extracts from the state of Sinaloa have
 a higher TPC, whereas those from the state of Campeche depict a lower AC.

Keywords: Secondary metabolites, synchrotron, crystallization, phytochemistry, plant physiology

Acknowledgments

We thank the IPN (CIP 20130390, FOLCER CALDERÓN (FOLC140288) and CONSOLIDERES
 FOLC10202) Group for their financial support. In addition to the FOLCADER - SEP to grant including
 to cover the authors and their autographic references whose commands support of the manuscript.

Potential reviewers

RIC. ADAMO AGUIAR, Smithsonian National School of Conservation, P.O. Box 290, Trinidad, St. Vincent and the
 Grenadines, adamo@si.edu

Prof. Enay A. W. Stewart, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, Department of
 Veterinary Medicine, +44 (0)1223 337733, enay.stewart@cam.ac.uk

Prof. Fernando, Chingrupa, National Institute of Contemporary Media, Biological Cosmography
 Division, Oaxaca, India, +52 (987) 291 6410, fernando@biocologia.mx

Prof. Subramanyam, Kishan, University of Jammu (UJ), Laboratory of Plant Biology and
 Nature Management, Baramulla, +91 98707 21 11, subraman@ujammu.ac.in

<http://mc.manuscriptcentral.com/jpe>

2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Introduction

Mentha leucosticta (L.) Steud. (Lamiaceae) is a deciduous shrubby herb and semi perennial aromatic species
 in the sub-tropical to dry and wet tropical regions and can be found from Mexico to Argentina (Gonz 2001)
 In Mexico it is distributed in the region of the Pacific coast from southwestern of the Gulf of California and
 along the coast of the Gulf of Mexico. This tree grows from the Pacific coastal plain at sea level to nearly 800
 m altitude in the tropical deciduous forest (Munz 1992; Ramírez 1979).

M. leucosticta is used as wood, bark, leaves and fruits are used as building material, extraction of oils,
 medicines and food in rural areas (Galindo and Pérez 2012; Varona et al. 2002). Their leaves and fruits are
 food source for a wide variety of wildlife such as birds, monkeys, crabs, mammals, bats, wild boars and
 even crabs, plus bird domestic animals such as chickens, cows, horses, dogs, cats and pigs (Amador et
 al. 2011; Capistrano-Hernández et al. 2006; Queser and Queser-Herzschberg 2013; Pomeroy and Ibrahim
 1969). It is also used in traditional medicine to alleviate fever and mouth ulcers, menstrual pain, etc.,
 besides analgesic and vermicidal effects (Alajó and Johnson 2012).

Diverse studies have shown the many plants contain chemical compounds and biological activities that exert
 direct phytochemical effects on cells. Among these chemical compounds the polyphenols are relevant as
 secondary metabolites due to their diverse actions among them are: anticancer, antioxidant, hypoglycemic and
 protective properties against UV radiation, anticancer and anti-proliferative effects (Lamas et al.,
 2011; Emmpire et al. 2008; Kishan et al. 2013; Srinivasan and Kishan 2012). These polyphenols act as a
 source of highly available hydrogen atoms that subsequently form radicals that can be detoxified within their
 chemical structure (Fitzpatrick et al. 1994). They act against other kind of free radicals reactive oxygen species
 (ROS), such as the superoxide anion, hydroxyl radical and hydrogen peroxide. These are part of a wide group
 of highly reactive chemical species that can cause oxidative damage to cellular molecules such as DNA and
 RNA, and implicated in the etiology of very diverse pathologies in nature (Fitzpatrick and Armstrong 1990)

It is an increased interest in the research about the antioxidant and chemopreventive compounds in plants extracts to
 include the phylogenetic of these natural induced reactions or usual chemical (Gill et al. 2013; Kishan et al.,
 1994; Srinivasan et al. 2013; Tattar et al. 2012). In relation to this, previous studies in *M. leucosticta*
 demonstrated the antioxidant activity and the use of diverse polyphenols against *Chryseida* and *Staph* 2012,
 Lamas et al. 2012; Queser et al. 2013

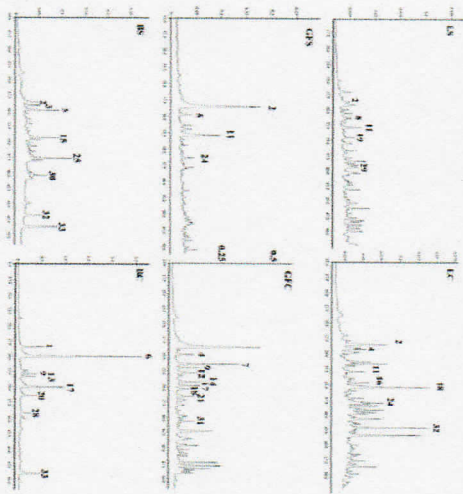
<http://mc.manuscriptcentral.com/jpe>

3

- 74 Polyphenols in plant and animal free radicals reactive oxygen species and the phenolic compound content in
 75 *M. leucosticta* are available at arxiv:hal.archives-ouvertes.fr/2012/05/01119. However, no work in this species shows whether
 76 these radical activities depend on the type of tissue, the phenolic concentration, or the type of phenolic
 77 compound. Hence, the objective of this study is to determine whether the total phenolic content, the flavonoid,
 78 the condensed tannin or the phenolic composition affects the antioxidant and detoxifying activity of extracts
 79 of the leaf, bark and flower of *M. leucosticta*.
- 80 **Materials and Methods**
- 81 **1.1 Biological Samples**
- 82 Samples of bark, leaves and green fruit (only seeds) were stored in liquid N₂ from 20 replicating
 83 plants, two were from the protected natural forest of the state of Campeche (19° 56' 32" N and 90° 22' 22" W),
 84 10° 01' 16" N and 91° 01' 16" W) and ten from the tropical deciduous forest of Calchuc in the state of Yucatán (20° 52' 42" N
 85 and 102° 17' 47" W) (Fig. 1B). Samples of the specimens were previously identified by specialists
 86 personnel of the herbaria of the University of Yucatán (CIUNYU) and the autonomous University of Yucatán
 87 and the vouchers of the specimens were deposited in the herbaria of the University of Yucatán (CIUNYU) and the
 88 autonomous University of Yucatán (CIUNYU). After their collection, samples were transported in a cold and dark container to avoid
 89 their oxidation. Once in the laboratory, samples were subjected to a standard protocol with nitrogen at less than 10
 90 °C in a vacuum layer. The dried samples were pulverized in a ball mill (Mixer, T83A, 2.5 kg of
 91 the resulting powder were measured in 20 mL of ethanol (95%) fractions were analyzed a dilution for 25
 92 to obtain the crude extracts.
- 93 **1.2 Phenolic content**
- 94 Total phenols were determined by the Folin-Ciocalteu method (Singleton et al. 1999; Singleton and Rossi
 95 1969), using 250 µL of crude extract, 2500 µL of Folin-Ciocalteu reagent, 125 µL of Folin reagent (Sigma®) and
 96 375 µL of Na₂CO₃ (Fisher®) in an assay tube. The mixture was shaken and left to react in darkness for 1 h.
 97 Afterwards, the absorbance of samples was read at 760 nm in a spectrophotometer (Cyan® PC9 9717R,
 98 Spectra Services Inc.) A standard curve was prepared (Y=0.0072-0.1197 [gallic acid] and R²=0.9922,
 99 coefficient=0.9945) with gallic acid (Sigma®) at different concentrations (0.2, 1.0, 1.5, 3.0, and 4.7 µg/mL).
 100 Absorbance values of the samples were substituted in the equation and the obtained results were adjusted to
 101 the used dilution factor and expressed as milligram equivalents of gallic acid (µg dry weight/mg dry weight).
- 102 Total flavonoid concentration was determined following the method described by Chang et al. (2002). An
 103 aliquot of 50 µL of the crude extract was mixed with 900 µL methanol and 50 µL AlCl₃ reagent prepared
 104 with 0.5 g AlCl₃ (Sigma®) mixed with 10 mL 10% methanol (Riedel®). The mixture was agitated and the
 105 absorbance was read immediately at 425 nm. A calibration curve (Y=0.014-0.0119 [quercetin] and R²=0.9922,
 106 coefficient=0.9945) was constructed with different quercetin (Sigma®) concentrations (0.25, 1.25, 2.50,
 107 5.0, and 10 µg/mL). The absorbance values of the samples were substituted in the equation and results were
 108 adjusted to the used dilution factor. Percent was expressed as milligram equivalents of quercetin (µg extract
 109 (mg)/(g dry wt)).
- 110 Condensed tannin were determined with the Jaffe®-Trinlo (1995) method by mixing 50 µL of the crude
 111 extract in an assay tube with 1.5 mL of the solution of Folin-Ciocalteu reagent prepared with methanol and
 112 750 µL concentrated HCl (Fisher®). The mixture was agitated and left to react in darkness at room
 113 temperature for 30 min. Then, the absorbance was read at 560 nm. A calibration curve (Y=0.0138-0.0077
 114 [absorbance] and R²=0.9922) was constructed with different quercetin (Sigma®) concentrations
 115 (0.25, and 10 µg/mL). The absorbance values of the samples were substituted in the equation adjusting the
 116 results to the used dilution factor and expressed them as milligram equivalents of quercetin (µg weight
 117 (mg)/(250 µg dry wt)).
- 118 **1.3 Phenol composition**
- 119 The phenol composition was determined using aliquots (100 µL) of each extract (concentrated to 10 mg/mL and
 120 re-dissolved in 5 mL ethanol, grade HPLC, Fisher®) by a gradient method of HPLC-DAD. Columns and
 121 Hachimoji 2007A, on a Zorbax Elite Series 200 EPRC and a Zorbax Elite Series 200 EPRC, Analytical C18 column
 122 (4.6 × 250 mm, 5 µm) by an analytical solvent-water gradient. Water (G. Merck®) adjusted to pH 1.5 with
 123 orthophosphoric acid and water (G. Merck®) and acetonitrile (G. Merck®) was the solvent B, mixed according to the
 124 following gradient: starting with 100% A, decreasing to 95% over the next 12 min, to 80% over the next 8
 125 min, to 67% over the next 12 min, to 57% over the next 10 min, and 50% at this level until the end of the 60
 126 min analysis. Special data for all peaks were registered in the range of 200-400 nm using a diode array
 127 detector (Shimadzu Diode Array 200) (Shimadzu). Information of the analyzed compounds were obtained by
 128 comparison of their retention times, UV spectra and some parameters obtained in prior chemical libraries
 129 (Atlantida, Crona, UK), online and (CET 13, June 27/2008, 20/08, 9/10), p-coumaric acid and (CET 17, 2, June

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- 130 2829h, 310g, 496e (ET) 49.66, 49.66, 205a, 205b, 299a, 370a, 496e (greenhouse), 2829h, 310g, 496e (ET);
131 2829h, 310g, 496e (ET) 49.66, 49.66, 205a, 205b, 299a, 370a, 496e (greenhouse), 2829h, 310g, 496e (ET);
132 2829h, 310g, 496e (ET) 49.66, 49.66, 205a, 205b, 299a, 370a, 496e (greenhouse), 2829h, 310g, 496e (ET);
133 according to the instructions compiled by Lakley et al. (1970) and Chung et al. (2007).
- 1.4 Analytical capacity
134
135 The D₂₀₂₂ assay is one of the most frequently used tests owing to its simplicity and for providing information
136 on the activity of the substrate tested with a few stable products. The assay is based on the measurement of the
137 reducing capability of sulfoxidation toward D₂₀₂₂ (Frost et al. 2005). Analytical activity was determined
138 using the stable form nitrate 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) according to Brand-Williams et al.
139 (1997), adding 0.0462 g of powdered DPPH (purity) in 100 mL of methanol. Absorbance of 1000, 200, 200,
140 200, 200, 200, 200, 200, and 100 µL of the mixture were applied with a dilution of 0, 10, 40, 100, 150,
141 180, 200, 250, and 300 µL of the extracts, respectively. The mixture was heated under agitation in
142 a water bath and absorbance was read at 520 nm after 30 min. The amount of flavonoids in each extract needed to
143 decolorize by 50% the initial concentration of DPPH (0.462) was obtained by comparing the DPPH
144 concentrations in a range between 10.0 to 100 µg/mL against the linear concentration of the extracts
145 using a calibration curve (R² = 0.9914) (generalized coefficient of determination = 0.9979). The results were
146 reported as milligram equivalents of quercetin per millilitre (mgEQ/mL).
- 147 The antioxidant activity through potassium permanganate reduction power (FRAP) was determined by the
148 method of Ouyang (1986), with some modifications. Briefly, 0.5, 1.25, and 50 µL of the sample were
149 supplemented with 75, 75, 50, and 25 µL of 100% methanol in assay tubes (Aldrich), 250 µL of phosphate
150 buffer (0.2 M, pH 6.9) and 1250 µL of potassium permanganate (KMnO₄) were added to each tube,
151 including the mixture in a thermostatic bath for 30 min at 50 °C (ThermoFisher Dry Bath D28123). Samples
152 were cooled to ambient temperature and mixed with 1250 µL of 0.5 M of sodium acetate (Sigma) and
153 added and tubes were centrifuged (Fisher 2210RC Laboratory, Germany) for 10 min at 2000 rpm at 25
154 °C. Absorbance, 625 nm of the supernatant was read and mixed with 625 µL of deionized water and 125 µL
155 of 10% of ferric chloride (Merck). Absorbance was read at 700 nm. A calibration curve (R² = 0.9979) was
156 [antioxidant activity coefficient (mgEQ)] was prepared with four concentrations of ascorbic acid (0.4,
- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- 157 40 µL combined with a volume of methanol in order to reach 1 mL of final volume). The results were
158 expressed in terms of EC₅₀ as milligram equivalents of ascorbic acid/mL (mgEQ/mL).
- 159 Total antioxidant capacity (TAC) was determined by the method of Wöhrle et al. (2007).
160 Following the procedure described by Fiala et al. (1999), 100 µL of sample were mixed with 1000 µL of
161 molybdenum solution in Diglycyl ether and incubated in a thermostatic bath at 37 °C after cooling
162 at room temperature in darkness. Absorbance was read at 695 nm. A calibration curve (R² = 0.9979) was
163 [gallic acid] correlation coefficient (mgEQ) was prepared with different concentrations of gallic acid
164 between 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10 mg/mL. The absorbance values of the sample were substituted in the
165 equation, results were adjusted to the used dilution factor and expressed as milligram equivalents of gallic
166 acid/mL (mgEQ/mL).
- 1.5 Statistical analysis
167
168 The analysis of the total phenolic content (TPC), total flavonoids (TF), condensed tannins (CT), and
169 antioxidant capacity by DPPH, FRAP, and TAC, was analyzed with the software SPSS (ver. 20.0) software, and
170 expressed as average ± standard deviation (SD), performing a one-way ANOVA test. Differences in means
171 with p < 0.05 were considered statistically significant.
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
- 3.1 Concentration of Total Phenolic, Total Flavonoids and Condensed Tannins
174 The differences among TPC, TF, and CT will depend on their sample source were statistically significant
175 (ANOVA, p < 0.05) (Table 1). The average total phenolic concentration was higher in CR with 6.41 ± 1.5
176 mgEQ/g dw, whereas the EC extract showed the lowest average concentration (0.65 ± 0.1 mgEQ/g dw).
177 On the other side, the highest total flavonoid concentration was found in the EC extract (31.5 ± 0.9 mgEQ/g dw),
178 whereas the CR extract showed the lowest concentration with 23.59 ± 1.4 mgEQ/g dw. Regarding condensed
179 tannins, the EC extract showed the highest concentration (0.84 ± 0.1 mgEQ/g dw), whereas the CR extract
180 showed the lowest concentration (0.14 ± 0.07 mgEQ/g dw).
- 3.2 Phenolic Composition
181
182 By means of HPLC-DAD analysis of every extract six compounds were obtained. The phenolic
183 compound distribution on a sample type is observed on each row (Fig. 2), and the structural information
184 [E1 (trans), 2-oxo] substance is described in table 2. According to the spectra data at least 13 phenolics

185 compounds were revealed: twelve were phenolic acids, nine were flavonoids, among them two
 186 methylated 3-glycosides, two isomeric 3-O-glycosides and two quercetin 3-O-glycosides; four were
 187 dihydroflavonoids, and four were flavones; one neoflavin glycoside, two flavolin glycosides, and one
 188 dihydroflavonoid glycoside, besides one flavonol and other three phenolic compounds that could not be identified.



191 The highest diversity in composition was obtained from QFC extract with 13 different compounds and the
 192 extracts with least diversity were QFS and LS with 5 compounds each one. The compound most shared by all
 193 extracts were the phenolic acids followed by flavonol (five Quercetin-3-O-glycosides) and dihydroflavonoids
 194 3,3'-Aminobenzyl Quercetin.
 195 The highest antioxidant capacity (IC₅₀) by DPPH corresponded to the herb extract from Simola (QFS 11.06
 196 mg/gQGal), whereas the QFS extract showed the lowest (07.03 mg/gQGal). On the other hand, the extracted
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224

<http://mc.manuscriptcentral.com/jpe>

197 activity by DPPH induction for each extract increased in the following order BS>BC>LC>QFC>LS>QFS.
 198 The LC extract showed the highest antioxidant capacity (IC₅₀) by the FRAP assay (4.64 mg/AAml).
 199 whereas the QFS extract presented the best antioxidant capacity (70.40 mg/AAml). The increasing order
 200 by FRAP was LC>BC>QFC>BS>LS>QFS. The highest total antioxidant capacity (CAT) corresponded to
 201 the LC extract (2413 mg/AAml), whereas the lowest was for the BC extract (714 mg/AAml). The
 202 decreasing order for TAC was LC>QFS>QFC>BS>LS>QFS. The differences in the antioxidant capacities
 203 among the three extracts of analysis (DPPH, FRAP, TAC) with respect to their extraction source were
 204 statistically significant (ANOVA, P < 0.05) (Table 3).
 205 The relationship between the antioxidant capacity by DPPH, FRAP and TAC with the concentrations of
 206 TPC, TFC and CT was moderate only between DPPH-TPC (r = 0.7196) and TAC-CT (r = 0.7364). On the
 207 other hand there was no correlation.
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224

Phenolic compounds are often produced and accumulated in subepidermal tissues of plants exposed to stress
 and pathogenic attack; their concentration tends to increase during the season, since from its geographical
 distribution, and could change during the different developmental stages (Ozgenel et al. 2007). The TPC in
 green fruits of *M. strobilata* agrees with the results obtained by Jaleel et al. (2009) in *Albizia* species and by
 Laksh et al. (2010) in *Pisonia* species. Higher concentrations in green fruits, as obtained in the QFS and
 QFC extracts, is due to the concentration of tannins in early stages of development (Kim et al. 2002), as a
 strategy used by the plant to make it less attractive to herbivores (Jordano 2000). The magnitude of total
 flavonoid and water-soluble polyphenol concentration of flavonoids and condensed tannins in plants (Aguiar
 and Tardío 2010; Bhowar et al. 2003). *M. strobilata* samples from Simola showed higher concentrations in total
 phenolic acids related to the higher UV-B radiation (Solomonson 2003). In addition, the TPC in the BS extract
 was higher than that reported by Lencover et al. (2012) for the water-soluble extract of the herb
 of the same species found in Brazil, whereas for the BC extract the difference amounted up to 47% (Simola
 data report, total phenolic concentration (TPC) in *M. strobilata* is higher than *Salvia composita* and *Ornitho-
 ceras* (Crisse et al. 2013; Zanetti et al. 2012). *Acacia gossypifera* and *Sidaean nigra* (Alum et al. 2012;
 Rinaldi et al. 2011), *Koeleria cristata* and *Physalis peruviana* (Chang-Liang et al. 2010) from two hot zones
 for their high polyphenol concentration. Higher flavonoid concentrations were obtained in LC and BS than

<http://mc.manuscriptcentral.com/jpe>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

225 feature is due to the fact that phlor compounds these compounds as a precursor in leaves and bark, in which
226 vascular tissues contribute a secondary substance system that becomes activated by UV radiation,
227 breaking and hydrolyzing (Aguiar et al. 2013; Aguiar and Tadini 2010; Ingersoll et al. 2010;
228 Johnson-Tilli et al. 2010; Kowalski-Bobylewicz et al. 2010). Focused on the phytochemical role of flavonoids in *M.*
229 *leucocarpa* and *M. leucocarpa*, these data may present similar concentrations at different habitats and solar irradiance
230 values.
231 Phenolic acids and flavonoids like Quercetin-3-O-glucoside and Kaempferol-3-O-glucoside were mainly
232 accumulated in green parts, this could result of reaching young fruits with saccharose ones. The four groups
233 differed chemical composition at each stage of development going from high concentration of polyphenols,
234 proteins, lipids and acids in the early stages to the opposite during maturity (Ayres and Kikvidze 2011;
235 Pavesio and Caputo 2013; Hobbie et al. 2013). The results showed the components of all the four
236 collected samples in the same direction that phenolic composition. On the other hand, phytochemicals,
237 which play a protective role against various pathogens of wood and bark, were found only in the bark of
238 *Abies balsamea* (Mill.) (Mill.) (Bark) and *Thuja occidentalis* (L.) (Bark) (Cannon and El-Shehry et al.
239 1999), whose species the presence of leaves and four diphenylmethane in the bark of the same species. The
240 presence of these compounds clearly indicates their specific function in the tree. Our results suggest that the
241 phenolic composition of the bark of this species is more complex and that, besides diphenylmethane and
242 flavonoids, some phenolic acids and flavonoids like quercetin-3-O-glucoside may be accumulated.
243 Remarkable differences in the phenolic composition between the samples from Slovakia and those from
244 Champagne were found and phenolic profiles have been reported in matured olives markets at specific and
245 intraspecific level (Ahneman-Albertin et al. 2013; Vidal et al. 1999). These differences found between the
246 samples from Slovakia and Champagne, which belong to the same species according to a morphological basis,
247 suggest that they may represent two chemotypes. Nevertheless, more studies focused in the chemotypes
248 should be carried out to define which one is present in the *M. leucocarpa* phenolic extract.
249 Phenolic compounds possess antioxidant activity and such activity in the analyzed system is due to the type
250 of compound (Oprea et al. 2006) which due to their redox properties, they play an important role in the
251 absorption and metabolism of free radicals by decreasing peroxide and oxidizing the oxygen radicals and
252 highly stable (Zhang and Wang 2011). The higher antioxidant capacity depicted by the BS extract through

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

253 DPPH1 reduction correlates with previous findings in *M. leucocarpa* bark (Lamoureaux et al. 2012), as well as in
254 other woody plant species (Silva et al. 2003; Wang et al. 2006) and this could be directly
255 related to the presence of phenolic acids and flavonoids in the system (Aguiar et al. 2005). The
256 antioxidant capacity determined by the DPPH1 method correlated weakly ($r = 0.7196$)
257 with TPC, but not with the TFC and CT concentrations. The LC showed the highest concentrations of TFC
258 and TFC besides the highest antioxidant capacity by TPC and TFC. The antioxidant capacity by TPC and TFC
259 TPC are related to high concentrations of flavonoids and condensed tannins in leaves (Cannon and El-Shehry et al.
260 2010; Zhang and Lan 2010). The high relationship among concentrations of TFC, TPC, CT and reducing
261 concentration of TPCAT in most of the cases and up to the relationship between the concentration of CAT
262 and TPC, CT and TFC there was only a moderate relationship between the latter and CAT (Zhang and
263 0.6333). (Zhang and Lan 2010). The high relationship among concentrations of TFC, TPC, CT and reducing
264 acid and phenolic derivatives (compounds 2, 4, 11, 16, 18, 24 and 26) confirm antioxidant capacity even at
265 low concentration. This can be explained as they influence by the phenolic composition of the extract rather
266 than its concentration. Zhang and Sun (2007) and Tavares (1999) reported that reactive phenolic hydroxy
267 groups, particularly flavonoids with *O*-hydroxy groups in 3 and 4 are related with an important
268 antioxidant capacity. This factor contributes a very effective system to prevent the potential photooxidation by
269 excessive damage of solar radiation (Ahneman-Albertin and Duarte B. et al. 2013; Bagnoli et al. 2007) and the stimulation of
270 ROS production in cells by ultraviolet during photosynthesis (Lamy 2006; Foyer and Hodges
271 2000). The antioxidant capacity of the extracts depends on the chemical structure of the phenolic compounds
272 present in the system, such as the number and localization of the hydroxy groups in the ring of flavonoids
273 and phenols (Fleming et al. 2002; Lam et al. 1999). This improves the capacity of plants to defend themselves
274 and eliminate other ROS (Ojonomwesi and Kikvidze 2012), and the variation in the antioxidant activities
275 found for the different tissues of *M. leucocarpa* from different geographical regions may be associated to
276 variation in their phenolic composition. These same differences in phenolic and flavonoid composition have
277 been reported for other species of *Pinus* (Bertini and Bernal et al. 2014).

278 **Conclusions**
279 Data presented in this paper showed that chemical extracts obtained from *Abies balsamea* (Mill.)
280 (Mill.) (Bark) and *Thuja occidentalis* (L.) (Bark) and condensed tannins that provides an antioxidant capacity

10
11

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

281 within acceptable range. Their concentrations vary among the extracts and between the two populations
282 because of their geographical location, under different climate conditions, soils, and vegetation. The results
283 presented of the fruit, leaves, and bark extracts of *M. roseana* are a source of phenolic compounds and
284 flavonoids with antioxidant capacity that may help and prevent disease generated by the substrate formed in
285 areas during conditions of food, exposure to UV radiation, or by the consumption of tobacco and alcohol.
286 This work supplies important information on the phenolic content, antioxidant and detoxifying capacity of the
287 extracts obtained from *M. roseana*, which by means of sustainable collection could become a practical
288 alternative as a source of antioxidant and metal chelating
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306

References
 290 We thank the EIR (GDP 2016/199), FOMEX-CAMPESIN (Gry14/201) and CONACYT-BEHEM
 291 TERAUTICAE (Gry14/201) for financial support. In addition to the FOMEX-CAMPESIN for grant scholarship
 292 to one of the authors and the anonymous reviewers whose constructive remarks improved the manuscript.
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306

Agarwal M, Sharma-Bhargava S (2007) Photo- and antioxidant protection and salicylic acid
 accumulation during post-anthesis seed senescence in *Caesalpinia katigera* grown under
 Mediterranean climate. *Physiology Plant*, 131:590-598.
 Agarwal G, Arzavalo F, Pollani S, Tariol M (2012) Flavonoids as antioxidants in plants:
 Location and functional significance. *Plant Science*, 198:67-76.
 Agarwal G, Ibrahim C, Di Ferdinando M, Tariol F, Pollani S, Tariol M (2013) Functional
 roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant
 Physiology and Biochemistry*, 72:33-45.
 Aguiar G, Tadini M (2010) Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New
 Phytologist*, 186:786-795.
 Agromonoff G, Chen F-A, Venkatesh V, Kuo DH, Shen PC (2008) Evolution of
 Antioxidant Polyphenols from Selected Mangrove Plants of India. *Asian Journal of
 Chemistry*, 20:1311-1322.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

307 Alun MN, Roy S, Mohammad Aminuzzaman S, Rafiquzzaman M (2012) Antioxidant
 308 activity of the ethanolic extracts of leaves, stems and fruits of *Sida acuta* Wight.
 309 *Thermopsis Communications*, 2:67-71.
 310 Ali H, Khan E, Sجاد MA (2013) Phytochemical and heavy metal—Concepts and
 311 applications. *Chemosphere*, 91:369-383.
 312 Alvarez-Abarca N, González-Esteban MS, Campos NG, Ayala-Sánchez ZE, Delgado-
 313 Alvarado EA, Astle-Reyes JA (2013) Variability of the chlorophyll profiles of the
 314 *Agave watermelon complex* (Agavaceae). *Botanical Sciences*, 25:5-806.
 315 Anugweni CI, González-Carrión JA, Martínez H, Nasser JM (2011) Nocturnal abscisic
 316 (Noctilonin), a potential seed disperser in disturbed tropical dry forest habitats.
 317 *Acta Oecologica*, 32:189-194.
 318 Anush K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and
 319 their functions. *Plant Physiology*, 141:391-396.
 320 Amussou M, Georgeton S, Yamoussa K (2011) Total phenolic and total flavonoid
 321 contents, antioxidant capacity and biological constituents in medicinal herbs.
 322 *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 46:81-88.
 323 Aydın N, Kadıoğlu A (2001) Changes in the chemical composition, polyphenol oxidase
 324 and peroxidase activities during development and ripening of medlar fruits
 325 (*Malus germanica* L.). *Bulgarian Letters of Plant Physiology*, 27:85-92.
 326 Babu TS, Akhtar TA, Sampi MA, Tripathi R, Dixon DG, Greenberg BM (2003)
 327 Similar stress responses are elicited by Copper and Ultraviolet Radiation in the
 328 aquatic plant *Lemna gibba*: Implication of Reactive Oxygen Species as common
 329 signals. *Plant and Cell Physiology*, 44:1320-1326.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- 330 Balick MA, Arveyo R (2015) Messages from the Guide: A Guide to the Useful Plants of
Belizel[®] (eds). Oxford University Press, pp 568
- 331
- 332 Baucqre D, Chahradari S, Hazru AK, Baucqre S, Rey J, Malherve B (2008) Antioxidant
activity and total phenolics of some mangoes in Soudanbous. *African J Biotech*,
7:307-310.
- 333
- 334
- 335 Barrios-Bernal LG, Alvarez-Abarca N, Delgado-Alvarado EA, Galindo-Velazquez T,
Ayala-Rivera JA, Torres-Morán MI, González-Elizalde MD, Herrera-Artien Y
(2014) Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of
Agave durangensis (Agavaceae). *Czech Journal of Food* 12:105-114.
- 336
- 337 Berg CC (2001) *Mango, Avocado, and Durian* (Moraceae): with introductions to the
family and *Ficus* and with additions and corrections to Flora Neotropica[®] (eds)
Flores neotropicas: Monograph no. 85. Bronx, N.Y.: Organization for Flora
Neotropica by the New York Botanical Garden, pp 346.
- 338
- 339 Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berist C (1995) Use of a free radical method to evaluate
antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28:23-30.
- 340
- 341 Campos Mdc, Marthian RN (2007) Structure information from HPLC and on-line
measured absorption spectra: Flavones, Flavonols and phenolic esters[®] (eds).
Cointera Empresa da Universidade de Coimbra.
- 342
- 343 Capriles-Barradas A, Moreno-Casasola P, Deiro O (2006) Fertilized and Seed
Removal by the Crab *Georchinus lateralis* in a Coastal Forest in Veracruz, Mexico.
Biotropica, 38:203-209.
- 344
- 345
- 346
- 347
- 348
- 349
- 350
- 351
- 352
- 353

<http://mc.manuscriptcentral.com/jpe>

14

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- 354 Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chen J-C (2002) Estimation of Total Flavonoid
Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of
Food and Drug Analysis*, 10:178-182.
- 355
- 356
- 357 Chavez GM, Cebal-Bascarras J (2013) Dietary Flexibility of the Brown Howler
Monkey Throughout its Geographic Distribution. *American Journal of
Primatology*, 75:16-29.
- 358
- 359
- 360 Dancer C, Tonati L, Guan f, Ordemir R, Topuz A, Salin-Andersen H, Tugulu-Ay S, Galinski
R (2013) Phenolic composition and antioxidant activity of *Salvia tomentosa* Miller:
effects of cultivation, harvesting year, and storage. *Turkish Journal of Agricultural
and Forestry*, 37:561-567.
- 361
- 362
- 363
- 364 El-Solily HN, Joshi A, Li XC, Kosa SA (1999) Flavonoids from *Medicago thapsus*.
Phytochemistry, 52:111-115.
- 365
- 366 Fawole OA, Oparua UL (2013) Seasonal variation in elemental composition, amino volatiles
and antioxidant capacity of portuguese dining fruit development African Journal
of Biotechnology, *African Journal of Biotechnology*, 12:4006-4019.
- 367
- 368
- 369 Foyce C, Noctor G (2000) Oxygen processing in photosynthetic regulation and signaling.
New Phytologist, 146:329-338.
- 370
- 371 Higda Z, Holmann J (2013) An ethnopharmacological survey of the traditional medicine
utilized in the community of Forvenc, Lago Parana Indian Reservation, Bolivia. *J
Ethnopharmacol*, 149:838-847.
- 372
- 373
- 374 Halliwell B, Gutteridge JM (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human
disease: an overview. *Biochemical Biophysics*, 186:1-85.
- 375

<http://mc.manuscriptcentral.com/jpe>

15

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

376 Hummel Y, Ogawa S, Fukui S (1994) The correlation between active oxygen scavenging and antioxidant effects of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, **16**:845-850.

377
378
379 Heim KE, Tagliero AR, Babilys DJ (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, **13**:372-384.

380
381
382 Hopkins A, Stepp J (2012) Distribution of Herbal Remedy Knowledge in Tsh, Vietnam, Mexico. *Economic Botany*, **66**:219-234.

383
384 Hughes N, Morley C, Smith W (2007) Coordination of antioxidant decline and photosynthetic maturation in juvenile leaves of three deciduous tree species. *New Phytologist*, **173**:175-183.

385
386
387 Holt-Vassavag S, Lewis-Lujan LM, Rivera-Chavezela EG, Gil-Salido AA, Acosta-Silva AL, Metz-Cueto CY, Rubio-Frino JL (2013) Effect of maturity and harvest season on antioxidant activity, phenolic compounds and ascorbic acid of *Meriania caribaea* L. (noni) grown in Mexico (with trunk change). *Applied Journal of Biotechnology*

388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399

12-1630-1639

Ingersoll CM, Nieschbaum RA, Weigle CE, Lehman JH (2010) Total phenolics and individual phenolic acids vary with light environment in *Lindera kelsoensis*. *Biology*, **98**:1007-1010.

Jabopi J, Vaheri R, Tompar F (2009) Estimation of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. *Acta Agrariae Scientiarum*.

Jordano P (2000) Fruits and longevity. Chapter 6. In (Ed. Fenner, ed) *Seed: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. Wallingford, UK: CAB, pp 125-166.

16

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

400 Julkunen-Tiljo R (1983) Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **33**:213-217.

401
402
403 Julkunen-Tiljo R, Neander N, Neugart S, Robson M, Agari G, Vepsäläinen J, Zepol G, Nyhultén I, Winkler B, Jansen MAK (2014) Assessing the response of plant flavonoids to UV radiation: an overview of appropriate redoxpairs. *Physiochemistry Reviews*.

404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423

Kim SK, Oh JR, Shim WJ, Lee DH, Yim JH, Hong SH, Shim YH, Lee DS (2002) Geographical distribution and accumulation feature of organochlorine residues in bioherbs from coastal areas of South Korea. *Marine Pollution Bulletin*, **45**:268-279.

Kuwalta JE, Franklin E, German B, Kramer J (1996) Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **70**:53-61.

Labbe M, Peña A, Sauer C (2010) Antioxidant capacity and phenolic composition of juices from pomograntes stored in refrigeration. In International Conference on Food Innovation 2010, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain; pp 25-29.

Lamontier KC, Cunha LCS, de Moraes SAL, de Aquino FTT, Chang R, do Nascimento FA, de Souza MGM, Martins CHG, Cunha WR (2012) Chemical Analysis and Study of Phenolics, Antioxidant Activity, and Antibacterial Effect of the Wood and Bark of *Machaonia tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2012**.

Liang-Jiang Z, Yi-Ming L, Hai-Chun Z, Shu-Dong W, Jin-Hong C (2010) Condensed Tannins from Mangrove Species *Kandelia candel* and *Rhizophora mangye* and their Antioxidant Activity. *Molecules*, **15**:420-431.

17

http://mc.manuscriptcentral.com/jpe

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- 424 Len EJ, Rao S, Bai H-H, Wang R (1999) Quantitative structure-activity relationship
analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 26:285-294.
- 425 Mabry TJ, Mathum SR, Thomas MB (1979) The systematic identification of
phenols (ed), Springer-Verlag.
- 426
427
428 Martin PS (1998) *Casley's R-o Mayo Plant: The Tropical Deciduous Forest & Ecoregion of*
Northwest Mexico. In (Eds. series, ed ed), University of Arizona Press.
- 429
430 Ozyun M (1986) *Indice on products of bromine reaction antioxidative activities of*
products of bromine reaction prepared from glucomann. *The Japanese Journal of*
Nutrition and Biochemistry, 47:1307-315.
- 431
432
433 Ozyuna SBO, Souza LAd, Badolati DC, Saragiotto ML, Silva AA (2013) *Preyfish*
Heterocyclic from *Marstonia heterocycla* (Falkl, *Quilaja* *Planz*, 86:800-812.
- 434
435 Ozyun M, Kahrman MV, Erum O (2007) Relation between esplan age, total phenols and
regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *African*
Journal of Biotechnology, 6:803-808.
- 436
437
438 Pennington TD, Santolita J (1966) *Aditivos repletivos de Mexico: manual para la*
identificación de espec de los principales edibles. Instituto Nacional de
Investigaciones Forestales.
- 439
440
441 Prieto P, Pinoch M, Aparicio M (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant
capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific
application to the determination of Vitamin E. *Food Chemistry*, 249:337-341.
- 442
443
444 Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of
antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food*
Chem, 53:1820-1832.
- 445
446
- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- 447 Rosli S, Hamid K-H, Kurniyaningrum N (2011) Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxicity
Activities of *Acacia gonggala* (L.) Willd. Leaves Ethanolic Extract
- 448
449 *Pharmazie Journal*, 65:50-58.
- 450
451 Rzedowski J (1978) *Vegetation types of Mexico: floras of vegetation de*
Mexico (ed), Mexico, D.F. Limusa-Whitney.
- 452
453 Siddhartha P, Becker K (2003) Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total
Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of *Dunalia*
Tree (Acrocydonia indica) Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
51:2114-2155.
- 454
455
456 Siguenza-Panor AJ, Muro-Prieto S, Balle E, Cano-Lamadrid M, Carbonell-Barrachina AA
(2015) Phytochemical assessment of *Gomphrena globosa* and *Zinnia elegans*
grown in arsenic-contaminated hydroponic conditions as a safe and feasible
alternative to be applied in arsenic-contaminated soils of the Bengal Delta.
- 457
458
459
460 *Environmental Monitoring and Assessment*, 187:1-9.
- 461
462
463
464
465
466
467
468
469
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and
other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *JA*
In (O' Leary, ed ed) *Methods in Biotechnology Academic Press*, pp 152-178.
- 465
466
467
468
469 Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdate-
Phosphotungstate Acid Reagents. *American Journal of Botany and Vascular*
16:114-118.
- 467
468
469 Solarteiro SADCY (2003) Global, direct and diffuse irradiance on horizontal and inclined
surfaces and DNI for the Mexican Republic. *Universidad global, directa y difusa en*
superficies horizontales e inclinadas, así como radiación directa normal para la

- 470 República Mexicana (S.A.D.C.V., SOLATRONIC, ed. Chihuahua, Mexico.
- 471 México.
- 472 Solovchenko A (2010) Fluorescence in Plants: Optical Sensing-based Mechanisms.
- 473 Springer, Berlin, Germany, pp 170.
- 474 Synonowicz M, Kucharski M (2012) Terpenoids and their properties to form stable
- 475 complexes. *Biochemistry and Food Science*, 7:638-41.
- 476 Teye B, Robinson M, Alshida HA, Salomon A (2006) Screening of the antioxidant potential
- 477 of the *Carum papaya* from Turkey. *Food Chemistry*, 95:208-204.
- 478 Yano J (1999) Dietary thiosinols as plasma antioxidants on lipid peroxidation.
- 479 Significance of metabolic conversion. In: G. Packer, M. Hiramoto, A. T.
- 480 Yoshikawa, ed (ed). *Antioxidant Food Ingredients in Human Nutrition*. Diego, CA:
- 481 Academic Press, pp 245-268.
- 482 Tomson HJ, Segredo MA, Magalhães LM, Barron L, Queiroz J, Cunha LM (2015)
- 483 Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant
- 484 properties. *Industrial Crops and Products*, 74:397-406.
- 485 Vail M, Beckler G, Hillier G, Pinner K, Cleaver H (1995) Independent and interactive
- 486 variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. *Phytochemistry*,
- 487 38:881-891.
- 488 Wang SY, Wu JH, Cheng SS, Lo CH, Chang HN, Shyan LR, Chang ST (2004) Antioxidant
- 489 activity of extracts from *Calceolaria flaccida* Hoff. bark, and heartwood. *Journal*
- 490 *of Medicinal Chemistry*, 46:422-426.
- 491 Yehua D, Van Dermeer T, Van Dermeer T (2002) *Mago Ethnobotany: Land, History,*
- 492 *and Traditional Knowledge in Northwest Mexico* (eds). University of California
- 493 Press, pp 372.

<http://www.manuscriptjournal.com/2016>

20

- 491 Zhang J, Shen S (1997) Antioxidant activities of basilic, green tea polyphenols and
- 492 vitamin E *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Nutrition and Biochemistry Medicine*,
- 493 7:79-89.
- 494 Zhang L, Li X (2000) Tannin from *Cassipouira alata* with potent antioxidant activity.
- 495 *Journal of Biological Chemistry*, 275:10627-30, 9:407-415.
- 496 Zheng W, Wang SY (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs.
- 497 *J Agric Food Chem*, 49:1504-1510.
- 498 Zulkifli KS, Norbani A, Samah A, Wan Sulaiman K, Wan S (2012) Bioactive
- 499 Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Selected Pine Folia.
- 500 *International Proceedings Chemical, Biological & Environmental*, 49:66.
- 501
- 502
- 503
- 504
- 505
- 506

<http://www.manuscriptjournal.com/2016>

21

1 ENCAPSULATION OF *Achirus thornei* BARK EXTRACT AND FISH OIL BY SPRAY DRYING

2

3 J. S. Diaz¹, L. Abundia Beltrán², N. Abumayyeh³, A. Luna González⁴, C. Romero González⁴, J. Jiménez

4 Cuzman⁴, H. A. González Campuz⁴

5

6 ¹Instituto Politécnico Nacional-Centro Investigaciones de Investigaciones Regionales-Instalación Regional-Instalación

7 ²Departamento de Estudios Posgrado 202, Col. San Jerónimo, C.P. 81101, Querétaro, Querétaro, México

8 ³Departamento de Estadística e Investigación en Alimentos, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional,

9 ⁴Cajon de Ajusco, C.P. 1140 México, D.F., México

10 ¹Instituto Politécnico Nacional-Centro Investigaciones de Investigaciones Regionales-Instalación Regional-Instalación

11 ²Departamento de Estudios Posgrado 202, Col. San Jerónimo, C.P. 81101, Querétaro, Querétaro, México

12 ³Departamento de Estadística e Investigación en Alimentos, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico

13 ⁴Cajon de Ajusco, C.P. 1140 México, D.F., México

14

15 **Abstract**

16 By spray drying, three different microcapsules containing *Achirus thornei* bark extract (DE) and fish oil in concentration of 0.25,

17 0.50 (DE0.25) and 1.00 (DE1.00) mg/mL, respectively, were obtained under conditions of inlet and outlet drying air temperature of 120 °C

18 and 60 °C. The microcapsules showed spherical and smooth surface, an average size of 21.27 μm (SD: 4.81) and 4.21 μm in DE0.25 and

19 DE0.50, respectively. Total phenolic content (TPC) was 273.25 mg BA/Dry microcapsules, total flavonoid (TF) 90.63 mg/Dg

20 microcapsules and condensed tannins (CT) 99.49 mg/BA/Dg microcapsules and total antioxidant capacity by reducing method

21 (FRAP) 55 mgBA/Dg (FRAP) microcapsules and low reduction power (FRAP) 10.99 μmol/L microcapsules were higher in all

22 cases for DE0.50.

23

24 **Keywords:** *Achirus thornei*, phenolics, antioxidant capacity, fish oil, spray drying, microcapsules

25

26 **Introduction**

27 *Achirus thornei* (L.) Steud. (Moraceae), named here as a medicinal plant from the dry forests of tropical America (Vélez

28 et al., 2001). A tea made with the bark eliminates discomfort in the throat and mouth; the resin is used as pain relief in

29 bark extract and decayed teeth (Fighin & Trabasso, 2012). Among the most important chemical constituents isolated from the

30 bark extract are flavonoid, xanthones, flavones and diacetic glycosides; these compounds have anti-UV and anti-fungal

31 activity, besides a remarkable antioxidant capacity (El-Saidy et al., 1999, 2001; Crowder et al., 2001; Chah et al., 2003),

32 Lamourer et al., 2012; Olyana et al., 2013). The phenolics are highly sensitive to light and heat, the best way to protect

33 them is transform them into microcapsules by spray drying technique, this way the water content is decreased resulting in a

34 powder with improved physicochemical properties, more manageable and with a longer life (De G., 1998; Chavallat et al.,

35 2007). On the other hand fish oil containing a high amount of n-3 fatty acids polyunsaturated which have been reported as

36 beneficial action on human health; however, excessive incorporation of these into processed foods is somewhat limited due

37 to low solubility in most food systems and excessive sensitivity to oxidation (Trush et al., 2007). In that sense the

38 microencapsulation technique is the most applicable, allowing stable liquids and gases can still be locked in sealed capsules

39 may release their contents at controlled rates under specific conditions (Clayport and Huang, 2008; Tang and Bhattach,

40 2010). The main reasons for encapsulation are: isolating the core of the harmful effects of oxygen, retard evaporation of

41 volatile core, control the rate at which it is released from the capsule, improve the handling properties of different materials,

42 reduce core reactive eluting and finally eluting the core materials when used in small amounts (Shahid and Han, 1993;

43 Chavallat et al., 2007). Furthermore, in the case of microencapsulation of bioactive lipids (Matsuno and Adachi, 1993)

44 have reported several advantages including slow autoxidation, improve stability and mask the flavor and aroma of the lipid

45 ingredients. Spray drying has been considered as a solution to the conventional problems of drying because the process has

46 proven to be not only efficient but also one of the most common and economical techniques to prepare food products

47 encapsulated an compared to the lyophilization (Luna 20 or 50 times cheaper (Matsuno, 1979; Deebiy et al., 1997). Among

48 the most commonly used materials for encapsulation by spray drying include maltodextrin which provides a good oxidative

49 stability to the encapsulated oil but exhibits poor emulsifying capacity, emulsion stability and low oil retention and the

50 water gain is most preferred as coating material for encapsulating lipid substances than maltodextrin because it produces

51 stable emulsions with most oil over a wide pH range and also because it is a wide film on the surface of oil (Bertalmio

52 and Vernon-Carter, 1993). The aim of the study was to evaluate the phenolic concentrations and antioxidant capacity of

53 *Achirus thornei* bark extract alone and three microencapsulated based on maltodextrin, gum Arabic, and fish oil in two

54 different concentrations.

55

56 **Methodology**

57 **Plant materials**

58 Bark samples were obtained from 10 reproductive trees in Culiacán, Sinaloa, México (24° 52' 52.39" N and 107° 17' 47.53"

59 W), after dried were pulverized and bark extract was obtained measuring 5 g of powder in 50 mL of methanol 50%
 60 (MeOH), besides the obtained microcapsules were obtained in methanol (1g 50 mL) in order to determine the concentration

61 of total phenols (TPC), total flavonoids (TF), and condensed tannins (CT) and antioxidant capacity by ferric reducing power

62 (FRAP) and total antioxidant capacity (TAC). In both cases the bark powder mixes with alcohol and drying the

63 microcapsules remained in the dark for 24 hrs (Shimada, et al., 2007). To obtain the microcapsules prepared 1 L bark extract,

64 diluting 100 g of bark powder in 1 L of ethanol 50% (MeOH), then allowed to stir for 24 hrs and to remove solids filtered

65 in analytical sieve with an opening of 50 μm (WSTyler[®], USA) to subsequently keep it protected from light in amber jars.

66

67 **Encapsulating materials**

68 Core materials were bark extract and fish oil (Prescuderia Mora, S.A. de C.V., Veracruz, México). Gum arabic food grade E

69 (Aldrich), Gum Arabic (Walt S. A. de C.V., Mexico, DF), and maltodextrin DE 10 (Chemistry LEBE S. A. de C.V., Mexico, DF),

70 were used as coating materials.

71

72 **Total Phenolic Content (TPC)**

73 Following Folin-Ciocalteu method (Singleton and Bond, 1963) mixed 250 μL of extract, 2500 μL of deionized water, 125

74 μL of Folin reagent (Sigma[®]) and 375 μL of Na₂CO₃ (Remont[®]). The mixture was agitated and left to react in darkness for

75 2 hrs. Later, the absorbance of samples was read at 760 nm in a spectrophotometer (Optizen[®] POP UV/Vis, Spectra Service

76 Inc.). A standard curve was prepared (A₇₆₀=0.0472-0.1167 [gallic acid] correlation coefficient r = 0.9943), with gallic acid

77 (Signal₁) at different concentrations (0.5, 1.0, 1.5, 3.0, and 4.5 µg/mL). Absorbance values were substituted in the equation
 78 and the results were integrated to the used dilution factor and expressed as milligram equivalents of gallic acid/g bark powder,
 79 and microcapsules (mg/GA/g).
 80
 81 **Total flavonoids Content (TFC)**
 82 Following the method of Chung et al. (2003), an aliquot of 50 µL of extract was mixed with 900 µL methanol and 50 µL
 83 AlCl₃ reagent prepared with 0.3 g AlCl₃ (Signal₁) mixed with 10 mL of methanol (Reagent₁). The mixture was agitated
 84 and the absorbance was read at 425 nm. A calibration curve (A₄₂₅=0.0414-0.0119 [µg/extract] correlation coefficient
 85 r=0.9995), was made with different quercetin concentrations (0.253, 1.26, 2.50, 5.0, and 10 µg/mL). The results were
 86 adjusted to dilution factor used and expressed as milligram of quercetin (Signal₁), equivalents per gram of bark powder
 87 and microcapsules (mg/GA/g).
 88
 89 **Condensed Tannin Content (CT)**
 90 By the Infusino-Tinco (1982) method, mixing 50 µL of extract with 1.5 mL of 4% vanillin (Tiscina Química, Mexico)
 91 prepared with methanol and 750 µL concentrated HCl (Reagent₁). The mixture was agitated and led to react in darkness at
 92 room temperature for 20 min. Absorbance was read at 560 nm. A calibration curve (A₅₆₀=0.0128-0.027 [µg/extract]
 93 correlation coefficient r=0.9940), was prepared with different concentrations of catechin (0.50 to 10 µg/mL). The results
 94 were expressed as milligram equivalents of catechin (Signal₁) per gram of bark powder, and microcapsules (mg/GA/g).
 95
 96 **Total antioxidant capacity (TAC)**
 97 Following the procedure of Prieto et al. (1999), mixed 100 µL of sample with 1000 µL of ascorbic acid solution in Epiproduct
 98 tubes and incubated in a thermostatic (Thermolyne® Dry Bath D125125) during 90 min at 95 °C. After cooling in darkness
 99 at room temperature, absorbance was read at 695 nm. A calibration curve (A₆₉₅=0.0729-0.0747 [µg/gallic acid] correlation
 100 coefficient r=0.9917), was prepared with different concentrations of gallic acid between 0.3, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, and 10
 101 mg/mL. Results were expressed as milligram equivalents of gallic acid per milliliter of bark extract, and microcapsules
 102 (mg/GA/mL).
 103
 104 **Ferric reducing antioxidant power (FRAP)**
 105 Using the Oryzalin (1986) procedure with some modifications, 1 mL of 0.5, 2.5, and 5.0 µL of the sample were supplemented
 106 with 7.5, 7.5, 5.0, and 2.5 µL of 100% ascorbic acid in assay tubes. Afterward, 4.50 µL of phosphoric buffer (0.2 M, pH 6.5) and
 107 1250 µL 30 mM of potassium ferrioxalate (ferromol[®]) were added to each tube, incubating the mixture in a thermostatic
 108 for 20 min at 50 °C. Samples were cooled in darkness at room temperature, then 1250 µL of 0.6 M of hydrochloric acid
 109 (Akonterg[®]) was added and tubes were centrifuged (Heraeus[®] 2215MX Labortechnik, Germany) for 10 min at 2500 rpm
 110 at 25 °C. Afterward, 625 µL of the supernatant were taken and mixed with 625 µL of deionized water and 125 µL 6 mM
 111 ferric chloride (Reagent₁). Absorbance was read at 700 nm. A calibration curve (A₇₀₀=0.0711-0.1037 [µg/gallic acid]
 112 correlation coefficient r=0.9965) was prepared with four concentrations of ascorbic acid (10-40 µL combined with a volume
 113 of methanol in order to reach 1 mL as final volume). The results were expressed in terms of µg/g as milligram equivalents
 114 of ascorbic acid per milliliter of bark extract and microcapsules (mg/GA/mL).
 115

116 **Microcapsules preparation**
 117 Three emulsions were prepared with homogenizer (IKA Ultramixer[®] T18 Basic, Wilmington, USA) at a speed of 20000
 118 rpm, 9 L L bark extract, 112 g maltodextrin DE 10 and 100 g of water gum, in addition to 25 mL and 50 mL of fish oil,
 119 respectively for the microcapsules ES, EP025 and EP050. The emulsions were protected from light at 22 °C for 12 h to
 120 allow complete hydration. The operation conditions of the spray dryer equipment (Möbiel Miniro[®] 2004, CIFA Siro,
 121 Denmark) were carried out at inlet and outlet drying air temperatures of 120 °C and 60 °C (Ashrafy, 1993), 0.8 bar of
 122 atomization pressure in ES, EP025 and EP050 respectively, using a pistonic pump (Watson-Dalrymple, UK, model 5285)
 123 a co-current arrangement, and a dual spray nozzle fluid with an internal diameter of 2 mm (206518 Möbiel Miniro[®] CIFA
 124 Siro, Denmark). Samples of the powders obtained directly from the cyclone were deposited in aluminum bags with anti-light
 125 and stored in a desiccator for analysis and use (Pereira et al., 2013).
 126
 127 **Morphology and size of the microcapsules**
 128 Morphology was determined by scanning electron microscopy (SEM-EDX, 3D Quanta FEG[®] F4100, FEI Co, USA) for which
 129 samples were analyzed in mounted, low vacuum sputtering images 500x, 1000x and 3500x (Bazzzali et al., 1998), whereas the
 130 average size of the microcapsules was determined by treatment 1 g of each powder in the particle size analyzer (Chas[®]
 131 particle size analyzer 1090, USA) using the Size Expert V9.93[®] software.
 132
 133 **Moisture content**
 134 Was determined by weight loss of 1 g sample of each encapsulated at 70 °C for 12 h in a vacuum oven (GC/AVC method
 135 923.09), using the formula (Ferreira et al., 2009):
 136
$$C\% = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (1)$$

 137 Where C% is the percentage of moisture content, W₁ is the initial weight of sample and W₂ the final weight of the same
 138 sample.
 139
 140 **Water activity (a_w)**
 141 Was determined in the Aquapha-417[®] (Decagon Devices Inc., USA) using 1 g sample placed in the measuring chamber in
 142 which a film, an infrared transducer that takes the temperature of the sample and dew point sensor takes the temperature
 143 of the air located there (Pillado and Alvim, 2002).
 144
 145 **Hygroscopicity**
 146 Was determined spreading 1 g powder on Petri dishes to allow a wide contact surface between the air and dust. Samples
 147 were placed in a desiccator at 25 °C and 70% relative humidity using NaCl solution (Coker and Tai, 2000). After one
 148 week were weighed and hygroscopicity was calculated with the equation:
 149
 150
$$H\% = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100 \quad (2)$$

 151
 152

153 Where $W\%$ is percentage of hygroscopicity, a is the amount sample (g), p moisture sample before exposure to relative
 154 humidity (g) and Wf is the increase in the moisture content of the powder (g).
 155
 156 **Wetting and dissection time**
 157 By static wetting as described in the FTI method (1985) with some modifications 1 g powder was placed on 10 mL of
 158 water. The time required in minutes for all particles immersed was recorded (Ghani et al., 2010). The dissection time was
 159 determined adding 2 g sample in a beaker with 100 mL capacity containing a volume of 50 mL of distilled water at 22 °C.
 160 The capsule was stirred at 700 rpm on a grill with magnetic stirring using a magnetic bar 2 mm x 10 mm (Foshl and
 161 Adhigunwo, 2005).
 162
 163 **Bulk density (ρ_b) and packed density (ρ_p)**
 164 The bulk density (ρ_b) was determined from the mass of test samples and the volume occupied by each uncompact in a
 165 test tube of 10 mL, while the packed density (ρ_p) determined by the material paker 100 times 5 cm from the surface to the
 166 compaction into a 10 mL beaker. Calculating both densities was obtained by recording the weight of the materials and the
 167 volume occupied of uncompact and compacted, to then split the sample volumes between the volume occupied by them
 168 (Jumah et al., 2006; Micro Analytical Methods, 2009). From the data obtained from V_p and V_b can index (CT) was calculated
 169 (Eq. 3) to evaluate the flowability of the powder (compressibility and friction) and the Hausner ratio (HR) (Eq. 4) (Hanson-
 170 Chongwe et al., 2005; Chongwe et al., 2009).
 171
 172
$$CT = 100 \frac{(V_b - V_p)}{V_p} \quad (3)$$

 173
 174
$$HR = 100 \frac{\rho_b}{\rho_p} \quad (4)$$

 175
 176 **Angle of repose (θ)**
 177 Pouring 5 g of powder into a funnel to a height of 10 cm from horizontal and that surface and allowed to flow freely. It was
 178 measured and calculated by the equation 3 (Khalifa et al., 2009):
 179
 180
$$\theta = \tan^{-1} A/Y \quad (5)$$

 181
 182 Where r is the radius and h is the height of the formed cylinder by the microcapsules.
 183
 184 **Statistical analysis**
 185 All measurements were performed in triplicate and results were analyzed with SPSS software (v 20.0). Values were
 186 expressed as mean \pm standard deviation (SD); one way ANOVA test was applied along with a post hoc SNK test to mean
 187 discrimination. The mean differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.
 188
 189 **Results and discussion**

190
 191 **Phenolic contents**
 192 The differences in concentrations of total phenols (TPC), total flavonoids (TF), and condensed tannins (CT) in the bark
 193 extract and the three microcapsules were statistically significant (ANOVA, $p < 0.05$, Table 1) with respect to the extraction
 194 source. The average concentrations were higher in EFC50 and EFC25 and minor in ES. Inactive ES shows a slight decrease
 195 in the concentrations of TPC and TF, from the original extract, but as for CT concentration ES showed an increase four
 196 times larger than the original extract. The order of concentration of TPC, TF, and CT shows according requires with
 197 respect to the amount of fish oil contains: ES < EFC25 < EFC50, indicating that fish oil contributes in the increasing
 198 concentration of the compounds mentioned. Furthermore, according to Chondratos-Letzana et al. (2012) the absence of
 199 fractions in the microcapsules, probably due to the low drying temperature used and the viscous and film forming
 200 properties provided by the waxes, may allow better physical protection and therefore retention of bark extract and fish oil.
 201
 202 **Antioxidant capacity**
 203 The antioxidant capacity detected by the BS extract coincides with previous findings in *A. fraxinea* bark extract in
 204 populations from Brazil (Limonier et al., 2012), as well as in other species like *Adonis autumnalis* (Siddiqui and Hocker,
 205 2003) and *Calceolaria paniculata* (Yang et al., 2010), both widely recognized by this property. The differences in the
 206 mean values of antioxidant capacity between the two methods of analysis (FRAP, TAC) with respect to its source extraction
 207 were statistically significant (ANOVA $p < 0.05$) and these values showed a marked increase as the extract was mixed with
 208 fish oil. Total antioxidant capacity (TAC) ranged from 28.32 to 33.67 $\mu\text{g TE/g EA}$ (Fig. 1a). The order of lowest
 209 to highest antioxidant capacity by TAC was: ES < EFC25 < EFC50. While FRAP antioxidant capacity (EC₅₀) ranged from
 210 7.1 (6.1) $\mu\text{g EA/mL}$ to 10.9 (0.4) (Fig. 1b). The order of lowest to highest antioxidant capacity by FRAP was:
 211 ES < EFC25 < EFC50. In this context, the antioxidant capacity in the microcapsules shows an increase with respect to
 212 the original extract. Ahmed et al. (2010) reported that malolactin enhance the antioxidant activities of functional compounds
 213 in microcapsules. According to Hogan et al. (2001) the increased antioxidant capacity in the three microcapsules from the
 214 original extract may be due to high efficiencies obtained in concentrations of TPC and TF, but another aspect that support
 215 this point is based on the chemical structure of phenolic acids and flavonoids in the bark extract like quercetin-3-O-
 216 galloyl, methyl-pyrocatechin 3'-O-galloyl which possesses three possible chelating sites: 2-hydroxychromone, 5-
 217 hydroxychromone and the 3',4'-dihydroxy group (Cornett and Martin, 2002), giving them a high antioxidant capacity
 218 (Saxena et al., 2012). In the particular case of EFC25 and EFC50 the antioxidant activity can be influenced by the presence
 219 of small sugars characteristic of fish oil (Fraj et al., 2005).
 220
 221 **Morphology and size of the microcapsules**
 222 The SEM (Figs. 2a, 2b and 2c) micrographs show a spherical shape in the three microcapsules, with a mix of smooth and
 223 rough surfaces, as well as a very small amount of fragments and some points of agglomeration specifically in EFC25 and
 224 EFC50 which indicates that this feature may be related to the nature of content. The wrinkles on the surface have been reported
 225 in other microcapsules which include malolactin (Requena et al., 2003), and also gain (Jinhee-Ayub et al., 2003) and
 226 fish oil as an extract encapsulating (Fidri et al., 2008; Pournazeri et al., 2011) and have been attributed to the result of
 227 mechanical stress induced by urease drying in different parts of the liquid droplets produced during the early stages of
 drying (Kishore et al., 2009), the movement of moisture during the period of no surface evaporation (Walton, 2000) and

228 the effect of surface tension driven viscous flow (Stern and Rosenberg, 1998). The microcapsules obtained shows a
229 continuous and smooth non-porous surface, indicating that there was no degradation of the drying volume, ensuring its
230 integrity. Also, spherical shapes with smooth surface without pores or cracks protect the fish oil from oxidation and release
231 drops to the surface of the particles (Aghajoshio et al., 2013). The maximum and minimum size values of the microcapsules
232 were 53.86-2.79 in ES, 10.60-1.48 in EF025 and 3.35-1.21 μm , while the average size ranged from 21.77-0.89 in ES,
233 4.81-0.20 in EF025 and 4.21-0.09 in EF050, respectively. According to Almirall et al. (2005) when encapsulated at low
234 temperatures, as in this case, a high degree of shrinkage is observed and the average particle size tends to be lower than
235 those obtained at higher temperatures. On the other hand the reduced size in EF025 and EF050 is an important feature for
236 a food product because ingested particles larger than 100 μm create an unpleasant mouthfeel as they are large enough to
237 be detected (Tved step-Jensen et al., 2002).

238 Moisture content and water activity

239 The moisture content in dry basis showed by the three microcapsules ranged from 11.39% to 4.72% (Table 2). These
240 values are characteristic of maltodextrin-based microcapsules (Robert et al., 2003) and very similar with reported by
241 Aghajoshio et al. (2013) and Patrick et al. (2011) who used whey protein and sodium caseinate and fish oil as coating and
242 core materials, and a mixture with sodium dodecyl sulfate and sodium carboxymethylcellulose (SDSCMC), gelatin and
243 fish oil as coating and core materials, respectively. It is observed that the composition of the formulation does not
244 substantially affect the moisture content. Kim et al. (2009) reports that drying at low temperatures a substantial amount of
245 water evaporates before the shell is formed, the components have more time to migrate to the surface of the drop and the
246 particle form also sealing the particles is slow to make the formation and migration of moisture to the surface of the core
247 less effectively been made. No significant differences were found in the water activity (a_w) and average values were 0.14
248 to 0.19 (Table 2). According to Blument (2006) the moisture content of the powder should be less than 5% with water
249 activity values from 0.13 to 0.20 indicating a high stability and minimal chemical reactions in the microcapsules (Goon,
250 1998). Redetzke (2004) reports that when the moisture content reduces lower than 7%, the water diffusion through the
251 food matrix decreases, which reduces the effect of moisture on the physical and chemical characteristics of the solid
252 matrix microencapsulated oil and oxygen accessibility through the network of pores. Moreover, low water activity values
253 are associated with the decrease in the components degradation. In the present study, the results indicate that water
254 availability to conduct the reactions of chemical-enzymatic degradation mechanisms in the microcapsules is low and
255 consequently the components degradation will be slower.

256 Wetting, Dissolution and Hygroscopicity

257 Wetting times observed in the present study ranged from 1379.8 s to 2140 s which are considered low, whereas the
258 dissolution times ranged from 6039.6 s to 3960 s (Table 3) in both cases the lowest values were observed in ES, while the
259 highest occurred in EF025, followed by EF050. In this sense there was an increase in the time of wetting and dissolution
260 when fish oil was incorporated in the formulation. This aspect is consistent with reports of Cahar et al. (2010) who found that
261 powder with high protein and lipid incorporation takes longer to wet because its hydrophobic nature resulting microcapsules
262 tend to float, to form aggregates and sometimes stick to the walls of the vessels. Arabic gum has the property to create a

265 strong protective film around the oil droplet (Kishan et al., 2005), which results from the anhydrogalactin-protein
266 structure highly branched that promotes both proteinaceous and polysaccharide moieties. Hydrophobic polyphenols can
267 and/or polysaccharides on the surface of the oil droplet and carboxylate aggregates preventing hydrophilic chains forming
268 a thick layer. According to Shimamura et al. (2000), Kim and Hwang (1999) very few polysaccharide-protein systems have a
269 stabilization mechanism comparable to the arabic gum. The values obtained for hygroscopicity (Table 2) were similar to
270 the three microcapsules and no differences regarding the fish oil content in the formulation were observed, the three values
271 were minor respect those reported by Patrick and Boudier-Shimamura (2014). In this context the similarities can be explained
272 by the chemical structure of wall materials. Arabic gum has a high number of branches with hydrophilic groups which easily
273 bind to water molecules and maltodextrin DE 10, which is hydrophilic starch also exhibits same branches with hydrophilic
274 groups which contribute to water absorption.

275 Flow properties

276 Car index values ranged from 38.56 \pm 2.21 and 50.43 \pm 1.28 which characterize the three encapsulated as poor flowability
277 powders and the Hausner ratio values were between 1.61 (0.05 and 2.02 \pm 0.05 (Table 3). The apparent packed density
278 values observed in the present study were typical for the type of microcapsule (Chondria et al., 1986). The properties of
279 poor or very poor management also were very compressible compared to other oil microcapsules obtained by spray drying
280 by Inoue et al. (2006). This property can be related to the size of the microcapsules since smaller particles can lead to a
281 higher force formation that lead to low resistance (Elmaghrabi, 2003). Furthermore, the powders obtained in this study,
282 using a substance of hydrophobic nature like fish oil, can lead to low flow. A greater Hausner ratio means that the powder
283 is cohesive and less able to flow freely. The same result was observed in microcapsules produced by spray drying or drying
284 by cooling, despite the decrease of Hausner ratio and Car index (Tuchs et al., 2006).

285 Angle of repose

286 The angle values observed in this study (Table 3) placed the three microcapsules within the category of free flowing
287 (Alshona - Casanova et al., 2004). In this study, according to Ishino et al. (2006), the dependence of the angle of repose
288 with respect to the wall concentration in this mixture was observed since cohesion and friction between the particles compressing
289 the clusters of microcapsules shows a reduction in EF025 and EF050 and increase in ES whose formulation not include
290 fish oil so the presence of fish oil in the mixture increases the fluidity of the wall materials.

291 Conclusions

292 The spray drying technique to process the bark extract of *Z. officinale* and fish oil produces small powders with good
293 physicochemical properties, degradability and free-flowing. Also, the phenolic concentrations and the antioxidant capacity
294 observed in vitro suggests that extract, fish oil, maltodextrin and gum arabic make a synergy that enhances the antioxidant
295 properties of each component separately. This study shows a significant antioxidant activity in microcapsules which
296 represents a promising source as a food additive to be incorporated into functional foods specifically aimed to production
297 of commensally important acquirable species such as white shrimp (*Litopenaeus setiferus*), in order to strengthen its
298 antioxidant enzyme system and thus avoid being infected by pathogens that impact in their gain of weight and size.

330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419

330 Aguilera, M., Melillo, H., Maradillo, A., Eskin, E., 2013. Effect of microencapsulation on inhibition by spray-dried operational emulsifier. *International Journal of Food Science and Technology* 48(10):2171-2173.

331 Aguilera, M., Melillo, H., Maradillo, A., Eskin, E., 2013. Influence of wall material and fluid drying air temperature on the microencapsulation of fish oil by spray drying. *Food Bioscience* 6, 1583-1589.

332 Aichrooy, R., 1993. Microencapsulation for food. *Journal of Microencapsulation* 01(04), 413-435.

333 Alarilla-Isabern, I., Chiriac, J., Jimenez-Aranda, M. R., Oubrahim, S. H., 2003. Description of morphological changes of particles during spray drying. *J. Food Eng.* 67, 179-184.

334 Almaraz-Arce, N., Campos, M. G., Acosta-Gonzalez, J. A., Jimenez, N. R., Lopez, J. H., Gonzalez-Alba, L. E., 2007. Antioxidant activity of polyphenolic extract of medicinal *Eccelesia-collada* pollen from Mexico. *Grassroots Medicine* (Laguna). *Journal of Food Composition and Analysis* 20(1), 151-158.

335 Barlowe-Cherrier, G. V., Gonzalez-Abraham, E., Salinas, P., Van H., 2005. Food powders: Physical properties, processing, and functionality. *Y & E Elsevier/Amsterdam: Elsevier*, New York, Pg. 271-304.

336 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

337 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

338 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

339 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

340 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

341 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

342 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

343 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

344 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

345 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

346 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

347 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

348 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

349 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

350 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

351 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

352 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

353 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

354 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

355 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

356 Branden, C. I., Verman, Carter, E. J., 1997. Studies at the extraction of solids. *Cacao storage and transport (Grassroots Medicine)*. *Journal of Food Engineering* 19(2), 449-461.

339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419

339 Fang, Z., Jhanwar, B., 2010. Encapsulation of polyphenolic extract. *Trends in Food Science & Technology* 21, 513-523.

340 Fang, Z., Jhanwar, B., 2010. Antioxidant preservation of milk film with the dispersed sugar and polyphenolic extract. *J. Agric. Food Sci.* 53(2), 70-84.

341 Pajonk, B., Johnson, M. R., Wilson, M. E., 2001. *The Taste of Food Science*. Oxford Univ. press, 391 pp.

342 FFL (Federación Latinoamericana de Leche, Huelva, B. 1989). *Determinación de la superhidratación de la leche condensada*. No. V04-268.

343 Fungtongk, J., 2005. Food powder. *Developing in Southeast Asia*. Bangkok and Portland: Boca Raton: CRC Press, p. 247-260.

344 Fula, M., Teshima, C., Saito, M., Oshikiri, M., E. Ohtsuna, C., Payne, H., 2006. Emulsion of oil in powder using spray drying and fluidized bed drying. *Journal of Food Eng.* 79, 27-32.

345 Gahan, C., Almaraz, M., Sanchez, C., Azab, T., 2010. How surface composition of high milk protein powder is influenced by spray drying temperature, colloid and surfactant. *International J. Food Sci. Technol.* 35, 377-386.

346 Gonzalez, V., Rosencrantz, K. A., 2008. Microencapsulation of fish oil: stability and handling characteristics of milk solids and powder. *A review with implications for food products*. *Journal of Food Eng.* 100, 475-485.

347 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Application of spray drying in microencapsulation of food ingredients. *Food Research International* 40, 1107-1120.

348 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

349 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

350 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

351 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

352 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

353 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

354 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

355 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

356 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

357 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

358 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

359 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

360 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

361 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

362 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

363 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

364 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

365 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

366 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

367 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

368 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

369 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

370 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

371 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

372 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

373 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

374 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

375 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

376 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

377 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

378 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

379 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

380 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

381 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

382 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

383 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

384 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

385 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

386 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

387 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

388 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

389 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

390 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

391 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

392 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

393 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

394 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

395 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

396 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

397 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

398 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

399 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

400 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

401 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

402 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

403 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

404 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

405 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

406 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

407 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

408 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

409 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

410 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

411 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

412 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

413 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

414 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

415 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

416 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

417 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

418 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.

419 Ghosh, A. M., Adhikary, R. K., 2007. Stability of liposomes during spray drying of emulsions. *Food Eng.* 100, 475-485.