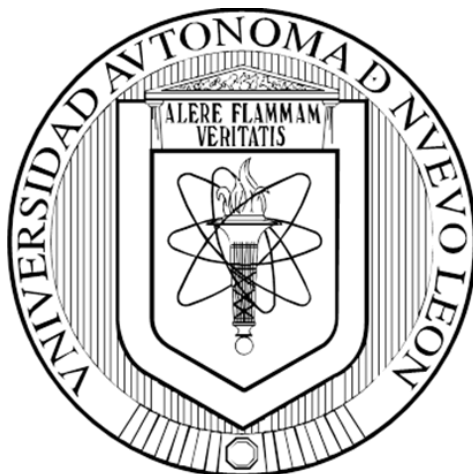


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFFECTO DE UNA PAPILLA ALTA EN ÁCIDO CLOROGÉNICO
INDUCIDA CON ESTRÉS POR CORTE, SOBRE EL DESARROLLO
COGNITIVO Y METABOLISMO DE RATAS WISTAR**

POR

M.C. JULIETA MELISSA LÓPEZ MARTÍNEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN ALIMENTOS**

MARZO, 2020

EFFECTO DE UNA PAPILLA ALTA EN ÁCIDO CLOROGÉNICO INDUCIDA CON ESTRES POR CORTE, SOBRE EL DESARROLLO COGNITIVO Y METABOLISMO DE RATAS WISTAR

Comité de Tesis

Dr. Carlos Abel Amaya Guerra

Director de Tesis

Dr. Juan Gabriel Báez González

Secretario

Dra. Sandra Loruhamá Castillo Hernández

Vocal 1

Dr. Carlos Javier Aguilera González

Vocal 2

Dra. María Adriana Núñez González

Vocal 3

EFFECTO DE UNA PAPPILLA ALTA EN ÁCIDO CLOROGÉNICO INDUCIDA CON
ESTRES POR CORTE, SOBRE EL DESARROLLO COGNITIVO Y METABOLISMO
DE RATAS WISTAR

Comité de Tesis

Dr. Carlos Abel Amaya Guerra

Director de Tesis

Dr. Daniel Alberto Jacobo Velázquez

Director Externo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Carlos Amaya por la confianza, transmitirme sus conocimientos, por estar siempre al pendiente y brindarme lo necesario para la realización de este proyecto y la oportunidad de poder formar parte de su equipo.

Agradezco al Dr. Daniel Jacobo, por darme la oportunidad de formar parte de sus proyectos, por sus aportaciones hacia esta investigación, por las enseñanzas que me transmitió y el tiempo que ha dedicado a este proyecto.

Agradezco al Dr. Eduardo Campos, Dra. Arlette Santacruz, Dr. Carlos Aguilera, Dra. Adriana Núñez, Dr. Juan Gabriel Báez, Dra. Sandra Castillo, por el tiempo que han dedicado a este proyecto

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León en especial al departamento de alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme el apoyo económico y necesario durante mi doctorado. Así como permitirme hacer uso de sus instalaciones.

Agradezco al Tecnológico de Monterrey el apoyo y por permitirme hacer una parte experimental de mi proyecto en sus instalaciones

Agradezco a CONACYT, el soporte económico brindado durante la realización de mi doctorado, ya que, sin él, la realización de este sueño no hubiera sido posible.

DEDICATORIAS

A mi hijo Vini, por todo su amor, por sus sacrificios, su paciencia y ser mi principal motor para culminar esta meta.

A mi esposo, por su gran amor, por siempre sacarme una sonrisa, por transmitirme sus conocimientos, por su paciencia y por estar siempre pendiente de nosotros.

A mis padres por su infinito amor, por la motivación y sus sacrificios, ya que sin ustedes el cumplimiento de esta meta no hubiera sido posible.

A mi familia, en especial a mi abuelito (qepd) y abuelita (qepd), a Ivette, Gerardo, a mi tía Lupita y a mi tío Alfredo (qepd) por estar pendiente a lo largo de este proceso.

A mis suegros, por el apoyo y el cariño que siempre me han brindado.

A todos los que formaron parte de esta etapa, y en la cual agradezco infinitamente su apoyo y amistad: Tere, Jeni, Mario, Jesús, Johanan, Rocío, Ariel, Tania, Analía, Ana, Cynthia, Mine.

GRACIAS, palabra pequeña, pero que encierra todo lo incondicional que ustedes han sido conmigo, pues de lo contrario no hubiese sido formidable y forjadora de mis nuevos retos por vivir.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	16
2	ANTECEDENTES	18
2.1	Descripción y clasificación taxonómica de las Zanahorias	18
2.2	Distribución y producción de zanahorias	19
2.3	Composición proximal de las zanahorias	19
2.4	Antioxidantes	21
2.4.1	Carotenos	22
2.4.2	Composición de carotenos en zanahorias	23
2.4.3	Compuestos fenólicos	25
2.4.4	Composición de compuestos fenólicos en zanahorias	26
2.4.5	Capacidad antioxidante	27
2.5	Estrés abiótico postcosecha	29
2.6	Ácido clorogénico	32
2.6.1	Efecto del ácido clorogénico sobre la concentración de antioxidantes en plasma	33
2.6.2	Efecto del ácido clorogénico sobre la Diabetes Mellitus	34
2.6.3	Efecto del ácido clorogénico sobre la hipertensión	35
2.6.4	Efecto del ácido clorogénico sobre la obesidad	36
2.6.5	Efecto del ácido clorogénico sobre la dislipidemia	37
2.6.6	Efecto del ácido clorogénico sobre las enfermedades neurológicas	37
2.6.7	Efecto de compuestos fenólicos sobre las enfermedades neurológicas	39
2.7	La memoria	40
2.8	Desarrollo Cognitivo	42
2.8.1	Laberinto de agua de Morris	43
2.8.1.1	Antioxidantes y su efecto sobre el laberinto de agua de Morris	44
2.9	Microbiota intestinal	49
2.9.1	Microbiota intestinal y su relación con el Sistema Nervioso Central	50
2.9.2	Microbiota intestinal y su relación con los antioxidantes	51
3	JUSTIFICACIÓN	54
4	HIPOTESIS	55
5	OBJETIVO DEL TRABAJO	56
6	MATERIALES Y MÉTODOS	57
6.1	Material vegetal y preparación de las muestras	57
6.2	Obtención de las papillas de zanahoria	57
6.3	Caracterización proximal de papillas de zanahoria	58
6.4	Colorimetría en papillas de zanahoria	59
6.5	Caracterización fitoquímica de papillas de zanahoria	59

6.5.1	Extracción y Cuantificación de Fenólicos	59
6.5.2	Extracción y Cuantificación de Carotenos	59
6.6	Bioensayo con ratas	60
6.7	Determinación de Glucosa, Colesterol y Triglicéridos en plasma	64
6.8	Determinación de antioxidantes en plasma	64
6.8.1	Extracción de antioxidantes en plasma	64
6.8.2	Determinación de capacidad antioxidante en plasma por el método ORAC	64
6.8.3	Determinación de glutatión S-transferasa (GST) en plasma	65
6.8.4	Determinación de actividad Superóxido Dismutasa (SOD) en plasma	65
6.9	Análisis de memoria y desempeño de aprendizaje	66
6.9.1	Memoria de Corto Plazo	67
6.9.2	Memoria de Largo Plazo	67
6.9.3	Memoria de Trabajo	67
6.9.4	Desempeño de Aprendizaje	68
6.10	Determinación de <i>Lactobacillus</i> spp. y Bacterias Totales	68
6.10.1	Extracción de ADN en contenido intestinal en ratas	68
6.10.2	Cuantificación de <i>Lactobacillus</i> spp. y Bacterias Totales	69
6.11	Determinación de Mielina en cerebros de ratas	69
6.12	Determinación de ADN y ARN en cerebros de ratas	70
6.13	Análisis estadístico	71
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
7.1	Caracterización proximal de papillas de zanahoria	72
7.2	Colorimetría en las papillas	73
7.3	Caracterización fitoquímica de las papillas de zanahoria	74
7.3.1	Compuestos fenólicos en papillas de zanahoria	74
7.3.2	Carotenos en papillas de zanahoria	76
7.4	Bioensayo	78
7.4.1	Efecto del ácido clorogénico sobre el metabolismo de ratas	78
7.4.1.1	Efecto del ácido clorogénico sobre el alimento ingerido de ratas de dos generaciones	78
7.4.1.2	Efecto del ácido clorogénico sobre el peso corporal de ratas	80
7.4.1.3	Efecto del ácido clorogénico sobre el peso del hígado de ratas	82
7.4.1.4	Efecto del ácido clorogénico sobre la glucosa en plasma de ratas	83
7.4.1.5	Efecto del ácido clorogénico sobre la concentración de colesterol en plasma de ratas	85
7.4.1.6	Efecto del ácido clorogénico sobre la concentración de triglicéridos en plasma de ratas	87

7.5	Antioxidantes en plasma	89
7.5.1	Efecto del ácido clorogénico sobre la concentración de antioxidantes por ORAC	89
7.5.2	Efecto del ácido clorogénico sobre la concentración de glutatión-S-transferasa (GST) en plasma	91
7.5.3	Efecto del ácido clorogénico sobre la concentración de Superóxido Dismutasa (SOD) en plasma	92
7.6	Desarrollo cognitivo	95
7.6.1	Efecto del ácido clorogénico sobre la memoria de corto plazo en ratas	95
7.6.2	Efecto del ácido clorogénico sobre la memoria de largo plazo en ratas	97
7.6.3	Efecto del ácido clorogénico sobre la memoria de trabajo en ratas	100
7.6.4	Efecto del ácido clorogénico sobre el desempeño de aprendizaje en ratas	103
7.7	Efecto del ácido clorogénico sobre la microbiota intestinal	106
7.7.1	Efecto del ácido clorogénico sobre la concentración de <i>Lactobacillus</i> spp. en contenido intestinal de ratas	106
6.7.2	Efecto del ácido clorogénico sobre la concentración de bacterias totales en contenido intestinal de ratas	108
6.8	Efecto del ácido clorogénico sobre el cerebro de ratas	109
6.8.1	Efecto del ácido clorogénico sobre el peso de cerebro, cerebelo y contenido de mielina de ratas	109
6.8.2	Efecto del ácido clorogénico sobre el contenido de proteína, ARN y ADN en el cerebro de ratas	111
8	CONCLUSIONES	115
9	PERSPECTIVAS	116
10	BIBLIOGRAFIA	117
11	RESUMEN BIBLIOGRAFICO	132
12	ANEXOS	133

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación taxonómica de la zanahoria	18
Tabla 2.	Contenido de micronutrientes en zanahorias	20
Tabla 3.	Contenido de diferentes tipos de carotenoides en diversos cultivos de zanahorias	24
Tabla 4.	Contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en diversos cultivos de zanahorias	28
Tabla 5.	Tratamientos y dieta	61
Tabla 6.	Contenido de la dieta AIN-76	61
Tabla 7.	Primers utilizados para la secuenciación de ADN de <i>Lactobacillus</i> spp. y bacterias totales	69
Tabla 8.	Composición proximal de papillas de zanahoria	72
Tabla 9.	Colorimetría en papillas de zanahoria (Lab)	74
Tabla 10.	Compuestos fenólicos en las papillas de zanahoria	75
Tabla 11.	Composición de carotenos en las papillas de zanahoria	77
Tabla 12.	Alimento ingerido por ratas tratadas con ácido clorogénico en la primera generación	79
Tabla 13.	Alimento ingerido por ratas tratadas con ácido clorogénico en la segunda generación	79
Tabla 14.	Peso de las ratas tratadas con ácido clorogénico en la primera generación	80
Tabla 15.	Peso de las ratas tratadas con ácido clorogénico en la segunda generación	81
Tabla 16.	Peso del hígado de las ratas tratadas con ácido clorogénico en la primera generación	82
Tabla 17.	Peso del hígado de las ratas tratadas con ácido clorogénico en la segunda generación	82
Tabla 18.	Contenido de glucosa en plasma de ratas de la primera generación	83
Tabla 19.	Contenido de glucosa en plasma de ratas de la segunda generación	84
Tabla 20.	Contenido de colesterol en plasma de ratas de la primera generación	85
Tabla 21.	Contenido de colesterol en plasma de ratas de la segunda generación	86
Tabla 22.	Contenido de triglicéridos en plasma de ratas de la primera generación	87
Tabla 23.	Contenido de triglicéridos en plasma de ratas de la segunda generación	88
Tabla 24.	Capacidad antioxidante en plasma de ratas de la primera generación	89
Tabla 25.	Capacidad antioxidante en plasma de ratas de la segunda generación	90
Tabla 26.	Contenido de glutatión-S-transferasa (GST) en plasma de ratas de la primera generación	92

Tabla 27.	Contenido de glutatión-S-transferasa (GST) en plasma de ratas de la segunda generación	92
Tabla 28.	Porcentaje de inhibición de la xantina oxidasa en plasma de ratas de la primera generación	93
Tabla 29.	Porcentaje de inhibición de la xantina oxidasa en plasma de ratas de la segunda generación	94
Tabla 30.	Errores y latencias cometidos por ratas en la memoria de corto plazo de la primera generación	95
Tabla 31.	Errores y latencias cometidos por ratas en la memoria de corto plazo de la segunda generación	96
Tabla 32.	Errores cometidos por ratas en la memoria de largo plazo de la primera generación de ratas Wistar	97
Tabla 33.	Latencia cometida por ratas en la memoria de largo plazo de la primera generación	98
Tabla 34.	Errores cometidos por ratas en la memoria de largo plazo de la segunda generación de ratas Wistar	99
Tabla 35.	Latencia cometida por ratas en la memoria de largo plazo de la segunda generación	99
Tabla 36.	Errores cometidos por ratas en la memoria de trabajo de la primera generación	100
Tabla 37.	Latencia cometida por ratas en la memoria de trabajo de la primera generación	101
Tabla 38.	Errores cometidos por ratas en la memoria de trabajo de la segunda generación	102
Tabla 39.	Latencia cometida por ratas en la memoria de trabajo de la segunda generación	102
Tabla 40.	Errores cometidos por ratas en el desempeño de aprendizaje de la primera generación	103
Tabla 41.	Latencia cometida por ratas en el desempeño de aprendizaje de la primera generación	104
Tabla 42.	Errores cometidos por ratas en el desempeño de aprendizaje de la segunda generación	104
Tabla 43.	Latencia cometida por ratas en el desempeño de aprendizaje de la segunda generación	105
Tabla 44.	Contenido de <i>Lactobacillus</i> spp. en intestino de ratas de la primera generación	106
Tabla 45.	Contenido de <i>Lactobacillus</i> spp. en intestino de ratas de la segunda generación	107
Tabla 46.	Contenido de bacterias totales en intestino de ratas de la primera generación	108

Tabla 47.	Contenido de bacterias totales en intestino de ratas de la segunda generación	108
Tabla 48.	Peso de cerebro, cerebelo y contenido de mielina de la primera generación de ratas	109
Tabla 49.	Peso de cerebro, cerebelo y contenido de mielina de la segunda generación de ratas	110
Tabla 50.	Contenido de proteína, ARN y ADN en el cerebro de ratas de la primera generación	112
Tabla 51.	Contenido de proteína, ARN y ADN en el cerebro de ratas de la segunda generación	113

INDICE DE FIGURAS

Número de la figura	Nombre de la figura	Página
Figura 1.	Estructura química de un caroteno	23
Figura 2.	Estructura química de un fenol	25
Figura 3.	Estructura base de un flavonoide	26
Figura 4.	Estructura química del ácido clorogénico	32
Figura 5.	Piscina del laberinto de agua de Morris	43
Figura 6.	Preparación de las muestras	57
Figura 7.	Zanahorias con estrés por corte	58
Figura 8.	Hígado de rata Wistar	83

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AC	Ácido clorogénico
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ND	No detectado
Bh	Base húmeda
Bs	Base seca
ORAC	Capacidad de absorción de radicales oxígeno
UV	Ultravioleta
ROS	Especies reactivas de oxígeno
IMC	Índice de masa corporal
TC	Tejido del cerebro
SOD	Superóxido dismutasa
ALA	A-ácido linoleico
AD	Alzheimer
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
GST	Glutatión-S-transferasa
ANOVA	Análisis de varianza
FI	Fibra insoluble
FS	Fibra soluble
p-CA	Ácido p-cumárico
p-CADA	Derivado de ácido p-cumárico

RESUMEN EN ESPAÑOL

El ácido clorogénico tiene efectos positivos contra el síndrome metabólico, sin embargo, hay pocas investigaciones que informen su efecto en el desarrollo del cerebro. El efecto de la papilla de zanahoria con alta concentración de ácido clorogénico, aumentado a partir de zanahorias previamente tratadas con estrés por corte (corte de zanahorias y almacenado durante 48 horas a 15 °C) fue evaluado sobre el metabolismo de las ratas, el contenido de *Lactobacillus* spp. en microbiota, el desarrollo cognitivo y cerebral en dos generaciones de ratas. A ratas Wistar recién destetadas se le asignaron tres dietas diferentes al azar: 90% control + 10% de papilla de zanahoria alta en AC, 90% control + 10% papilla de zanahoria control y control (AIN -76). Los efectos cognitivos de las ratas se evaluaron con las pruebas de laberinto de agua de Morris (memoria a corto plazo, memoria a largo plazo, memoria de trabajo y desarrollo del aprendizaje). Las ratas se reprodujeron y se sacrificaron para las determinaciones de metabolismo, cerebro y microbiota. El estrés por corte aumentó la concentración de ácido clorogénico ~ 4 veces en comparación con la papilla de zanahoria control (522 mg / kg). Las ratas tratadas con dietas con papilla de zanahoria control y papilla de zanahoria alta en AC aumentaron los conteos de *Lactobacillus* spp. en la microbiota intestinal en comparación con el grupo de control ($p < 0.019$) de la segunda generación. El contenido de mielina del tratamiento con la papilla de zanahoria alta en AC fue significativamente mayor que los grupos control y en el tratamiento con la papilla control en la primera generación. En la segunda generación, la mielina aumentó a 204 mg / g en el grupo con la papilla de zanahoria alta en AC y este grupo tuvo el mayor contenido de ARN. En general, los resultados de la investigación sugieren que la papilla de zanahoria alta en AC mejora el desarrollo cerebral al aumentar la concentración de mielina y el ARN.

RESUMEN EN INGLES

Chlorogenic acid has positive effects against metabolic syndrome, nevertheless there are few investigations reporting its effect on brain development. The effect of carrot puree with enhanced levels of chlorogenic acid, obtained from carrots previously treated with wounding stress (shredded and stored for 48 h at 15 °C) on metabolism, *Lactobacillus* spp. concentration in microbiota, cognitive and brain development in two generations of rats was evaluated. Post-weaning Wistar rats (24) were randomly assigned three different diets: 90% control + 10% wounding stress carrot puree (WSCP), 90% (w/w) control + 10% carrot puree (CP), and control (AIN-76). Rat cognitive effects were evaluated with Morris water maze tests (Short- Term memory, Long-Term Memory, Working Memory and Learning Development). Rats reproduced and were sacrificed to determine the metabolism, the concentration of *Lactobacillus* spp. in the intestine microbiota and brain development with myelin, DNA and RNA cerebral content. Wounding stress enhanced chlorogenic acid concentration ~4 times when compared to untreated CP (522 mg/kg). Rats treated with WSCP and CP diets increased the counts of *Lactobacillus* spp. in the gut microbiota as compared with the control group ($p < 0.019$) of the second generation. Myelin content of WSCP was significantly higher than control and CP groups in first generation. In second generation, myelin raised to 204 mg/g in WSCP group and this group had the highest RNA content. Overall, research findings suggest that WSCP improves brain development by increasing myelin concentration and RNA.

1. INTRODUCCIÓN

Las zanahorias son uno de los vegetales mayor cultivados en el mundo, en el cual China es el mayor productor a nivel mundial con 20,000,000 toneladas anuales (Datt, et al., 2012; Zhang & Hamauzu, 2004). Sin embargo, su consumo ha aumentado en los últimos años con el uso creciente de verduras mínimamente procesadas (Zhang & Hamauzu, 2004).

Estás raíces pueden ser de diversos colores como amarillo, naranja, rojo y morado. El color de las zanahorias es definido por la presencia de los pigmentos de carotenos que hay en ellas (Akhtar et al., 2017; Grauwet et al., 2014). El naranja en las zanahorias se debe a su alta concentración de β -caroteno y α -caroteno, mientras que el color amarillo al contenido de luteína. El licopeno define el color en las zanahorias rojas y la alta concentración de antocianinas da como resultado el color morado en estos vegetales (Akhtar et al., 2017; Dias, 2014; Heywood, 1983).

La zanahoria es una fuente importante de carbohidratos, minerales, fibra dietética y fitonutrientes, incluidos los fenólicos y carotenoides. La zanahoria es rica en β -caroteno, ácido ascórbico y tocoferol. Debido al nivel apreciable de la variedad de diferentes compuestos benéficos presentes, las zanahorias se consideran un alimento funcional con importantes propiedades que promueven la salud (Haq, Kumar, & Prasad, 2016; Khandare, et al., 2011; Patras, Brunton, & Butler, 2010).

La ingestión de compuestos fenólicos se asocia con numerosos beneficios para la salud. Los compuestos fenólicos se sintetizan para diversas funciones fisiológicas que sirven como componentes de la pared celular o se generan durante la respuesta al estrés para proteger la célula de agentes bióticos y abióticos externos (Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012).

El estrés abiótico postcosecha se ha identificado como un medio para mejorar el perfil nutricional de los vegetales al aumentar la concentración de compuestos fenólicos y otros compuestos químicos sintetizados durante la respuesta al estrés (Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012). Las zanahorias han servido para investigar los efectos del estrés abiótico posterior a la recolección, tales como heridas inducidas, luz UV, atmósfera

modificada y fitohormonas. El estrés inducido por la herida es el más estudiado, ya que es uno de los enfoques más efectivos, rápidos y económicos (Becerra-Moreno et al., 2015; Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012; Surjadinata, Jacobo-Velázquez, & Cisneros-Zevallos, 2017).

El estrés de las heridas activa la ruta metabólica fenilpropanoide que genera derivados del ácido hidroxicinámico, principalmente ácido clorogénico (Becerra-Moreno et al., 2015; Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012). En las zanahorias tratadas con estrés abiótico postcosecha, la concentración de ácido clorogénico es la más alta entre los compuestos fenólicos (~ 440-920mg / kg) (Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012).

El ácido clorogénico (AC) es absorbido y metabolizado por el cuerpo humano, donde los estudios *in vitro* y clínicos indican que tiene un impacto positivo contra enfermedades crónicas degenerativas como la diabetes (Ma et al., 2015), hipertensión (Mubarak et al., 2012), obesidad (Huang et al., 2014), dislipidemia (Wan et al., 2012) y síndrome metabólico (Santana-Gálvez et al., 2017).

Además de los beneficios bien documentados contra el síndrome metabólico, los estudios de investigación sugieren que los compuestos fenólicos pueden mejorar el rendimiento de las neuronas y ayudar a prevenir la degeneración neuronal del envejecimiento (Gul et al., 2016; Prediger et al., 2008; Shukitt-Hale et al., 2005, 2009; Shukitt-Hale, Carey). Los estudios de investigación que evalúan los efectos del AC en la salud neural son escasos, aunque Gul et al. (2016) informaron que este compuesto protegía a las células corticales del cerebro de rata contra el estrés oxidativo. De manera similar, la AC puede tener actividad anti-amnésica en el hipocampo y la corteza frontal (Kwon et al., 2010). Por otro lado, estudios recientes sugieren que la microbiota puede estar involucrada en el desarrollo y la función neuronal (Borre et al., 2014; Bravo et al., 2011). Los polifenoles pueden modular la microbiota *in vivo*, produciendo cambios en bacterias benéficas como *Lactobacillus* spp. (Molan, Liu y Kruger, 2010).

2. ANTECEDENTES

2.1. Descripción y clasificación taxonómica de las Zanahorias

La zanahoria (*Daucus carota L.*) es una raíz que proviene de la familia Apiaceae y es considerada como una modificación cónica de una raíz primaria (Datt et al., 2012; Esmail, 2017). Su clasificación taxonómica se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la Zanahoria

Reino	Plantae
División	Magnoliófitá
Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Superorden	Asteranae
Orden	Apiales
Familia	Apiaceae
Genero	<i>Daucus</i>
Especie	<i>Daucus carota</i>

Esmail, 2017

Los tallos de las zanahorias son erectos, ramificados y resistentes, los cuales pueden llegar a medir hasta 60 cm de alto. Las hojas se localizan finamente divididas, de las cuales, las hojas más bajas son considerablemente más grandes que las hojas superiores y todas las hojas juntas abrazan el vástago con la base de revestimiento (Esmail, 2017; Heywood, 1983; W. Simon, 2010).

Las flores se encuentran densamente agrupadas en umbelas terminales, donde los tallos florales se dividen para formar una umbela secundaria o rotula de flores blancas externas. Las flores son pequeñas, pero en gran cantidad y forman una cabeza conspicua, la cual es plana o ligeramente convexa mientras florecen. Mientras las semillas maduran, las umbelas se contraen y el fruto está ligeramente aplanado con numerosas cerdas de cinco filas (Esmail, 2017; Heywood, 1983; W. Simon, 2010).

2.2. Distribución y producción de zanahorias

las zanahorias son cultivadas en diferentes partes del mundo, entre ellas: China, Europa, Rusia, Japón y Estados Unidos. El hábitat natural del cultivo de estos vegetales son las regiones templadas con algunas áreas tropicales y subtropicales que se producen durante el invierno ya que su óptimo crecimiento se da a temperaturas entre 15 y 25° C (Haq et al., 2016; Heywood, 1983; Simon, 2010).

Los registros escritos en Europa indican que las zanahorias comenzaron a cultivarse antes del siglo X, siendo las zanahorias amarillas y moradas las primeras en cultivarse, mientras que las zanahorias naranjas fueron cultivadas en los siglos XV y XVI en Europa Central, así mismo, esta variedad de zanahorias es la más popular en la actualidad (Dias, 2014).

Hoy en día, las zanahorias que son procesadas industrialmente se pueden encontrar en diferentes productos, las cuales se pueden vender como congeladas, sopas, enlatadas, deshidratadas, jugos, mermeladas, yogurt, dulces, chips, bebidas, entre otros (Haq et al., 2016; Khandare et al., 2011).

2.3. Composición proximal de las zanahorias

La zanahoria está constituida principalmente de agua (90 - 95% aproximadamente de su peso húmedo). Su porción comestible es de 82% (Chávez Muñoz, 2010; Haq et al., 2016; Singh, Kawatra, & Sehgal, 2001). La energía que aporta la zanahoria es de 30 kcal/ 100 g. Los carbohidratos conforman entre el 5% y el 10 %, mientras que las proteínas solo aportan un 0.7 -0.9 % y las grasas 0.2% en la porción comestible (Datt et al., 2012; Soria, Sanz, & Villamiel, 2009).

Los sólidos solubles en la zanahoria van de 6.7 a 9.5 °Brix, de los cuales el azúcar total se encuentra en un intervalo de 3.82 a 15.22% (Espin, 2003; Khandare et al., 2011). La fructuosa, glucosa y sucrosa son los principales azúcares que conforman la zanahoria (Soria et al., 2009).

Estos vegetales son una excelente fuente de fibra dietética ya que su composición va desde 0.99 hasta 5.16 g (Chávez Muñoz, 2010; Datt et al., 2012; Espin, 2003; Haq et al., 2016). La celulosa (71.7 – 80.9 %), hemicelulosa (9 - 13%), pectina (7.41%) y lignina (2.4 -15.2%) son los principales tipos de fibra encontrados en la zanahoria (Datt et al., 2012; Soria et al., 2009).

Las zanahorias se caracterizan por tener una cantidad apreciable de minerales comparado con otros vegetales (Dias, 2014). El calcio, potasio, hierro y magnesio son los principales minerales presentes en las zanahorias como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Contenido de micronutrientes en zanahorias

Minerales	
Micronutrientes	Contenido
Calcio	34 - 39 mg
Fosforo	15.74 – 53.46 mg
Hierro	0.30 – 5.21 mg
Magnesio	9 - 16 mg
Sodio	30.29 – 70.56 mg
Potasio	197.5 – 324.2 mg
Zinc	0.09 – 2.11 mg
Vitaminas	
Vitamina A	835 µg
Ácido ascórbico	4 - 5.9 mg
Tiamina	0.04 mg
Riboflavina	0.02 - 0.04 mg
Niacina	0.2 - 0.5 mg
Piridoxina	0.15 mg
Ácido fólico	14 µg
Cobalamina	0 µg

(Chávez Muñoz, 2010; Henríquez et al., 2010; Khandare et al., 2011; Sharma) Valores expresados en 100 gramos.

Las vitaminas que las conforman en mayor proporción a la zanahoria son la tiamina, riboflavina, niacina, ácido fólico y vitamina C como se observa en la Tabla 2. Esta

composición importante de las vitaminas antes mencionadas, hacen que la zanahoria sea un alimento multivitamínico y necesario para el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y el crecimiento saludable.

Algunos beneficios a la salud que han sido reportados en las vitaminas que conforman las zanahorias son los siguientes: la tiamina (B1) tiene efectos benéficos sobre el sistema nervioso y la actitud mental; la riboflavina (B2) es una vitamina necesaria para la respiración celular y la formación de glóbulos rojos; la piridoxina (B6) inhibe la formación de homocisteína y reduce el riesgo de enfermedades cardíacas, mientras que el ácido fólico (B9) puede reducir el riesgo de ataques cardíacos al disminuir los niveles de homocisteína (altos niveles de homocisteína se asocian con un mayor riesgo de endurecimiento de las arterias debido a la acumulación de placas de grasa) y de igual manera los folatos pueden prevenir los defectos de nacimiento en embarazos; la vitamina C o ácido ascórbico promueve la absorción de hierro que se requiere para combatir las infecciones y la vitamina K ayuda en la prevención del sangrado; por lo que todos estos beneficios que aportan las vitaminas que contienen las zanahorias hacen que estas sean un vegetal que aporta beneficios positivos a la salud (Chávez Muñoz, 2010; Dias, 2014).

2.4. Antioxidantes

Algunos compuestos que conforman las plantas, principalmente los metabolitos secundarios tienen propiedades que promueven la salud, a los cuales se les conoce como fitonutrientes. La importancia de los antioxidantes en el mantenimiento de la salud y la protección contra las enfermedades crónico-degenerativas ha generado un gran interés entre los científicos, los fabricantes de alimentos y los consumidores a medida que la tendencia del futuro avanza hacia alimentos funcionales con efectos específicos para la salud. Estudios *in vitro* han indicado que los fitonutrientes, como los carotenoides y los compuestos fenólicos, pueden desempeñar un papel importante como protección de los efectos del estrés oxidativo sobre los sistemas biológicos (Huang et al., 2014; Jin et al., 2015; Mubarak et al., 2012; Suzuki et al., 2006; Taram, Winter, & Linseman, 2016; Thom, 2007; van Dijk et al., 2009; Wan et al., 2012).

En los últimos años, el consumo de zanahoria cruda y los productos derivados de las zanahorias han aumentado constantemente debido a su reconocimiento como una fuente importante de antioxidantes naturales (Datt et al., 2012).

La zanahoria es una fuente importante de fitonutrientes, incluidos los fenólicos y carotenoides. La zanahoria es rica en β -caroteno, ácido ascórbico y tocoferol. Debido al nivel apreciable de la variedad de diferentes compuestos benéficos presentes, las zanahorias se consideran un alimento funcional con importantes propiedades que promueven la salud (Haq et al., 2016; Khandare et al., 2011; Patras et al., 2010).

2.4.1. Carotenos

Los carotenoides son un grupo de fitoquímicos que forman una familia de más de 700 compuestos en la naturaleza y son responsables de la pigmentación en muchas frutas y verduras (Arscott & Tanumihardjo, 2010). Estos compuestos son sintetizados exclusivamente por organismos fotosintéticos, incluyendo plantas de cultivo, algas, algunos hongos y ciertas bacterias, donde desempeñan un papel vital en el metabolismo de las plantas y la biosíntesis de otras biomoléculas (Ahmad et al., 2007). La síntesis de los carotenoides se lleva a cabo cuando estos pigmentos recogen la luz de la clorofila en los cloroplastos de los tejidos fotosintéticos y en los cromoplastos de los tejidos no fotosintéticos, como las frutas, las flores y las raíces de las zanahorias (Arscott & Tanumihardjo, 2010).

Los carotenoides se definen por su estructura química que tiene una cadena de 40 carbonos y pueden ser acíclicos o contener un anillo de 5 o 6 carbonos en uno o ambos extremos de la molécula (Figura 2). Los carotenoides hidrocarbonados se conocen como carotenos, mientras que los derivados oxigenados de estos hidrocarburos se conocen como xantofilas (Ahmad et al., 2007; Knockaert et al., 2012).

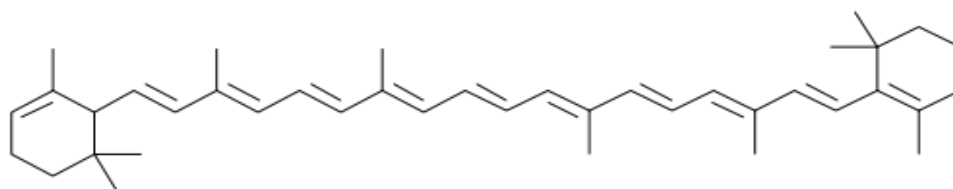


Fig 1. Estructura química de un caroteno

2.4.2. Composición de carotenos en zanahorias

Los carotenoides derivaron su nombre de un pigmento importante en la raíz de zanahoria, *Daucus carota*, que es indudablemente entre los pigmentos más importantes en los organismos vivos (Ahmad et al., 2007).

Seis carotenos (α -, β -, γ - y δ -carotenos, β -zeacaroteno y licopeno) se han podido separar y cuantificar de forma rutinaria en zanahorias típicas y naranja oscuro. Los carotenoides predominantes en estas raíces son los carotenos provitamina A, es decir, α y β -caroteno (Arscott & Tanumihardjo, 2010).

Los carotenos encontrados en las zanahorias son de vital importancia, ya que tienen funciones y acciones biológicas. Los carotenoides están presentes intracelularmente y sus acciones benéficas implican el efecto que tienen sobre las funciones de las células (inhibición de monocitos y activación de plaquetas) y la regulación de la expresión génica. Estos efectos biológicos son independientes de la actividad pro-vitamina A y se han atribuido a la propiedad antioxidante de los carotenoides, a través de la desactivación de los radicales libres y la extinción del singlete de oxígeno (Rodríguez-Amaya, 2010; Rodríguez-Bernaldo de Quirós & Costa, 2006).

En la actualidad, los carotenoides como el β -caroteno han traído una atención considerable debido a su posible efecto protector contra algunos tipos de cáncer (Bozalan & Karadeniz, 2011; Knockaert et al., 2012). De igual manera, estos compuestos han sido relacionado con la mejora del sistema inmunológico y la disminución de enfermedades degenerativas incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Arscott & Tanumihardjo, 2010; Datt et al., 2012).

El contenido total de carotenoides en la porción comestible de las zanahorias varía de 5,300 a 54,800 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, ya que su concentración de carotenos depende de muchos factores, entre ellos, su color principalmente (Datt et al., 2012; Nicolle et al., 2004). En una investigación en Francia sobre la composición de diferentes cultivares de zanahorias realizada por Nicolle y colaboradores en el 2007 (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido de diferentes tipos de carotenoides en diversos cultivos de zanahorias

Cultivar	Color	Luteína	α -caroteno	β -caroteno	Carotenos totales
		$\mu\text{g/g}$ (base húmeda)			
Hyb1	Naranja	94	1972	5433	9374
New Kuroda	Naranja	93	1635	3262	6448
Carentan	Naranja	145	1644	5932	9684
Hyb2	Naranja	164	3131	6653	12524
Hyb3	Naranja	60	1419	4149	9588
Kokubu	Naranja	161	1748	3740	8351
Hyb4	Naranja	157	2291	6190	11435
San Nai	Naranja	180	1333	3206	6648
Blanche des HCM	Blanca Naranja oscuro	ND 103	ND 7583	ND 17206	ND 26548
Violette	morada	224	ND	381	605
Blanche collet	Blanca	ND	ND	ND	ND
Yellowstone	Amarilla	232	ND	332	563
Jaune obtuse	Amarilla	138	ND	332	469
Hyb5	Naranja	116	1916	4730	9414
Violette t.	Morada	176	ND	318	493
Guerande	naranja	161	1278	3354	5998

Nicolle y colaboradores (2007)

En este reporte se publicaron los principales compuestos de carotenoides (luteína, α -caroteno y β -caroteno) y su concentración en diferentes cultivos de zanahorias (naranjas, blancas, moradas, amarillas). En la Tabla 3 se muestran los resultados de esta investigación, en la cual se presenta que la concentración de carotenos es diversa entre las diferentes variedades de zanahorias, donde la luteína abarca un contenido que va de no detectado (ND) hasta 232 $\mu\text{g/g}$ (bh).

Por otro lado, la concentración de α -caroteno es significativamente diferente entre variedades, ya que en algunas zanahorias no se detectaron estos compuestos y en otras se reportan concentraciones muy altas hasta de 7583 $\mu\text{g/g}$ (bh), así mismo, el compuesto β -caroteno va de ND a 17206 $\mu\text{g/g}$ (bh). El contenido total de carotenos en las diferentes variedades de zanahoria abarcó concentraciones de ND a 26548 $\mu\text{g/g}$ (bh). Cabe destacar, que las zanahorias de variedad blanca son los vegetales que no presentan contenido de

luteína, α -caroteno, β -caroteno y carotenos totales, esto se debe a que presentan baja pigmentación (Nicolle et al., 2004).

2.4.3. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son los responsables de la protección de las plantas y contribuyen al sabor, color y astringencia de frutas y vegetales (Boudet, 2007; Luisa Soto et al., 2011). Los fenólicos son metabolitos secundarios, derivados de la ruta de la pentosa fosfato, shikimato y fenilpropanoide. Estos compuestos se constituyen con uno o más grupos hidroxilo en el anillo o anillos aromáticos (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006; Boudet, 2007; Umar Lule & Xia, 2005). En la Figura 2 se observa la estructura básica de un fenol. Estos compuestos pueden estar presentes como conjugados con monosacáridos y polisacáridos, unidos a uno o más grupos fenólicos, entre otros (Balasundram et al., 2006).

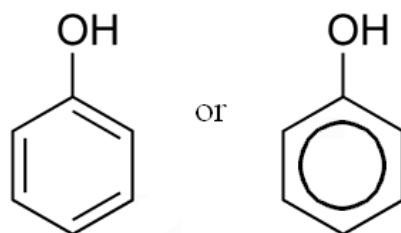


Figura 2. Estructura básica de un fenol

Los compuestos fenólicos se dividen en diferentes clases; los ácidos fenólicos, taninos y flavonoides; a su vez los ácidos fenólicos se subdividen en dos grupos: ácido hidroxibenzoico (ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatehuico, vainillico y siringico), que tienen en común la estructura C6-C1, y ácido hidroxicinámico (ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico y sináptico), que son compuestos aromáticos con tres carbonos en la cadena lateral (C6-C3) (King & Young, 1999; Laura, 1998).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular, comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), y están compuestos por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (Balasundram et al., 2006; Martínez-Flórez et al., 2002). En la Figura 3 muestra la estructura base de un flavonoide.

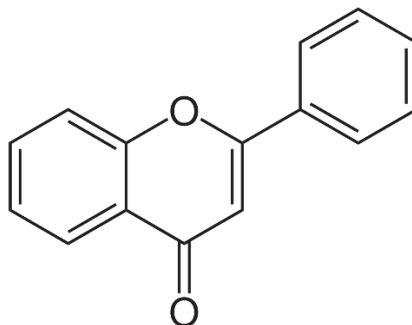


Figura 3. Estructura base de un flavonoide

2.4.4. Composición de compuestos fenólicos en zanahorias

Las zanahorias contienen compuestos fenólicos con un anillo aromático conocido como ácido fenólico. Los principales compuestos fenólicos de las zanahorias son los ácidos hidroxicinámicos formados por la esterificación de los ácidos cinámicos como el ácido clorogénico, ácido cafeíco, ácido p-cumárico, ácido ferúlico y ácido quínico (Arscott & Tanumihardjo, 2010; Datt et al., 2012; Dias, 2014). De igual manera, estas raíces contienen en menores concentraciones algunos tipos de flavonoides como el kaemperol, quercentina y luteolina (Dias, 2014).

Las zanahorias presentan una concentración de compuestos fenólicos totales que van desde 114 mg hasta 306 mg de equivalentes de catequinas/ kg (bh) (Datt et al., 2012; Haq et al., 2016; Nicolle et al., 2004). De los cuales, el ácido clorogénico es el ácido hidroxicinámico más importante, ya que representa entre el 42.2 y 61.8% del total de fenólicos (Datt et al., 2012). El promedio de la concentración de ácido clorogénico de la zanahoria abarca rangos de 45 mg/kg a 52 mg/kg (Santana-Gálvez et al., 2016; Bernadeth Surjadinata, Jacobo-Velázquez, & Cisneros-Zevallos, 2017).

La concentración de compuestos fenólicos en las zanahorias es diferente dependiendo del tejido, la mayor concentración se encuentra en la cáscara, seguido del floema y por último el xilema (Datt et al., 2012). Haq y colaboradores, 2016; determinaron la concentración de compuestos fenólicos totales en zanahorias provenientes de Sangrur, India. Los análisis los realizaron en la cáscara de zanahoria, en la porción comestible y en la

hortaliza entera. El mayor contenido de compuestos fenólicos se encontró en la cáscara de la zanahoria (42.28 -53.11 mg de equivalentes de ácido gálico/ 100 g (bh)), mientras que la porción comestible tuvo menor concentración que abarco de 35.98 a 42.31 mg de equivalentes de ácido gálico/ 100 g (bh).

2.4.5. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante ha sido correlacionada con algunos compuestos fenólicos, ya que este parámetro proporciona información sobre la efectividad de los compuestos fenólicos para neutralizar los radicales libres, y así correlacionarse con la pendiente de una actividad antioxidante contra los fenólicos (Jacobo-Velazquez & Cisneros-Zevallos, 2009).

Existen diferentes métodos para medir la actividad antioxidante como el ABTS (2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolona-6-ácido silfónico), FRAP (Reducción férrica del plasma), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y ORAC (Capacidad de absorbancia de radicales libres); sin embargo, el método de ORAC, es el único método que combina el tiempo de inhibición y el grado de inhibición en una sola cantidad (Huang et al., 2002). Esta técnica depende del daño de los radicales libres hacia la fluoresceína por el cambio de la intensidad de la fluoresceína. En presencia del antioxidante, existe cierta protección a la fluoresceína del daño de los radicales libres (Huang et al., 2002; Wu et al., 2004).

En una investigación reciente se determinó la composición de fenólicos y capacidad antioxidante en diferentes variedades de zanahoria como se muestra en la Tabla 4. Los fenólicos de esta investigación se analizaron por el método de Folín-Ciocalteu y la capacidad antioxidante por el método de ORAC. El contenido de compuestos fenólicos de las zanahorias presentó un nivel de 3.3 a 16.9 mg de equivalentes de ácido gálico/g (bs); mientras que la capacidad antioxidante abarca concentraciones desde 3.6 hasta 14.8 μmol de trolox/g (bh) (Nicolle et al., 2004).

Tabla 4. Contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en diversas variedades de zanahorias

Cultivar	Color	Fenólicos totales (mg de equiv de ácido gálico/g (base seca))	ORAC (μmol de trolox/g (base húmeda))
Hyb1	Naranja	3.3	10.5
New Kuroda	Naranja	5.9	9.1
Carentan	Naranja	3.8	9.2
Hyb2	Naranja	4.6	8.7
Hyb3	Naranja	3.9	8.0
Hyb4	Naranja	3.5	10.5
San Nai	Naranja	4.4	8.9
Blanche des	Blanca	3.4	3.6
HCM	Naranja	5.1	14.8
Violette	morada	16.9	7.3
Blanche collet	Blanca	3.3	4.6
Yellowstone	Amarilla	4.3	8.5
Jaune obtuse	Amarilla	4.4	8.1
Hyb5	Naranja	3.5	11.1
Violette t.	Morada	9.6	8.4
Guerande	naranja	3.4	8.7

Nicolle et al., 2004

En Alemania se analizaron las variedades “Napoli”, “White Satin”, “Purple Haze”, “Bejo”, “Mello Yello” y “Nutri Red” cultivadas en 2 años diferentes. El método utilizado para determinar la actividad antioxidante fue ABTS. La variedad “Bejo” presentó la mayor capacidad antioxidante 210 – 215 μm equivalentes de Trolox, seguida por la variedad “Purple Haze” (125 – 150 μm equivalentes de Trolox,); mientras que la variedad “Napoli” fue la que mostró hasta siete veces menor actividad antioxidante (30 – 35 μm equivalentes de Trolox) (Grassmann, Schnitzler, & Habegger, 2007).

La ingestión de compuestos fenólicos ha sido asociada a números beneficios a la salud, por sus funciones fisiológicas en el cuerpo humano, como antioxidantes, antitumorales y anti mutagénicas (Jin et al., 2015; Mubarak et al., 2012; Santana-Gálvez, Cisneros-Zevallos, & Jacobo-Velázquez, 2017; Suzuki et al., 2006; van Dijk et al., 2009). Ya que se ha

reportado que estos compuestos son potentes antioxidantes que ayudan a combatir radicales libres que son perjudiciales para nuestro cuerpo (Dias, 2014).

2.5. Estrés abiótico postcosecha

Las técnicas modernas de cultivos y la selección de cultivares han ayudado a los agricultores a mejorar la calidad deseada de los vegetales. Sin embargo, en la actualidad se ha documentado que los factores de estrés ambiental y postcosecha pueden alterar las características funcionales de vegetales y frutas frescas como la acumulación de antioxidantes (Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012; Talcott & Howard, 1999).

El estrés abiótico postcosecha se ha identificado como una estrategia para mejorar el perfil nutricional de los vegetales cultivados, al aumentar la concentración de compuestos fenólicos y otros compuestos químicos sintetizados durante la respuesta al estrés de la planta (Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012; Santana-Gálvez et al., 2016).

En años recientes, los investigadores han publicado algunas estrategias efectivas para aumentar los antioxidantes en vegetales los cuales son el estrés por corte, luz UV, atmósferas modificadas y fitohormonas (Becerra-Moreno et al., 2015; Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012; Sánchez-Rangel, Jacobo-Velázquez, Cisneros-Zevallos, & Benavides, 2016; Santana-Gálvez et al., 2016).

Estas estrategias inducen la acumulación de compuestos fenólicos en diferentes tejidos de plantas tales como la uva, la zanahoria, la lechuga, la manzana, la jícama, el apio, el camote y la col (Sánchez-Rangel et al., 2016).

Sin embargo, la zanahoria ha sido el modelo más estudiado en este tipo de técnicas por su efectividad en el mejoramiento de su perfil nutricional (Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012; Sánchez-Rangel et al., 2016; Santana-Gálvez et al., 2016).

Algunos autores han estudiado en zanahorias, la aplicación de estrés por corte en combinación con otro tipo de estrés abiótico postcosecha (luz UV, atmósferas modificadas y fitohormonas), en el cual se ha visto que esta combinación de los tipos de estrés aumenta la

acumulación de compuestos fenólicos en las zanahorias y mejora sus perfiles fenólicos (Becerra-Moreno et al., 2015; Bernadeth Surjadinata et al., 2017).

El efecto de la combinación de dos tipos de estrés abiótico postcosecha fue investigada con luz UV-B y los diferentes tipos de cortes en zanahoria sobre el aumento de antioxidantes. Algunos parámetros evaluados fueron el contenido de fenólicos solubles totales a través de la cuantificación de ácido clorogénico, carotenos y la capacidad antioxidante. Las muestras fueron expuestas a una dosis de luz UV-B de 141.4 mJ/cm² durante 3 días, de igual manera se midieron los compuestos en un control (0 días) y un control de 3 días sin luz UV-B. En los resultados se determinó que hubo un aumento significativo de fenólicos totales en las muestras que fueron expuestas a luz UV-B incrementó (24.2 mg de ácido clorogénico/100 g (bh)) en comparación con el control (12.9 mg de ácido clorogénico/100 g (bh)). Este estudio concluyó que el incremento del ácido clorogénico está directamente relacionado con el incremento del área/radio de las zanahorias frescas expuestas a la luz UV-B (Du et al., 2012).

Así mismo, Surjadinata & Cisneros -Zevallos (2017) determinaron que a mayor intensidad del corte de las zanahorias (23.5 cm²/g) de tres variedades (Navajo, Legend y Choctaw) y almacenadas durante 4 días, es mayor la concentración de fenólicos con un aumento hasta 2.5 veces más. De igual manera la capacidad antioxidante es mayor en las zanahorias cortadas con hasta 12.4 veces más antioxidantes comparados con zanahorias enteras. A su vez, estos mismos autores reportaron en que el compuesto fenólico que más aumentó con el estrés por corte fue principalmente el ácido clorogénico, seguido del ácido 3,5-dicafeolquínico.

Becerra-Moreno y colaboradores (2015) evaluaron la combinación y el efecto del estrés por corte junto con el estrés por pérdida de agua (modificación de atmosferas) por medio de la activación primaria (ácido shikímico) y secundaria (fenilpropanoide) para la acumulación de compuestos fenólicos en zanahorias. Estos parámetros fueron medidos por medio de los niveles de expresión genética en la acumulación de metabolitos. En los resultados se publicó que, el estrés por corte produce una alta activación del metabolismo primario y secundario en las zanahorias comparado solo con el estrés por pérdida de agua, por lo que en combinación con el estrés por corte existe un aumento de ácido shikímico,

compuestos fenólicos y lignina. Por último, los autores concluyen que es necesaria la combinación de los dos tipos de estrés para acelerar la biosíntesis de estos compuestos.

Por lo tanto, se ha determinado que en la aplicación de otro tipo de estrés abiótico postcosecha (luz UV, atmosferas modificadas y fitohormonas) es necesaria la aplicación de estrés por corte para activar los metabolismos de las plantas (Jacobó-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012).

En resumen, entre estas técnicas de estrés abiótico postcosecha, el estrés inducido por corte es el más estudiado, ya que es uno de los enfoques más efectivos, rápidos y económicos (Becerra-Moreno et al., 2015; Jacobó-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012; Sánchez-Rangel et al., 2016; Bernadeth Surjadinata et al., 2017).

Santana-Gálvez y colaboradores (2016) realizaron un polvo de zanahorias rico en antioxidantes, este aumento de antioxidantes los realizaron por estrés por corte en las zanahorias. El estrés se llevó a cabo con un procesador de alimentos, donde las zanahorias fueron cortadas en tiras y fueron colocadas en contenedores de plástico en una incubadora a 15°C durante 48 h, mientras tanto el control solo se cortó en tiras para comparar las determinaciones proximales y fitoquímicos de los dos tratamientos. Los resultados proximales determinaron que las zanahorias que tuvieron el estrés por corte mostraron menor cantidad de calorías (1.2%), menos carbohidratos (1.5%), y mayor cantidad de fibra soluble total (23%) (predominó el contenido de fibra insoluble) en comparación con el control. En cuanto a la concentración de fitoquímicos, las zanahorias estresadas por corte fueron significativamente altas en ácido clorogénico (522%), ácido ferúlico (140%), isocumarinas (66%), derivado de ácido p-cumárico (69%) y compuestos fenólicos totales (225%) en comparación con el control. Por otro lado, también se observó una mayor concentración de α -caroteno (16%) y β -caroteno (13%) en las zanahorias que fueron estresadas por corte comparadas con el control.

Se ha comprobado científicamente que la síntesis de compuestos fenólicos se da como respuesta de ayuda a mitigar el daño celular de la planta provocado por el estrés por corte y se encuentra mediado por moléculas de señalización, como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y algunas fitohormonas, como el etileno y metil jasmonato (Sánchez-Rangel et al.,

2016). Estas moléculas de señalización inducen la producción de los fenólicos activando la ruta metabólica fenilpropanoide que genera derivados del ácido hidroxicinámico, principalmente el ácido clorogénico (Becerra-Moreno et al., 2015; Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012).

En las zanahorias tratadas con estrés abiótico postcosecha, se han encontrado diferentes compuestos, sin embargo, la concentración de ácido clorogénico es la más alta entre los compuestos fenólicos (~ 440-920 mg / kg) (Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012).

2.6. Ácido clorogénico

El ácido clorogénico es un compuesto fenólico derivado de la familia del ácido hidroxicinámico. Su estructura química consiste en un éster de ácido cafeico y un éster de ácido quínico (como se muestra en la Figura 4), por lo que es mayor conocido como 5-O-ácido cafeoilquinico (5-CQA) (Santana-Gálvez et al., 2016).

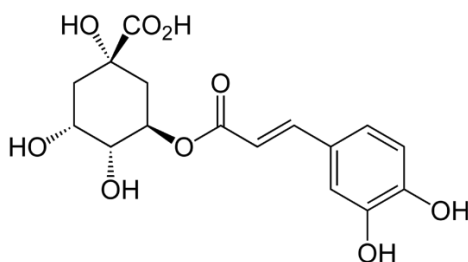


Figura 4. Estructura química del ácido clorogénico

Este compuesto fenólico ha sido estudiado por diferentes autores ya que se encuentra distribuido en diferentes vegetales y es uno de los principales componentes en las dietas de los humanos (Jin et al., 2015; Santana-Gálvez et al., 2016; Suzuki et al., 2006). Aunado a esto el ácido clorogénico es absorbido y metabolizado en el cuerpo humano, donde en estudios *in vitro* y clínicos se ha demostrado que tiene un impacto positivo contra enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes (Jin et al., 2015; van Dijk et al., 2009), hipertensión (Mubarak et al., 2012; Suzuki et al., 2006), obesidad (K. Huang et al., 2014;

Thom, 2007), dislipidemia (Wan et al., 2012) y síndrome metabólico (Santana-Gálvez et al., 2017).

2.6.1. Efecto del ácido clorogénico sobre la concentración de antioxidantes en plasma

Los polifenoles consumidos a través de la dieta son beneficiosos para la salud humana, al ejercer diversos efectos biológicos. El ácido clorogénico está compuesto por grupos hidroxilo adyacentes a un residuo aromático, el cual exhibe actividades anti mutagénicas, carcinogénicas y antioxidantes *in vitro*, el cual consiste en eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sato et al., 2011).

La administración de antioxidantes en la dieta podría ayudar a eliminar a las ROS, ya que se ha observado que estos antioxidantes pueden mejorar la defensa celular y ayudar a prevenir el daño por oxidación de los componentes celulares, ya que el estrés oxidativo se produce cuando la producción de ROS supera la capacidad de las defensas antioxidantes celulares para eliminar estas especies tóxicas (Maurya & Rizvi, 2010).

Algunas enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, desempeñan funciones importantes defensivas reduciendo los niveles peligrosos como el O₂ (radical anión superóxido). Esta situación disminuye la baja formación de ROS, neutralizando o reduciendo sus acciones perjudiciales (Vicente, Ishimoto, & Torres, 2013).

Por otro lado, las enzimas glutatión-S-transferasas pueden metabolizar toxinas endógenas y exógenas y los carcinógenos catalizando la conjugación de diversos electrófilos como el glutatión reducido (Maurya & Rizvi, 2010).

La capacidad antioxidante, es la forma de medir los compuestos antioxidantes exógenos y endógenos presentes en el plasma. Cuando hay una mayor capacidad antioxidante, podría decirse que los antioxidantes tienen una mayor capacidad para estabilizar los radicales, y por ende provocando un efecto benéfico a la salud (Jacobo-Velazquez & Cisneros-Zevallos, 2009).

Suzuki y colaboradores (2006) realizaron una investigación del consumo de ácido clorogénico y sus efectos sobre la hipertensión utilizando ciertos parámetros de medición como la enzima superóxido dismutasa y la capacidad antioxidante en plasma de ratas. Ratas Wistar-Kyoto fueron divididas en 4 grupos. El primer y segundo grupo consistió en ratas sanas (el primer grupo fue control y a el segundo grupo se le administraron 300 mg/kg de ácido clorogénico a su dieta). El tercer y cuarto tratamiento constó de ratas con hipertensión,

de las cuales el tercer grupo fue el control y el cuarto consumió 300 mg/kg de ácido clorogénico. Las ratas hipertensas que consumieron este compuesto presentaron 17.3 % de inhibición de actividad superóxido dismutasa y 232 nmol/L de concentración de antioxidantes totales en plasma. Mientras que las ratas hipertensas control obtuvieron 18.2% de inhibición de actividad superóxido dismutasa y 251nmol/L de concentración de antioxidantes totales en plasma. Y las ratas que estaban sanas (grupo 1) presentaron un porcentaje de inhibición de 21.1% inhibición de actividad superóxido dismutasa y 423 nmol/L de concentración de antioxidantes totales en plasma y el grupo de ratas sanas que consumieron ácido clorogénico tuvieron 22.5 % inhibición de actividad superóxido dismutasa y 434 nmol/L de concentración de antioxidantes totales en plasma, por lo cual no hubo diferencias entre estos dos grupos.

2.6.2. Efecto del ácido clorogénico sobre la Diabetes Mellitus

Jin y colaboradores (2015) realizaron una investigación en el cual su objetivo fue examinar los efectos del ácido clorogénico sobre la glucosa y el metabolismo en lípidos de ratones diabéticos db/db. Treinta y dos ratones fueron divididos en cuatro grupos: grupo control, grupo con ácido clorogénico, db/grupo control y db/grupo con ácido clorogénico. Los animales alimentados con ácido clorogénico recibieron 80 mg/ peso corporal durante 12 semanas. Los resultados determinaron que el consumo de ácido clorogénico disminuyó el porcentaje de grasa corporal (11.5%), la glucosa plasmática en ayunas (14.6 mmol/L) y la hemoglobina glucosilada (27.6%) comparadas con el grupo control/db, los cuales presentaron concentraciones promedio de 12.7%, 20.5 mmol/L y 35.8% respectivamente.

Asimismo, se ha observado que el ácido clorogénico también tiene efectos sobre la diabetes en estudios clínicos. En un estudio reciente sobre el efecto de ácido clorogénico en la elevación de glucosa en plasma en humanos, se realizó una investigación en la cual se reclutaron 15 hombres con sobrepeso (IMC= 25-35 kg/m²). Al azar, a estos pacientes se les administraron 4 diferentes suplementos; 12 g de café descafeinado, 1 g de ácido clorogénico puro, 500 mg de trigonelina o el placebo de 1 g de manitol disuelto en 270 ml de agua. Las personas que consumieron el ácido clorogénico redujeron significativamente su concentración de glucosa (-0.7 mmol/L, P= 0.007) e insulina (-73 pmol/L, P= 0.038) a los 15 min de realizarse la prueba de tolerancia a la glucosa, comparado con los pacientes que

consumieron el placebo. Por lo que se concluye que este compuesto fenólico podría tener un efecto positivo sobre la diabetes mellitus (van Dijk et al., 2009).

2.6.3. Efecto del ácido clorogénico sobre la hipertensión

Los efectos del ácido clorogénico sobre la hipertensión fueron reportados en una investigación realizada por Suzuki y colaboradores (2006). Esta investigación fue dividida en dos partes y fueron utilizadas 45 ratas Wistar-Kyoto. En el primer experimento se administró por vía oral ácido clorogénico puro en varias dosis: 30 mg/kg de peso, 100 mg/kg de peso, 300 mg/kg de peso y 600 mg/kg de peso y en el segundo experimento; las ratas fueron alimentadas con una dieta que contenía el 0.5% de ácido clorogénico durante 8 semanas. La ingestión pura de ácido clorogénico en una dosis mínima de 100 mg/kg de peso corporal redujo significativamente la presión arterial sistólica (-11.7%) en comparación con el control. En el segundo experimento se comprobó que el consumo del ácido clorogénico en un 0.5% en una dieta durante 8 semanas puede inhibir el desarrollo de la hipertensión, ya que, al término del estudio, los roedores que consumieron el ácido clorogénico en la dieta, tuvieron una presión arterial sistólica de 193 mmHg, mientras que el control tuvo 203 mmHg, por lo que estos resultados fueron significativos.

Por otro lado, se realizó un estudio sobre el efecto del ácido clorogénico sobre la presión arterial en 23 personas sanas (4 hombres y 19 mujeres). En esta investigación, se formaron dos grupos al azar, al primer grupo se les dio agua como control y al segundo 400 mg de ácido clorogénico disuelto en 200 mL de agua baja en nitratos. La presión arterial fue tomada antes del tratamiento y 60, 90, 120 y 150 min posteriormente a la toma del procedimiento. En los resultados de la investigación, los autores mencionan que la presión sistólica (-2.41 mmHg, $P= 0.05$) y presión diastólica (-1.53 mmHg, $P= 0.04$) disminuyeron significativamente con la ingestión del ácido clorogénico en comparación con el control, por lo cual este compuesto fenólico podría tener un efecto benéfico sobre las enfermedades cardiovasculares (Mubarak et al., 2012).

2.6.4. Efecto del ácido clorogénico sobre la obesidad

Huang y colaboradores (2014) realizaron una investigación con 40 ratas Sprague-Dawley, las cuales fueron divididas al azar en 4 grupos: Grupo 1: ratas alimentadas con una dieta normal, grupo 2: ratas alimentadas con una dieta alta en grasas, grupo 3: Ratas alimentadas con una dieta alta en grasas con 20 mg de ácido clorogénico/kg de peso corporal y grupo 4: ratas alimentadas con una dieta alta en grasas con 90 mg de ácido clorogénico/kg de peso corporal durante 12 semanas. Las ratas que consumieron el ácido clorogénico en menos dosis tuvieron una disminución del incremento de peso, grasa visceral y los ácidos grasos libres comparados con el control. Sin embargo las ratas que consumieron mayor contenido de ácido clorogénico tuvieron aún más disminución en estos parámetros, ya que presentaron una menor disminución del peso (342 g), grasa visceral (28 g kg⁻¹ peso corporal) y ácidos grasos libres (534 mol L⁻¹) comparado con el control que presentaron cantidades de 410 g de peso ganado, 49 g kg⁻¹ peso corporal de grasa visceral y 755 mol L⁻¹ de ácidos grasos libres.

Estudios clínicos han reportado también el efecto benéfico del ácido clorogénico sobre la obesidad. Treinta hombres con sobrepeso (IMC= 27.5 – 32 kg/ m²) participaron en un estudio clínico para determinar el efecto del ácido clorogénico, sobre su peso corporal. Los individuos fueron divididos en dos grupos aleatoriamente, el primer grupo consumió café con 45 mg ácido clorogénico/g y el segundo grupo consumió café instantáneo con 30-40 mg de ácido clorogénico /g. Estos sujetos consumieron 5 tazas al día de café con un promedio de 11 g de café al día durante 12 semanas. Al término del tratamiento, el grupo que consumió 45 mg/ ácido clorogénico/g redujo su peso corporal en un -5.4 kg, mientras que el grupo que consumió en promedio 30-40 mg de ácido clorogénico /g redujo -1.7 kg de peso corporal, por lo que el consumo de ácido clorogénico podría ayudar en la disminución del peso corporal en humanos (Thom, 2007).

2.6.5. Efecto del ácido clorogénico sobre la dislipidemia

El efecto del ácido clorogénico sobre la hiper colesterolemia fue investigado por Wan y colaboradores (2012), este estudio se llevó acabo monitoreando el perfil lipídico en plasma (Colesterol total, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad y lipoproteínas de baja

densidad) de ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta normal, una dieta alta en colesterol y una dieta alta en colesterol suplementada con ácido clorogénico (1 o 10 mg/kg/día) durante 28 días. La dieta suplementada con ácido clorogénico (10 mg/kg/día) redujo significativamente el colesterol total (4.83 mmol/L) y lipoproteínas de baja densidad (6.93 mmol/L) e incrementó las lipoproteínas de alta densidad (0.63 mmol/L) en roedores comparados con el control, en el cual se presentaron resultados colesterol total (5.78 mmol/L), lipoproteínas de baja densidad (8.74 mmol/L) y lipoproteínas de alta densidad (0.44 mmol/L). Con estos resultados se observa el efecto ateroscleroprotector y cardioprotector del compuesto fenólico.

2.6.6. Efecto del ácido clorogénico sobre las enfermedades neurológicas

Así mismo de los beneficios bien documentados contra el síndrome metabólico, los estudios de investigación *in vitro* e *in vivo* sugieren que el ácido clorogénico puede ayudar a prevenir la degeneración neuronal del envejecimiento (Ferlemi et al., 2015; Gul et al., 2016; Kwon et al., 2010; Shukitt-Hale et al., 2015).

La efectividad del ácido clorogénico y sus metabolitos, es decir ácido cafeíco y quínico fueron probados en el estrés oxidativo de cerebros de rata. Ratas hembra, Sprague-Dawley fueron utilizadas en este bioensayo. Para la realización de este experimento, se utilizó el radical H₂O₂, el cual indujo alteraciones en la tinción de Cloruro de 5-trifeniltetrazolio, la producción de malonaldeído y la producción de ROS en los pedazos corticales de las ratas. Las concentraciones del H₂O₂ disminuyeron en las tinciones con Cloruro de 5-trifeniltetrazolio en los tratamientos con ácido clorogénico (concentración utilizada de ácido clorogénico 0.1 µm a 10), por lo que los autores relacionan que la masiva cantidad de H₂O₂ esta correlacionada con la perdida neuronal, es decir los cerebros tratados con ácido clorogénico tienen menor perdida neuronal que los cerebros control. En conclusión, el ácido clorogénico protege los pedazos corticales de las ratas contra la oxidación por Ho en parámetros de estrés oxidativo (Gul et al., 2016).

Taram y colaboradores (2016), investigaron el efecto neuro protector del ácido clorogénico y sus principales metabolitos en cultivos de neuronas de los gránulos del cerebro de ratas. Para realizar este experimento se obtuvieron gránulos de las neuronas del cerebro de camadas de ratas Sprague-Dawley de 7 días de nacidas. El ácido clorogénico y cafeíco

(50 μm) mostraron efectos protectores contra el donador de óxido nítrico, nitroprusiato de sodio, mientras que el ácido cafeico y ferúlico protegieron significativamente las neuronas de la toxicidad. Por otro lado, también el ácido cafeico mostró un efecto protector significativamente contra el peróxido de hidrogeno, inhibición de proteasoma (PS-341), la apoptosis intrínseca dependiente de caspasa y el estrés del retículo endoplásmico. Por lo que el ácido clorogénico y sus metabolitos (ácido cafeico) presentan un efecto neutro protector en diferentes métodos de estrés a los que se puede someter a los gránulos de las neuronas.

Por otro lado, se evaluaron los efectos neuro-protectores del ácido clorogénico en la disminución de memoria inducidos por la escopolamina (0.5 mg/kg i.p.) usando un laberinto en Y y las pruebas de Morris. Para realizar esta investigación se utilizaron ratones macho de 4 semanas de edad; el agua y comida se proporcionó *ad libitum*. Las dosis administradas de ácido clorogénico fueron 0, 3, 6 ó 9 mg/kg de peso corporal. El ácido clorogénico en mayor concentración (9mg/kg) mejoró significativamente el comportamiento en las pruebas de memoria en el grupo inducido con escopolamina en el laberinto Y con un 42%, en comparación con el control (58%). Así mismo, el ácido clorogénico disminuyó las latencias en el laberinto de Morris (25 s) a diferencia de las mayores latencias del control (80 s). En cuanto a las pruebas ex vivo, el ácido clorogénico inhibió la actividad de la acetilcolina esterasa en el hipocampo (1.4 nmol/mg de tejido de cerebro (TC)) y en la corteza frontal (1.8 nmol/mg TC), en comparación con el control que presentaron una actividad de 3 nmol/mg de TC y 3 nmol/mg de TC respectivamente. De igual manera, el ácido clorogénico disminuyó los niveles de malondialdehído en el hipocampo 1.2 $\mu\text{mol/mg}$ TC y la corteza cerebral 2.2 $\mu\text{mol/mg}$ TC comparados con el control (5.5 y 5.8 $\mu\text{mol/mg}$ TC). En las pruebas in vitro, el ácido clorogénico inhibió la actividad de acetilcolina esterasa (IC_{50} = 98.17 $\mu\text{l/ml}$) y los radicales libres (IC_{50} = 3.09 $\mu\text{l/ml}$). Por lo que los autores propusieron que el mecanismo de acción podría ser que el ácido clorogénico actúa en el sistema nervioso central a través de la barrera hematoencefálica, en su forma intacta o como metabolito. Siendo que esté compuesto fenólico puede actuar directamente eliminando radicales libres o como regulador para inhibir la acetilcolina esterasa, como actividad oxidativa y homeostasis iónica del desequilibrio en las neuronas inducidas por escopolamina que pasa a través de la barrera hematoencefálica. En conclusión, los autores reportan la evidencia neuro protectora del ácido clorogénico, ya

que está relacionado con la inhibición en el hipocampo y corteza frontal en ratones inducidos a amnesia por medio de la escopolamina (Kwon et al., 2010).

2.6.7. Efecto de compuestos fenólicos sobre las enfermedades neurológicas

De igual manera, otros compuestos fenólicos han sido reportados como buenos antioxidantes que podrían ayudar en la prevención de la neurodegeneración y mejorar el rendimiento de las neuronas (Ferlemi et al., 2015; Shukitt-Hale et al., 2005).

El extracto de las hojas de blueberries (ácido clorogénico, rutina, isoquercetina y agliconas de quercetina) fue estudiado para observar el efecto y los mecanismos del estrés oxidativo inducido por selenio en cerebros de ratas recién nacidas, ya que los polifenoles de los blueberries tienen efectos positivos sobre el aprendizaje y memoria en ratas adultos por medio de la neurotransmisión y la defensa antioxidante en el cerebro. Para realizar la investigación se utilizaron 6 camadas de Ratas Wistar de 7 días de nacidas. Las camadas fueron divididas al azar en 3 grupos: 1: control, 2: grupo inducido con selenio y 3: grupo inducido con selenio y con tratamiento de extracto de blueberries (100 mg/kg). En los resultados, se observó que hubo una mayor inhibición en DPPH en el grupo de las ratas con el extracto de blueberries (34.21 µg/mL) en comparación con el grupo dos. La administración de extracto de blueberries redujo significativamente la peroxidación lipídica en la corteza (22%) y el mesencéfalo (54%) en comparación con el grupo tratado con Selenio. El grupo que recibió el extracto de blueberries incrementó la actividad SOD significativamente en el cerebelo en comparación con los otros dos grupos. Por lo que el extracto rico en ácido clorogénico y flavonoles protegió los tejidos alterados por sobredosis de selenio y también mejoró el efecto antioxidante en tejidos afectados como el mesencéfalo y cerebelo (Ferlemi et al., 2015).

Shukitt-Hale y colaboradores (2005) evaluaron el efecto de una dieta suplementada con polifenoles obtenido de diversas frutas sobre el déficit de comportamiento y déficit de memoria por la edad. La metodología consistió en 70 Ratas Fisher de 19 meses de edad divididas en 5 grupos y alimentadas con una dieta balanceada control o una dieta suplementada con 2% de extracto de blueberry o 2% cranberry o 2% grosella negra o 2% boysenberry o control durante 12 - 16 semanas. Se realizaron determinaciones de fenólicos

y antocianinas en los extractos. El extracto se realizó añadiendo agua 1:1 (v/v), se homogenizó y centrifugó, se congeló y se hizo polvo, para después agregarlos a las dietas NIH-31, previamente estandarizadas. Los extractos analizados tuvieron las siguientes concentraciones de antocianinas y fenólicos: Blueberry (antocianinas totales 1.3 mg/g, fenólicos totales 1.2 mg/g); grosella (antocianinas totales 8.7 mg/g, fenólicos totales 2.9 mg/g), boysenberry (antocianinas totales 9.2 mg/g, fenólicos totales 2.0 mg/g); cranberry (antocianinas totales 3.3 mg/g, fenólicos totales 3.6 mg/g). El grupo de la grosella negra y el cranberry mejoró las señales de transducción neuronal medidas por la liberación de la dopamina ($P = 0.004$ y $P = 0.007$ respectivamente), mientras que los grupos con la dieta con blueberry (y cranberry tuvieron mejor eficiencia en el desarrollo motor y neuro protección del hipocampo HSP70 comparado con el control ($P = 0.001$ y $P = 0.060$). Por consiguiente, los antioxidantes de los berries pueden mejorar el desarrollo funcional de la neurona y la medición de liberación de dopamina restaurando el cerebro, por medio de la protección contra el estrés oxidativo e inflamación.

2.7. La memoria

La memoria se define como la capacidad de retener y de evocar eventos del pasado, mediante procesos neurobiológicos de almacenamiento y de recuperación de la información, básica en el pensamiento y el aprendizaje (Etchepareborda & Abad, 2005).

En la actualidad son reconocidos 3 procesos básicos en el sistema de la memoria:

La codificación de la información: Proceso en cual registramos inicialmente la información para que se pueda guardar. La información puede codificarse como una imagen, sonidos, experiencias, acontecimientos o ideas significativas. Las circunstancias como la atención, la concentración, que rodean este momento resultan fundamentales para el éxito o fracaso de la memoria (Amaya-Guerra, 2003; Etchepareborda & Abad, 2005).

El almacenamiento de la información: Se caracteriza por el ordenamiento o categorización de la información mientras se desarrolla el proceso en curso y consiste en

guardar la información de la memoria y conserva la información hasta que se necesite (Amaya-Guerra, 2003).

Evocación o recuperación de la información: Proceso por el cual la información es recuperada. Si ésta ha sido bien almacenada y clasificada será más fácil localizarla y utilizarla en el momento en que se solicita. Por lo que solo si se llevan a cabo estos tres procesos, se podrá recordar la información (Amaya-Guerra, 2003; Etchepareborda & Abad, 2005).

La memoria ha sido clasificada por algunos autores en diferentes tipos de procesamiento:

Memoria de Corto plazo: Es el tipo de memoria que se utiliza cuando se desea retener información por un corto tiempo para pensar en ella. El almacén a corto plazo tiene un componente de memoria de trabajo, una especie de espacio de trabajo mental o bloc de dibujo en la mente, que se utiliza para manipular la información en la conciencia (Engle et al., 1999). Si las unidades de información no reciben un procesamiento cuando llegan a él, desaparecerán en unos pocos segundos y podrían durar solo unas pocas horas (Prediger et al., 2008). Por ejemplo, un número de teléfono que memorizamos mientras hacemos la llamada y luego desaparece esta información (Amaya-Guerra, 2003).

Memoria de Largo plazo: En este tipo de memoria se guarda la información recibida a través de los sentidos, en el cual comienza con la memoria de corto plazo y que puede ser transferida este tipo de memoria. Se ha considerado que esta memoria es consolidada lenta y es relativamente permanente (Prediger et al., 2008). En ella se almacenan los conceptos y las asociaciones o relaciones que hay entre ellos y esta información es ilimitada, en cuanto al periodo de duración de la información y en su capacidad (cantidad de unidades o grupos de información que podemos almacenar) (Amaya-Guerra, 2003).

Memoria de Trabajo: La memoria es procesada en el lóbulo frontal del cerebro y es considerada como un sistema encargado de almacenar y administrar transitoriamente toda la información que se encuentra actualmente en uso para la realización de una tarea específica. Esta memoria es inmediata y puede durar desde segundos a unos minutos (Prediger et al., 2008). Este sistema se basa en tres componentes principales: 1) Un sistema de control con

capacidad atencional limitada que se denomina: Componente Central Ejecutivo, el cual es asistido por dos sistemas subsidiarios de almacenamiento. 2) El circuito fonológico, que está basado en sonido y lenguaje. 3) El esquema visual-espacial (Carrillo-Mora, 2010).

Desempeño de aprendizaje: El desempeño de aprendizaje en las ratas se explica como un proceso de azar y fijación. Esta situación se vio reflejada en ratas en donde se colocaron en un laberinto sin salida, en el cual había una caja con alimento, y se observó que la rata efectuaba movimientos al azar. Todas estas idas y venidas frustraron movimientos de ensayo y error y solo un movimiento correcto conducía a la salida, no solo lo realizaba por libertad, sino también por el alimento, es decir, un objeto satisfactorio. Mediante repeticiones el movimiento acertado llegó a fijarse y las reacciones inadecuadas fueron eliminadas gradualmente (Amaya-Guerra, 2003).

2.8. Desarrollo cognitivo

El desarrollo cognitivo considera al cerebro como un sistema de procesamiento de información, por lo tanto, trata de indagar en las actividades de procesamiento que tiene durante el curso de aprendizaje y el modo en el que la información se queda procesada en la memoria. Al ser actividades internas, las actividades de procesamiento de información no son directamente observables como “conductas, si no son inferidas a partir de la observación de la conducta. Por ello, el estudio de cualquier fenómeno psicológico a un nivel cognitivo no puede ser nunca independiente del estudio de este fenómeno a nivel conductual (Aguado-Aguilar, 2001).

Los procesos cognitivos como memoria, expectativa, razonamiento no son “observados” en sí mismos, sino inferidos a partir de las actividades conductuales de los sujetos. El estudio cognitivo del aprendizaje y la memoria es el estudio del proceso de formación de nuevas representaciones mentales, es decir, de los contenidos informativos derivados de experiencias pasadas o de las actividades de procesamiento llevadas a cabo sobre los propios contenidos de la memoria (Aguado-Aguilar, 2001; Amaya-Guerra, Serna Saldívar, & Alanis-Guzman, 2006).

2.8.1. Laberinto de agua de Morris

El laberinto de agua de Morris es la prueba más utilizada para estudiar el comportamiento, los procesos psicológicos y mecanismos neuronales del aprendizaje espacial y la memoria en la neurociencia (Bromley-Brits, Deng, & Song, 2011; Morris, 1984; Vorhees & T Williams, 2006). Esta prueba fue desarrollada en 1981 por el neurocientífico Richard Morris en la Universidad de St. Andrews en Escocia. El laberinto de Morris se utiliza principalmente para evaluar el desarrollo cognitivo en modelos animales, por ejemplo, el envejecimiento (Shukitt-Hale et al., 2006; Shukitt-Hale et al., 2009), enfermedades neurológicas (Essa et al., 2015) y nuevos fármacos (Bromley-Brits et al., 2011).

Este ensayo consiste en una piscina circular de agua, en el cual existe una plataforma oculta y donde los roedores utilizan la memoria espacial para poder localizar la plataforma, por lo cual la prueba se deriva en las neuronas del hipocampo que son las encargadas de identificar el espacio en un entorno. La piscina debe ser camuflada con algún colorante para ocultar la plataforma, que debe estar colocada unos cuantos centímetros más abajo del agua para poder ocultarse. Se debe asignar dos estándares como ejes principales del laberinto y así crear cuadrantes imaginarios, los cuales se deben dividir en: Norte (N), Sur, (S), Este (E) y Oeste (O) como se observa en la Figura 5. Estas no son posiciones verdaderas de la brújula, pero sirven como referencia para el experimentador en la prueba. La plataforma debe ser colocada en cierto cuadrante, mientras que el roedor en otro cuadrante (Morris, 1984).

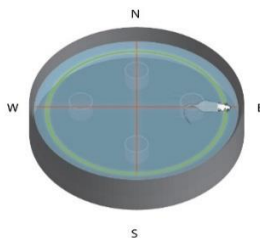


Figura 5. Piscina del laberinto de agua de Morris

Morris describió los procedimientos básicos en 1984 y posteriormente agregó detalles y procedimientos para evaluar formas relacionadas de aprendizaje y memoria (Vorhees & T Williams, 2006). Las ratas son nadadoras naturales y realizan las pruebas de agua fácilmente,

incluso si han sufrido lesiones cerebrales encefálicas de varios tipos. Una de las ventajas del laberinto de agua de Morris es que el agua proporciona un entorno que controla las señales olfativas y permite una variedad de procedimientos de entrenamiento para relacionar al aprendizaje y el rendimiento (Morris, 1984). En la actualidad el laberinto de agua de Morris juega un papel importante en la validación de modelos de roedores para trastornos neurocognitivos como la enfermedad de Alzheimer (Bromley-Brits et al., 2011).

2.8.1.1. Antioxidantes y su efecto sobre el laberinto de agua de Morris

Diversos autores han utilizado la prueba del laberinto de agua de Morris para estudiar el efecto de los antioxidantes derivados de extractos de diversas frutas sobre el desarrollo cognitivo en ratas (Essa et al., 2015; Prediger et al., 2008; Shukitt-Hale, Carey, Jenkins, Rabin, & Joseph, 2007; Shukitt-Hale et al., 2006, 2005, 2009).

Shukitt-Hale y colaboradores han publicado diversas investigaciones sobre el consumo de antioxidantes y su efecto en el laberinto de Morris. Una de sus publicaciones investigó el ácido clorogénico como compuesto de un suplemento de ciruela *Prunus domestica*. en el efecto de la mitigación de la deficiencia de la función cognitiva con la edad. Esta investigación fue dividida en dos experimentos. Para realizar el primer experimento se utilizaron 30 ratas, de las cuales, 15 consumieron el polvo de ciruela y 15 control. Las ratas consumieron una dieta NHI-31 a la cual se incorporó un 2% de polvo a la dieta. Esta dieta fue suministrada durante 8 semanas. El contenido del suplemento tuvo una composición de 99% de polvo de ciruela y 1% de calcio. La concentración de fenólicos del polvo fue de 6.86 mg de equivalentes de ácido gálico/ g. y ORAC- 198 $\mu\text{mol}/\text{Teg}$ de polvo. El segundo experimento se realizó con jugo de ciruela. En cual se dividieron 28 ratas, 13 control y 15 consumieron jugo. Todas las ratas consumieron una dieta NHI-31 y agua (control) o jugo de ciruela *ad libitum*. La concentración de fenólicos del jugo fue de 6.29 mg GAE/g (peso seco), o (1264 mg GAE/L), antocianinas 0.009 mg C3GE /g peso seco y ORAC 156 $\mu\text{mol}/\text{TE g}$ de peso seco de jugo. Al término, de la dieta se realizó la prueba del laberinto de agua de Morris. Las ratas que consumieron el jugo de ciruela tuvieron mejor latencia en la memoria de trabajo en el laberinto de Morris ($P=0.01$), comparado con las ratas que consumieron el suplemento en polvo, ya que estas no tuvieron diferencias significativas respecto al control. Según los autores, estos resultados se pueden deber a la menor cantidad de fenólicos que hay en el polvo

en comparación con el jugo. Ya que las ratas que consumían el jugo lo hacían en un promedio más de 9 veces al día (consumían el 100% de jugo), mientras que las que consumían el polvo solo era el 2% al día. Por lo que el efecto de los antioxidantes que contiene el jugo de ciruela es positivo sobre el desarrollo cognitivo comparado con el polvo de ciruela y el control (Shukitt-Hale et al., 2009).

En otra de las publicaciones se determinó el efecto de un jugo de uva (alto contenido de resveratrol) sobre el déficit cognitivo provocado por el estrés oxidativo de la edad. Para el cual, se utilizaron 45 ratas macho de 19 semanas de edad, divididas al azar en 3 grupos (15 ratas por grupo). Al primer grupo se le dio 0% de jugo de uva, al segundo 10% de jugo de uva (40% de agua y 10% de jugo) = fenólicos totales: 255 mg/L GAE, antocianinas 36.6 mg/L equivalentes de malvidina y ORAC -3272 $\mu\text{mol/L TE}$. Al último grupo se le administró 50% de jugo (50% agua y 50% jugo) = fenólicos totales: 1098 mg/L GAE, antocianinas 183 mg/L equivalentes de malvidina y ORAC -16397 $\mu\text{mol/L TE}$. Esta dieta se consumió durante 8 semanas y al término de este tiempo, se realizaron las pruebas cognitivas por el laberinto de agua de Morris. En los resultados los autores mencionan que los grupos que consumieron el 10% y 50% de jugo obtuvieron mejores resultados estadísticamente en las pruebas psicomotoras comparados con el control ($P < 0.005$), mientras que la liberación de dopamina fue significativamente mejor en el grupo del 10% que en el grupo del 50% y control ($P < 0.05$). Las ratas que tomaron 10% de jugo de uva tuvieron mejores tiempos de latencia en el laberinto de agua de Morris comparados con el control ($P < 0.05$). Por lo que en este estudio se concluyó que los alimentos ricos en polifenoles pueden tener efecto benéfico en el revertimiento del comportamiento de la edad y en el curso neuronal, posiblemente a través de la multiplicidad directa e indirecta de efectos que afectan los parámetros neuronales (Shukitt-Hale et al., 2006).

En algunos estudios se ha comprobado que la exposición de Fe al cuerpo hace que aumente el déficit del funcionamiento neuronal, por lo que una investigación evaluó la eficacia de dietas con antioxidantes sobre la irradiación con partículas de Fe. Para determinar este efecto se utilizaron 60 ratas macho Sprague-Dawley. Veinte ratas fueron alimentadas con 2% de fresas y 98% de dieta NIH-31; 20 ratas con 2% de berries y 98% de dieta NIH-31 y 20 control 100% NIH-31. Este alimento se administró *ad libitum* durante 8 semanas. Para

la preparación del concentrado de antioxidantes, las fresas y berries fueron mezcladas con (1:1 o 1:2 (V:P), respectivamente). Se centrifugaron y el sobrenadante fue liofilizado y congelado. Al momento de realizar la radiación los tratamientos se dividieron en 6: dieta control, control irradiado, grupo de blueberry sin radiar, blueberry radiado, fresa sin radiar y fresa irradiado. Para analizar el desarrollo cognitivo se realizó la prueba del laberinto de agua de Morris, de igual manera, se realizaron mediciones de dopamina. La exposición de radiación afectó el comportamiento cognitivo, sin embargo, el grupo de las ratas que consumieron fresas y berries mostraron una mayor protección contra esta radiación. El grupo control irradiado realizó mayor latencia en llegar a la plataforma en comparación con el grupo control no irradiado ($p < 0.005$). En la concentración de dopamina, los controles irradiados tienen mucho menor contenido de dopamina que los irradiados y suplementados con berries y fresas ($p < 0.001$). Por lo que estos datos demostraron que las dietas con berries y fresas (altas en antioxidantes) proveen protección contra efectos de radiación, específicamente en aprendizaje espacial y de memoria (Shukitt-Hale et al., 2007).

Algunos estudios sugieren que los flavonoides y sus metabolitos se absorben a través de la barrera hematoencefálica y puede ejercer acciones neuro farmacológicas a nivel molecular, que influyen en las vías de señalización, la expresión génica y función de proteína, las cuales pueden ser probadas por medio de la prueba del laberinto de agua de Morris. Rendeiro y colaboradores (2013) dividieron 4 grupos de ratas macho Wistar de 18 meses (grupos de 8 ratas): grupo 1: control, grupo 2: 2% de extracto de blueberry (253.1 mg flavonoides/g (179.0 mg antocianinas; 74.1 mg flavanoles)) en dieta; grupo 3: extracto de antocianinas (179.0 mg de antocianinas) y grupo 4 flavanoles (14.8 mg epicatequina y 59.3 mg de catequina). Los polvos fueron agregados a una dieta AIN-76 previamente estandarizada. Estos tratamientos fueron administrados durante 6 semanas y al término se realizaron pruebas de memoria y mediciones en el hipocampo al terminar este tiempo. Los flavonoides puros y las antocianinas indujeron significativamente la mejoría en la memoria de trabajo espacial ($p < 0.002$ y $p < 0.006$), muy similar a la dieta con blueberry ($p < 0.002$). Estos cambios sugieren esto se debe al incremento de los niveles de proteína del factor neurotrófico derivado del cerebro en el hipocampo, un mecanismo para mejorar la memoria. Sin embargo, también se observó que las antocianinas potenciaron la expresión del mRNA en los niveles de proteína del factor neurotrófico del hipocampo. Por lo que los flavonoides,

epicatequina, catequina y antocianinas son capaces de inducir efectos benéficos en la memoria de ratas viejas aportando beneficios al desarrollo cognitivo.

Así mismo, el laberinto de Morris ha sido utilizado como modelo para evaluar el consumo de antioxidantes en la dieta y estudiar su efecto sobre algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. El efecto de una dieta suplementada con granada (antocianinas y elagitaninos) sobre la memoria, ansiedad y habilidades de aprendizaje en un modelo de ratón transgénico (Alzheimer) con una doble mutación (APP sw/Tg2576). Para la realización del suplemento, la granada fue congelada y triturada, posteriormente se realizó el jugo y después el secado a 40° C para concentrarlo. Se requirieron de 20 ratones hembra transgénicos y 6 ratones no transgénicos divididos en 3 grupos. Grupo 1: ratones no transgénicos alimentados con una dieta estándar, grupo 2: ratones transgénicos alimentados con una dieta estándar y grupo 3: ratones transgénicos alimentados con 4% de granada a su dieta. La administración de las dietas comenzó desde los 4 meses hasta los 14 meses de edad, al terminó se realizó la prueba del laberinto de Morris (memoria espacial y habilidad de aprendizaje), prueba rotarod (coordinación psicomotora) y test de laberinto elevado (ansiedad). El grupo 2 presentó déficit de memoria, aumento de ansiedad relacionada con el comportamiento e impedimentos en la habilidad de aprendizaje espacial y coordinación motora comparada con el grupo de ratones no transgénicos. En contraste, el grupo 3, es decir, los ratones transgénicos alimentados con granada mostraron mejorías en la memoria, aprendizaje, función locomotora, reducción de ansiedad comparas con el ratón transgénico que no consumió granada. Por lo que finalmente, los autores concluyeron que una dieta suplementada con granada podría reducir la progresión cognitiva y alteraciones de comportamiento en Alzheimer (Essa et al., 2015).

Muthaiyah y colaboradores (2014) evaluaron el efecto de una dieta suplementada con nueces (tocoferol, folatos, melatonina, flavonoides y fenólicos (ácido elagico) y n- α -ácido linoleico (ALA) sobre las habilidades de aprendizaje, memoria, ansiedad, actividad locomotora y coordinación motora en ratones transgénicos con enfermedad de Alzheimer (AD). Para está investigación se utilizaron ratones hembra transgénicas con una doble mutación K670N y M671L. Las dietas fueron divididas en 4: 3 de esos grupos eran ratones transgénicos los cuales, un grupo se suplemento con un 9% de nueces, el siguiente con un

6% y el último fue el control. Por otro lado, el 4to grupo fue un control no transgénico. Las dietas administradas (AIN-93) fueron estandarizadas para equilibrar su proporción con las nueces (el 6% y 9% equivale a una porción en una persona adulta). Esta dieta se dio durante 13-14 semanas, y al finalizar, los ratones realizaron pruebas en el laberinto de Morris (memoria espacial y habilidad de aprendizaje), laberinto T (habilidad de aprendizaje por discriminación), rotarod (coordinación psicomotora) laberinto elevado (ansiedad). Los ratones transgénicos AD con la dieta control mostraron déficit de memoria, ansiedad relacionada con el comportamiento ($P < 0.01$), discapacidad de aprendizaje espacial, habilidad de aprendizaje ($P < 0.05$) y coordinación motora ($P < 0.05$) en comparación con el grupo de ratones no transgénicos de la misma dieta. Los ratones AD que recibieron una dieta con 6% y 9% de nueces mostraron significantes mejoras en la memoria, habilidad de aprendizaje, ansiedad y desarrollo motor en comparación con el grupo de ratones control AD. No hubo diferencias significativas entre los dos tratamientos con nueces, por lo cual cualquier dosis de nueces sugieren tener un efecto benéfico en la reducción del riesgo o lenta progresión del AD. Por lo que se concluyó que una suplementación (a largo plazo) con un 6% o 9% de nueces en ratones transgénicos AD reducen significativamente el déficit de memoria y aprendizaje comparado con ratones transgénicos AD control (Muthaiyah et al., 2014).

De igual manera, otros autores han evaluado los extractos de antioxidantes administrados vía intraperitoneal (cafeína, rutina y kaemperol) en el laberinto de agua de Morris, probando el efecto de un extracto hidroalcohólico del Mate (*Ilex paraguariensis*) sobre el aprendizaje a corto y largo plazo y la memoria en ratas en el laberinto de agua de Morris. Ratas macho Wistar de 3 meses de edad y ratas macho jóvenes de 25-30 días fueron utilizadas para realizar este experimento. Estos roedores fueron divididos aleatoriamente en 5 tratamientos, 1: control, 2: cafeína (10 mg/kg), 3: 62.5 mg/kg de extracto de mate; 4: 125 mg/kg del extracto de mate; 5: 250 mg/kg del extracto de mate. El extracto se realizó con las hojas y los tallos de *Ilex paraguariensis*; estos fueron secados e inmersos en una solución hidroalcohólica (1:1) y por último se concentró. El extracto hidroalcohólico se administró por vía intravenosa o por vía oral. El extracto hidroalcohólico de *Ilex paraguariensis* moduló significativamente el aprendizaje y la memoria de corto y largo plazo en ratas (Prediger et al., 2008).

2.9. Microbiota intestinal

El tracto intestinal humano se encuentra poblado por un gran número de especies de bacterias que alcanzan concentraciones que oscilan desde 10^7 hasta 10^{12} células/ g de contenido intestinal (intestino delgado hasta el colon). Esta comunidad microbiana se desarrolla dentro de un huésped durante toda la vida al establecer relaciones simbióticas mutualistas que favorecen su coexistencia (Sanz & Santacruz, 2008).

El tracto gastrointestinal es estéril en el útero, pero se coloniza rápidamente al nacer, principalmente a través del contacto materno. La cantidad y diversidad de bacterias aumenta a lo largo de la primera infancia, y se estima que en la edad adulta el colon contiene bacterias por gramo de contenido de colon (Caracciolo, Xu, Collins, & Fratiglioni, 2014). El genoma del microbiota intestinal (microbioma) contiene al menos 100 veces más genes del genoma humano, lo que contribuye a la diversidad fisiológica humana (Sanz & Santacruz, 2008).

Recientes estudios demuestran que el microbiota intestinal desempeña un papel muy importante en la vida y la salud del huésped al proteger en el metabolismo contra los agentes patógenos, los nutrientes, los medicamentos y en la absorción y distribución de la grasa dietética; de igual manera, la microbiota ha sido relacionada en la relación positiva a una variedad de enfermedades, que incluyen obesidad, diabetes, enfermedad del hígado graso no alcohólico, autismo, esclerosis múltiple y enfermedad cardiovascular (Borre et al., 2014; Caracciolo et al., 2014; Santacruz et al., 2012).

En la actualidad los diseños de estrategias dietéticas para favorecer la prevalencia de bacterias promotoras de la salud han aumentado, por la evidencia positiva sobre el microbiota equilibrada y la salud humana. Estas nuevas estrategias incluyen la administración de prebióticos (ingredientes dietéticos no digeribles que permiten cambios, tanto en la composición como en la actividad del microbiota gastrointestinal que confieren beneficios a la salud del huésped) y probióticos (microbios vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud al huésped) en forma de alimentos funcionales, suplementos y productos farmacológicos (Sanz & Santacruz, 2008).

2.9.1. Microbiota intestinal y su relación con el Sistema Nervioso Central

Los efectos benéficos del microbiota intestinal están bien documentados y recientes estudios de investigación sugieren que la microbiota puede influir en el Sistema Nervioso Central, particularmente en el cerebro. La relación directa de cerebro/ intestino / microbiota representa una red compleja de comunicación en la cual modulan las funciones inmunes, del intestino y del sistema nervioso central en el cerebro (Borre et al., 2014; Desbonnet et al., 2015).

Se ha publicado que la relación de la microbiota intestinal con el Sistema Nervioso Central abarca las ramas simpáticas y parasimpáticas del sistema nervioso autónomo, así como el sistema nervioso entérico y los sistemas neuroendocrinos y neuroinmunes (Borre et al., 2014).

La idea de que el microbioma intestinal influye en la función cerebral se basa en la larga observación de que los antibióticos administrados por vía oral mejoran la disminución de la función cognitiva en pacientes con encefalopatía hepática (Caracciolo et al., 2014).

De igual manera en una investigación realizada por Desbonnet y colaboradores (2015), sobre la relación de los antibióticos, microbiota y el cerebro en ratones, se concluyó que el tratamiento crónico de los antibióticos bajaba la concentración de microbiota en ratones y a su vez aumentaron la ansiedad y los comportamientos cognitivos en estos roedores.

Por otro lado, se ha visto que las dietas influyen directamente sobre la microbiota intestinal, el cerebro y el desarrollo cognitivo en ratones utilizando el laberinto de agua de Morris. Magnusson y colaboradores (2015) investigaron el efecto de dietas que pueden conducir a cambios en la microbiota y contribuir a alteraciones en la ansiedad, memoria y flexibilidad cognitiva en ratones. Se utilizaron 18 ratones macho, (60 d), C57BL/6 para la realización de esta investigación. Aleatoriamente fueron agrupados en tres tratamientos: el primero con una dieta alta en grasa (42% grasa, 43% carbohidratos), el segundo con dieta alta en azúcar (12% grasa, 70 carbohidratos) y el último con una dieta normal o control (13% grasa, 62% carbohidratos). La dieta se administró durante 4 semanas. Al termino, del

experimento, se mostraron algunas alteraciones en el microbioma de las dietas alta en grasa y azúcares en comparación con el control (ejemplo *Clostridiales*). Los *Lactobacillus* incrementaron significativamente en el grupo de la dieta alta en azúcar y el contenido de *Erysipelotrichales* solo fue diferente en el grupo de la dieta alta en grasa. De igual manera, los animales con aumento en cantidad de *Lactobacillus* por una dieta alta en azúcares tuvieron diferencias significativas en el menor desarrollo espacial en la memoria de corto y largo plazo en el laberinto de agua de Morris en comparación con el grupo control. Por lo que algunas bacterias específicas dentro del microbiota podrían estar relacionados a la función cognitiva.

Existe información científica, que sugiere que los probióticos pueden regular la respuesta al estrés, ansiedad y estados de ánimo en pacientes con fatiga crónica y síndrome de intestino irritable. Siendo el *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) el principal microorganismo que modula el sistema inmunológico, previniendo la inducción de IL-8 por TNF- α en las líneas de células epiteliales del colon humano y a su vez modulando la inflamación a través de la generación de células T reguladoras (Bravo et al., 2011a).

2.9.2. La microbiota intestinal y su relación con los antioxidantes

Por otro lado, la modulación de la microbiota intestinal por el consumo de los polifenoles ha sido un tema de atención creciente por parte de la comunidad científica en los últimos años. Algunos autores han llevado a cabo varios estudios, desde los enfoques experimentales más simples sobre el efecto de los polifenoles en el crecimiento de bacterias intestinales aisladas hasta aproximaciones complejas que implican la microbiota intestinal completa, ya sea en experimentos de fermentación o mediante composiciones (Desbonnet et al., 2015; Santacruz et al., 2012; Sanz & Santacruz, 2008).

Por lo tanto, se ha visto que los polifenoles de bajo peso molecular (estructuras monoméricas y diméricas) pueden absorberse fácilmente en el intestino delgado o en el colon (polifenoles oligoméricos y poliméricos como los taninos condensados o hidrolizables). Estudios recientes estiman que solo el 5-10% de la ingesta total de polifenoles se absorbe en el intestino delgado, mientras que el resto de los polifenoles consumidos (90-95%) se acumulan en el lumen intestinal, pasando por las actividades enzimáticas y por lo tanto, la

microbiota colónica es la principal responsable de la descomposición de las estructuras polifenólicas en metabolitos fenólicos de bajo peso molecular y absorbibles, que podrían ser los causantes de los efectos benéficos a la salud derivado del consumo de alimentos ricos en polifenoles (Cardona et al., 2013; Dueñas et al., 2015).

Sin embargo, a pesar de las revisiones, solo unas pocas especies bacterianas se han identificado catalizando el metabolismo de los fenólicos, entre estas especies se encuentran *Escherichia coli*, *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Bacteroides sp.*, *Eubacterium sp.* (Cardona et al., 2013).

Por otra parte, el café es rico en ácido clorogénico y sus metabolitos como ácido cafeíco, el cual ha sido estudiado por algunos autores, para investigar la relación entre el consumo de esta sustancia y la microbiota intestinal, ya que el café es absorbido en el estómago e intestino delgado, sin embargo, es fermentado en el colon por la microbiota.

Cowan y colaboradores (2014) determinaron si el consumo crónico de café puede mitigar las malas concentraciones de microorganismos en la microbiota inducidos por una dieta alta en grasa, así como el metabolismo de las ratas. Aleatoriamente fueron escogidas 40 ratas macho Sprague-Dawley para formar dos grupos. El grupo control consumió 12% kcal de grasa y el otro grupo 60% kcal de grasa (10 ratas a cada tratamiento). Cada grupo a su vez fue dividido en dos grupos al primero se le administró agua y al segundo café durante 10 semanas. Al término de este tiempo, se reportó que el consumo de café en ratas con una dieta alta en grasa está asociada al decremento de peso corporal ($P < 0.05$), adipocitos ($P < 0.05$), triglicéridos en hígado ($P < 0.05$) y energía consumida ($P < 0.05$) comparado con el control, esto probablemente porque el consumo de café está relacionado con la alteración de la sensibilidad a la insulina. El consumo de café atenuó el incremento de proporción de *Firmicutes* ($P < 0.05$), *Bacteroidetes* ($P < 0.05$) y *Clostridium* ($P < 0.05$) asociado con dietas altas en grasas. De igual manera, el café incremento los niveles de ácidos grasos de cadena corta aromáticos y circulantes. Por lo que el consumo crónico de café (ácido clorogénico) tiene efectos protectores contra una dieta alta en grasas, siendo que estos efectos van desde el metabolismo hasta la alteración de la microbiota intestinal.

En humanos que han consumido vino rojo durante 20 días se ha presentado una reducción del género *Clostridium*, asociado a un alto consumo de polifenoles de la bebida. Por otro lado, este género o algunas bacterias gram-positivas son más sensibles a los efectos de los polifenoles comparados con las bacterias gram-negativas debido a su estructura de la membrana. Por lo que, se ha establecido la relación entre polifenoles y la microbiota intestinal, la cual a su vez es responsable de los efectos benéficos en la salud (Cueva et al., 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

Las zanahorias son buena fuente de fitoquímicos como los carotenos y compuestos fenólicos. La ingestión de compuestos fenólicos se asocia con numerosos beneficios para la salud.

El estrés abiótico postcosecha es un medio para mejorar el perfil nutricional de los vegetales al aumentar la concentración de compuestos fenólicos durante la respuesta al estrés. Las zanahorias han servido para investigar los efectos del estrés abiótico posterior a la recolección, tales como el estrés por corte, luz UV, atmósfera modificada y fitohormonas. Entre estas técnicas, el estrés por corte es el más estudiado, ya que es el más efectivo, rápido y económico.

El estrés por corte activa la ruta metabólica fenilpropanoide que genera derivados del ácido hidroxicinámico, principalmente ácido clorogénico (AC). En las zanahorias tratadas con estrés abiótico postcosecha, la concentración de ácido clorogénico es la más alta entre los compuestos fenólicos (~ 440-920 mg / kg).

Estudios *in vitro* y clínicos indican que el ácido clorogénico tiene un impacto positivo contra las enfermedades crónico-degenerativas. Además de los beneficios contra el síndrome metabólico, los estudios de investigación sugieren que los compuestos fenólicos pueden mejorar el rendimiento de las neuronas y ayudar a prevenir la degeneración neuronal del envejecimiento. Sin embargo, hay pocos estudios de investigación que evalúan los efectos del AC en la salud neurológica, a pesar de que se ha reportado que este compuesto protege a las células corticales del cerebro de rata contra el estrés oxidativo.

Por lo que, no existe ninguna investigación que abarque desde la inducción del ácido clorogénico por estrés por corte en un alimento y el efecto que tiene en el metabolismo, la microbiota, el desarrollo cognitivo y el cerebro en ratas.

4. HIPOTESIS

“La papilla de zanahoria con alto contenido en ácido clorogénico inducida por estrés por corte tiene un efecto positivo sobre el metabolismo, microbiota y desarrollo cognitivo de ratas Wistar”

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

Objetivo general

- ✚ Evaluar el efecto de una papilla de zanahoria con alto contenido de ácido clorogénico aumentada por estrés por corte en el metabolismo y desarrollo cognitivo en ratas Wistar

Objetivos particulares

- ✚ Aumentar el contenido de ácido clorogénico en una papilla de zanahoria por estrés de corte y determinar su composición proximal – fitoquímica
- ✚ Determinar el efecto fisiológico de las papillas altas en ácido clorogénico en ratas Wistar
- ✚ Analizar el efecto de la papilla alta en ácido clorogénico sobre el desarrollo cognitivo en ratas Wistar
- ✚ Determinar el efecto de la papilla alta en ácido clorogénico sobre la concentración de *Lactobacillus* spp. y bacterias totales en contenido intestinal
- ✚ Determinar el efecto de la papilla alta en ácido clorogénico sobre la concentración de ADN, ARN y mielina en los cerebros de las ratas

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material vegetal y preparación de las muestras

Las zanahorias (*Daucus carota* L.) utilizadas para la elaboración de papillas fueron adquiridas en un supermercado local (HEB, Monterrey, NL, México). La selección de las muestras se realizó corroborando que no tuvieran daños físicos visibles. Las zanahorias fueron lavadas y desinfectadas con agua clorada durante 5 min (200 ppm, pH 6.5 – 7) y al terminó, se cortaron los dos extremos manualmente con un cuchillo de acero inoxidable como se observa en la Figura 6.



Figura 6. Preparación de las muestras

6.2. Obtención de las papillas de zanahoria

El estrés por corte se realizó utilizando un procesador de alimentos (Waring Commercial, WFP11, Torrington, CT, USA); en el cual las zanahorias fueron cortadas en forma de rodajas. Las zanahorias previamente cortadas, fueron colocadas en contenedores de plástico de 19 litros (3 kilos por contenedor). Anterior a colocar las zanahorias, los contenedores fueron desinfectados y en la parte inferior se colocó papel de toalla para absorber la humedad como se muestra en la Figura 7. Las zanahorias cortadas se colocaron dentro del contenedor y fueron incubadas (VWR, Radnor, PA, USA) a 15 °C durante 48 h.



Figura 7. Zanahorias con estrés por corte

Posteriormente, las zanahorias pasaron por un proceso de escaldado a una temperatura de 82 ° C por 6 min. Al terminar, las muestras se licuaron para la realización de las papillas y se pasteurizaron a 85° C durante 10 min.

Por otro lado, la papilla de zanahoria control se obtuvo con un procesador de alimentos, en el cual las zanahorias fueron cortadas en rodajas. Inmediatamente, las rodajas fueron escaldadas (82° C, 10 min), licuadas y pasteurizadas (85° C, 10 min).

En ambos tratamientos después de la pasteurización, las papillas fueron enfriadas a una temperatura de 20° C y se colocaron en tubos de 50 mL (aproximadamente 30 g de papilla estresadas o control por tubo) y almacenadas a -80° C hasta su posterior utilización.

6.3. Caracterización proximal de papillas de zanahoria

La caracterización química nutricional de las papillas de zanahoria se realizó por normas oficiales y metodologías oficiales de la AOAC: Proteínas (Nmx-F608-Normex-2011), Grasas (Nom-086-SSA-1-1994), fibra dietética insoluble (AOAC 991.42), fibra dietética soluble (AOAC 993.19), fibra dietética total (AOAC 985.29), cenizas totales (Nmx-F-607-Normex-2013), Humedad (Nom-116-SSA-1-1994). Todos los resultados fueron expresados en porcentaje en base húmeda.

6.4. Colorimetría en papillas de zanahoria

El color de las papillas se determinó colocando 10 g de papilla de zanahoria en un colorímetro Hunter Labscan modelo 5100, en el cual se realizaron las mediciones por triplicado.

6.5. Caracterización fitoquímica de papillas de zanahoria

6.5.1. Extracción y Cuantificación de Fenólicos

La extracción y cuantificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito por Santana-Gálvez y colaboradores (2016) con algunas modificaciones. La extracción de fenólicos se realizó homogenizando 5 g de muestra fresca y 20 mL de metanol. Esta mezcla se centrifugó a 12,000 g durante 15 minutos (4° C). Los extractos fueron filtrados a través de una jeringa con filtro (0.45 µm, VWR).

El perfil de fenólicos se determinó inyectando 10µL del extracto de muestra a un HPLC-DAD (Agilent Technologies, 1260 Infinity, Santa Clara, Ca, USA) usando una columna fase reversa C18 (250 x 4.6 mm, tamaño de partícula: 5µm, Luna, Phenomenex Torrance, CA, USA). Las fases móviles utilizadas consistieron en agua (fase A) y metanol 60% (fase B), ambas ajustadas a un pH de 2.4 con ácido ortofosfórico). Los fenólicos se detectaron a 320 nm. La información cromatográfica fue procesada con el software OpenLAB CDS ChemStation (Agilent Technologies). Las determinaciones fueron realizadas por triplicado y los resultados fueron expresados como mg/kg en base seca.

6.5.2. Extracción y Cuantificación de Carotenos

La extracción de carotenos y cuantificación se llevó a cabo de acuerdo con lo publicado por Santana-Gálvez y colaboradores (2016) con algunas modificaciones. Las extracciones se realizaron en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. A 2 g de muestra fresca se le agregaron 25 mL de acetona grado HPLC con 0.1% BHT (w/v) y esta mezcla fue homogenizada durante 30 segundos. El homogenizado fue filtrado por medio de vacío (Whatmann No. 1). El filtrado fue recolectado y transferido a un matraz. Este

procedimiento se repitió cuatro veces más. Los extractos fueron filtrados con una jeringa y un filtro (0.45 μm , PTFE, Millipore, Billerica, MA, USA) y posteriormente se colocaron en viales con nitrógeno para prevenir la oxidación de los carotenos.

El perfil de carotenos se determinó inyectando 25 μL en un HPLC-DAD (Agilent Technologies, 1260 Infinity Santa Clara, CA, USA), utilizando una columna fase reversa C30 (150 x 4.6 mm, 3 μm , YMC, Wilmington, NC, USA). Las fases móviles consistieron en metanol 50%, MTBE 45% y agua 5%. Los carotenoides se detectaron a 450 nm. La información cromatográfica fue procesada con el software OpenLAB CDS ChemStation (Agilent Technologies). Las determinaciones fueron realizadas por triplicado y los resultados fueron expresados como mg/kg en base seca.

6.6. Bioensayo con ratas

El protocolo experimental de este bioensayo fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Nuevo León (CEIBA-2018-031). El experimento se realizó en dos generaciones de ratas Wistar.

Primer Generación: Veinticuatro ratas Wistar recién destetadas (24 -30 días de nacidas) con un peso promedio de 40-50 g fueron asignadas aleatoriamente a 3 tratamientos. Cada grupo fue alimentado con una diferente dieta como se muestra en la Tabla 5. Los grupos contaban con 8 ratas de las cuales, se colocaron 4 hembras y 4 machos por tratamiento. La dieta de los tres grupos de ratas fue realizada por día, para evitar la degradación de los compuestos fenólicos. Las papillas de zanahoria se descongelaban antes de la preparación del alimento, y al estar a temperatura ambiente se realizaba el alimento. El sobrante de las papillas fue desechado al terminar la formulación del alimento.

Tabla 5. Tratamientos y dieta

Etiqueta	% AIN-76 Dieta	% Puré de zanahoria	Tipo de puré
Papilla con estrés por corte	90	10	Estresada por corte
Papilla control	90	10	No estresada
Dieta AIN-76	100	-	-

Los roedores fueron colocados individualmente en jaulas de acero inoxidable, bajo condiciones ambientales controladas (21 °C con periodos de luz y oscuridad alternados cada 12 h). El agua se proporcionó *ad libitum* y el alimento se restringió a 30 g por día. Los pesos del alimento ingerido fueron registrados por día por cada rata individualmente a la misma hora en una báscula digital. El contenido de la dieta a base de caseína AIN-76 se encuentra descrito en la Tabla 6.

Tabla 6. Contenido de Dieta AIN-76

Ingrediente	Contenido en 100 g
Azúcar	50g
Caseína	20 g
Almidón	15 g
Aceite de Maíz	5 g
Celulosa	5 g
Mineral Mix ^a	3.5 g
Vitamin Mix ^b	1 g

Composición (g/kg) ^aFosfato de calcio dibásico 500.0, cloruro de sodio 74.0, citrato de potasio 220.0, sulfato de potasio 52.0, óxido de magnesio 24.0, carbonato de manganeso (43–48%) 3.5, citrato férrico (16–17% Fe) 6.0, carbonato de zinc (70%) 1.6, carbonato cúprico (53–55%) 0.3, yodato de potasio 0.01, selenito de sodio 0.01, sulfato de potasio 2.12 y cromo 0.55. ^b(por kg de mezcla) Tiamina 600 mg, riboflavina 600 mg, piridoxina 700 mg, ácido nicotínico 3 g, pantotenato de calcio D 1.6 g, 200 mg de ácido fólico, 20 mg de D-biotina, cianocobalamina 1 mg, 120,000 equivalentes de retinol, 5,000 UI de actividad de vitamina E, colecalciferol 2,5 mg (100,000 UI) y menaquinona 5,0 mg.

El primer grupo recibió una alimentación con 90% de dieta AIN-76 más un 10% de papilla de zanahoria estresada o con alto contenido de ácido clorogénico (p/p), mientras que el segundo grupo consumió una dieta con un 90% de AIN-76 y un 10% de papilla de zanahoria no estresada o control y el último tratamiento fue el grupo control, quien recibió

una dieta balanceada a base de caseína y con todos los requerimientos necesarios para un crecimiento óptimo (AIN-76).

El peso de las ratas fue determinado individualmente por semana para el análisis de peso corporal obtenido durante la investigación y este parámetro fue registrado hasta el día del sacrificio.

Treinta días después de que las ratas comenzarán con su alimentación correspondiente a su tratamiento, los roedores fueron preparados y aclimatados para la realización de las pruebas del laberinto de agua de Morris, las cuales fueron divididas en cuatro: Memoria de corto plazo, memoria de largo plazo, memoria de trabajo y desempeño de aprendizaje. Durante las pruebas, las ratas fueron alimentadas de la misma forma que los primeros 30 días.

Al finalizar las pruebas del laberinto de agua de Morris (30 días después), las ratas hembra se colocaron en jaulas colectivas junto con 2 machos de su tratamiento para su reproducción durante 10 días, al finalizar los 10 días se colocó a otro macho de su mismo grupo por 10 días más. Esta situación se efectuó con todas las hembras de cada tratamiento.

A continuación, las hembras preñadas se colocaron individualmente en jaulas de maternidad y los machos regresaron a sus jaulas individuales de acero inoxidable.

El parto de las ratas se registró aproximadamente 27 días después. Las crías se mantuvieron en un periodo de lactancia alrededor de 20 - 25 días aproximadamente. Al concluir la lactancia, se determinó el número de hembras y machos de cada camada y se registró el número de crías sobrevivientes. Posteriormente, se escogieron al azar y por peso promedio crías de cada tratamiento para la continuación del estudio de la segunda generación de ratas.

Las hembras y machos de la primera generación y las crías que no entraron en la siguiente investigación fueron sacrificadas con punción intracardiaca. Durante el sacrificio los roedores fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg) por vía intraperitoneal.

Al término del sacrificio, la sangre de las ratas de la primera generación fue recolectada y el plasma fue obtenido por centrifugación a 3.306 x g durante 15 minutos a 4° C.

Posteriormente el plasma fue colocado en tubos Eppendorf de 400 µL y almacenado a -20° C hasta su análisis. El Intestino delgado y el cerebro fueron extraídos quirúrgicamente y se colocaron en contenedores de 60 mL de boca ancha, herméticos y estériles. Las muestras se colocaron a -20° C hasta su análisis posterior.

Segunda generación: Ratas Wistar recién destetadas de cada grupo fueron seleccionadas al azar y por peso promedio de cada grupo (40 – 50 g) para la siguiente generación. Cada grupo fue alimentado durante 30 días con su dieta respectiva como la primera generación (tabla 5). El grupo control y el grupo con la papilla alta en ácido clorogénico se conformaron de 4 hembras y 4 machos, mientras que el grupo con papilla control tuvo 2 hembras y 2 machos.

Los roedores fueron colocados individualmente en jaulas de acero inoxidable, bajo condiciones ambientales controladas (21 °C con periodos de luz y oscuridad alternados cada 12 h). El agua se proporcionó *ad libitum* y el alimento se restringió a 30 g por día. Los pesos del alimento ingerido fueron registrados por día por cada rata individualmente a la misma hora en una báscula digital. El grupo control recibió una dieta balanceada a base de caseína y con todos los requerimientos necesarios para un crecimiento óptimo (AIN-76), el grupo dos ingirió 90% de una dieta AIN-76 y el 10% (p/p) con papilla de zanahoria control o no estresado y por último el tercer grupo recibió una dieta del 90% AIN-76, más un 10% (p/p) de papilla de zanahoria estresada o alta en ácido clorogénico (AC).

Se determinó el peso de las ratas individualmente por semana para el análisis de crecimiento y este parámetro se registró hasta el día del sacrificio. Al término de los 30 días de su alimentación correspondiente, las ratas fueron preparadas y aclimatadas para las pruebas de desarrollo cognitivo del laberinto de Morris durante 30 días aproximadamente.

Las ratas de la segunda generación fueron sacrificadas con punción intracardiaca. Durante el sacrificio los roedores fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg) por vía intraperitoneal. Al término del sacrificio, la sangre de las ratas de la segunda

generación fue recolectada y el plasma fue obtenido por centrifugación a $3.306 \times g$ durante 15 minutos a $4^{\circ} C$. Posteriormente el plasma fue colocado en tubos Eppendorf de $400 \mu L$ y almacenado a $-20^{\circ} C$ hasta su análisis. El Intestino delgado y el cerebro fueron extraídos quirúrgicamente y se colocaron en contenedores de 60 mL de boca ancha, herméticos y estériles. Las muestras se colocaron a $-20^{\circ} C$ hasta su análisis posterior.

6.7. Determinación de Glucosa, Colesterol y Triglicéridos en plasma

La glucosa, colesterol y triglicéridos se determinaron con la adición de $100 \mu L$ de muestra al equipo de espectrofotometría COBAS INTEGRA 400 Plus (Laboratorios Roche, Suiza) con kits de tests clínicos. Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados fueron expresados en mg/dL

6.8. Determinación de antioxidantes en plasma

6.8.1. Extracción de antioxidantes en plasma

Las muestras de plasma fueron descongeladas lentamente y homogenizadas gentilmente en un vortex. La separación de las proteínas en plasma se realizó acidificando las muestras, agregando el volumen de muestra igual al volumen de ácido perclórico al 0.5M (1:1) y centrifugando a 14 rpm durante 15 minutos. Se recuperaron $100 \mu L$ de sobrenadante y se agregaron $900 \mu L$ de buffer de fosfato 75mM (pH 7.4) a un tubo Eppendorf de 2 mL. Las muestras fueron guardadas a $-20^{\circ} C$ hasta los análisis posteriores.

6.8.2. Determinación de capacidad antioxidante en plasma por el método ORAC

La capacidad antioxidante en plasma fue determinada con el método de capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC), previamente descrito por Huang y colaboradores (2002). Se mezclaron 207 mg de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) en 5 mL de una solución amortiguadora de fosfato 75 mM (pH 7.4) (solución 1). Por otro lado, se diluyó una

solución de fluoresceína al 4.19 mM con la solución amortiguadora de fosfato 75 mM (pH 7.4), y se mantuvo en condiciones en la oscuridad a 4 °C (aluminio) (solución 2).

A una placa negra de 96 pozos se agregaron 25 μ L de muestra, blanco y la curva estándar de Trolox + 150 μ l de fluoresceína (previamente diluída) como proteína oxidable y se incubaron a 37°C durante 30 minutos, a continuación, se agregó el 2,2'-azobis (2-amidinopropano) como generador de radicales libres y se realizaron lecturas de fluorescencia cada 2 minutos hasta completar 31 lecturas. La incubación y determinación se realizó en un lector de fluorescencia en microplatos Synergy 2 HT, Bio-Tek (USA).

Los resultados de la curva estándar y las muestras fueron determinados por el Software Gen 5 (Biotek) incorporado al lector de microplatos. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados fueron expresados como equivalente de Trolox en μ mol⁻¹ mg.

6.8.3. Determinación de glutatión S-transferasa (GST) en plasma

La determinación de la actividad de glutatión S-transferasa en plasma fue realizada de acuerdo con lo descrito por Wilce y Parker (1994) con leves modificaciones. Para la realización de este ensayo se utilizó un buffer Dubelco (DPBS) pH 7.2, que fue elaborado agregando 800 mg de Cloruro de Sodio, 115 mg de fosfato disódico, 20 mg de Cloruro de Potasio, 20 mg de fosfato de monopotasio, 10 mg de Cloruro de Calcio y 10 mg de Cloruro de Magnesio a un matraz aforado de 100 ml para su posterior aforación con agua bidestilada.

El inicio de la reacción de la GST fue realizado agregando 300 μ l de mezcla de sustrato con glutatión L reducido (200 mM) y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB, 100mM) en el buffer Dubelco previamente preparado y 10 μ l de extracto enzimático. La absorbancia fue registrada a 340nm por cada 1 min durante 10 min en un lector de microplacas (Elx800, Biotek) por el Software Gen5. Los resultados de la actividad de GST en plasma se obtuvieron por el promedio del triplicado de cada extracto y se expresaron como μ mol⁻¹ min⁻¹ mg protein⁻¹, usando el coeficiente molar de extinción de 9.6 mM⁻¹ cm⁻¹ para 1-cloro-2,4-dinitrobenceno.

6.8.4. Determinación de actividad Superóxido Dismutasa (SOD) en plasma

La actividad de superóxido dismutasa en plasma fue medida por espectrofotometría por el método previamente descrito por Peskin & Winterbourn (2000). Para la realización de la reacción, se utilizó un buffer de muestra 50 mM Tris-HCL (pH 8.0) para diluir la xantina oxidasa (Sigma X1875-SOUN), las muestras y los estándares de SOD antes de realizar el ensayo. De igual manera se utilizó un buffer de ensayo 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) + 0.1 mM de ácido dietilen triamin pentacético y 0.1 mM de hipoxantina para diluir el detector de radicales, el cual contenía una solución de sal de tetrazolium (Cayman Chemical, Cat. # 706004).

La reacción de SOD fue determinada en un microplatos y consistió en 200 μ l de una solución de sal de tetrazolium, 50 mM de buffer de ensayo (0.1 mM de ácido dietilen triamin pentacético y 0.1 mM de hipoxantina) y 10 μ L de extracto enzimático. La reacción inicio añadiendo 20 μ L de xantina oxidase en 50 mM de buffer de muestra, catalizando la liberación de los radicales superóxidos y capturados por la sal de tetrazolium. La cuantificación se determinó a 450nm. La concentración de radicales fue inversamente proporcional a la actividad de superóxido dismutasa en las muestras. La concentración de la actividad fue determinada por el porcentaje de inhibición de la xantina oxidasa. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados fueron expresados como equivalente de Trolox en μ mol⁻¹ mg.

6.9. Análisis de memoria y desempeño de aprendizaje

El análisis de memoria y desempeño de aprendizaje se realizó por medio del laberinto de agua de Morris de acuerdo con la metodología usada por Morris (1984) con leves modificaciones. La prueba consistió en un tanque circular (azul) de 2 m de diámetro y 0.8 m de altura. Este tanque se llenó con agua teñida con colorante azul, para ocultar la plataforma de 20 x 20 x 69 cm que fue situada a 1 cm de profundidad del agua. En la parte exterior del tanque se colocaron objetos visibles, con la intención de que las ratas pudieran reconocer el espacio. El tanque se dividió en cuatro cuadrantes imaginarios: sureste, suroeste, noreste y

noroeste. Las ratas tuvieron un periodo de adaptación al agua, en donde aprendieron a nadar y se acostumbraron a nadar, con el fin de que no hubiera alteraciones en los resultados.

A continuación, se realizaron pruebas de memoria y desempeño de aprendizaje, en el cuál consistieron en la medición del tiempo en el que la rata nadaba para localizar la plataforma (latencia) y el número de errores que cometía la rata al entrar a un cuadrante imaginario incorrecto. Todos los errores y la latencia se registraron durante cada prueba individualmente por tratamiento. Las pruebas cognitivas se realizaron de acuerdo con lo descrito por Amaya-Guerra y colaboradores (2006) con algunas adaptaciones.

6.9.1. Memoria de Corto Plazo

Esta prueba consistió en la instalación de la plataforma en el cuadrante noroeste e introduciendo a las ratas desde el punto este. La primera vez de la prueba se situó a la rata en la plataforma alrededor de 60 segundos para que se familiarizara con el entorno. La prueba comenzó a registrarse con la colocación de la rata en el punto este y se dejó que nadará hasta encontrar la plataforma; si pasaban 120 segundos y la rata lo encontraba la plataforma, se regresaba a colocar el roedor en la plataforma unos 20 segundos para que reconociera el lugar. Se realizaron 20 pruebas consecutivas durante 1 día, determinando la latencia y el número de errores para registrar la memoria de corto plazo.

6.9.2. Memoria de Largo Plazo

La prueba de punto de salida constante a intervalos mayores de tiempo mejor conocida como memoria de largo plazo se realizó 3 días después de la prueba de memoria de corto plazo. La técnica usada fue similar a la utilizada en la memoria de corto plazo a diferencia de que se realizaron cuatro pruebas por día. Las pruebas se efectuaron durante días seguidos y observando el promedio de latencia por tratamiento que fuera igual o inferior a 10 segundos durante 2 días consecutivos.

6.9.3. Memoria de Trabajo

La prueba de punto de inicio variable mejor conocida como memoria de trabajo consistió en 6 repeticiones diarias durante 3 días consecutivos. El punto de inicio se

encontraba en el sector este en las pruebas 1, 2, 4 y 5, mientras que en la prueba 3 y 6 hubo un cambio de punto de inicio en el siguiente orden: 3 (oeste) y 6 (noreste) conforme a lo descrito por Amaya- Guerra y colaboradores (2006) con algunas modificaciones.

6.9.4. Desempeño de Aprendizaje

En la última prueba se evaluó el desempeño de aprendizaje. La plataforma sumergida se movió 180 ° de su posición original. Las ratas comenzaron en la posición norte (plataforma en el sur). La ubicación de la plataforma se giró posteriormente hacia el sur, este y oeste del tanque de agua, y el punto de entrada de la rata se movió en consecuencia. Cada ensayo se repitió cuatro veces durante tres días consecutivos. Como en el caso de las pruebas de memoria a largo plazo, se registraron la latencia y el error para cada individuo.

6.10. Determinación de *Lactobacillus* spp. y Bacterias Totales

6.10.1. Extracción de ADN en contenido intestinal en ratas Wistar

El contenido intestinal de las ratas fue removido quirúrgicamente del intestino delgado y homogenizado con agua peptonada 1:10 (p/v) en una campana de extracción estéril.

La extracción de ADN se realizó con el Kit DNeasy Clean Microbial (QIAGEN, 6MBH, QIAGEN STRASSEL, Hilden, Germany). Se agregó 1.8 mL del homogenizado a un tubo de 2 ml y se centrifugo a 10,000 g por 30 segundos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se centrifugó de nuevo a las mismas condiciones. A continuación, se resuspendió el contenido final del tubo en 300 µL de solución powerbead y se mezcló gentilmente. Esta mezcla se traspasó a otro tubo al cuál se le agregaron 50µL de solución SL y se realizó un tratamiento térmico a 90° C durante 10 minutos. Posteriormente se colocaron los tubos horizontalmente en un Vortex a velocidad máxima por 10 minutos. Al término, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 2 mL y se agregaron 100 µL de solución IRS y se mezcló en el Vortex por 5 segundos, para incubarlo a una temperatura de 4° C durante 5 minutos.

Consecutivamente se centrifugaron los tubos a 10,000 g por 1 minuto a temperatura ambiente, para la transferencia del sobrenadante a un tubo de 2 mL nuevo. Se agregaron 900µL de solución SB y se mezcló durante 5 segundos. A continuación se añadieron 700µL de la mezcla a una columna MB Spin y se centrifugó a 10,000 g por 30 segundos y se descartó el sobrenadante. Este paso se realizó 3 veces. Posteriormente se añadieron 300µL de solución CB y se centrifugó durante 30 segundos a 10,000 g, al término se descartó el sobrenadante y se centrifugó a 10,000 g por 1 minuto. Al término, se colocó una columna especial MB en un tubo nuevo de 2 mL y se agregaron 50 µl de solución EB (Elución) en el centro del filtro de la membrana, centrifugando a 10,000 g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Por último, se descartó la columna MB y el DNA que quedó en el tubo de 2 mL. El DNA se guardó a una temperatura de -20° C.

6.10.2. Cuantificación de *Lactobacillus* spp. y Bacterias Totales

La cuantificación de *Lactobacillus* spp. y bacterias totales se realizó por medio de una PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizaron primers específicos para cada grupo de bacterias (Tabla 7). La detección y amplificación se efectuó por un Rotor-Gen R6-3000, QIAGEN.

Tabla 7. Primers utilizados para la secuenciación de ADN de *Lactobacillus* spp. y bacterias totales

Bacterias	Primers	Secuencia
<i>Lactobacillus</i> spp.	Forward	AGCAGTAGGGAATCTTCCA
	Reverse	ATTYCACCGCTACACATG
Bacterias totales	Forward	TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGC
	Reverse	CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT

Liu et al., 2013

Para cada reacción se mezclaron 7µL de agua grado molecular, 1.25µL del primer forward, 1.25µL del primer reverse, 12.5 µL de Syber Green PCR Master Mix y 3µL de ADN; para la formación de una mezcla de 25 µL.

6.11. Determinación de Mielina en cerebros de ratas

El cerebro y cerebelo de las ratas fueron extraídos quirúrgicamente en una campana de extracción. Se determinó el peso de las muestras por medio de una balanza analítica (VE204-B) antes de que se realizarán las determinaciones.

La determinación de la mielina se realizó de acuerdo con lo descrito por Folch y colaboradores (1957) con algunas modificaciones. Para esta determinación se utilizó la mitad del cerebro y cerebelo. Estos órganos fueron mezclados con solución de cloroformo/metanol/agua 8:4:3 (v/v/v). A esta mezcla se agregó hidroxitolueno butilado (0.02 g/L) para prevenir la oxidación lipídica. Posteriormente, las muestras fueron diluidas (1:10) y homogenizadas en una solución de sucrosa (0.8 mol/L) y centrifugadas a 12,000 rpm durante 70 min. El sobrenadante fue recuperado y resuspendido en 30 mL de agua destilada. Las muestras fueron colocadas en hielo y agitadas manualmente durante 20 min. La centrifugación seguida del lavado se realizó dos veces más y por último el extracto final se seco en una incubadora del vacío (Modelo 1400 E; VWR, West Chester, PA, EE. UU.) a 60 °C. Las muestras secas fueron pesadas en una balanza analítica (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957).

6.12. Determinación de ADN y ARN en cerebros de ratas

El tejido de cerebro (0.5 g) se resuspendió en una solución de ácido tricloroacético (TCA; 50% v/v) y se centrifugó a 2,500 rpm durante 20 min. El sedimento fue recolectado y resuspendido en 2.0 mL de 5% (v/v) de TCA y se sumergió durante 30 min en un baño de agua hirviendo. Los tubos fueron centrifugados a 2,500 rpm durante 15 min (Morse & Carter, 1949). El sobrenadante fue recolectado y la determinación de AND y ARN se realizó por colorimetría (Dische, 1993). A continuación, se mezcló una alícuota (1.2 mL) con 2.4 mL de Orcinol y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 15 min. Las muestras se enfriaron y se midió la absorbancia a 665 nm para determinar el contenido de ARN. Para la cuantificación de ADN, se agregaron 320 µL de difenilamina a cada muestra. La mezcla se incubó a 37 ° C durante 4 h, y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 600 nm en un espectrocolorímetro Spekol (VEB-Carl Seizz, Jena, Alemania) (Dische, 1983; Morse & Carter, 1949).

6.13. Análisis estadístico

El promedio y desviación estándar de la concentración de los compuestos fitoquímicos, latencia y errores en el laberinto de agua de Morris, parámetros fisiológicos, el contenido de *Lactobacillus* spp., bacterias totales, concentración de mielina, ADN y ARN fue analizada con un Análisis de Varianza (ANOVA) de un solo factor con el Software SPSS (v22). La prueba de Tukey fue utilizada para realizar la comparación de medias entre los tratamientos y determinar las diferencias. Los análisis estadísticos de los resultados fueron realizados con 0.05 de significancia.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Caracterización proximal de papillas de zanahoria

La composición proximal de las dos papillas analizadas se muestra en la Tabla 8. La composición de carbohidratos de la papilla de zanahoria control y la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico fue muy similar entre ambas, ya que presentaron contenidos de 6.77% y 7.63% respectivamente. Estos valores obtenidos concuerdan con lo publicado por Datt y colaboradores (2012), donde mencionan que los carbohidratos de la zanahoria ocupan porcentajes de 5 a 10% en peso total del vegetal.

Tabla 8. Composición proximal de las papillas de zanahoria

Determinación	Papilla de zanahoria Control	Papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico
Carbohidratos (%)	6.77 ± 0.19a	7.63 ± 0.21a
Grasa (%)	0.29 ± 0.01a	0.27 ± 0.02a
Proteínas (%)	0.59 ± 0.03a	0.59 ± 0.03a
Ceniza (%)	0.54 ± 0.04a	0.48 ± 0.01a
Fibra dietaria insoluble (%)	1.38 ± 0.57a	1.33 ± 0.38a
Fibra dietaria soluble (%)	1.19 ± 0.51a	1.31 ± 0.45a
Fibra dietaria total (%)	2.57 ± 0.16a	2.64 ± 0.47a

Valores expresados como promedio de las determinaciones por duplicado y su desviación estándar. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

De igual manera, las concentraciones de grasa y proteínas en las dos papillas de zanahoria analizadas no mostraron variabilidad entre ambas (grasa: 0.27% y 0.29% / proteína: 0.59% y 0.59%) y contienen valores bajos de estos macro nutrientes como se esperaría, ya que la zanahoria es un vegetal que aporta en su mayoría agua (90% - 95%) y carbohidratos (Chávez Muñoz, 2010; Haq et al., 2016; Singh et al., 2001; Soria et al., 2009).

Así mismo, estos valores obtenidos de grasa y proteína en las papillas de zanahoria concuerdan con otros autores donde mencionan que el contenido de grasa y proteína en la zanahoria abarca porcentajes de 0.2% y 0.5% en el peso total del vegetal respectivamente (Chávez Muñoz, 2010; Datt et al., 2012).

El contenido de ceniza en un alimento representa la medida total de los minerales. En las papillas analizadas se encontraron niveles de 0.54% de papilla de zanahoria control de y 0.48% de la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico, sin embargo, las diferencias entre ambas papillas no fueron significativas, pero concuerdan con lo publicado con Datt y colaboradores (2012) quienes reportan una concentración de 0.5% - 0.6% de cenizas en zanahorias. Las zanahorias se caracterizan por ser buena fuente de minerales comparado con otros vegetales como el tomate, el cual tiene concentraciones bajas de calcio, magnesio, potasio y hierro en comparación con las zanahorias (Chávez Muñoz, 2010).

Por otro lado, no hubo diferencia significativa en el contenido de fibra total (FT) de las papillas de zanahoria analizadas, ya que la papilla de zanahoria control presentó un porcentaje de 2.57% y la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico tuvo una concentración de 2.64%. Por consiguiente, los porcentajes de fibra soluble (FS) e insoluble (FI) fueron muy similares en las dos papillas analizadas, ya que la papilla de zanahoria control mostró contenidos de 1.38 de FI y 1.19 de FS, mientras que la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico tuvo niveles de 1.19 de FI y 1.31 de FS.

La literatura determina que la zanahoria contiene en mayor proporción celulosa, hemicelulosa y lignina como fibra soluble y la pectina como fibra insoluble (Datt et al., 2012). Santana y colaboradores (2016) reportaron porcentajes más altos en FT (2.8 – 3.4%) y FI (1.8 – 2.5%) en zanahorias, sin embargo, las concentraciones de FS (0.8 – 0.9%) se encuentran por debajo de lo analizado por nosotros. No obstante, las zanahorias son un vegetal con alta aportación de fibra dietaria en comparación con otros vegetales. Existen reportes del consumo de fibra y los efectos positivos sobre enfermedades metabólicas, cardiovasculares, control de peso y síndrome metabólico (Sadiq Butt, Tahir-Nadeem, Khan, Shabir, & Butt, 2008). Estos efectos se asocian a las propiedades fisicoquímicas de la fibra dietética, las cuales son: la capacidad de retención de agua, viscosidad y fermentación (Wildman, 2006).

7.2. Colorimetría en las papillas

Los valores de colorimetría de L*, a, b de las papillas analizadas se muestran en la Tabla 9. La papilla de zanahoria control contiene un nivel más alto significativamente de L* (46.13) en comparación con la papilla de zanahoria estresada (46.08). Esta reportado que los valores de luminosidad (L*) en las zanahorias cortadas disminuyen continuamente a lo largo de su vida útil (Talcott & Howard, 1999), esto concuerda con nuestros resultados, ya que las papillas de zanahoria con estrés por corte, permanecieron 48 h en incubación. La papilla de zanahoria que presentó estrés por corte obtuvo niveles más bajos significativamente en los valores de a (30.83) y b (42.94) comparados con el control que presentó niveles de 34.27 y 47.59 respectivamente.

Tabla 9. Colorimetría en papillas de zanahoria (Lab)

Valor	Papilla de zanahoria control	Papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico	P-Valor
L	46.13 ± 0.0	46.08 ± 0.0	0.030
a	34.27 ± 0.0	30.83 ± 0.0	0.00
b	47.59 ± 0.0	42.94 ± 0.0	0.00

Valores expresados como promedio de las determinaciones por triplicado y su desviación estándar. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por la prueba de Tukey (P < 0.05).

En una investigación realizada por Talcott & Howard (1999) se demostró que el valor a y b son afectados directamente por la concentración de compuestos fenólicos en purés de zanahoria. A mayor cantidad de fenólicos menor es el valor de a y b. Esta misma situación se presenta en nuestros resultados de colorimetría en las papillas de zanahoria, ya que la concentración de compuestos fenólicos es diferente entre ambas papillas.

7.3. Caracterización fitoquímica de las papillas de zanahoria

7.3.1. Compuestos fenólicos en papillas de zanahoria

El ácido clorogénico, el ácido p-cumárico (p-CA) y un derivado del ácido p-cumárico (p-CADA) fueron los compuestos fenólicos detectados en las dos papillas de zanahoria. El ácido clorogénico fue el fenólico que se encontró en mayor proporción en las dos papillas,

seguido por el ácido p-cumárico y en menor cantidad se presentó el derivado de ácido p-cumárico. Esto concuerda con algunos autores quienes reportan que los principales compuestos fenólicos de la zanahoria son los ácidos hidroxicinámicos, siendo el ácido clorogénico en que se encuentra en mayor proporción en este vegetal, seguido por otros compuestos como el ácido p-cumárico (Arscott & Tanumihardjo, 2010; Datt et al., 2012; Dias, 2014; Bernadeth B. Surjadinata & Cisneros-Zevallos, 2012).

Los valores de fenólicos que presentó la papilla de zanahoria control fueron 522 mg/kg de ácido clorogénico, 64 mg/kg de ácido p-cumárico y 12 ± 1 mg/kg del derivado de ácido p-cumárico como se muestra en la Tabla 10. La concentración de ácido clorogénico en las zanahorias abarca desde 45 mg/kg hasta 52 mg/kg, esto coincide con el contenido de este compuesto en la papilla de zanahoria control (Bernadeth B. Surjadinata & Cisneros-Zevallos, 2012). De lo contrario, los valores de ácido p-cumárico y el derivado de ácido p-cumárico que se obtuvieron en los análisis de la papilla de zanahoria control son menores a los encontrados por Santana y colaboradores (2016) quienes reportan que las zanahorias frescas tienen concentraciones de 95 mg/kg de ácido p-cumárico y 159 mg/kg del derivado de ácido p-cumárico.

Tabla 10. Compuestos fenólicos de las papillas de zanahoria

Compuesto fenólico	Papilla de zanahoria control	Papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico (AC)
Ácido clorogénico	522 ± 23b	2296 ± 217a
p-CA	64 ± 4b	121 ± 12a
p-CADA	12 ± 1b	62 ± 4a

Valores expresados en mg/ kg y como promedio de las determinaciones por triplicado y su desviación estándar. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Por otro lado, el estrés por corte en las zanahorias y la incubación de estos vegetales a 15° C durante 48 h aumentó la concentración de ácido clorogénico ~ 4 veces (2296 mg / kg) en comparación con las zanahorias que no fueron incubadas (522 mg / kg) lo cual las hizo diferentes significativamente. Del mismo modo, hubo una variabilidad significativa en los otros compuestos fenólicos de la papilla de zanahoria estresada por corte ya que presentó concentraciones 2 veces mayor de ácido cumárico (121 mg/kg) y 5 veces mayor del derivado

de ácido p-cumárico (62 mg/kg) cuando se comparó con las muestras de control (ácido cumárico (64 mg/kg) y derivado de ácido p-cumárico (12 mg/kg).

Santana-Gálvez y colaboradores (2016) observaron un aumento similar en el contenido de compuestos fenólicos. Estos investigadores aumentaron la concentración de ácido clorogénico en las zanahorias por medio de estrés por corte. Estos vegetales previamente cortados fueron almacenados a 15° C durante 48 horas. Los resultados obtenidos mostraron un incremento de 522% de p-cumárico y 69% del derivado de ácido p-cumárico en zanahorias que fueron estresadas por corte en comparación con el control.

Se ha comprobado científicamente que los derivados del ácido hidroxicinámico, como el ácido clorogénico y el ácido cumárico, se sintetizan a través de la ruta metabólica del fenilpropanoide que se activa como parte de los mecanismos de las células vegetales contra el daño celular de la planta provocado por el estrés por corte (Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012).

De igual manera, hay reportes con aumento de la concentración de ácido clorogénico en zanahorias en otras investigaciones. El efecto del estrés por corte sobre la concentración de compuestos fenólicos en tres variedades de zanahoria (Navajo, Legend y Choctaw) fue investigado por Surjadinata-Bernadeth y colaboradores (2012). Las zanahorias fueron cortadas de diferentes formas y se almacenaron a 15° C durante 4 días. El compuesto que más aumento fue el ácido clorogénico, como en nuestra investigación. El aumento de los fenólicos fue diferente dependiendo del corte de la zanahoria. En promedio las tres variedades de zanahoria aumentaron su contenido de ácido clorogénico en un ~97% en corte en rebanadas, ~76% en corte en pedazos grandes y las zanahorias cortadas en tiras hasta ~252%.

7.3.2. Carotenos en papillas de zanahoria

La composición de carotenos y sus concentraciones en papillas de zanahoria se observan en la Tabla 11. α -caroteno, β -caroteno y luteína fueron los carotenos detectados en las papillas de zanahoria. Estos compuestos encontrados concuerdan con la literatura, en la cual se reporta que los carotenos principales presentes en la zanahoria son α -caroteno, β -

caroteno y luteína (Ahmad et al., 2007; Arscott & Tanumihardjo, 2010; Datt et al., 2012; Nicolle et al., 2004).

Tabla 11. Composición de carotenos en papillas de zanahoria

Carotenos	Papilla de zanahoria control	Papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico
α -caroteno	2872 \pm 22a	2594 \pm 65b
β -caroteno	5116 \pm 59a	4841 \pm 46b
Luteína	361 \pm 10a	347 \pm 37a

Valores expresados en mg/kg y como promedio de las determinaciones por triplicado y su desviación estándar. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

La papilla de zanahoria control presentó niveles de 2872 mg/kg de α -caroteno, 5116 mg/kg de β -caroteno y 361 mg/kg de luteína. Algunos autores hacen referencia que el caroteno con mayor concentración presente en la zanahoria es el β -caroteno con rangos desde 381 μ g/g hasta 17206 μ g/g de zanahoria fresca, seguido por el α -caroteno con niveles hasta de 7583 μ g/g (bh) y la luteína con un contenido de 93 μ g/g a 232 μ g/g (bh), por lo que concuerda con lo encontrado en esta investigación (Nicolle et al., 2004).

Las papillas de zanahoria estresadas por corte y altas en ácido clorogénico disminuyeron significativamente la concentración de α -caroteno y de β -caroteno, ya que presentaron concentraciones menores estadísticamente de 2872 mg/g (bh) y 5116 mg/g (bh) respectivamente, comparadas con la papilla de zanahoria control, mientras que el contenido de luteína fue muy similar entre las dos papillas analizadas ($P > 0.50$).

Estos resultados son diferentes a los encontrados por Santana-Gálvez y colaboradores (2016), quienes reportan que la incubación de las zanahorias cortadas a 15° C durante 48 h aumentó la concentración de carotenos. Este aumento en las zanahorias estresadas por corte fue significativo en el contenido de α -caroteno con 551 μ g/g en comparación con el control (476 μ g/g). De igual manera, el β -caroteno en las zanahorias control (528 μ g/g) fue menor en comparación con las zanahorias estresadas las cuales tuvieron concentraciones de 598 μ g/g de β -caroteno.

Sin embargo, en los resultados de esta investigación, se observa la disminución de α -caroteno y de β -caroteno en las papillas estresadas por corte se puede atribuir a la exposición a la luz ambiental y al oxígeno de la superficie de la zanahoria cortada (Martín-Diana et al., 2005; Ruiz-Cruz, Islas-Osuna, Sotelo-Mundo, Vázquez-Ortiz, & González-Aguilar, 2007). Asimismo, la generación de radicales libres también puede inducir la oxidación de los carotenos a través de la actividad de la lipoxigenasa (Martín-Diana et al., 2005).

De igual manera, está reportado que la disminución de carotenos totales esta correlacionado con los valores disminuidos de b (croma), esto concuerda con la Tabla 9 de los valores de colorimetría de las papillas, en la cual las papillas que fueron estresadas (42.94) tienen valores disminuidos significativamente en comparación con el control (47.27). Los ácidos fenólicos no polares y polares tienen afinidad sobre la fracción lipídica de los carotenos en las zanahorias, lo cual baja directamente el valor de croma o tras su posterior oxidación (Talcott & Howard, 1999).

7.4. Bioensayo

7.4.1. Efecto del ácido clorogénico sobre el metabolismo de ratas

El efecto del ácido clorogénico de las papillas de zanahoria sobre diferentes parámetros relacionados al metabolismo se muestra en los siguientes puntos. Las ratas Wistar evaluadas en esta investigación se dividieron en tres tratamientos, en los cuales en el primer tratamiento las ratas consumieron un promedio aproximado de 6.87 mg de ácido clorogénico al día debido al estrés por corte de las zanahorias con las que se realizaron papillas, en el segundo tratamiento las ratas consumieron un promedio de 1.56 mg de ácido clorogénico al día y el grupo control no consumió ácido clorogénico, sin embargo, su dieta fue balanceada 100%.

7.4.1.1. Efecto del ácido clorogénico sobre el alimento ingerido de ratas de dos generaciones

En la primera generación de ratas no hay diferencias significativas en el consumo de su alimento ($P = 0.492$), a pesar de que los dos grupos de las ratas que consumieron papillas de zanahoria solo tenían el 90% de su dieta balanceada y un 10% de su papilla control o su papilla alta en ácido clorogénico. El grupo control consumió 25 g de alimento al día, siendo el grupo que consumió menos de alimento, mientras que el tratamiento de la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico consumió 26 g de alimento y el tratamiento con la papilla de zanahoria control 27 g de alimento, como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Alimento ingerido por ratas tratadas con ácido clorogénico en la primera generación

Tratamiento	Comida ingerida por día (g)	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	26.12 ± 0.9	
Papilla de zanahoria control	26.75 ± 0.4	0.492
Control	25.21 ± 1	

Valores expresados como promedio de las determinaciones y su desviación estándar. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

De igual manera, en la segunda generación de ratas, no hubo diferencias significativas entre tratamientos en el consumo de alimento ($P = 0.291$) como se muestra en la tabla 13. El grupo control y el grupo con la papilla de zanahoria estresada consumieron un promedio de 27 g de alimento por día, mientras que el grupo del tratamiento con la papilla de zanahoria control consumió 28 g de alimento por día. El consumo de alimento promedio de ratas Wistar por día alcanza valores desde 15 g hasta 30 g aproximadamente (Kathleen et al., 2011), por lo que el consumo de alimento de las ratas de las dos generaciones de esta investigación se encuentran dentro del rango de estos valores.

Tabla 13. Alimento ingerido por ratas tratadas con ácido clorogénico en la segunda generación

Tratamiento	Comida ingerida por día (g)	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	27.37 ± 0.5	
Papilla de zanahoria control	28.5 ± 0.9	0.291
Control	26.8 ± 0.6	

Valores expresados como promedio de las determinaciones y su desviación estándar. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Estos resultados concuerdan con una investigación en la cual se realizó con café (ácido clorogénico) en ratas macho Sprague-Dawley obesas inducidas por una dieta alta en

grasas durante 10 semanas. Cuarenta ratas fueron divididas en 4 tratamientos, el grupo 1 o control (dieta balanceada y agua), grupo 2 (dieta balanceada y café), grupo 3 (agua y dieta alta en grasas) y grupo 4 (café y dieta alta en grasas). Las ratas que recibieron una dieta equilibrada con agua o con café consumieron la misma cantidad de comida al día durante el experimento (132 y 107 kcal/día), como en nuestros resultados que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, las ratas que eran obesas y que consumieron café consumieron menor cantidad de alimento (109 kcal/día) en comparación con el grupo de ratas obeso y que consumió agua (152 kcal/día) (Cowan et al., 2014). Por lo que el ácido clorogénico probablemente actúe positivamente sobre una dieta alta en grasas y no en una dieta equilibrada.

De igual manera, una dieta alta en flavonoides o alta en antocianinas o control en ratas sanas no tienen un efecto sobre el consumo de alimento al día, ya que estos roedores de estos tres tratamientos consumieron un promedio de 29.1 a 31.2 g de alimento por día (Rendeiro et al., 2013).

7.4.1.2. Efecto del ácido clorogénico sobre el peso corporal de ratas

En la Tabla 14 se observa el peso ganado en porcentaje de las ratas de la primera generación desde el comienzo del experimento hasta el día de su sacrificio. Las ratas que consumieron la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico tuvieron un mayor incremento de peso durante el experimento con 183% sobre su peso inicial, seguidas del grupo de ratas que consumieron la papilla control con un 169% y por último las ratas que ganaron menos peso durante la investigación fueron el grupo control; sin embargo, a pesar de estos resultados, la diferencia de peso entre tratamientos no fue significativo ($P = 0.725$).

Tabla 14. Peso de las ratas tratadas con ácido clorogénico de la primera generación

Tratamiento	Peso ganado (%)	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	183 ± 35	
Papilla de zanahoria control	169 ± 17	0.725
Control	155 ± 12	

Valores expresados como promedio de las determinaciones y su desviación estándar. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

En la Tabla 15 se muestra la variabilidad del peso ganado de los tratamientos de las ratas de la segunda generación desde el inicio del experimento hasta el día de sacrificio. El tratamiento que ganó menos peso con 139% fue el grupo que consumió un 10% de papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico, seguido del grupo control que ganó un peso de 150% y por último el grupo que tuvo mayor ganancia de peso fue el grupo que consumió la papilla de zanahoria control, sin embargo, a pesar de la variabilidad entre el peso ganado de los tratamientos no hubo diferencia significativa ($P = 0.555$). En el anexo se muestran los pesos de las ratas el día del sacrificio, divididas en machos y hembras de las dos generaciones, ya que las hembras tienen un peso menor que los machos (peso promedio en hembras 200 - 400g y macho 300 – 500g), sin embargo, aquí se muestra el promedio del porcentaje de peso ganado considerando el peso inicial de cada rata como individuo.

Tabla 15. Peso de las ratas tratadas con ácido clorogénico de la primera generación

Tratamiento	Peso ganado (%)	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	139 ± 11	0.555
Papilla de zanahoria control	170 ± 29	
Control	150 ± 17	

Valores expresados como promedio de las determinaciones y su desviación estándar. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Estos resultados concuerdan con lo publicado por Suzuki Atsushi y colaboradores (2006), quienes reportaron que los roedores sin patologías que consumen una dieta equilibrada sin o con antioxidantes durante 8 semanas no tienen diferencias significativas entre el peso final de las ratas control y ratas que consumieron ácido clorogénico (30 -600 mg/ kg). Ya que las ratas control de su experimento tuvieron un peso final de 415 g y el promedio de peso de las ratas que consumieron este compuesto fenólico fue de 421 g.

De igual manera, se presentaron resultados similares en otra investigación experimental de ratas, quienes consumieron ácido clorogénico por medio del café. Se dividieron 3 tratamientos, en el cual, el primero fue control, al segundo se le administró café (ácido clorogénico) y al tercero se le dio café con leche durante 3 semanas. Los autores reportaron que no había diferencias significativas entre el peso ganado de los tres tratamientos del estudio al terminar el experimento (Dupas et al., 2006).

7.4.1.3. Efecto del ácido clorogénico sobre el peso del hígado de ratas Wistar

El peso del hígado de las ratas de los tres tratamientos de la primera generación se presenta en la Tabla 16. No hubo diferencia significativa entre los tres grupos de roedores ($P=0.816$), ya que el grupo con que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico tuvo un promedio de peso de hígado de 10 g, seguidos del grupo que consumió la papilla de zanahoria control y el tratamiento control que presentaron un peso de 11 g.

Tabla 16. Peso del hígado de las ratas tratadas con ácido clorogénico de la primera generación

Tratamiento	Peso del hígado	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	10.12 ± 1.8	0.816
Papilla de zanahoria control	11.00 ± 1.4	
Control	11.37 ± 0.8	

Valores expresados como promedio de las determinaciones y su desviación estándar. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

De igual manera, no hubo variabilidad en el peso promedio de los hígados de los tres tratamientos de la segunda generación ($P=0.989$). Los tratamientos de las ratas que consumieron las papillas tuvieron un peso promedio de hígado de 12 g, mientras que el grupo control presentó un peso de hígado de 11 g como se observa en la Tabla 17.

Tabla 17. Peso del hígado de las ratas tratadas con ácido clorogénico de la primera generación

Tratamiento	Peso del hígado	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	11.5 ± 1.4	0.989
Papilla de zanahoria control	11.5 ± 2.0	
Control	11.2 ± 0.9	

Valores expresados como promedio de las determinaciones y su desviación estándar. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

El incremento de peso del hígado normalmente se da en respuesta al aumento de grasa y colesterol en la dieta que crean deposiciones de lípidos en este órgano (Wan et al., 2012). Los hígados de las ratas Wistar de los tres tratamientos de las dos generaciones estudiadas

no presentaron grasa físicamente, ni volumen aumentado, por lo que pudo observarse que eran hígados sanos. Estos órganos de los tres tratamientos estaban compuestos de 6 lóbulos como se muestra en la figura 8.



Figura 8. Hígado de rata Wistar

7.4.1.4. Efecto del ácido clorogénico sobre la glucosa en plasma de ratas

Las ratas que consumieron una papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico presentaron la menor cantidad de glucosa en plasma con 148 mg/dL (Tabla 18), seguidos de las ratas control que tuvieron un valor de glucosa en plasma de 166 mg/dL, y por último el tratamiento con la papilla de zanahoria control que obtuvo un nivel de glucosa de 191 mg/dL, sin embargo, a pesar de estas variabilidades, la diferencia no fue significativa entre los tres tratamientos de ratas ($P= 0.222$).

Tabla 18. Contenido de glucosa en plasma de ratas de la primera generación

Tratamiento	Glucosa (mg/dL)	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	148 ± 10a	0.222
Papilla de zanahoria control	191 ± 21a	
Control	166 ± 15a	

Valores expresados como promedio de los tratamientos por triplicado y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

En algunos artículos de investigación se ha mencionado que las ratas Wistar desarrollan intolerancia a la glucosa y una menor respuesta de la insulina a la glucosa con la edad (Reaven, Gold, & Reaven, 1979; Wang et al., 1997), por lo cual los valores aumentados de glucosa en plasma de los tres tratamientos de las ratas de nuestra investigación se podría deber principalmente a que los roedores presentaban una edad de 23 semanas aproximadamente, cuando se recolectó la sangre para realizar los análisis respectivos.

El efecto de los tratamientos sobre la glucosa en plasma de la segunda generación de ratas Wistar se muestra en la Tabla 19. Los resultados no fueron significativos entre los tres tratamientos ($P=0.525$), sin embargo, el grupo control presentó una concentración de glucosa de 148 mg/dL, seguido del tratamiento que consumió la papilla alta en ácido clorogénico con 133 mg/dL y un contenido de glucosa de 133 mg/dL en el grupo que consumió la papilla de zanahoria control.

Tabla 19. Contenido de glucosa en plasma de ratas de la segunda generación

Tratamiento	Glucosa (mg/dL)	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	135 ± 8a	
Papilla de zanahoria control	133 ± 11a	0.525
Control	148 ± 9a	

Valores expresados como promedio de los tratamientos por triplicado y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Estos resultados sin diferencias significativas entre tratamientos se deben a que las ratas que se utilizaron en este experimento fueron ratas sanas. Por lo cual no se esperaría que cambiaran sus valores de concentración de glucosa en plasma, si no que el ácido clorogénico estuviera funcionando como preventivo contra la diabetes mellitus al no presentar diferencias significativas entre tratamientos. El ácido clorogénico regula la homeostasis de glucosa mediante la inhibición de la digestión de los carbohidratos, disminuye la absorción intestinal de la glucosa, modula la liberación de la glucosa en hígado (inhibe la glucosa-6-fosfato translocasa 1, la cual suprime la gluconeogénesis hepática) y modifica la captación de glucosa en tejidos sensibles a la insulina (estimula la captación de glucosa de adipocitos y del músculo esquelético a través de la activación de la quinasa dependiente de AMP) (Huang et al., 2014; Ong, Hsu, & Tan, 2013).

Las investigaciones en las cuales, el ácido clorogénico tiene un efecto positivo sobre la glucosa son estudios en donde se utilizan ratas obesas o diabéticas o con una dieta alta en grasas. Ratones diabéticos db/db se utilizaron para evaluar el efecto del ácido clorogénico sobre la glucosa. Durante 12 semanas, 32 ratas fueron alimentados con diferentes tratamientos: Dieta control, dieta control con 80 mg de ácido clorogénico, ratones diabéticos db/db con dieta control y ratones diabéticos db/db con dieta con ácido clorogénico (80 mg). El ácido clorogénico en ratones con diabetes disminuyó la glucosa plasmática en ayunas (14.6 mmol/L) y la hemoglobina glucosilada (27.6%) comparadas con el grupo control/db quienes presentaron concentraciones de 20.5 mmol/L de glucosa plasmática en ayunas y 35% de hemoglobina glucosilada (Jin et al., 2015). De igual manera, en otra investigación el ácido clorogénico administrado durante 11 días disminuyó los niveles de glucosa en sangre en ayunas en Ratas Sprague-Dawley diabéticas en comparación con el control (Hunyadi et al., 2012).

7.4.1.5. Efecto del ácido clorogénico sobre la concentración de colesterol en plasma de ratas

El contenido de ácido clorogénico sobre el colesterol en plasma de ratas de la primera generación se muestra en la Tabla 20. No hubo diferencia significativa entre los 3 tratamientos ($P = 0.203$), ya que las ratas que consumieron una papilla de zanahoria aumentada en ácido clorogénico tuvieron concentraciones de colesterol en plasma de 70 mg/dL, muy parecido al control que obtuvo niveles de colesterol de 67 mg/dL y el tratamiento que consumió la papilla de zanahoria control presentó un contenido de colesterol en plasma de 83 mg/dL.

Tabla 20. Contenido de colesterol en plasma de ratas de la primera generación

Tratamiento	Colesterol (mg/dL)	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	70 ± 5a	0.203
Papilla de zanahoria control	83 ± 9a	
Control	67 ± 3a	

Valores expresados como promedio de los tratamientos por triplicado y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Las ratas de la segunda generación que consumieron una papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico tuvieron una concentración de colesterol en plasma de 70 mg/dL, mientras que las ratas que consumieron la papilla de zanahoria control presentaron un contenido de colesterol en plasma de 56 mg/dL y las ratas con consumieron una dieta control obtuvieron niveles de colesterol en plasma de 80 mg/dL, por lo que no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P = 0.320$) como se muestra en la Tabla 21.

Tabla 21. Contenido de colesterol en plasma de ratas de la primera generación

Tratamiento	Colesterol (mg/dL)	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	70 ± 9a	
Papilla de zanahoria control	56 ± 9a	0.320
Control	80 ± 11a	

Valores expresados como promedio de los tratamientos por triplicado y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Las diferencias no significativas entre tratamientos de colesterol en plasma de las dos generaciones de ratas podrían deberse a que en los tres tratamientos que se utilizaron en esta investigación, no se administró una dieta alta en grasas, si no que su dieta fue balanceada relativamente entre los tratamientos, por lo que este parámetro podría considerarse normal.

Sin embargo, hay diferentes investigaciones en las cuales se utilizan dietas altas en grasas y si existe un efecto positivo del ácido clorogénico sobre el colesterol en plasma. Ratas macho Sprague-Dawley de dos meses de edad fueron suplementadas con ácido clorogénico (1 mg/kg/día o 10 mg/kg/día) en una dieta alta en colesterol, este tratamiento se comparó con un grupo control (dieta equilibrada) y un tratamiento con una dieta alta en colesterol sin suplementos durante 28 días. Se tomó la muestra de plasma antes y después del experimento. El grupo que consumió la mayor dosis de ácido clorogénico tuvo menor concentración de colesterol en plasma (4.83 mmol/L), en comparación con el grupo que consumió menor cantidad de ácido clorogénico en plasma (5.78 mmol/L) y el grupo control con dieta alta en colesterol (5.70 mmol/L) (Wan et al., 2012). De igual manera, en otro experimento se administró una dieta alta en colesterol y el ácido clorogénico en ratones, al terminó del estudio, se determinó que hubo una disminución significativa de la concentración de colesterol en plasma (3.42 mmol/L) en comparación con ratones que solo consumieron una dieta alta en grasas (5.53 mmol/L) (Cho et al., 2010).

Los resultados benéficos del ácido clorogénico sobre dietas altas en grasas o dietas hipercolesterolemias se puede deber a la regulación que hace este compuesto fenólico sobre la expresión de CYP7A1, ya que se ha demostrado que hay una correlación entre el ácido clorogénico que disminuye el nivel de CYP7A1 y la baja de concentración de colesterol en sangre en animales con una dieta alta en colesterol. CYP7A1 es una enzima que determina la velocidad en la ruta biosintética de los ácidos biliares al disminuir el colesterol en el hígado y es el principal mecanismo de eliminación del colesterol (Wan et al., 2012).

7.4.1.6. Efecto del ácido clorogénico sobre la concentración de triglicéridos en plasma de ratas

El efecto del ácido clorogénico sobre el contenido de triglicéridos en la primera generación de ratas se muestra en la Tabla 22. El grupo control presentó concentraciones de triglicéridos en plasma de 70 mg/dL, seguido por el tratamiento que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico que presentó un contenido de triglicéridos de 83 mg/dL y el grupo que consumió la papilla de zanahoria control obtuvo un porcentaje de triglicéridos totales de 103 mg/dL. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los tres tratamientos ($P = 0.141$).

Tabla 22. Contenido de triglicéridos en plasma de ratas de la primera generación

Tratamiento	Triglicéridos (mg/dL)	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	83 ± 11a	0.141
Papilla de zanahoria control	103 ± 15a	
Control	70 ± 5a	

Valores expresados como promedio de los tratamientos por triplicado y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Las concentraciones de triglicéridos en plasma de los tres tratamientos de la segunda generación de ratas son muy similares y no presentan diferencias significativas ($P = 0.195$). El tratamiento con la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico presentó concentraciones de triglicéridos en plasma de 53 mg/dL, seguido por el tratamiento con la papilla de zanahoria control con un nivel de triglicéridos en plasma de 72 mg/dL y el grupo control que obtuvo un contenido de triglicéridos en plasma de 74 mg/dL como se presenta en la Tabla 23.

Tabla 23. Contenido de triglicéridos en plasma de ratas de la segunda generación

Tratamiento	Triglicéridos (mg/dL)	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	53 ± 6a	0.195
Papilla de zanahoria control	72 ± 14a	
Control	74 ± 6a	

Valores expresados como promedio de los tratamientos por triplicado y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Las diferencias no significativas entre los tres tratamientos de las dos generaciones se deben principalmente a que las dietas de las ratas estudiadas son equilibradas y no son altas en grasas como en otras investigaciones, por lo que las concentraciones de triglicéridos en plasma son similares entre sí, ya que se ha visto un efecto positivo del ácido clorogénico sobre los triglicéridos en plasma, pero en las investigaciones en las cuales los roedores tienen una dieta hipercalórica.

Cho Ae-Sim y colaboradores (2010) realizaron una investigación con ratones obesos inducidos con una dieta alta en calorías en la cual administraron 0.02% de ácido clorogénico sobre su dieta. Las ratas control tuvieron una concentración de triglicéridos en plasma de 1.95 mmol/L, mientras que las ratas que consumieron el ácido clorogénico presentaron un contenido de triglicéridos en plasma de 0.91 mmol/L.

De igual manera, en otra publicación se determinó que las ratas que consumieron una dieta alta en grasas y un alto contenido de ácido clorogénico (90 mg/kg⁻¹) tuvieron concentraciones menores de triglicéridos en plasma de 1.59 mmol/L⁻¹, comparados con el control que presentó niveles de triglicéridos en plasma de 1.81 mmol/L⁻¹ (K. Huang et al., 2014).

Los resultados positivos del ácido clorogénico sobre dietas altas en grasas o dietas hipercolesterolemias se debe a la regulación que hace este compuesto fenólico sobre la expresión de PPAR- α en un exceso de ácidos grasos en el organismo, ya que PPAR- α pertenece a la familia de receptores nucleares de los factores de transcripción, que tienen

efectos importantes sobre la homeostasis de lípidos a través de la regulación de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos; por lo que PPAR- α se expresa predominantemente en el hígado y está encargada de regular la transcripción de genes implicados en la captación y regulación de los ácidos grasos hepáticos (Huang et al., 2014).

Sin embargo, también hay estudios que no concuerdan con estos resultados positivos, ya que Wan Chun-Wai y colaboradores (2012) determinaron que una dieta alta en colesterol en ratas en la cual se administraron dos concentraciones de ácido clorogénico (1 o 10 mg/kg) no hubo una disminución en el contenido de triglicéridos en plasma entre estos dos tratamientos (0.73 mmol/L y 0.73 mmol/L) y el control que consumió la misma dieta alta en colesterol y no consumió este compuestos fenólico (0.70 mmol/L).

7.5. Antioxidantes en plasma

7.5.1. Efecto del ácido clorogénico sobre la concentración de antioxidantes por ORAC

La concentración de antioxidantes en plasma se determinó por medio de la Capacidad de absorción de radicales de oxígeno. El tratamiento con mayor concentración de antioxidantes en plasma de la primera generación de ratas fue el tratamiento que consumió la papilla de zanahoria control (913 μ moll/ml), seguido por el tratamiento control con 892 μ moll/ml y por último el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico que tuvo la menor concentración de antioxidantes en plasma (641 μ moll/ml), sin embargo, estas diferencias no fueron significativas entre los tres tratamientos ($P = 0.069$), como se observa en la Tabla 24.

Tabla 24. Capacidad antioxidante en plasma de ratas en la primera generación

Tratamiento	Capacidad antioxidante	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	641 \pm 48a	
Papilla de zanahoria control	913 \pm 78a	0.069
Control	892 \pm 116a	

Valores expresados en μ moll/ml equivalentes de Trolox como promedio de los tratamientos y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Estos resultados no concuerdan con lo publicado por Vicente y colaboradores (2014), quienes realizaron un experimento con café, el cual es rico en ácido clorogénico. Para esta investigación se utilizaron 12 ratas macho Wistar para cada tratamiento. Al primer grupo se le administraron 2 ml de café y el segundo grupo se le administraron 2 ml de agua (control). Ambos grupos tuvieron una dieta *ad libitum* (AIN-76) durante 28 días. La capacidad antioxidante (ORAC) en el grupo control fue de 700 $\mu\text{mol TE/ml}$, mientras que el grupo que consumió el café incremento hasta 25% más su capacidad antioxidante (850 $\mu\text{mol TE/ml}$), por lo que las diferencias fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, la capacidad antioxidante fue medida en el hígado de las ratas y no en el plasma como en nuestra investigación (J V Vicente et al., 2013). Esto concuerda con Barriga y colaboradores (2017), quienes publicaron que los niveles más altos de capacidad antioxidante por el método de ORAC se detectan en mayor nivel en el hígado, ya que generalmente los compuestos antioxidantes se depositan en este órgano, mientras que en el plasma se detecta menor nivel de concentración ya que permanece poco tiempo en sangre.

De lo contrario a la primera generación, en la segunda generación el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico tuvo mayor concentración de antioxidantes en plasma con 866 $\mu\text{mol/ml}$, seguido por la papilla de zanahoria control con 820 $\mu\text{mol/ml}$ y la menor cantidad de antioxidantes en plasma la tuvo el grupo control. Sin embargo, no se notaron diferencias significativas entre los tres tratamientos ($P = 0.595$) como se muestra en la Tabla 25.

Tabla 25. Capacidad antioxidante en plasma de ratas en la segunda generación

Tratamiento	ORAC	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	866 \pm 82a	
Papilla de zanahoria control	820 \pm 170a	0.595
Control	721 \pm 75a	

Valores expresados en $\mu\text{mol/ml}$ equivalentes de Trolox como promedio de los tratamientos y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Como se mencionó anteriormente, la concentración de antioxidantes en plasma en los tres tratamientos de las dos generaciones fue similar estadísticamente. Esta situación podría deberse a que algunos estudios reportan que el ácido clorogénico no se encuentra en plasma,

es decir no se metaboliza en el plasma, sino que es excretado por la vía urinaria (Lafay, Morand, Manach, Besson, & Scalbert, 2006; Shukitt-Hale et al., 2009).

Por otro lado, otra investigación reporta que se evaluaron 4 grupos de ratas macho Wistar en las cuales se suplementó con ácido clorogénico (250 μmol), ácido cafeico (250 μmol), ácido quínico (250 μmol) y el último grupo fue el control. Esta dieta se administró durante 8 días, al finalizar el tiempo se midieron las concentraciones de estos compuestos, en plasma y orina. El porcentaje de absorción en plasma y orina de las ratas no excedió ni el 0.5% de la dosis de ácido clorogénico que consumieron durante el experimento, sin embargo, se encontró que las ratas que consumieron ácido clorogénico en la dieta tuvieron concentraciones de ácido hipúrico, el cual es una molécula derivada del ácido quínico y ácido cafeico, que son componentes del ácido clorogénico. Por lo que la mayor parte del ácido clorogénico no es absorbida en la parte proximal del intestino, sin embargo, es hidrolizado por la microflora en el intestino largo que exhibe actividades de esterasa, donde el ácido cafeico y el quínico se liberan y se metabolizan aún más. Ya que en esta sección del intestino se encontró el 57.4% de la ingesta del ácido clorogénico de la dieta (Dupas et al., 2006), por lo que los autores concluyen y coinciden con otros investigadores en que esta abundancia de metabolitos muestra que la biodisponibilidad del ácido clorogénico depende en gran medida del metabolismo en la microflora intestinal (Dupas et al., 2006; Gonthier et al., 2003).

7.5.2. Efecto del ácido clorogénico sobre la concentración de glutatión-S-transferasa (GST) en plasma

El tratamiento control tuvo la mayor concentración de glutatión-S-transferasa en plasma (16.1 $\mu\text{mol/ml}$) en la primera generación de ratas, en comparación con el grupo de ratas que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico (11.3 $\mu\text{mol/ml}$), siendo estas diferencias significativas estadísticamente ($P = 0.005$). Por otro lado, el grupo que consumió la papilla de zanahoria control presentó contenido similar a los otros dos tratamientos de glutatión-S-transferasa en plasma como se presenta en la Tabla 26.

Tabla 26. Concentración de Glutation-S-transferasa (GST) en plasma de ratas de la primera generación

Tratamiento	GST	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	11.3 ± 0.4b	
Papilla de zanahoria control	14.3 ± 1.2ab	0.005
Control	16.1 ± 0.7a	

Valores expresados en $\mu\text{mol/ml}$ como promedio de los tratamientos y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

La segunda generación de ratas presentó concentraciones de glutatión-S-transferasa en plasma similares estadísticamente entre los tres tratamientos ($P = 0.692$). Ya que, los 2 grupos que consumieron las papillas de zanahoria tuvieron la misma concentración de glutatión-S-transferasa en plasma ($9.9 \mu\text{mol/ml}$) y el control presentó un contenido de $10.4 \mu\text{mol/ml}$ (Tabla 27).

Tabla 27. Concentración de Glutation-S-transferasa (GST) en plasma de ratas de la segunda generación

Tratamiento	GST	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	9.9 ± 0.2a	
Papilla de zanahoria control	9.9 ± 0.1a	0.692
Control	10.4 ± 0.5a	

Valores expresados en $\mu\text{mol/ml}$ como promedio de los tratamientos y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Los resultados obtenidos del contenido de GST en plasma no concuerdan con lo publicado por Lin y colaboradores (1998), quienes administraron un extracto de hojas de té verde (2.5%) a ratas macho Wistar durante 63 semanas, y analizaron el contenido de GST en hígado. Ya que sus resultados señalaron que el grupo que consumió el extracto tuvo una mayor concentración de esta enzima ($2240 \text{ nmol/mg proteína}$) comparado con el grupo control ($2240 \text{ nmol/mg proteína}$) (Lin et al., 1998). Sin embargo, el corto tiempo de estudio, aunado a la determinación en plasma podrían ser las causas de la diferencia entre los resultados.

7.5.3. Efecto del ácido clorogénico sobre la concentración de Superóxido Dismutasa (SOD) en plasma

La concentración de la enzima superóxido dismutasa está relacionada con el porcentaje de inhibición de la xantina oxidasa. A mayor inhibición de la xantina oxidasa, hay una mayor concentración de la enzima superóxido dismutasa. El porcentaje de inhibición de la xantina oxidasa en plasma de ratas de los tres tratamientos de la primera generación se reporta en la Tabla 28. El grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico tuvo el mayor porcentaje de inhibición de xantina oxidasa (23.8%) y a su vez esta diferencia fue significativa comparada con los otros dos tratamientos ($P = 0.08$), ya que se observó que tuvo hasta el doble de porcentaje de inhibición en comparación con el grupo control (12.9%) y el grupo que consumió la papilla de zanahoria control (12.2%).

Tabla 28. Porcentaje de inhibición de xantina oxidasa en plasma de ratas de la primera generación

Tratamiento	% de inhibición de la xantina oxidasa	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	23.8 ± 1.8a	0.008
Papilla de zanahoria control	12.2 ± 3.8b	
Control	12.9 ± 1.7b	

Valores expresados en porcentaje de inhibición de xantina oxidasa como promedio de los tratamientos y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Estos resultados concuerdan con una investigación sobre la concentración de ácido clorogénico en una dieta alta en grasas en ratas macho Sprague-Dawley. En la cual se dividieron 4 grupos, el grupo 1 consumió una dieta equilibrada, el grupo 2 consumió una dieta alta en grasas, el grupo 3 consumió una dieta alta en grasas y 20 mg/kg de ácido clorogénico y el 4to grupo una dieta alta en grasas y 90 mg/kg de ácido clorogénico. El tratamiento que consumió la mayor cantidad de ácido clorogénico fue el que presentó la mayor concentración de SOD (17 U mg⁻¹ proteína) comparados con los otros 3 tratamientos como se observa en la primera generación de ratas de nuestra investigación. El grupo control y el tratamiento que consumió una baja dosis de ácido clorogénico presentaron concentraciones muy similares (64.1 U mg⁻¹ proteína y 64.8 U mg⁻¹ proteína).

Cabe mencionar, que este parámetro fue medido en el hígado de la rata, por lo que los valores podrían ser diferentes con la concentración de plasma, ya que se ha reportado que dependiendo del tejido o plasma es el porcentaje de inhibición de la xantina oxidasa (Barriga Vallejo et al., 2017).

Así mismo, se ha reportado la mayor concentración de SOD en el cerebro de ratas, las cuales recibieron un concentrado de hojas de blueberries (100 mg bs) por vía intraperitoneal, estos roedores fueron dañados a nivel cerebral por Selenio. La composición de fenólicos del extracto fue de ácido clorogénico, rutina, isoquercetina y quercetina. El extracto de blueberry incrementó significativamente la actividad de SOD en el cerebelo de los ratas en comparación con el grupo control ($P < 0.01$) (Ferlemi et al., 2015). Estos resultados pueden deberse a que las ratas recibieron el concentrado vía intraperitoneal, por lo que no paso por el tracto gastrointestinal en el cual el ácido clorogénico es metabolizado de diferente manera.

En la segunda generación no se observó la misma tendencia entre los grupos de estudio, ya que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de xantina oxidasa entre los tres tratamientos ($P = 0.125$). El grupo que consumió la papilla de zanahoria control presentó un nivel de 37% de inhibición de la xantina oxidasa, seguido del tratamiento control con 32.8% de inhibición y el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico presento porcentajes de inhibición de xantina oxidasa de 31.6% como se presenta en la Tabla 29.

Tabla 29. Porcentaje de inhibición de xantina oxidasa en plasma de ratas de la segunda generación

Tratamiento	SOD	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	31.6 ± 1a	
Papilla de zanahoria control	37.0 ± 1a	0.125
Control	32.8 ± 2a	

Valores expresados en porcentaje de inhibición de xantina oxidasa como promedio de los tratamientos y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Estos resultados concuerdan con Susuki-Atsuhi y colaboradores (2006), quienes reportan que un consumo de 30 mg de ácido clorogénico en ratas macho Wistar-Kyoto sanas,

no tiene efectos significativos en la concentración de SOD en el suero de ratas (22.5%) en comparación con el control (21.1%).

Huang-Kang y colaboradores (2015) explican que al mezclar el ácido clorogénico con el alimento podría ser la causa de que no se absorba al 100% este antioxidante, ya que es posible que el animal no consuma la cantidad de ácido clorogénico al día. De igual manera, el ácido clorogénico podría volverse inestable al mezclarse con la comida y el tiempo que pase junto a este alimento antes de que el roedor lo consuma, y eso podría ser la razón de las diferencias de concentraciones de antioxidantes en plasma entre las dos generaciones de ratas que hemos investigado. De igual manera, los antioxidantes permanecen poco tiempo en plasma, generalmente después de su consumo, ya que son metabolizados y depositados en órganos específicos, por lo cual, eso podría estar sucediendo en nuestros resultados.

7.6. Desarrollo cognitivo

En esta sección se realizaron 4 pruebas de desarrollo cognitivo del laberinto de agua de Morris en los tres tratamientos de ratas de las dos generaciones estudiadas, en los siguientes puntos se muestran los resultados de cada prueba (errores y latencias).

7.6.1. Efecto del ácido clorogénico sobre la memoria de corto plazo en ratas

El promedio de los errores y las latencias de la prueba de memoria de corto plazo de los tres tratamientos investigados de la primera generación de ratas se observa en la Tabla 30. No hubo diferencias significativas entre los tres tratamientos que realizaron esta prueba, considerando los 2 parámetros evaluados: errores ($P = 0.691$) y latencia ($P = 0.369$).

Tabla 30. Errores y latencias cometidos por ratas en la Memoria de Corto Plazo de la primera generación

Tratamiento	Errores ¹	Latencia ²
Papilla de zanahoria + AC	6.5 ± 1	79 ± 11
Papilla de zanahoria control	5.6 ± 0.4	58 ± 4
Control	6.7 ± 0.9	71 ± 13
Valor -P	0.691	0.369

Valores expresados como el promedio en errores¹ y segundos² y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

El grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico cometió 6.5 errores al tratar de encontrar la plataforma en la prueba de memoria de corto plazo del laberinto de agua de Morris, mientras que el grupo control realizó 6.7 errores y el grupo que consumió la papilla de zanahoria control obtuvo 5.6 errores.

Por otro lado, el tratamiento que cometió la mayor cantidad de segundos en encontrar la plataforma en esta prueba fue el que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico (79 s), seguido por el tratamiento control (71 s) y finalmente el grupo que consumió la papilla de zanahoria control con 58 s.

Cabe mencionar que, en esta prueba específicamente se observó que las ratas de los tres tratamientos de la primera generación estaban muy nerviosas, ya que les costó trabajo encontrar la plataforma y tuvieron que colocarse en la plataforma por lo menos 2 o 3 veces más en alguna repetición del experimento para que reconocieran el lugar; por esta situación estos tres grupos de ratas en la prueba de memoria de corto plazo del laberinto de Morris cometieron la mayor cantidad de errores y latencia en comparación con las otras tres pruebas de esta generación y la generación dos.

En la generación dos, las ratas permanecieron más tranquilas, por lo que cometieron menos errores y se registró menor cantidad de latencias en comparación con la generación 1. El grupo control presentó la menor cantidad de errores en encontrar la plataforma de la prueba de memoria de corto plazo de la generación dos (1.4 errores), seguido por el grupo que consumió la papilla de zanahoria control (2.2 errores) y el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico (2.5 errores), sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos ($P = 0.087$) como se observa en la Tabla 31.

Tabla 31. Errores y latencias cometidos por ratas en la Memoria de Corto Plazo de la segunda generación

Tratamiento	Errores ¹	Latencia ²
Papilla de zanahoria + AC	2.5 ± 0.3	25 ± 3
Papilla de zanahoria control	2.2 ± 0.8	26 ± 7
Control	1.4 ± 0.2	16 ± 2
Valor -P	0.087	0.088

Valores expresados como el promedio en errores¹ y segundos² y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey (P < 0.05).

De igual forma que en el parámetro de los errores de la memoria de corto plazo de la segunda generación, no hubo diferencias significativas en la latencia entre los tres tratamientos (P = 0.088). El tratamiento control tardó 16 seg en encontrar la plataforma de esta prueba, seguido por el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico (25 s) y las ratas que consumieron la papilla de zanahoria control (26 s).

7.6.2. Efecto del ácido clorogénico sobre la memoria de largo plazo en ratas

Las ratas de primera generación que siguieron a la dieta de control registraron la mayor cantidad de errores del ensayo en los primeros cuatro días de la prueba (día 1: 5, día 2: 3.7, día 3: 3.4, día 4: 2.5) comparado con los grupos que consumieron la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico (día 1: 4.8, día 2: 2.4, día 3: 1.7, día 4: 2.0) y el grupo que consumió la papilla de zanahoria control (día 1: 4.3, día 2: 3.3, día 3: 1.4, día 4: 1.3).

Sin embargo, solo en el día 3 de la prueba de memoria de largo plazo hubo diferencias significativas del grupo control, con respecto a los otros dos tratamientos (P >0.006) como se presenta en la Tabla 32. En general, el número de errores disminuyó conforme fueron pasando los días del ensayo de la memoria de largo plazo, esto es lo esperado en este tipo de prueba, ya que la repetición hace que disminuya el número de errores (Amaya-Guerra et al., 2006). En el día 5 de la prueba no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos (P = 0.053).

Tabla 32. Errores cometidos por las ratas en la Memoria de Largo Plazo de la primera generación

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Papilla de zanahoria + AC	4.8 ± 0.7a	2.4 ± 0.5 a	1.7 ± 0.2a	2.0 ± 0.5a	2.6 ± 0.3a
Papilla de zanahoria control	4.3 ± 0.5a	3.3 ± 0.5a	1.4 ± 0.3a	1.3 ± 0.2a	1.3 ± 0.2a
Control	5.0 ± 0.6a	3.7 ± 0.9a	3.4 ± 0.5b	2.5 ± 0.2a	2.1 ± 0.4a
Valor-P	0.615	0.357	0.006*	0.066	0.053

Valores expresados como promedio de los errores de los individuos por tratamiento en el laberinto de Morris y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Los resultados de la latencia de la primera generación de las ratas siguieron una tendencia muy similar al número de errores que cometieron las ratas de la misma generación. El grupo control de la primera generación presentó la mayor latencia en los primeros 4 días (día 1 : 40 s, día 2: 30 s, día 3: 28 s, día 4: 18 s) comparado con el tratamiento donde se consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico (día 1 : 29 s, día 2: 19 s, día 3: 13s, día 4: 16 s) y el tratamiento de la papilla de zanahoria control (día 1 : 34 s, día 2: 24 s, día 3: 15 s, día 4: 13 s).

Sin embargo, solo hubo diferencias significativas en el día 3 entre el grupo control y el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico ($P = 0.026$). De igual manera, se observó un decremento en el número de latencia conforme pasaron los días de prueba. En el día 5 no se observaron diferencias significativas entre los tres tratamientos ($P = 0.121$) como se muestra en la Tabla 33.

Tabla 33. Latencia cometida por las ratas en la Memoria de Largo Plazo de la primera generación

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Papilla de zanahoria + AC	29 ± 4 a	19 ± 3a	13 ± 1a	16 ± 2a	16 ± 1a
Papilla de zanahoria control	34 ± 5a	24 ± 3a	15 ± 3ab	13 ± 2a	10 ± 1a
Control	40 ± 8a	30 ± 7a	28 ± 5b	18 ± 3a	15 ± 1a
Valor-P	0.579	0.387	0.026*	0.472	0.121

Valores expresados como promedio en segundos y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Por el contrario, el grupo control de ratas de la segunda generación presentó menor cantidad de errores en el primer y segundo día ($p < 0.000$ y $p < 0.001$) en comparación con el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico y el tratamiento de la papilla de zanahoria control como se observa en la Tabla 34. No obstante, no se presentaron diferencias significativas en los errores de la pruebas de memoria de largo plazo en los días 3, 4 y 5 entre el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico (día 3: 2.9, día 4: 2.0, día 5: 2.0), el grupo con la papilla de zanahoria control (día 3: 3.2, día 4: 1.3, día 5: 2.0) y el control (día 3: 2.6, día 4: 1.4, día 5: 2.0).

Tabla 34. Errores cometidos por ratas en la Memoria de Largo Plazo de la segunda generación

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Papilla de zanahoria + AC	4.9 ± 0.3b	5.3 ± 0.8b	2.9 ± 0.5a	2.0 ± 0.3a	2.0 ± 0.3a
Papilla de zanahoria control	4.8 ± 1b	3.3 ± 0.7ab	3.2 ± 1.0a	1.3 ± 0.2a	2.0 ± 0.8a
Control	1.8 ± 0.3a	1.3 ± 0.3a	2.6 ± 0.5a	1.4 ± 0.4a	2.0 ± 0.3a
Valor-P	0.000*	0.001*	0.816	0.458	1.000

Valores expresados como promedio de los errores de los individuos por tratamiento en el laberinto de Morris y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

En la prueba de memoria de largo plazo de la segunda generación no se observó la tendencia a disminuir errores conforme el paso de los días de la prueba como en la primera generación.

De igual manera, el número de latencia de los tratamientos de las ratas de la segunda generación presentó tendencias muy similares a los errores que cometieron las ratas en la prueba de memoria de largo plazo del laberinto de agua de Morris como se observa en la Tabla 35. El grupo control tuvo una menor latencia en el día 1 y día 2 ($p < 0.021$ y $p < 0.025$) en comparación con el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico y la papilla de zanahoria control. Por otro lado, en los días 3, 4 y 5 no se reportaron diferencias significativas entre el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico (día 3: 22 s, día 4: 21 s, día 5: 15 s), la papilla de zanahoria control (día 3: 29 s, día 4: 11 s, día 5: 13 s), y el tratamiento control (día 3: 22 s, día 4: 15 s, día 5: 17 s).

Tabla 35. Latencias cometidas por ratas en la Memoria de Largo Plazo de la segunda generación

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Papilla de zanahoria + AC	38 ± 4b	36 ± 7b	22 ± 2a	21 ± 4a	15 ± 1a
Papilla de zanahoria control	44 ± 14b	27 ± 7b	29 ± 11a	11 ± 1a	13 ± 4a

Control	18 ± 3a	13 ± 2a	22 ± 2a	15 ± 2a	17 ± 1a
Valor-P	0.021*	0.025*	0.612	0.175	0.593

Valores expresados como promedio en segundos y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

En una investigación similar, las ratas fueron alimentadas con jugo de ciruela (6.29 mg equivalentes de ácido gálico (GAE) / g bs de jugo) o un suplemento de ciruela en polvo (6.86 mg GAE / g bs de polvo). Cada grupo fue conformado por 15 ratas en el cual tuvieron una dieta balanceada (NHI-31). En las pruebas en el laberinto de agua de Morris, los tratamientos no presentaron diferencias de memoria a largo plazo en el primer ensayo durante los primeros 4 días de prueba (Shukitt-Hale et al., 2009). Sin embargo, los autores realizaron un segundo ensayo de memoria a largo plazo para ver si los resultados del primer ensayo cambiaban y observaron que el grupo de jugo de ciruela mejoró la latencia en esta prueba. Los autores concluyeron que estos resultados se debieron a que las ratas del tratamiento con el suplemento en polvo de ciruela consumieron una cantidad menor de polvo de ciruela, ya que solo se les administraba una vez al día, por lo que resultó en una menor ingesta de fenólicos (3.30 mg de GAE por rata por día) en comparación con las ratas que tomaron el grupo de jugo de ciruela, donde el jugo era administrado varias veces al día y consumieron en promedio unos 30.3 mg de GAE por rata por día, por lo que esta situación, podría haber resultado en las diferencias de latencia observada.

7.6.3. Efecto del ácido clorogénico sobre la memoria de trabajo en ratas

Los errores cometidos al encontrar la plataforma en la prueba de memoria de trabajo del laberinto de agua de Morris de la primera generación de ratas se observan en la Tabla 36. No se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos en los tres días de prueba de memoria de trabajo ($P > 0.050$). El grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico presentó errores muy similares entre los tres días de prueba (1.4, 1.1 y 1.3 errores), de igual manera esta situación se registró en el grupo control (1.8, 1.2 y 1.4 errores), mientras que, el grupo que consumió la papilla de zanahoria control realizó la misma cantidad de errores en los días de prueba (1.1 errores).

Tabla 36. Errores cometidos por ratas en la Memoria de Trabajo de la primera generación

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3
-------------	-------	-------	-------

Papilla de zanahoria + AC	1.4 ± 0.5a	1.1 ± 0.4a	1.3 ± 0.3a
Papilla de zanahoria control	1.1 ± 0.2a	1.1 ± 0.2a	1.1 ± 0.2a
Control	1.8 ± 0.3a	1.2 ± 0.2a	1.4 ± 0.4a
Valor -P	0.460	0.960	0.813

Valores expresados como promedio de los errores de los individuos por tratamiento en el laberinto de Morris y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

El grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico presentó latencia muy similar en los tres días de prueba (día 1: 11.2 s, día 2: 9.4 s y día 3: 10 s), de igual manera, los otros 2 tratamientos encontraron la plataforma en tiempos muy parecidos entre los tres días de prueba de la memoria de trabajo de la primera generación, ya que el grupo que consumió la papilla de zanahoria control presentó tiempos de 11.9 s, 9.9 s y 12 s, respectivamente entre día 1, día 2, día 3 y el tratamiento control una latencia de 12.9 s, 8.9 s y 12 s como se presenta en la Tabla 37.

Tabla 37. Latencias cometidas por las ratas en la Memoria de Trabajo de la primera generación

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3
Papilla de zanahoria + AC	11.2 ± 2a	9.4 ± 2a	10 ± 2a
Papilla de zanahoria control	11.9 ± 2a	9.9 ± 1a	12 ± 3a
Control	12.9 ± 1a	8.9 ± 1a	12 ± 2a
Valor- P	0.876	0.928	0.885

Valores expresados como promedio de los segundos y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

El número de errores cometidos en los tres tratamientos de la prueba de memoria de trabajo realizada en el laberinto de agua de Morris de la segunda generación de ratas se presenta en la Tabla 38. No hubo diferencias significativas entre los tres tratamientos en los tres días de prueba de la memoria de trabajo ($P > 0.050$). El grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico disminuyó su número de errores conforme pasaron los días de prueba con 1.7 errores en el día 1, 1.2 errores en el día 2 y 0.6 errores en el día 3, de igual manera siguió la misma tendencia el grupo control (día 1: 2.4 errores, día 2: 1.3 errores y día 3: 1.1 errores), sin embargo el grupo que consumió la papilla de zanahoria control no siguió la misma tendencia que los otros dos tratamientos (día 1: 1.4, día 2: 1.5, día 3: 1.2 errores).

Tabla 38. Errores cometidos por la latencia en la Memoria de Trabajo de la segunda generación

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3
Papilla de zanahoria + AC	1.7 ± 0.3a	1.2 ± 0.4a	0.6 ± 0.1a
Papilla de zanahoria control	1.4 ± 0.7a	1.5 ± 0.7a	1.2 ± 0.8a
Control	2.4 ± 0.7a	1.3 ± 0.3a	1.1 ± 0.3a
Valor-P	0.526	0.913	0.513

Valores expresados como promedio de los errores de los individuos por tratamiento en el laberinto de Morris y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

El promedio de latencia de los tres días de los tratamientos de la prueba de memoria de trabajo de la segunda generación siguió la misma tendencia que los errores cometidos por las ratas en la misma prueba. El tratamiento control y el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico disminuyeron el tiempo en encontrar la plataforma al pasar los 3 días de la prueba de memoria de trabajo con 21 s, 13 s, 10 s y 13 s, 12 s, 9 s respectivamente; siendo el tratamiento alto en ácido clorogénico el que cometió la menor cantidad de errores por día de prueba, pero sin diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0.050$). Mientras que el grupo que consumió la papilla de zanahoria control realizó tiempos de 14 s en el día 1, 18 s en el día 2 y 11 s en el día 3, en la memoria de trabajo del laberinto de agua de Morris como se observa en la Tabla 39.

Tabla 39. Latencia cometida por ratas en la Memoria de Trabajo de la segunda generación

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3
Papilla de zanahoria + AC	13 ± 2a	12 ± 2a	9 ± 2a
Papilla de zanahoria control	14 ± 5a	18 ± 6a	11 ± 3a
Control	21 ± 4a	13 ± 1a	10 ± 1a
Valor -P	0.350	0.482	0.821

Valores expresados como el promedio en seg y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Por consiguiente, se resume que no hubo diferencias estadísticamente significativas en los tres tratamientos de la prueba de memoria de trabajo de las dos generaciones de ratas. Esto se puede deber a que esta fue la tercera prueba que realizaron las ratas, y fue muy diferente a las otras dos, ya que en la Memoria de corto y largo plazo la plataforma permaneció en el mismo punto (Este), por lo que las ratas se familiarizaron con esta situación. Siendo que, en la prueba de Memoria de trabajo, la plataforma se movió 180 grados y los 3 grupos de ratas se confundieron y buscaron el mismo punto. Estos resultados son similares a otra investigación donde en la prueba de memoria de trabajo del laberinto de agua de Morris no hubo diferencias significativas entre los grupos de ratas (Amaya-Guerra et al., 2006).

La evidencia sugiere que los animales al no encontrar la plataforma se estresan, por lo que su desempeño podría ser más deficiente o diferente en el laberinto de agua de Morris (Bromley-Brits et al., 2011).

7.6.4. Efecto del ácido clorogénico sobre el desempeño de aprendizaje en ratas

El efecto del ácido clorogénico sobre el número de errores cometidos en la prueba de desempeño de aprendizaje en la primera generación de ratas se observa en la Tabla 40. En el día 1 y día 2 no hubo diferencias significativas ($P > 0.50$) entre el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico (día 1: 2.8 y día 2: 1.7), la papilla de zanahoria control (día 1: 2.1 y día 2: 2.2) y el tratamiento control (día 1: 2.8 y día 2: 1.2). Sin embargo, en el día 3, se observaron diferencias significativas ($P = 0.019$), en donde el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico mejoró el número de errores de 2 a 1, en comparación con el grupo que consumió la papilla de zanahoria control, el cual obtuvo un promedio de errores de 2.3.

Tabla 40. Errores cometidos por las ratas en el Desempeño de aprendizaje de la primera generación

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3*
Papilla de zanahoria + AC	2.8 ± 0.4a	1.7 ± 0.4a	1.0 ± 0.0a
Papilla de zanahoria control	2.1 ± 0.3a	2.2 ± 0.7a	2.3 ± 0.4b
Control	2.8 ± 0.4a	1.2 ± 0.2a	1.1 ± 0.2a
Valor-P	0.403	0.468	0.019

Valores expresados como promedio de los/ errores de los individuos por tratamiento en el laberinto de Morris y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

No se reportaron diferencias significativas ($P > 0.050$) en la latencia entre el tratamiento de ratas al que se le administró la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico (día 1: 20 s, día 2: 12 s, día 3: 9 s), el grupo que consumió la papilla de zanahoria control (día 1: 14 s, día 2: 13 s, día 3: 15 s) y el tratamiento control (día 1: 18 s, día 2: 11 s, día 3: 9 s) en los tres días de la prueba de desarrollo aprendizaje del laberinto de agua de Morris (tabla 41).

Tabla 41. Latencia cometida por las ratas en el Desempeño de aprendizaje de la primera generación

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3
Papilla de zanahoria + AC	20 ± 1a	12 ± 2a	9 ± 1a
Papilla de zanahoria control	14 ± 1a	13 ± 2a	15 ± 2a
Control	18 ± 1a	11 ± 1a	9 ± 1a
Valor-P	0.128	0.868	0.058

Valores expresados como promedio en segundos y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

En la segunda generación, los roedores que consumieron las dietas con papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico y la papilla de zanahoria control mejoraron significativamente los promedios de los errores del día 1 (3.4 y 3.7) al día 3 (1.2 y 0.7) en la prueba de desarrollo de aprendizaje del laberinto de agua de Morris, sin embargo, a pesar de la disminución de errores, no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos en ninguno de los 3 días de prueba como se presenta en la Tabla 42 ($P > 0.050$).

Tabla 42. Errores cometidos por las ratas en el Desempeño de aprendizaje de la segunda generación

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3
Papilla de zanahoria + AC	3.4 ± 0.5a	1.9 ± 0.4a	1.2 ± 0.2a
Papilla de zanahoria control	3.7 ± 0.9a	1.6 ± 0.6a	0.7 ± 0.1a
Control	2.6 ± 0.3a	1.9 ± 0.5a	2.0 ± 0.4a
Valor-P	0.361	0.922	0.053

Valores expresados como promedio de los errores de los individuos por tratamiento en el laberinto de Morris y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

El promedio de la latencia por día de la prueba de desempeño de aprendizaje de la segunda generación de ratas fue registrado en la Tabla 43. En general, se observó una tendencia de disminución de segundos de cada tratamiento conforme pasaron los días de la prueba de desempeño de aprendizaje de la segunda generación de ratas Wistar.

En el día 1 y día 2 no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el promedio de latencia entre el tratamiento de la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico (día 1: 24 s y día 2: 14), el grupo que consumió la papilla de zanahoria control (día 1: 29 s y día 2: 12) y el tratamiento control (día 1: 23 s y día 2: 14).

Tabla 43. Latencia cometida por ratas en el Desempeño de aprendizaje de la segunda generación

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3*
Papilla de zanahoria + AC	24 ± 5a	14 ± 2a	8 ± 1a
Papilla de zanahoria control	29 ± 7a	12 ± 2a	7 ± 1a
Control	23 ± 3a	14 ± 3a	17 ± 2b
Valor-P	0.730	0.912	0.020

Valores expresados como promedio en segundos y su error estándar. Letras diferentes en la columna indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Los estudios de investigación sugieren que los compuestos fenólicos podrían actuar de diferentes maneras sobre los diferentes tipos de memoria (memoria espacial a largo plazo, corto plazo, memoria de trabajo y el desarrollo del aprendizaje). Por ejemplo, las elgitanninas actúan a través del hipocampo, las proantocianidinas actúan en el surco cerebral y los flavonoles son eficaces para regular el factor neurotrófico derivado del metabolismo cerebral (Kwon et al., 2010; Rendeiro, Rhodes, & Spencer, 2015; Shukitt-Hale et al., 2007).

Por otro lado, el ácido clorogénico actúa sobre el sistema nervioso central a través de la barrera hematoencefálica en su composición química original o como un metabolito secundario. Una vez dentro, activa la serotonina en el hipocampo del cerebro, lo que a su vez disminuye la ansiedad del individuo (Bouayed et al., 2007).

Cabe mencionar que el día 3 en la prueba de desarrollo de aprendizaje, el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico en ambas generaciones cometió menos errores y latencia que el grupo de control en la primera generación o con el grupo que consumió la papilla de zanahoria control en la segunda generación. Por lo tanto, el ácido

clorogénico presente en las papillas de zanahoria con alto contenido de ácido clorogénico podría haber ayudado a las ratas a experimentar menos estrés durante los ensayos y obtener mejores resultados en las pruebas cognitivas.

Entre las cuatro pruebas realizadas en el laberinto de agua de Morris (memoria de corto plazo, memoria de largo plazo, memoria de trabajo y desempeño de aprendizaje), no hay un acuerdo sobre qué grupo tuvo un mejor desempeño. Sin embargo, las pruebas evalúan diferentes tipos de memoria en la que la memoria espacio temporal se procesa en el hipocampo, mientras que el desarrollo del aprendizaje es un estímulo que se asocia repetidamente con una respuesta procesada en los ganglios basales (Prediger et al., 2008).

7.7. Efecto del ácido clorogénico sobre la microbiota intestinal

7.7.1. Efecto del ácido clorogénico sobre la concentración de *Lactobacillus* spp. en contenido intestinal de ratas

Los efectos benéficos de la microbiota intestinal están bien documentados y estudios de investigación recientes sugieren que también puede influir en el Sistema Nervioso Central, particularmente en el cerebro. *Lactobacillus* spp. son bacterias Gram positivas que se encuentran en la microbiota y generalmente están presentes como probióticos (Borre et al., 2014).

El promedio, la mediana y el rango de concentración de *Lactobacillus* spp. en el contenido intestinal de las ratas Wistar de los tres tratamientos de la primera generación se registra en la Tabla 44. No hubo efecto significativo del ácido clorogénico sobre el contenido de *Lactobacillus* spp. de los tres tratamientos ($P = 0.728$), ya que el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico presentó concentraciones de *Lactobacillus* spp. de 7.1 log células/g en el contenido intestinal, seguido por el grupo que consumió la papilla de zanahoria control con niveles de *Lactobacillus* spp. de 7.2 log células/g y por último el tratamiento control que obtuvo un contenido de *Lactobacillus* spp. de 7.4 log células/g en contenido intestinal.

Tabla 44. Contenido de *Lactobacillus* spp. en intestino de ratas de la primera generación

Tratamiento	n	Promedio	Mediana	IRQ	P-Valor
-------------	---	----------	---------	-----	---------

Papilla de zanahoria + AC	8	7.1a	7.4	7.1 – 8.1	
Papilla de zanahoria control	8	7.2a	7.3	6.1 – 7.9	0.728
Control	7	7.4a	7.4	6.9 – 7.8	

Los valores se expresan como media, mediana, media intercuartil (IRQ) del log de células de registro por gramo de muestras fecales. Las letras diferentes indican una diferencia significativa estadísticamente. * Indica una diferencia significativa estadísticamente por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

No obstante, en la segunda generación se encontraron diferencias significativas ($p < 0.019$), ya que el grupo de ratas que consumió la papilla alta en ácido clorogénico (6.9 log células/g) y la papilla control (6.6 log células/g) tuvieron mayor concentración de *Lactobacillus* spp. comparados con el grupo control (4.5 log células/g). Estos resultados del promedio de concentración de *Lactobacillus* spp. en el contenido de las ratas se pueden observar en la Tabla 45.

Tabla 45. Contenido de *Lactobacillus* spp. en intestino de ratas de la segunda generación

Tratamiento	n	Promedio	Mediana	IRQ	P-Valor
Papilla de zanahoria + AC	6	6.9a	7.0	6.4 – 7.3	
Papilla de zanahoria control	4	6.6a	6.9	5.6 – 7.1	0.019*
Control	6	4.5b	4.3	4.2 – 6.9	

Los valores se expresan como media, mediana, media intercuartil (IRQ) del log de células de registro por gramo de muestras fecales. Las letras diferentes indican una diferencia significativa estadísticamente. * Indica una diferencia significativa estadísticamente por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Se ha determinado que *Lactobacillus* spp. previene la disfunción de la memoria al normalizar la expresión del factor neurotrófico CA1 en el hipocampo de ratas (Bravo et al., 2011b; Collins et al., 2012).

De igual manera, los polifenoles afectan la composición de la microbiota al actuar como probióticos al incrementar los microorganismos beneficiosos al tiempo que disminuyen los microorganismos patógenos los cuales podrían ser los pertenecientes al género *Clostridium* Cluster XI que generalmente se ha visto que están relacionadas con la obesidad (Cowan et al., 2014). Un ejemplo de los polifenoles que aumentan los microorganismos benéficos a la salud son los flavonoles que favorecen el crecimiento de *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterias* spp. (Cardona et al., 2013; Cueva et al., 2013; Mills et al., 2015). Sin

embargo, los mecanismos de acción que ayudan a aumentar el crecimiento de las bacterias beneficiosas siguen siendo desconocidos (Cardona et al., 2013).

A su vez, este aumento en la concentración de los *Lactobacillus* spp. en los tratamientos con papilla alta en ácido clorogénico y la papilla control coinciden con las latencias más cortas registradas en el día 3 de la prueba de desempeño del aprendizaje de la segunda generación de las ratas (tabla 45).

6.7.2. Efecto del ácido clorogénico sobre la concentración de bacterias totales en contenido intestinal de ratas

El ácido clorogénico no afectó el contenido de bacterias totales del contenido intestinal de los tres tratamientos de la primera generación de ratas ($P = 0.402$). El grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico presentó una concentración promedio de bacterias totales de 5.6 log células/g, seguido por el grupo control que obtuvo niveles de bacterias totales de 5.0 log células/g, y el grupo que consumió la papilla de zanahoria control tuvo un contenido de bacterias totales de 4.9 log células/g como se observa en la Tabla 46.

Tabla 46. Contenido de bacterias totales en intestino de ratas de la primera generación

Tratamiento	n	Promedio	Mediana	IRC	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	6	5.6a	5.2	4.7 – 8.3	0.402
Papilla de zanahoria control	8	4.9a	4.9	4.4 – 5.2	
Control	8	5.0a	5.1	4.4 – 5.2	

Los valores se expresan como media, mediana, media intercuartil (IRC) del log de células de registro por gramo de muestras fecales. Las letras diferentes indican una diferencia significativa estadísticamente. * Indica una diferencia significativa estadísticamente por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

El efecto del ácido clorogénico sobre el promedio, la mediana y el rango del contenido de bacterias totales de los tres tratamientos de la segunda generación de ratas se muestra en la Tabla 47.

Tabla 47. Contenido de bacterias totales en intestino de ratas de la segunda generación

Tratamiento	n	Promedio	Mediana	IRC	Valor -P
Papilla de zanahoria + AC	6	5.0a	4.9	4.9 – 5.3	

Papilla de zanahoria control	4	5.1a	5.0	4.8 – 5.5	0.045*
Control	8	5.9b	5.6	4.3 – 7.9	

Los valores se expresan como media, mediana, media intercuartil (IRC) del log de células de registro por gramo de muestras fecales. Las letras diferentes indican una diferencia significativa estadísticamente. * Indica una diferencia significativa estadísticamente por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Los tratamientos con la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico y la papilla de zanahoria control de la segunda generación de ratas no aumentaron el número de bacterias totales (5.0 log células/g y 5.1 log células/g) como recursos de carbono en comparación del control ($P = 0.045$) que tuvo un contenido de bacterias totales de 5.9 log células/g.

La concentración de bacterias totales en el contenido intestinal puede indicar que hay un aumento de bacterias patógenas para el organismo, por ejemplo, el género *Clostridium difficile*, ya que se ha demostrado que hay una reducción de estas bacterias patógenas en humanos que consumen bebidas con polifenoles como el vino en un periodo de 20 días (Cowan et al., 2014).

6.8. Efecto del ácido clorogénico sobre el cerebro de ratas

6.8.1. Efecto del ácido clorogénico sobre el peso de cerebro, cerebelo y contenido de mielina de ratas

La dieta de los tres tratamientos de la primera generación de ratas no influyó en el peso del cerebro y cerebelo de las ratas como se observa en la Tabla 48. Las ratas que consumieron la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico mostraron un peso de cerebro de 1183 mg y cerebelo de 301 mg/g, mientras que las ratas con el tratamiento de papilla de zanahoria control tuvieron un peso de cerebro de 1240 g y de cerebelo de 280 mg/g, y el grupo control presentó un peso de cerebro de 1296 g y cerebelo de 312 mg/g.

Tabla 48. Peso del cerebro, cerebelo y el contenido de mielina en la primera generación de ratas

Tratamiento	Peso del Cerebro ¹	Peso del cerebelo ²	Mielina ³
Papilla de zanahoria + AC	1183.15 ± 91a	301.26 ± 31a	182.48 ± 85a
Papilla de zanahoria control	1240.10 ± 139a	280.11 ± 46a	165.75 ± 14b

Control	1296 ± 90a	312.40 ± 48a	178.01 ± 11ab
---------	------------	--------------	---------------

Valores expresados como promedio de las determinaciones por triplicado y su desviación estándar. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por la prueba de Tukey (P < 0.05). Los resultados son expresados en ¹:mg, ²:mg/g and ³: %.

Se ha observado que las ratas que consumen una dieta con menor cantidad de proteínas, está relacionada directamente con el desarrollo del peso del cerebro y cerebro en ratas, por lo que esto podría estar sucediendo en la primera generación de ratas, al estar consumiendo solo un 90% de sus proteínas requeridas; ya que este parámetro pudo influenciar en su crecimiento del peso del cerebro y cerebelo al no consumir la calidad proteica necesaria o al inadecuado equilibrio de los aminoácidos esenciales (Amaya-Guerra et al., 2006).

Por otro lado, se determinó que hubo un efecto del ácido clorogénico sobre el contenido de mielina en la primera generación de ratas, ya que los roedores que consumieron la papilla de zanahoria con alto cantidad de ácido clorogénico presentaron un porcentaje de mielina de 182% el cual fue significativamente mayor en comparación con el tratamiento de la papilla de zanahoria control y el control, quienes presentaron niveles de mielina de 165% y 178% respectivamente.

Los resultados del efecto de los tratamientos sobre el peso de cerebro, cerebelo y porcentaje de mielina de la segunda generación de ratas Wistar se muestra en la Tabla 49. El grupo de ratas control presentó el mayor peso de cerebro con 1161 g, mientras que el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico obtuvo un peso de cerebro de 1054 g, que es similar al peso de cerebro del grupo control y al grupo de la papilla de zanahoria control (972 g).

Tabla 49. Peso del cerebro, cerebelo y contenido de mielina en la segunda generación de ratas

Tratamiento	Peso del Cerebro ¹	Peso del cerebelo ²	Mielina ³
Papilla de zanahoria + AC	1054.00 ± 93ab	306.35 ± 13ab	204.17 ± 6a
Papilla de zanahoria control	972.50 ± 12b	295.05 ± 8b	166.75 ± 8b
Control	1161.80 ± 126a	321.71 ± 19a	206.75 ± 4a

Valores expresados como promedio de las determinaciones por triplicado y su desviación estándar. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por la prueba de Tukey (P<0.05). Los resultados son expresados en ¹:mg, ²:mg/g and ³: %.

De igual manera, se observaron las mismas tendencias en el peso del cerebelo en la segunda generación de ratas, donde el grupo control presentó el mayor peso de cerebelo con 321 g, seguido del grupo de ratas que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico con un peso de cerebelo de 306 g, este resultado fue similar al peso del cerebelo control y al peso del cerebelo del grupo de ratas que consumió la papilla de zanahoria control que tuvo un peso de cerebelo de 295 g y que fue diferente estadísticamente al grupo control.

Por consiguiente, el grupo que consumió la papilla de zanahoria registró los pesos más bajos del cerebro y del cerebelo en la segunda generación por lo que podrían estar directamente relacionados con el desarrollo motor y la memoria a largo plazo en los animales (Warren & Bedi, 1984).

El tratamiento con la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico y el tratamiento control tuvieron mayor porcentaje de mielina en el cerebro de las ratas de la segunda generación, ya que presentaron niveles de 204 mg/g y 206 mg/g respectivamente, comparados con la papilla de zanahoria control que tuvo un contenido de mielina muy por debajo de los otros tratamientos con 166 mg/g. Por lo que, debido a esta situación, se puede deducir que el ácido clorogénico podría estar modulando los nucleótidos al activar la ectonucleósido trifosfatasa y la ecto-50-nucleotidasa y con esto aumentando el contenido de mielina en los cerebros de las ratas (Leal et al., 2016). La mielina está involucrada directamente con las señales del sistema nervioso central, por lo que las ratas que consumieron la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico podrían estar procesando las señales neurológicas más rápido y esto a su vez se puede reflejar en los resultados cognitivos (Amaya-Guerra et al., 2006; Elaine & Katja, 2012).

6.8.2. Efecto del ácido clorogénico sobre el contenido de proteína, ARN y ADN en el cerebro de ratas

El contenido de proteína en los cerebros de las ratas de la primera generación fue muy similar entre los tres tratamientos, ya que las ratas que consumieron la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico y las ratas que consumieron la papilla de zanahoria control presentaron un contenido de proteína en cerebro de 105 mg/g, mientras que las ratas del grupo control tuvieron un contenido de proteína en cerebro de 110 mg/g.

De igual manera, en la primera generación de ratas, el contenido de RNA entre tratamientos fue similar y no significativo como se muestra en la Tabla 50. El grupo control tuvo una concentración de ARN en cerebro de 4.47 mg/g, seguido del tratamiento en el cual se recibió una papilla de zanahoria con alto ácido clorogénico el cual tuvo un contenido de ARN en cerebro de 4.41 mg/g y por último el grupo que recibió una papilla de zanahoria control, con un ARN en cerebro de 4.22 mg/g.

Tabla 50. Contenido de proteína, ARN y ADN en el cerebro de ratas de la primera generación

Tratamiento	Proteína/peso de cerebro	ARN/peso de cerebro	ADN/ peso de cerebro	Proteína/ADN	Proteína/ARN
Papilla de zanahoria + AC	105.85 ± 3a	4.41 ± 0.2a	6.71 ± 0.2ab	15.78 ± 0.8a	0.66 ± 0.03a
Papilla de zanahoria control	105.26 ± 4a	4.22 ± 0.3a	6.49 ± 0.2b	16.22 ± 0.7a	0.65 ± 0.03a
Control	110.22 ± 1a	4.47 ± 0.3a	6.92 ± 0.3a	15.92 ± 0.4a	0.64 ± 0.04a

Valores expresados como promedio de las determinaciones por triplicado y su desviación estándar. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Los resultados son expresados en 1:mg/g.

Sin embargo, a diferencia de estos resultados, el parámetro de ADN fue diferente, ya que el grupo control presentó un mayor contenido de ADN en cerebro con 6.92 mg/g en comparación con el grupo que recibió la papilla de zanahoria control (6.49 mg/g).

Por lo cual, los cerebros del grupo control podrían tener un número mayor de neuronas cerebrales que el grupo que consumió la papilla de zanahoria control ($P < 0.011$), ya que el número de neuronas estar relacionadas directamente con el contenido de ADN cerebral (Amaya-Guerra et al., 2006). El tratamiento con papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico tuvo contenido similar (6.71 mg/g) a los otros dos tratamientos.

El efecto del ácido clorogénico sobre el contenido de proteína, ARN y DNA en cerebro de ratas de la segunda generación se muestra en la Tabla 51. El contenido de proteína en cerebro fue similar estadísticamente entre tratamientos, ya que el grupo control presentó una concentración de proteína cerebral de 106 mg/g, seguido del grupo de ratas que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico con un nivel de proteína cerebral de 105 mg/g y el grupo que consumió la papilla de zanahoria control obtuvo un porcentaje de 102 mg/g

de proteína cerebral. De igual manera, se observaron tendencias similares en la concentración de ADN entre tratamientos, ya que no presentaron diferencias significativas entre grupos. El grupo control tuvo un nivel de ADN en cerebro de 6.88 mg/g, seguido por el tratamiento con la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico que presentó un contenido de ADN en cerebro 6.77 mg/g y, por último, el grupo con la papilla de zanahoria control, que obtuvo una concentración de ADN en cerebro de 6.40 mg/g.

Tabla 51. Contenido de proteína, ARN y ADN en el cerebro de ratas de la segunda generación

Tratamiento	Proteína/peso de cerebro ¹	ARN/peso de cerebro ¹	ADN/ peso de cerebro ¹	Proteína/ADN	Proteína/ARN
Papilla de zanahoria + AC	105.26 ± 4a	4.85 ± 0.2a	6.77 ± 0.4a	15.56 ± 0.6a	0.71 ± 0.03a
Papilla de zanahoria control	102.87 ± 3a	4.00 ± 0.08c	6.40 ± 0.1a	16.08 ± 0.7a	0.62 ± 0.02b
Control	106.67 ± 2a	4.53 ± 0.22b	6.88 ± 0.3a	15.54 ± 1.1a	0.66 ± 0.02b

Valores expresados como promedio de las determinaciones por triplicado y su desviación estándar. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por la prueba de Tukey (P < 0.05). Los resultados son expresados en 1:mg/g.

Sin embargo, en esta misma generación, se observaron concentraciones diferentes de ARN cerebral entre los tres tratamientos (P < 0.000). El grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico tuvo un contenido de ARN en cerebro mayor (4.85 mg/g) al grupo que consumo la papilla de zanahoria control (4.00 mg/g) e incluso al tratamiento control (4.53 mg/g).

Esta medida (ARN) es utilizada para determinar el parámetro de ARN / ADN, que es un indicador de la actividad metabólica de las células cerebrales, por lo que el grupo que consumió la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico presentó una mayor actividad metabólica que los grupos control y el grupo de la papilla de zanahoria control. (p <0,000).

Algunos investigadores han relacionado un bajo contenido de ADN y ARN en el cerebro con la pérdida de memoria y enfermedades crónicas como el Alzheimer. Un aumento de los radicales libres puede inducir la peroxidación lipídica, que a su vez afecta a los ácidos grasos poliinsaturados presentes en el cerebro (Chu et al., 2009; Gul et al., 2016; Markesbery & Lovell, 2007).

El ácido clorogénico es un potente antioxidante que puede inhibir la peroxidación lipídica, ya que secuestra los radicales libres, lo que proporciona un efecto protector contra el estrés oxidativo en el cerebro (Gul et al., 2016; Kwon et al., 2010; Leal et al., 2016; Oboh et al., 2013) . Además, los derivados del metabolito secundario del ácido clorogénico como los ácidos ferúlicos, cumárico y cafeico también pueden atravesar la barrera hematoencefálica y difundirse a diferentes regiones del cerebro. De igual manera, se ha reportado que la difusión exitosa también se ve afectada y depende de otros factores como el estado de carga, si son lipofílicos y las proteínas de transporte (Amaya-Guerra et al., 2006; Ferlemi et al., 2015; Shukitt-Hale et al., 2009).

Los parámetros de los resultados del efecto del ácido clorogénico sobre el desarrollo cerebral y el laberinto de agua de Morris no coinciden entre los tres tratamientos. Sin embargo, el laberinto de agua de Morris es complejo, ya que muchas veces el éxito o el fracaso de los animales en la búsqueda de la plataforma está influenciado por varios factores como la atención, la motivación y la función sensoriomotora (Prediger et al., 2008).

Por otro lado, debe señalarse que la mielina, el peso del cerebro, el peso del cerebelo, el contenido de ADN y ARN están estrictamente relacionados con una nutrición adecuada de proteínas (Amaya-Guerra et al., 2006; Cruz-Rizzolo et al., 2017; Griffin, Woodward, & Chanda, 2018) como se mencionó anteriormente en la sección del peso de cerebro y cerebelo por lo que se debe considerar que los grupos que consumieron la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico y la papilla de zanahoria control consumieron aproximadamente 90% de sus proteínas diarias y el 10% lo cubrió el puré de zanahoria que contiene una pequeña cantidad de proteína en comparación con la caseína. Por lo tanto, si el puré de zanahoria se usará como un suplemento para las dietas que cubren el 100% de los requerimientos de proteínas, el ácido clorogénico podría mejorar el desarrollo del cerebro, lo que puede resultar en mejores resultados en las pruebas cognitivas del laberinto de agua de Morris.

8. CONCLUSIONES

- ❖ El estrés por corte aumentó el contenido de ácidos hidroxicinámicos en las papillas de zanahoria principalmente el ácido clorogénico.
- ❖ La exposición de las zanahorias cortadas al oxígeno y a la luz disminuyeron la concentración de carotenos en las papillas
- ❖ La concentración de papilla no fue suficiente para dar resultados significativos en el laberinto de agua de Morris
- ❖ No hubo efecto de la papilla alta en ácido clorogénico en las funciones fisiológicas de las ratas a excepción de la primera generación en donde el tratamiento con la papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico presentó mayor inhibición de xantina oxidasa
- ❖ Las papillas de zanahorias aumentaron la concentración de *Lactobacillus* spp. y disminuyeron el contenido de bacterias totales
- ❖ La papilla de zanahoria alta en ácido clorogénico tiene un efecto positivo sobre el desarrollo del cerebro en cuanto al contenido de mielina y una mejor actividad cerebral en comparación con el tratamiento que consumió la papilla de zanahoria control
- ❖ Aunque no se obtuvieron diferencias significativas en las pruebas de laberinto y análisis sanguíneos en las ratas de las dos generaciones, debido probablemente a la baja concentración de la papilla en la dieta; las diferencias significativas en las pruebas con los cerebros (mielina y ARN) sugieren el principio del beneficio cognitivo
- ❖ El estrés por corte es un excelente método para inducir el ácido clorogénico en alimentos de manera natural, el cual puede tener un efecto benéfico para la salud.

- ❖ Se deben realizar más estudios, incrementado el tiempo y concentración de la papilla, para determinar si hay un efecto sobre el desarrollo cognitivo, ya que este alimento podría servir para prevenir algunas enfermedades crónico-degenerativas.

9. PERSPECTIVAS

Se recomienda hacer estudios subsecuentes a esta investigación, en la cual se utilice la papilla alta en ácido clorogénico inducida por estrés por corte como suplemento a una dieta equilibrada entre tratamientos, es decir, utilizando la misma cantidad de calorías y de proteínas entre los grupos.

Por otro lado, se recomienda hacer este mismo estudio en un solo género de ratas, ya que se han visto diferencias significativas entre hembras y machos en el laberinto de agua de Morris, por lo que podrían dar resultados diferentes.

Los resultados presentados en el metabolismo de ratas en nuestra investigación y los estudios publicados de otros autores, sugieren una nueva investigación en la cual se recomienda ofrecer una dieta hipercalórica para inducir a los animales a alguna enfermedad crónico-degenerativa los tratamientos con la introducción de las papillas altas en el ácido clorogénico inducido a través del estrés por corte, para poder observar el efecto benéfico de esta papilla sobre el peso ganado, el alimento ingerido, la glucosa en plasma, colesterol en plasma, triglicéridos en plasma y antioxidantes en plasma.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguado-Aguilar, L. (2001). Aprendizaje y memoria. *Revista de Neurologia*, 32(4), 373–381.
- Ahmad, M., Saleemullah, M., Shah, H., A. Khalil, I., & Saljoq, A. U. R. (2007). *Determination of beta carotene content in fresh vegetables using high performance liquid chromatography. Sarhad Journal of Agriculture* (Vol. 23).
- Akhtar, S., Rauf, A., Imran, M., Saleem, Q., Riaz, M., & Mubarak, M. (2017). *Black carrot (Daucus carota L.), dietary and health promoting perspectives of its polyphenols: A review. Trends in Food Science & Technology* (Vol. 66). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.004>
- Amaya-Guerra, C.-A. (2003). *Efectos de la fortificación y enriquecimiento de tortillas regulares y de maíz de alta calidad proteica en el desarrollo fisiológico, cerebral y desempeño de aprendizaje de ratas de laboratorio*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Amaya-Guerra, C., Serna Saldívar, S., & Alanis-Guzman, M. G. (2006). Soyabean fortification and enrichment of regular and quality protein maize tortillas affects brain development and maze performance of rats. *British Journal of Nutrition*, 96(01), 161. <https://doi.org/10.1079/BJN20061804>
- Arcott, S. A., & Tanumihardjo, S. A. (2010). Carrots of Many Colors Provide Basic Nutrition and Bioavailable Phytochemicals Acting as a Functional Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(2), 223–239. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00103.x>
- B. Rodriguez-Amaya, D. (2010). *Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability*

and antioxidant activity of food carotenoids—A review. *Journal of Food Composition and Analysis - J FOOD COMPOS ANAL* (Vol. 23).
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.008>

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>

Barriga Vallejo, C., Aguilera, C., Cruz, J., Banda-Leal, J., Lazcano, D., & Mendoza, R. (2017). *Ecotoxicological Biomarkers in Multiple Tissues of the Neotenic Ambystoma spp. for a Non-lethal Monitoring of Contaminant Exposure in Wildlife and Captive Populations. Water, Air, & Soil Pollution* (Vol. 228). <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3590-3>

Becerra-Moreno, A., Redondo-Gil, M., Benavides, J., Nair, V., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. a. (2015). Combined effect of water loss and wounding stress on gene activation of metabolic pathways associated with phenolic biosynthesis in carrot. *Frontiers in Plant Science*, 6(October), 837. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00837>

Borre, Y. E., O’Keeffe, G. W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 20(9), 509–518. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.05.002>

Bouayed, J., Rammal, H., Dicko, A., Younos, C., & Soulimani, R. (2007). Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *Journal of the Neurological Sciences*, 262(1), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.06.028>

Boudet, A.-M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68(22–24), 2722–2735. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.012>

Bozalan, N. K., & Karadeniz, F. (2011). Carotenoid profile, total phenolic content, and antioxidant activity of carrots. *Int. J. Food Prop.*, 14(5), 1060–1068. <https://doi.org/10.1080/10942910903580918>

- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., ... Cryan, J. F. (2011a). Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., ... Cryan, J. F. (2011b). Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201102999. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1102999108>
- Bromley-Brits, K., Deng, Y., & Song, W. (2011). Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (53). <https://doi.org/10.3791/2920>
- Caracciolo, B., Xu, W., Collins, S., & Fratiglioni, L. (2014). Cognitive decline, dietary factors and gut-brain interactions. *Mechanisms of Ageing and Development*, 136–137, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.11.011>
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), 1415–1422. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>
- Carrillo-Mora, P. (2010). Sistemas de memoria: reseña histórica, clasificación y conceptos actuales. Primera parte: Historia, taxonomía de la memoria, sistemas de memoria de largo plazo: la memoria semántica . *Salud Mental* . scielomx .
- Chávez Muñoz, M. (2010). *Composición de Alimentos* (Segunda ed). México: Mc Graw Hill.
- Cho, A.-S., Jeon, S.-M., Kim, M.-J., Yeo, J., Seo, K.-I., Choi, M.-S., & Lee, M.-K. (2010). Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(3), 937–943. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.003>
- Chu, Y.-F., Brown, P. H., Lyle, B. J., Chen, Y., Black, R. M., Williams, C. E., ... Cheng, I.

- H. (2009). Roasted coffees high in lipophilic antioxidants and chlorogenic acid lactones are more neuroprotective than green coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(20), 9801–9808. <https://doi.org/10.1021/jf902095z>
- Collins, S. M., Surette, M., & Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*, *10*, 735. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2876>
- Cowan, T. E., Palmnäs, M. S. A., Yang, J., Bomhof, M. R., Ardell, K. L., Reimer, R. A., ... Shearer, J. (2014). Chronic coffee consumption in the diet-induced obese rat: impact on gut microbiota and serum metabolomics. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *25*(4), 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.12.009>
- Cruz-Rizzolo, R. J., Limieri, L. L., de Paiva, I. R., Ribeiro, J. O. B., Pimenta, T. F., Pinato, L., ... Liberti, E. A. (2017). Protein malnutrition during gestation and early life decreases neuronal size in the medial prefrontal cortex of post-pubertal rats. *IBRO Reports*, *3*, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2017.08.002>
- Cueva, C., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Walton, G. E., Gibson, G. R., Martín-Álvarez, P. J., ... Moreno-Arribas, M. V. (2013). In vitro fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: changes in microbial groups and phenolic metabolites. *FEMS Microbiology Ecology*, *83*(3), 792–805. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12037>
- Datt, S. K., Swati, K., Singh, T. N., & Surekha, A. (2012). Chemical composition, functional properties and processing of carrot—a review. *Journal of Food Science and Technology*, *49*(1), 22–32.
- Desbonnet, L., Clarke, G., Traplin, A., O’Sullivan, O., Crispie, F., Moloney, R. D., ... Cryan, J. F. (2015). Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain, Behavior, and Immunity*, *48*, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.004>
- Dias, J. (2014). *Nutritional and Health Benefits of Carrots and Their Seed Extracts*. *Food and Nutrition Sciences* (Vol. 05). <https://doi.org/10.4236/fns.2014.522227>

- Dische, E. (1983). *In Physiological studies on the herbicide "Cotorane" S.S. Roushdy*. University of Cairo Egypt.
- Du, W.-X., Avena-Bustillos, R. J., Breksa, A. P., & McHugh, T. H. (2012). Effect of UV-B light and different cutting styles on antioxidant enhancement of commercial fresh-cut carrot products. *Food Chemistry*, *134*(4), 1862–1869. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.097>
- Dueñas, M., Muñoz-González, I., Cueva, C., Jiménez-Girón, A., Sánchez-Patán, F., Santos-Buelga, C., ... Bartolomé, B. (2015). *A Survey of Modulation of Gut Microbiota by Dietary Polyphenols. BioMed Research International* (Vol. 2015). <https://doi.org/10.1155/2015/850902>
- Dupas, C., Marsset Baglieri, A., Ordonaud, C., Tome, D., & Maillard, M.-N. (2006). Chlorogenic acid is poorly absorbed, independently of the food matrix: A Caco-2 cells and rat chronic absorption study. *Molecular Nutrition & Food Research*, *50*(11), 1053–1060. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600034>
- Elaine, M., & Katja, H. (2012). *Human Anatomy & Physiology*. (Pearson, Ed.) (8th Editio). San Francisco, California: Benjamin Cummings.
- Engle, R. W., Tuholski, S. W., Laughlin, J. E., & Conway, A. R. A. (1999). Working memory, short-term memory, and general fluid intelligence: a latent-variable approach. *Journal of Experimental Psychology. General*, *128*(3), 309–331. <https://doi.org/10.1037/0096-3445.128.3.309>
- Esmail, A.-S. A. (2017). Nutritional and therapeutic importance of *Daucus carota*-A review. *Journal of Pharmacy*, *7*(2), 72–82.
- Espin. (2003). *Raíces y Tubérculos Andinos : Alternativas*.
- Essa, M. M., Subash, S., Akbar, M., Al-Adawi, S., & Guillemin, G. J. (2015). Long-Term Dietary Supplementation of Pomegranates, Figs and Dates Alleviate Neuroinflammation in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLOS ONE*, *10*(3), e0120964. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120964>
- Etchepareborda, M. C., & Abad, L. (2005). *Memoria de trabajo en los procesos básicos del*

aprendizaje. Revista De Neurología (Vol. 40).

- Ferlemi, A.-V., Mermigki, P. G., Makri, O. E., Anagnostopoulos, D., Koulakiotis, N. S., Margarity, M., ... Lamari, F. N. (2015). Cerebral Area Differential Redox Response of Neonatal Rats to Selenite-Induced Oxidative Stress and to Concurrent Administration of Highbush Blueberry Leaf Polyphenols. *Neurochemical Research*, *40*(11), 2280–2292. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1718-7>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, *226*(1), 497–509.
- Gonthier, M.-P., Verny, M.-A., Besson, C., Remesy, C., & Scalbert, A. (2003). Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *The Journal of Nutrition*, *133*(6), 1853–1859. <https://doi.org/10.1093/jn/133.6.1853>
- Grassmann, J., Schnitzler, W. H., & Habegger, R. (2007). Evaluation of different coloured carrot cultivars on antioxidative capacity based on their carotenoid and phenolic contents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *58*(8), 603–611. <https://doi.org/10.1080/09637480701359149>
- Grauwet, T., Kebede, B. T., Delgado, R. M., Lemmens, L., Manzoni, F., Vervoort, L., ... Van Loey, A. (2014). Evaluating the potential of high pressure high temperature and thermal processing on volatile compounds, nutritional and structural properties of orange and yellow carrots. *European Food Research and Technology*, *240*(1), 183–198. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2319-4>
- Griffin, W. S. T., Woodward, D. J., & Chanda, R. (2018). Malnutrition and brain development: cerebellar weight, DNA, RNA, protein and histological correlations. *Journal of Neurochemistry*, *28*(6), 1269–1279. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1977.tb12320.x>
- Gul, Z., Demircan, C., Bagdas, D., & Buyukuysal, R. L. (2016). Protective Effects of Chlorogenic Acid and its Metabolites on Hydrogen Peroxide-Induced Alterations in Rat Brain Slices: A Comparative Study with Resveratrol. *Neurochemical Research*, *41*(8), 2075–2085. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1919-8>

- Haq, R., Kumar, P., & Prasad, K. (2016). Physico-chemical, antioxidant and bioactive changes in cortex core sections of carrot (*Daucus carota* var. Pusa rudhira). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(3), 701–708. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9354-8>
- Henríquez, C., Almonacid, S., Chiffelle, I., Valenzuela, T., Araya, M., Cabezas, L., ... Speisky, H. (2010). Determination of Antioxidant Capacity, Total Phenolic Content and Mineral Composition of Different Fruit Tissue of Five Apple Cultivars Grown in Chile. *Chilean J. Agric. Res.*, 70(4), 523–536. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392010000400001>
- Heywood, V. H. (1983). *Relationships and evolution in the Daucus carota complex*. *Israel J Bot* (Vol. 32). <https://doi.org/10.1080/0021213X.1983.10676964>
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437–4444. <https://doi.org/10.1021/jf0201529>
- Huang, K., Liang, X., Zhong, Y., He, W., & Wang, Z. (2014). 5-Caffeoylquinic acid decreases diet-induced obesity in rats by modulating PPAR α and LXR α transcription. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(9), 1903–1910. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6896>
- Hunyadi, A., Martins, A., Hsieh, T.-J., Seres, A., & Zupko, I. (2012). Chlorogenic Acid and Rutin Play a Major Role in the In Vivo Anti-Diabetic Activity of *Morus alba* Leaf Extract on Type II Diabetic Rats. *PloS one* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050619>
- J V Vicente, S., Ishimoto, E., & Torres, E. (2013). Coffee Modulates Transcription Factor Nrf2 and Highly Increases the Activity of Antioxidant Enzymes in Rats. *Journal of agricultural and food chemistry* (Vol. 62). <https://doi.org/10.1021/jf401777m>
- Jacobo-Velazquez, D. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2009). Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: a new approach in data analysis for food and

- medicinal plants. *Journal of Food Science*, 74(9), R107-13.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01352.x>
- Jacobo-Velázquez, D. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2012). An Alternative Use of Horticultural Crops: Stressed Plants as Biofactories of Bioactive Phenolic Compounds. *Agriculture*. <https://doi.org/10.3390/agriculture2030259>
- Jin, S., Chang, C., Zhang, L., Liu, Y., Huang, X., & Chen, Z. (2015). Chlorogenic Acid Improves Late Diabetes through Adiponectin Receptor Signaling Pathways in db/db Mice. *PLOS ONE*, 10(4), e0120842. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120842>
- Kathleen R. Pritchett-Corning, Aurélie Girod, Gloria Avellaneda, Patricia E. Fritz, S. C. y M. J. B. (2011). Manual de signos clínicos en roedores y conejos. In *Charles River Laboratories* (p. 12).
- Khandare, V., Walia, S., Singh, M., & Kaur, C. (2011). Black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice: Processing effects on antioxidant composition and color. *Food and Bioprocess Processing*, 89(4), 482–486. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.07.007>
- King, A., & Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(2), 213–218. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(99\)00051-6](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(99)00051-6)
- Knockaert, G., Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Hendrickx, M., & van Loey, A. (2012). Changes in β -carotene bioaccessibility and concentration during processing of carrot puree. *Food Chemistry* (Vol. 133). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.066>
- Kwon, S.-H., Lee, H.-K., Kim, J.-A., Hong, S.-I., Kim, H.-C., Jo, T.-H., ... Jang, C.-G. (2010). Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *European Journal of Pharmacology*, 649(1), 210–217. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.001>
- Lafay, S., Morand, C., Manach, C., Besson, C., & Scalbert, A. (2006). Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *The British*

Journal of Nutrition, 96(1), 39–46.

- Laura, B. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317–333.
- Leal, C. A. M., Leal, D. B. R., Adefegha, S. A., Morsch, V. M., Beckmann, D. V., Castilhos, L. G., ... Schetinger, M. R. C. (2016). Effects of chlorogenic acid on adenine nucleotides hydrolyzing enzyme activities and expression in platelets of rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 81, 363–370. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.04.003>
- Lin, Y.-L., Cheng, C.-Y., Lin, Y.-P., Lau, Y.-W., Juan, I.-M., & Lin, J. (1998). *Hypolipidemic Effect of Green Tea Leaves through Induction of Antioxidant and Phase II Enzymes Including Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione S-Transferase in Rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry - J AGR FOOD CHEM* (Vol. 46). <https://doi.org/10.1021/jf970963q>
- Luisa Soto, M., Moure, A., Domínguez, H., & Carlos Parajó, J. (2011). *Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. Journal of Food Engineering - J FOOD ENG* (Vol. 105). <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.010>
- Markesbery, W. R., & Lovell, M. A. (2007). Damage to lipids, proteins, DNA, and RNA in mild cognitive impairment. *Archives of Neurology*, 64(7), 954–956. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.7.954>
- Martín-Diana, A. B., Rico, D., Barry-Ryan, C., Frías, J. M., Mulcahy, J., & Henchan, G. T. M. (2005). Comparison of calcium lactate with chlorine as a washing treatment for fresh-cut lettuce and carrots: quality and nutritional parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(13), 2260–2268. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2254>
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, 17(6), 271–278. https://doi.org/10.3305/nutr_hosp.v17in06.3338
- Maurya, P. K., & Rizvi, S. I. (2010). Age-dependent changes in glutathione-s-transferase:

- correlation with total plasma antioxidant potential and red cell intracellular glutathione. *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB*, 25(4), 398–400. <https://doi.org/10.1007/s12291-010-0047-5>
- Mills, C. E., Tzounis, X., Oruna-Concha, M.-J., Mottram, D. S., Gibson, G. R., & Spencer, J. P. E. (2015). In vitro colonic metabolism of coffee and chlorogenic acid results in selective changes in human faecal microbiota growth. *British Journal of Nutrition*, 113(08), 1220–1227. <https://doi.org/10.1017/S0007114514003948>
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11(1), 47–60.
- Morse, M., & Carter, E. (1949). The synthesis of nucleic acid in cultures of *Escherichia coli*, strain B and B/R. *Journal of Bacteriology*, 58, 317.
- Mubarak, A., Bondonno, C. P., Liu, A. H., Considine, M. J., Rich, L., Mas, E., ... Hodgson, J. M. (2012). Acute Effects of Chlorogenic Acid on Nitric Oxide Status, Endothelial Function, and Blood Pressure in Healthy Volunteers: A Randomized Trial. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9130–9136. <https://doi.org/10.1021/jf303440j>
- Muthaiyah, B., Essa, M. M., Lee, M., Chauhan, V., Kaur, K., & Chauhan, A. (2014). Dietary supplementation of walnuts improves memory deficits and learning skills in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 42(4), 1397–1405. <https://doi.org/10.3233/JAD-140675>
- Nicolle, C., Simon, G., Rock, E., Amouroux, P., & Rémésy, C. (2004). *Genetic Variability Influences Carotenoid, Vitamin, Phenolic, and Mineral Content in White, Yellow, Purple, Orange, and Dark-orange Carrot Cultivars*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. American Society for Horticultural Science (Vol. 129). <https://doi.org/10.21273/JASHS.129.4.0523>
- Oboh, G., Agunloye, O. M., Akinyemi, A. J., Ademiluyi, A. O., & Adefegha, S. A. (2013). Comparative study on the inhibitory effect of caffeic and chlorogenic acids on key enzymes linked to Alzheimer's disease and some pro-oxidant induced oxidative stress in rats' brain-in vitro. *Neurochemical Research*, 38(2), 413–419.

<https://doi.org/10.1007/s11064-012-0935-6>

- Ong, K. W., Hsu, A., & Tan, B. K. H. (2013). Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochemical Pharmacology*, *85*(9), 1341–1351. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.008>
- Patras, A., Brunton, N. P., & Butler, F. (2010). Effect of water immersion and sous-vide processing on antioxidant activity, phenolic, carotenoid content and color of carrot disks. *Journal of Food Processing and Preservation*, *34*(6), 1009–1023. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2009.00434.x>
- Prediger, R. D. S., Fernandes, M. S., Rial, D., Wopereis, S., Pereira, V. S., Bosse, T. S., ... Costa-Campos, L. (2008). Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *Journal of Ethnopharmacology*, *120*(3), 465–473. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.09.018>
- Rendeiro, C., Rhodes, J. S., & Spencer, J. P. E. (2015). The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. *Neurochemistry International*, *89*, 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.08.002>
- Rendeiro, C., Vauzour, D., Rattray, M., Waffo-Téguo, P., Mérillon, J. M., Butler, L. T., ... Spencer, J. P. E. (2013). Dietary Levels of Pure Flavonoids Improve Spatial Memory Performance and Increase Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor. *PLOS ONE*, *8*(5), e63535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063535>
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., & Costa, H. S. (2006). Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(2), 97–111. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.04.004>
- Ruiz-Cruz, S., Islas-Osuna, M. A., Sotelo-Mundo, R. R., Vázquez-Ortiz, F., & González-Aguilar, G. A. (2007). Sanitation Procedure Affects Biochemical and Nutritional Changes of Shredded Carrots. *Journal of Food Science*, *72*(2), S146–S152. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00279.x>
- Sadiq Butt, M., Tahir-Nadeem, M., Khan, M. K. I., Shabir, R., & Butt, M. S. (2008). Oat:

- unique among the cereals. *European Journal of Nutrition*, 47(2), 68–79.
<https://doi.org/10.1007/s00394-008-0698-7>
- Sánchez-Rangel, J. C., Jacobo-Velázquez, D. A., Cisneros-Zevallos, L., & Benavides, J. (2016). Primary recovery of bioactive compounds from stressed carrot tissue using aqueous two-phase systems strategies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(1), 144–154. <https://doi.org/10.1002/jctb.4553>
- Santacruz, A., Marcos, A., Wärnberg, J., Martí, A., Martín-Matillas, M., Campoy, C., ... Sanz, Y. (2012). Interplay Between Weight Loss and Gut Microbiota Composition in Overweight Adolescents. *Obesity*, 17(10), 1906–1915.
<https://doi.org/10.1038/oby.2009.112>
- Santana-Gálvez, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, A. D. (2017). Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules* . <https://doi.org/10.3390/molecules22030358>
- Santana-Gálvez, J., Pérez-Carrillo, E., Velázquez-Reyes, H. H., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2016). Application of wounding stress to produce a nutraceutical-rich carrot powder ingredient and its incorporation to nixtamalized corn flour tortillas. *Journal of Functional Foods*, 27, 655–666.
<https://doi.org/10.1016/J.JFF.2016.10.020>
- Sanz, Y., & Santacruz, A. (2008). *Evidence on the role of gut microbes in obesity Revisión. Revista Espanola de Obesidad* (Vol. 6).
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., ... Iseki, K. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1–2), 136–138.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.035>
- Shukitt-Hale, B., Bielinski, D. F., Lau, F. C., Willis, L. M., Carey, A. N., & Joseph, J. A. (2015). The beneficial effects of berries on cognition, motor behaviour and neuronal function in ageing. *British Journal of Nutrition*, 114(10), 1542–1549.
<https://doi.org/10.1017/S0007114515003451>

- Shukitt-Hale, B., Carey, A. N., Jenkins, D., Rabin, B. M., & Joseph, J. A. (2007). Beneficial effects of fruit extracts on neuronal function and behavior in a rodent model of accelerated aging. *Neurobiology of Aging*, 28(8), 1187–1194. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.031>
- Shukitt-Hale, B., Carey, A., Simon, L., Mark, D. A., & Joseph, J. A. (2006). Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. *Nutrition*, 22(3), 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2005.07.016>
- Shukitt-Hale, B., Galli, R. L., Meterko, V., Carey, A., Bielinski, D. F., McGhie, T., & Joseph, J. A. (2005). Dietary supplementation with fruit polyphenolics ameliorates age-related deficits in behavior and neuronal markers of inflammation and oxidative stress. *Age*, 27(1), 49–57. <https://doi.org/10.1007/s11357-005-4004-9>
- Shukitt-Hale, B., Kalt, W., Carey, A. N., Vinqvist-Tymchuk, M., McDonald, J., & Joseph, J. A. (2009). Plum juice, but not dried plum powder, is effective in mitigating cognitive deficits in aged rats. *Nutrition*, 25(5), 567–573. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.10.018>
- Singh, G., Kawatra, A., & Sehgal, S. (2001). Nutritional composition of selected green leafy vegetables, herbs and carrots. *Plant Foods for Human Nutrition*, 56(4), 359–364. <https://doi.org/10.1023/A:1011873119620>
- Soria, A., Sanz, M., & Villamiel, M. (2009). Determination of minor carbohydrates in carrot (*Daucus carota* L.) by GC–MS. *Food Chemistry* (Vol. 114). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.060>
- Surjadinata, B Bernadeth, Jacobo-Velázquez, A. D., & Cisneros-Zevallos, L. (2017). UVA, UVB and UVC Light Enhances the Biosynthesis of Phenolic Antioxidants in Fresh-Cut Carrot through a Synergistic Effect with Wounding. *Molecules* . <https://doi.org/10.3390/molecules22040668>
- Surjadinata, Bernadeth B., & Cisneros-Zevallos, L. (2012). Biosynthesis of phenolic antioxidants in carrot tissue increases with wounding intensity. *Food Chemistry*, 134(2), 615–624. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.01.097>

- Suzuki, A., Yamamoto, N., Jokura, H., Yamamoto, M., Fujii, A., Tokimitsu, I., & Saito, I. (2006). Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 24(6).
- Talcott, S., & Howard, L. (1999). *Chemical and Sensory Quality of Processed Carrot Puree As Influenced by Stress-Induced Phenolic Compounds*. *Journal of agricultural and food chemistry* (Vol. 47). <https://doi.org/10.1021/jf981135f>
- Taram, F., Winter, A. N., & Linseman, D. A. (2016). Neuroprotection comparison of chlorogenic acid and its metabolites against mechanistically distinct cell death-inducing agents in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Research*, 1648, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.07.028>
- Thom, E. (2007). The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in overweight and obese people. *The Journal of International Medical Research*, 35(6), 900–908. <https://doi.org/10.1177/147323000703500620>
- Umar Lule, S., & Xia, W. (2005). Food Phenolics, Pros and Cons: A Review. *Food Reviews International*, 21(4), 367–388. <https://doi.org/10.1080/87559120500222862>
- van Dijk, A. E., Olthof, M. R., Meeuse, J. C., Seebus, E., Heine, R. J., & van Dam, R. M. (2009). Acute Effects of Decaffeinated Coffee and the Major Coffee Components Chlorogenic Acid and Trigonelline on Glucose Tolerance. *Diabetes Care*, 32(6), 1023 LP – 1025.
- Vorhees, C., & T Williams, M. (2006). *Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory*. *Nature protocols* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
- W. Simon, P. (2010). Domestication, Historical Development, and Modern Breeding of Carrot. In *Plant Breed. Rev.* (Vol. 19, pp. 157–190). <https://doi.org/10.1002/9780470650172.ch5>
- Wan, C.-W., Wong, C. N.-Y., Pin, W.-K., Wong, M. H.-Y., Kwok, C.-Y., Chan, R. Y.-K., ... Chan, S.-W. (2012). Chlorogenic Acid Exhibits Cholesterol Lowering and Fatty

Liver Attenuating Properties by Up-regulating the Gene Expression of PPAR- α in Hypercholesterolemic Rats Induced with a High-Cholesterol Diet. *Phytotherapy Research*, 27(4), 545–551. <https://doi.org/10.1002/ptr.4751>

Warren, M. A., & Bedi, K. S. (1984). A quantitative assessment of the development of synapses and neurons in the visual cortex of control and undernourished rats. *Journal of Comparative Neurology*, 227(1), 104–108. <https://doi.org/10.1002/cne.902270111>

Wildman. (2006). *Handbook of nutraceuticals and functional foods*.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4026–4037. <https://doi.org/10.1021/jf049696w>

Zhang, D., & Hamauzu, Y. (2004). *Phenolic compounds and their antioxidant properties in different tissues of carrots (Daucus carota L.)*. *J Food Agric Environ* (Vol. 2).

11. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Julieta Melissa López Martínez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Alimentos

Tesis: EFECTO DE UNA PAPILLA ALTA EN ÁCIDO CLOROGÉNICO INDUCIDA CON ESTRES POR CORTE, SOBRE EL DESARROLLO COGNITIVO Y METABOLISMO DE RATAS WISTAR

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en Xalapa, Veracruz el 29 de Julio de 1986, hija de Agustín López Tellez y Julieta Martínez García

Educación: Egresada del Tecnológico de Monterrey, grado obtenido

Maestra en Ciencias con especialidad en biotecnología

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido

Licenciada en Nutrición

Experiencia profesional: Docente en la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Agosto – Diciembre 2012)

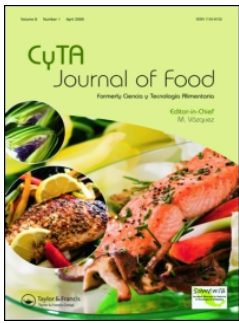
Investigador en el laboratorio de Proteómica del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública de la facultad de Salud Pública y Nutrición (Agosto 2012 – Diciembre 2012)

Colaboración en la redacción de artículos científicos para Pepsico (Agosto 2012 – 2015)

12. ANEXOS

Anexo 1. Peso ganado de ratas que consumieron ácido clorogénico de dos generaciones			
	Tratamiento	Sexo	Peso obtenido (%)
Primera generación	Papilla con alto contenido de AC	Macho	262 ± 80
		Hembra	104 ± 29
	Papilla control	Macho	215 ± 12
		Hembra	124 ± 21
	Control	Macho	185 ± 16
		Hembra	126 ± 23
Segunda generación	Papilla con alto contenido de AC	Macho	169 ± 13
		Hembra	110 ± 6
	Papilla control	Macho	219 ± 39
		Hembra	123 ± 7
	Control	Macho	194 ± 26
		Hembra	107 ± 9

Valores expresados como promedio de las determinaciones y su desviación estándar



Effects of carrot puree with enhanced levels of chlorogenic acid on rat cognitive abilities and neural development

Julieta Melissa López-Martínez, Jesús Santana-Gálvez, Carlos Aguilera-González, Arlette Santacruz, Carlos Abel Amaya-Guerra & Daniel A. Jacobo-Velázquez

To cite this article: Julieta Melissa López-Martínez, Jesús Santana-Gálvez, Carlos Aguilera-González, Arlette Santacruz, Carlos Abel Amaya-Guerra & Daniel A. Jacobo-Velázquez (2020) Effects of carrot puree with enhanced levels of chlorogenic acid on rat cognitive abilities and neural development, *CyTA - Journal of Food*, 18:1, 68-75, DOI: [10.1080/19476337.2020.1711813](https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1711813)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1711813>



© 2020 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.



Published online: 28 Jan 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 180



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Effects of carrot puree with enhanced levels of chlorogenic acid on rat cognitive abilities and neural development

Julieta Melissa López-Martínez^{a,b}, Jesús Santana-Gálvez^{ib}, Carlos Aguilera-González^a, Arlette Santacruz^b, Carlos Abel Amaya-Guerra^a and Daniel A. Jacobo-Velázquez^{ib}

^aFacultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México; ^bTecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Monterrey, México

ABSTRACT

In this study, the effect of carrot puree with enhanced levels of chlorogenic acid, obtained from carrots treated with wounding stress, on *Lactobacillus* concentration in microbiota, cognitive and brain development in two generations of rats was evaluated. Wistar rats were randomly assigned three different diets: control, 90% (w/w) control + 10% carrot puree (CP), and 90% control + 10% wounding stress carrot puree (WSCP). Wounding stress enhanced chlorogenic acid concentration ~4 times when compared to untreated CP (522 mg/kg). Rats treated with WSCP and CP diets increased the counts of *Lactobacillus* in the gut microbiota as compared with the control group ($p < 0.019$) of the second generation. Myelin content of WSCP was significantly higher than control and CP groups in the first generation. In the second generation, myelin raised to 204 mg/g in WSCP group and this group had the highest RNA content. Overall, results indicate that WSCP improves brain development by increasing myelin concentration and RNA.

Efectos del puré de zanahoria con niveles elevados de ácido clorogénico sobre las capacidades cognitivas y desarrollo neuronal de ratas

RESUMEN

En este estudio, se evaluó el efecto del puré de zanahoria con niveles elevados de ácido clorogénico, obtenido de zanahorias tratadas con estrés de corte, sobre la concentración de *Lactobacillus* en la microbiota y el desarrollo cognitivo y cerebral de dos generaciones de ratas. Las ratas Wistar se dividieron de forma aleatoria en tres dietas diferentes: control, 90%(w/w) control + 10% puré de zanahoria(CP), y 90% control + 10% puré de zanahoria obtenida de zanahorias tratadas con estrés de corte(WSCP). El estrés de corte incrementó ~4 veces el contenido de ácido clorogénico comparado con CP(522 mg/kg). Las ratas tratadas con las dietas WSCP y CP incrementaron el conteo de *Lactobacillus* en la microbiota intestinal de la segunda generación comparado con el grupo control ($p < 0.019$). El contenido de mielina del grupo WSCP fue significativamente mayor que en los grupos control y CP en la primera generación. En la segunda generación, el contenido de mielina se incrementó a 204 mg/g en el grupo WSCP, el cual mostró mayor contenido de ARN. En general, los resultados indican que la dieta adicionada con WSCP mejora el desarrollo cerebral mediante el incremento de mielina y ARN.

ARTICLE HISTORY

Received 25 August 2019
Accepted 20 December 2019

KEYWORDS

Carrot puree; wounding stress; chlorogenic acid; cognitive test; *Lactobacillus* spp; brain development

PALABRAS CLAVE

Puré de zanahoria; estrés de corte; ácido clorogénico; prueba cognitiva; *Lactobacillus* spp; desarrollo cerebral

1. Introduction

Carrot is one of the main vegetable crops cultivated worldwide, where China is the largest producer with an estimated 20,000,000 annual ton. Carrots are good source of carbohydrates, minerals (Ca, P, Fe, Mg), dietary fiber, and phytochemicals like carotenes and phenolic compounds (Datt, Swati, Singh, & Surekha, 2012; Esmail, 2017; Santana-Gálvez, Pérez-Carrillo, Velázquez-Reyes, Cisneros-Zevallos, & Jacobo-Velázquez, 2016).

Ingestion of phenolic compounds is associated with numerous health benefits (Chávez Muñoz, 2010; Gul, Demircan, Bagdas, & Buyukuysal, 2016; Ma, Gao, & Liu, 2015; Mubarak et al., 2012; Wan et al., 2012). Phenolic compounds are synthesized in plants for diverse physiological functions, serving as cell wall components or generated during stress response to protect the cell from external biotic and abiotic agents (Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012).

Postharvest abiotic stress has been reported to improve the nutritional profile of vegetables by increasing the concentration of phenolics and other chemical compounds synthesized during stress response (Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012). Carrots have served as model system to investigate the effects of post-harvest abiotic stresses such as wounding, UV light, modified atmosphere and phytohormones. Among these techniques, wounding stress is the most studied as it is one of the most effective, fast, and economic approaches (Becerra-Moreno et al., 2015; Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012; Surjadinata, Jacobo-Velázquez, & Cisneros-Zevallos, 2017).

Wounding stress activates the phenylpropanoid metabolic route that generates hydroxycinnamic acid derivatives, mainly chlorogenic acid (Becerra-Moreno et al., 2015; Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012). In carrots treated with postharvest abiotic stresses, chlorogenic acid is the main phenolic accumulated (~440–920 mg/kg) (Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012).

Chlorogenic acid (CA) is absorbed and metabolized by the human body, where *in vitro* and clinical studies indicate that it has a positive impact against chronic degenerative diseases like diabetes (Ma et al., 2015), hypertension (Mubarak et al., 2012), obesity (Huang, Liang, Zhong, He, & Wang, 2014), dyslipidemia (Wan et al., 2012), and metabolic syndrome (Santana-Gálvez, Cisneros-Zevallos, & Jacobo-Velázquez, 2017).

In addition to the well-documented benefits against the metabolic syndrome, research studies suggest phenolic compounds may improve neuron performance and help against aging neuron degeneration (Gul et al., 2016; Prediger et al., 2008; Shukitt-Hale et al., 2005). Scientific reports evaluating CA effects on neural health are scarce, although Gul et al. (2016) reported that this compound protects rat brain cortical cells against oxidative stress. Similarly, CA may have anti-amnesic activity in the hippocampus and frontal cortex (Kwon et al., 2010). CA is mostly metabolized by the gut microbiota, exerting a prebiotic effect (Cowan et al., 2014; Gonther, Verny, Besson, Révész, & Scalbert, 2003). On the other hand, recent studies suggest that microbiota may be involved in neuronal development and function (Borre et al., 2014; Bravo et al., 2011). Phenolic compounds, like CA, may modulate the microbiota *in vivo*, producing changes in beneficial bacteria such as *Lactobacillus* spp. (Molan, Liu, & Kruger, 2010).

The objective of the present study was to evaluate the effect of carrot puree with enhanced levels of chlorogenic acid obtained from carrots treated with wounding stress on the microbiota, cognitive and brain development of rats.

2. Materials and methods

2.1. Wounding stress application and production of carrot puree

Carrots (*Daucus carota* L.) were purchased in a local supermarket and visually inspected to discard samples with physical damage. Carrots were washed and disinfected with a chlorine solution (200 mg/L, pH 6.5–7.0) for 5 min. Both carrot ends were manually cut-off with a steel knife and the remaining carrot bodies were sliced with a commercial food processor (Waring Commercial, WFP11, Torrington, CT, USA). Samples intended to serve as non-stressed carrot puree (CP) were blanched (82°C, 6 min), grinded and pasteurized (85°C, 10 min). In the case of samples intended for the production of puree obtained from carrots treated with wounding stress (wounding stress carrot puree, WSCP), carrot slices were placed in plastic containers and stored for 48 h at 15°C before blanching, grinding and pasteurizing. Wounding Stress conditions were established to maximize the phenolic content of carrot based on studies previously performed by our group (Kovacs et al., 2011; Santana-Gálvez et al., 2016). Puree was cooled down to 20°C, divided into 30-g portions, and stored in 50-mL plastic cryovials at –80°C until used.

2.2. Proximal composition

CP and WSCP were analyzed to determine protein (NMX-F608-Normex-2011), fat (NOM-086-SSA-1-1994), non-soluble dietary fiber (AOAC 991.42), soluble dietary fiber (AOAC 993.19), total dietary fiber (AOAC 985.29), ash (NMX-F-607-Normex-2013),

and moisture (NOM-116-SSA-1-1994) contents. All results were expressed as percentage in weight basis.

2.3. Phenolic compounds

Carrot puree samples (5 g) were homogenized with 20-mL of methanol and centrifuged for 15 min (12,000 g, 4°C). The supernatant was collected and filtered with a 0.45- μ m syringe, and a 10- μ L aliquot was injected to a HPLC-DAD (Agilent Technologies, 1260 Infinity Santa Clara, CA, USA) with a reverse C18 column (250 x 4.6 mm, 15 μ m, Luna, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Mobile phases consisted of water (A) and 60% methanol (B) solutions adjusted to pH 2.5 with orthophosphoric acid. Phenolics were detected at 320-nm wavelength. Chromatogram information was processed with OpenLAB CDS ChemStation software (Agilent Technologies), and results were expressed as mg/kg on dry weight base (Santana-Gálvez et al., 2016).

2.4. Rat individuals and diets

Post-weaning Wistar rats (30 day) were randomly selected and fed according to diets shown in Table 1. Each treatment group contained four females and four males, and rodents were individually kept in stainless steel cages with controlled room conditions (21°C, 12 h of alternate light/dark cycles).

The control group daily received 30 g of a casein balanced diet (AIN-76). The diet AIN-76 semi-purified casein control diet was formulated with 20% casein, 50% sucrose, 15% corn starch, 5% cellulose, 5% vegetable oil, 3.5% mineral mix and 1% vitamin mix (Bieri, 1980). The remaining treatments group were fed with 90% (w/w) of the AIN-76 diet, and the rest 10% (w/w) intake was supplied through carrot puree (CP; Group 2) or wounding-stress carrot puree (WSCP; Group 1) for 30 days (Table 2). Ad libitum water intake was set for all treatment groups. Food intake per day and weight gain per week were recorded until sacrifice day.

After 30 days, the rats were subjected to cognitive tests described below (60 d of age). Once rats finished cognitive tests two females were randomly paired with one male of the same treatment group up to 10 days for reproduction, and male individuals were rotated after 5 days. Pregnant females were placed in maternity cages and males were placed back in their individual cage. Rats gave birth after 27 days allowing offspring weaning for 20–25 days. Feeding of the first rat generation continued as established in Table 1 during the reproduction and lactation periods. At 179 d of age, individuals were anesthetized through intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (40 mg/kg) and sacrificed with intracardiac puncture.

The small intestine and brain were surgically removed and stored in hermetic, wide opening 60-mL containers. All samples were stored at –20°C until further analysis. Post-weaning survivors of the second rat generation were selected to continue

Table 1. Treatments and diets.

Tabla 1. Tratamientos y dietas.

Treatment	% AIN-76 Diet	% Carrot	Carrot puree
WSCP	90	10	Wounding stress
CP	90	10	Non-stressed/control
Control group	100	-	-

WSCP: wounding stress carrot puree; CP: control carrot puree; AIN-76: base diet complemented with casein.

WSCP: Papilla de zanahoria inducida con estrés por corte; CP: Papilla de zanahoria control; AIN-76: Dieta base complementada con caseína.

Table 2. Composition of the experimental diets per day (30 g).**Tabla 2.** Composición de las dietas experimentales por día (30 g).

Component	WSCP	CP	Control (AIN-76)
Casein	5.4 g	5.4 g	6.0 g
Sucrose	13.5 g	13.5 g	15.0 g
Corn starch	4.05 g	4.05 g	4.5 g
Cellulose	1.35 g	1.35 g	1.5 g
Vegetable oil	1.35 g	1.35 g	1.5 g
Mineral mix	0.94 g	0.94 g	1.05 g
Vitamin mix	0.27 g	0.27 g	0.3 g
Carrot puree	3.0 g	3.0 g	–
Calories	110.2 kcal	110.3 kcal	121 kcal
Chlorogenic acid	0.6 mg	0.14 mg	–

WSCP: wound stress carrot puree; CP: control carrot puree; AIN-76: base diet complemented with casein. Results were expressed as fresh weight.

WSCP: puré de zanahoria obtenido de zanahorias tratadas con estrés de corte; CP: puré de zanahoria control. AIN-76: Dieta base complementada con caseína. Resultados expresados como base húmeda.

diets for 1 month (Table 2). As in the case of the first generation, each treatment group was balanced with four-female and 4-male individuals. Following 30 days, second-generation rats were subjected to cognitive tests and sacrificed for collecting small intestine and brain samples as described above. This experimental protocol was reviewed and approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Biological Sciences (CEIBA-2018-031).

2.5. Cognitive development

Each rat generation was subjected to the Morris maze test (Morris, 1984). A circular water tank was subdivided into four sections (northwest, northeast, southwest, southeast). A blue-coloured squared platform was placed in the water tank. Blue-tainted water filled the tank to hide the platform. The submerged platform was moved 180° from its original position (southeast). Rats started on the northern position (platform on the south). The platform location was subsequently rotated to the south, east and west of the water tank, and the rat drop-off point was moved along accordingly. Each trial was repeated four times during three consecutive days. Latency and error were recorded for each individual (Amaya-Guerra, Serna Saldivar, & Alanis-Guzman, 2006).

2.6. Gut microbiota DNA

Surgically removed small intestines were homogenized with 1:10 (w/v) of peptone water in a sterile laminar flow hood (Santacruz et al., 2012). DNA extraction was done with DNeasy Clean Microbial kit (QIAGEN, 6MBH, QIAGEN STRASSEL, Hilden, Germany).

2.7. RT-PCR microbial quantification

Lactobacillus spp. and total count were determined by real-time PCR using specific primers for each microbial group. Amplification and detection were determined with a Rotor-Gen R6-3000, QIAGEN using the SyBR Green PCR kit consisting of 12.5 µL forward primer, 12.5-µL reverse primer, 12.5 µL of SyBR Green PCR Master Mix, and 3 µL of DNA. The sequence of the forward and reverse primers were 5'AGCAGTAGGGAATCTTCCA and 3'ATTYCACCGCTACACATG for *Lactobacillus* spp.; 5'TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGC

and 3'CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT for total bacteria (Liu et al., 2014).

2.8. Myelin determination

Brain and cerebellum samples were weighed with an analytical balance prior to extraction. Half of the surgically removed brains and cerebellums were mixed with a chloroform/methanol/water 8:4:3 (v/v/v) solution. Butylated hydroxytoluene (BHT) was added (0.02g/L) to prevent lipid oxidation. Samples were diluted (1:10) and homogenized in sucrose solution (0.8 mol/L). The mixture was centrifuged at 12,000 rpm for 70 min. Supernatants were collected and resuspended in 30 mL of distilled water. Samples were placed in ice and manually agitated for 20 min. Centrifuging followed by washing was performed two more times, and the final extract was dried in a vacuum incubator (Model 1400 E; VWR, West Chester, PA, USA) at 60°C. Dried samples were weighed in an analytical balance (VE204-B) (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957).

2.9. Brain's protein determination

Protein content of brain was determined with 2-mL aliquot taken in duplicate and digested with 3 mL of H₂SO₄ and 1 g of K₂SO₄: CuSO₄ (25:1) in a micro-Kjeldahl. The nitrogen content was determined after the sample was adjusted to 25 mL with distilled water using an Orion 901 ion analyzing microprocessor (Orion Research, Inc. Cambridge, MA). Bovine serum albumin and ammonium sulfate were used to standardize the procedure. Protein content was estimated by multiplying nitrogen content by 6.25 (Bernocchi & Scherini, 1980).

2.10. Cerebral DNA and RNA determination

Brain tissue (0.5 g) was suspended in a trichloroacetic acid solution (TCA; 50% v/v) and centrifuged at 2,500 rpm for 20 min. The pellet was collected, resuspended in 2.0 mL of 5% (v/v) TCA and immersed for 30 min in a boiling water bath. Tubes were centrifuged at 2,500 rpm for 15 min (Morse & Carter, 1949). Supernatant was collected for colorimetric DNA and RNA determination (Dische, 1983). An aliquot (1.2 mL) was mixed with 2.4 mL of orcinol and placed for 15 min in a boiling water bath. Samples were cooled down and absorbance was measured at 665 nm to determine RNA content. For DNA quantification, 320 µL of diphenylamine were added to each sample. The mixture was incubated at 37°C during 4 h, and absorbance was measured at 600-nm wavelength in a Spekol-spectrocolorimeter (VEB-Carl Seizz, Jena, Germany).

2.11. Statistical analysis

Average and standard deviation values of phytochemical concentration for each diet treatment group were analyzed with a one-factor ANOVA using SPSS Statistics software (v22). *Lactobacillus* spp., total bacteria count, and Morris cognitive tests results were analyzed using the Tukey mean comparison tests. Statistical analysis was done with 0.05 significance.

3. Results and discussion

3.1. Carrot puree phytochemical and physicochemical characterization

CP and WSCP had similar carbohydrate, fiber, fat and protein content (Table 3). On the other hand, wounding stress enhanced chlorogenic acid concentration ~4 times (2296 ± 217 mg/kg) when compared to control carrot puree (522 ± 23 mg/kg). The results for CA content reported herein are in agreement with a previous report, where carrots treated with wounding stress, were further processed into juice by applying additional treatments such as blanching and pasteurization (Santana-Gálvez, Santacruz, Cisneros-Zevallos, & Jacobo-Velázquez, 2019). Likewise, WSCP showed 2–5-fold higher concentrations of coumaric acid (*p*-CA) and *p*-CA derivative *p*-CADA when compared to control samples. Santana-Gálvez et al. (2016) observed a similar increase of these phenolic compounds after wounding stress. Results showed 522% CA and 69% *p*-CADA increments in wounding stress shredded carrots when compared to the control. Hydroxycinnamic acid derivatives like chlorogenic acid and coumaric acid are synthesized via the phenylpropanoid metabolic route which is triggered as part of the plant cell mechanisms against cellular damage induced by wounding (Jacobo-Velázquez & Cisneros-Zevallos, 2012).

3.2. Learning development

Food intake and weight gain were not statistically different between treatments. There were no significant differences between the three groups in the first two days of the learning development test in the first rat generation (Figure 1). Nevertheless, WSCP improved the number of errors from 2 to 1 when compared with the CP group ($p < 0.019$) in day 3. On the second generation, subjects under CP and WSCP diets significantly improved, averaging 1 error and < 10 s to find the hidden platform. Both parameters were significantly lower ($p < .020$) when compared to the control diet group.

Table 3. Carrot puree proximal and phytochemical composition.

Tabla 3. Composición proximal y fitoquímica de la papilla de zanahoria.

Determination	Samples	
	Control carrot puree	Wounding stress carrot puree
Proximal composition		
Carbohydrates (% FW)	$6.77 \pm 0.19a$	$7.63 \pm 0.21a$
Ash (% FW)	$0.54 \pm 0.04a$	$0.48 \pm 0.01a$
Insoluble dietary fiber (% FW)	$1.38 \pm 0.57a$	$1.33 \pm 0.38a$
Soluble dietary fiber (% FW)	$1.19 \pm 0.51a$	$1.31 \pm 0.45a$
Total dietary fiber (% FW)	$2.57 \pm 0.16a$	$2.64 \pm 0.47a$
Fat (% FW)	$0.29 \pm 0.01a$	$0.27 \pm 0.02a$
Proteins (% FW)	$0.59 \pm 0.03a$	$0.59 \pm 0.03a$
Moisture (% FW)	$91.7 \pm 0.22a$	$91.0 \pm 0.25a$
Phytochemical composition		
Phenolics		
Chlorogenic acid (mg/kg DW)	$522 \pm 23b$	$2296 \pm 217a$
<i>p</i> -CA (mg/kg DW)	$64 \pm 4b$	$121 \pm 12a$
<i>p</i> -CADA (mg/kg DW)	$12 \pm 1b$	$62 \pm 4a$

Values are means and standard deviations. Rows with different letters were statistically different ($p < 0.05$) by the Tukey's Test. Results were expressed as fresh weight (FW) and dry weight (DW). *p*-CA: *p*-coumaric acid; *p*-CADA: *p*-coumaric acid derivate.

Los valores están expresados como medias y su desviación estándar. Las filas con letras diferentes fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey. Los resultados se expresaron como peso fresco (FW) y peso seco (DW). *p*-CA: ácido *p*-cumárico; *p*-CADA: derivado de ácido *p*-cumárico.

Although there are no previous reports on the application of CA in cognitive development, a previous study of Jang et al. (2013) investigated the consumption of instant decaffeinated coffee (120 mg/g per day) in scopolamine rats for 2 weeks. Coffee contains high amounts of CA. In agreement with the results obtained herein, scopolamine rats treated with instant decaffeinated coffee showed improved performance in Morris water maze as compared with the untreated rats.

Research studies suggest that phenolic compounds could act in different ways on learning development. For example, ellagitannins act through the hippocampus, proanthocyanidins in the brain sulcus and flavonols are efficient to regulated the neurotrophic factor derived from the brain metabolism (Kwon et al., 2010; Rendeiro et al., 2013). Chlorogenic acid acts on Central Nervous System through the blood-brain barrier in its original chemical composition or as a secondary metabolite. Once inside, it triggers serotonin in the brain hippocampus which in turn lowers the anxiety of the individual (Bouayed, Rammal, Dicko, Younos, & Soulimani, 2007). It should be noted that on day 3, group WSCP of both generations made fewer errors/latencies than the control group in the first generation or with the group CP in the second generation. Therefore, chlorogenic acid present in WSCP could have helped rats to experience less stress during trials and perform better on cognitive test (Prediger et al., 2008).

3.3. *Lactobacillus* spp. concentration in gut microbiota

The beneficial effects of gut microbiota are well documented and recent research studies suggest that it may also influence the Central Nervous System, particularly the brain (Borre et al., 2014; Bravo et al., 2011). Moreover, it has been demonstrated that phenolic compounds can regulate the composition of microbiota (Filosa, Meo, & Crispi, 2018). *Lactobacillus* spp. are Gram-positive bacteria present in the microbiota and they are usually present as probiotics. This genus of bacteria is capable to produce gamma-aminobutyric acid (GABA), which is an activity biogenic substance present in CNS and implicated in neurotransmission and brain metabolism (Yunes et al., 2016).

Diet did not influence gut microbiota in the first generation on the three groups (Table 4). Nonetheless, WSCP and CP had higher concentration of *Lactobacillus* spp. than the control group ($p < 0.019$) of the second generation. *Lactobacillus* spp. prevents memory dysfunction by normalizing the expression of neurotrophic factor CA1 on rat hippocampus (Bouayed et al., 2007; Bravo et al., 2011). Phenolic compounds affect microbiota composition by exerting as probiotics for beneficial microorganisms while sensitizing pathogens. For example, flavonols favor *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacteria* spp. growth (Cardona, Andrés-Lacueva, Tulipani, Tinahones, & Queipo-Ortuño, 2013; Cueva et al., 2013), although the mechanisms that enhance beneficial bacteria growth remain unknown (Cardona et al., 2013). Higher *Lactobacillus* spp. contents in WSCP and CP coincide with shorter latencies in learning performance of the second generation at day 3 (Figure 1(d)). On the other hand, the total bacteria count in the gut microbiota of the first generation is similar among the three treatments. However, groups of the second generation that consumed the carrot purees (WSCP and CP) did not increase the number of

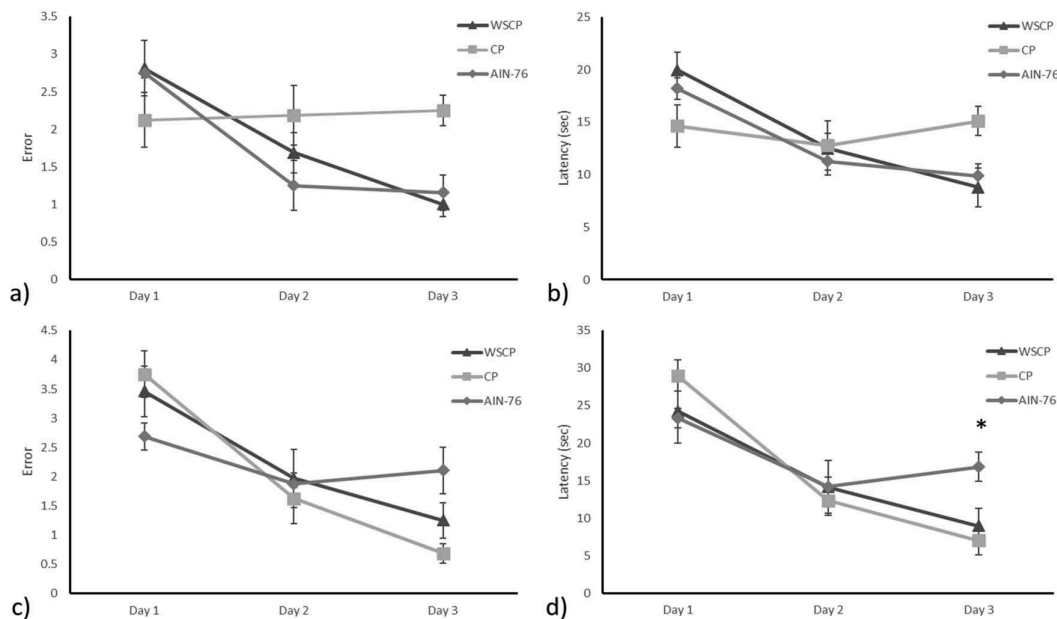


Figure 1. Learning Performance errors and latency in two generations of rats. Figures: (a) Learning performance errors in first generation; (b) Learning performance latency in first generation; (c) Learning performance errors in second generation; (d) Learning performance latency in second generation. Values are means and bars indicate standard error of the mean. * indicates statistically significant difference by the Tukey's Test ($p < 0.005$). WSCP: wound stress carrot puree; CP: control carrot puree; AIN-76: base diet complemented with casein.

Figura 1. Errores y latencia en el desempeño de aprendizaje de dos generaciones de ratas. Figuras: (a) Errores en el desempeño de aprendizaje en la primera generación; (b) latencia en el desempeño de aprendizaje en la primera generación; (c) errores en el desempeño de aprendizaje en la segunda generación; (d) Latencia en el desempeño de aprendizaje en la segunda generación. Los valores están expresados como medias y las barras indican el error estándar de la media. * indica una diferencia estadísticamente significativa mediante la prueba de Tukey ($p < 0.005$). WSCP: puré de zanahoria obtenido de zanahorias tratadas con estrés de corte; CP: puré de zanahoria control. AIN-76: Dieta base complementada con caseína.

Table 4. Bacterial counts in gut microbiota.

Tabla 4. Recuento de bacterias en la microbiota del intestino.

<i>Lactobacillus</i>					
Treatment	n	Mean	Median	IQR	P-Value
First generation					
WSCP	8	7.1a	7.4	7.1–8.1	0.728
CP	8	7.2a	7.3	6.1–7.9	
AIN-76	7	7.4a	7.4	6.9–7.8	
Total bacteria					
WSCP	6	5.6a	5.2	4.7–8.3	0.402
CP	8	4.9a	4.9	4.4–5.2	
AIN-76	8	5.0a	5.1	4.4–5.2	
Second generation					
WSCP	6	6.9a	7.0	6.4–7.3	0.019*
CP	4	6.6a	6.9	5.6–7.1	
AIN-76	6	4.5b	4.3	4.2–6.9	
Total bacteria					
WSCP	6	5.0a	4.9	4.9–5.3	0.045*
CP	4	5.1a	5.0	4.8–5.5	
AIN-76	8	5.9b	5.6	4.3–7.9	

Data are shown as mean, median, interquartile range (IQR) of log cell number per gram of fecal samples. Mean with different letters indicate statistically significant difference. *Indicates statistically significant difference by Tukey's test ($p < 0.050$). WSCP: wound stress carrot puree; CP: control carrot puree; AIN-76: base diet complemented with casein.

Los datos se muestran como media, mediana, rango intercuartil (RIC) del número de células logarítmicas por gramo de muestras fecales. El promedio con letras diferentes indica una diferencia estadísticamente significativa. * Indica una diferencia estadísticamente significativa mediante la prueba de Tukey ($p < 0.050$). WSCP: puré de zanahoria obtenido de zanahorias tratadas con estrés de corte; CP: puré de zanahoria control. AIN-76: Dieta base complementada con caseína.

bacteria as carbon sources, in comparison with the control ($p < 0.045$). These results indicate that CA helps to maintain gut health by modulating the gut microbial balance through stimulating the growth of beneficial bacteria such as *Lactobacillus* spp.

3.4. Brain development

Diet did not influence brain (1183–1296 mg) or cerebellum (280–312 mg) weight of the first generation (Table 5). Over the next generation, CP and WSCP averaged more brain and cerebellum weight, although significant differences were only found while comparing the control and CP treatments. Myelin content of WSCP was significantly higher (183 ± 45 mg/g) than CP (166 ± 14 mg/g) group. In the second generation, myelin raised to 204 ± 6 mg/g, although significant differences were only observed with the CP group.

Chlorogenic acid could be modulating nucleotides by activating the ecto-nucleoside triphosphatase and ecto-50-

Table 5. Effect of diet on brain and cerebellar weight and myelin.

Tabla 5. Efecto de la dieta sobre el peso del cerebro y cerebelo y mielina.

Treatment	Brain weight ¹	Cerebellar weight ²	Myelin ³
First generation			
WSCP	1183.15 ± 91a	301.26 ± 31a	182.48 ± 85a
CP	1240.10 ± 139a	280.11 ± 46a	165.75 ± 14b
Control	1296 ± 90a	312.40 ± 48a	178.01 ± 11ab
Second generation			
WSCP	1054.00 ± 93ab	306.35 ± 13ab	204.17 ± 6a
CP	972.50 ± 12b	295.05 ± 8b	166.75 ± 8b
Control	1161.80 ± 126a	321.71 ± 19a	206.75 ± 4a

Values are means and standard deviations. Columns of each generation with different letters indicate statistically significant difference by the Tukey's Test ($p < 0.005$). Results expressed in ¹mg, ²mg/g and ³%. WSCP: wound stress carrot puree; CP: control carrot puree; AIN-76: base diet complemented with casein.

Los valores están expresados como medias y su desviación estándar. Las columnas de cada generación con letras diferentes indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($p < 0.005$). Resultados expresados en ¹mg, ²mg/g y ³%. WSCP: puré de zanahoria obtenido de zanahorias tratadas con estrés de corte; CP: puré de zanahoria control. AIN-76: Dieta base complementada con caseína.

nucleotidase to increase myelin content (Leal et al., 2016). Myelin is directly involved with signals of the central neuro system, thus rats consuming WSCP can process neuro signals faster and may be reflected on cognitive results (Amaya-Guerra et al., 2006; Elaine & Katja, 2012). The CP group registered the lowest brain and cerebellum weights, which are directly related to motor development and long-term memory in animals (Warren & Bedi, 1984). No significant differences between treatments in protein and RNA concentrations were observed in the first generation (Table 6). However, the control group brains could have a greater number of brain neurons than the CP group ($p < 0.011$), because neurons may be related to brain DNA content (Amaya-Guerra et al., 2006). In generation two, the WSCP group had the highest RNA content, followed by the control group and finally the CP group ($p < 0.000$). This parameter is used to determine RNA/DNA, which is an indicator of metabolic activity of brain cells, so WSCP group showed greater metabolic activity than the control and CP groups ($p < 0.000$).

Some researchers have related a low DNA and RNA brain content with memory loss and chronic diseases like Alzheimer. An increase of free radicals may induce lipid peroxidation, which in turn affects polyunsaturated fatty acids present in the brain (Chu et al., 2009; Gul et al., 2016; Markesbery & Lovell, 2007). Chlorogenic acid is a potent antioxidant that may inhibit lipid peroxidation as it sequesters free radicals, providing a protective effect against oxidative stress in the brain (Elaine & Katja, 2012; Gul et al., 2016; Kwon et al., 2010). Furthermore, chlorogenic acid derivatives like ferulic, coumaric, and caffeic acids may also go through the blood-brain barrier and diffuse to different brain regions. Successful diffusion is also affected by other factors like charge state, lipophile and transport proteins (Amaya-Guerra et al., 2006; Ferlemi et al., 2015; Shukitt-Hale et al., 2005). Likewise, results observed in the second could be attributed to an epigenetic regulation capacity exerted by CA present in WSCP (Lee & Zhu, 2006).

Parameters on the brain development results and the Morris water maze do not coincide between treatments. However, Morris water maze is complex, since many times the success or failure of the animals in the search for the platform is influenced by several factors such as attention, motivation and sensorimotor function (Prediger et al., 2008). On the other hand, it should be noted that myelin, brain weight, cerebellum weight, DNA and RNA content are strictly related to adequate protein nutrition (Cruz-Rizzolo et al., 2017; Griffin, Woodward, & Chanda, 2018) and it should be considered that the CP and WSCP groups consumed

approximately 90% of their daily proteins as carrot puree contains a small amount of protein than casein. Therefore, if the carrot puree will be used as a supplement to diets covering 100% of protein requirement, the WSCP may result in improved brain development, which may subsequently result in better results on Morris water maze cognitive tests.

4. Conclusions

Results indicated that WSCP have a positive effect on improving brain development, myelin concentration and brain of rats. Rats treated with WSCP showed a higher concentration of *Lactobacillus* spp and lower total bacterial content compared to CP group, indicating that CA exerts a prebiotic effect. Now that the potential positive effects of CA on *Lactobacillus* spp have been identified, future research should consider the evaluation of a dose response. Furthermore, to better understand these results more studies evaluating a larger rodent population considering longer study duration, more generations and the effect of gender should be performed. Indeed, the latter (effect of gender) should be specially considered since although reports indicate that gender does not affect the gut microbiota (Lay et al., 2005), other authors have reported that gender affect gut microbiota, metabolism and neural system (Bridgewater et al., 2017; Bullock, Gemzik, Johnson, Thomast, & Parkinson, 1991; Czerniak, 2001; Fukuno, Nagai, Horii, Yamamoto, & Konishi, 2018; Fukushima et al., 2015; Jasarevic, Morrison, & Bale, 2016; Org et al., 2016), suggesting that compounds may undergo gender-dependent metabolism.

Acknowledgments

This study is based upon research supported by Universidad Autónoma de Nuevo León and Tecnológico de Monterrey Bioprocess and NutriOmics Research Groups. Author J.M.L.-M acknowledges the scholarship [#373289] from CONACYT.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

ORCID

Jesús Santana-Gálvez  <http://orcid.org/0000-0002-8766-5835>
Daniel A. Jacobo-Velázquez  <http://orcid.org/0000-0002-9478-2570>

Table 6. Effect of diet on brain protein, RNA and DNA.

Tabla 6. Efecto de la dieta sobre el contenido de proteína, ARN y ADN en el cerebro.

Treatment	Protein/brain weight ¹	RNA/brain weight ¹	DNA/brain weight ¹	Protein/DNA	RNA/DNA
First generation					
WSCP	105.85 ± 3a	4.41 ± 0.2a	6.71 ± 0.2ab	15.78 ± 0.8a	0.66 ± 0.03a
CP	105.26 ± 4a	4.22 ± 0.3a	6.49 ± 0.2b	16.22 ± 0.7a	0.65 ± 0.03a
Control	110.22 ± 1a	4.47 ± 0.3a	6.92 ± 0.3a	15.92 ± 0.4a	0.64 ± 0.04a
Second generation					
WSCP	105.26 ± 4a	4.85 ± 0.2a	6.77 ± 0.4a	15.56 ± 0.6a	0.71 ± 0.03a
CP	102.87 ± 3a	4.00 ± 0.08c	6.40 ± 0.1a	16.08 ± 0.7a	0.62 ± 0.02b
Control	106.67 ± 2a	4.53 ± 0.22b	6.88 ± 0.3a	15.54 ± 1.1a	0.66 ± 0.02b

Values are means and standard deviations. Columns of each generation with different letters indicate statistically significant difference by the Tukey's Test ($p < 0.005$). Results expressed in ¹mg/g. WSCP: wound stress carrot puree; CP: control carrot puree; AIN-76: base diet complemented with casein.

Los valores están expresados como medias y su desviación estándar. Las columnas de cada generación con letras diferentes indican una diferencia estadísticamente significativa según la prueba de Tukey ($p < 0.005$). Resultados expresados en ¹mg/g. WSCP: puré de zanahoria obtenido de zanahorias tratadas con estrés de corte; CP: puré de zanahoria control. AIN-76: Dieta base complementada con caseína.

References

- Amaya-Guerra, C., Serna Saldivar, S., & Alanis-Guzman, M. G. (2006). Soyabean fortification and enrichment of regular and quality protein maize tortillas affects brain development and maze performance of rats. *British Journal of Nutrition*, 96, 161. doi:10.1079/BJN20061804
- Becerra-Moreno, A., Redondo-Gil, M., Benavides, J., Nair, V., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2015). Combined effect of water loss and wounding stress on gene activation of metabolic pathways associated with phenolic biosynthesis in carrot. *Frontiers in Plant Science*, 6, 837. doi:10.3389/fpls.2015.00837
- Bernocchi, G., & Scherini, E. (1980). Cytochemical data on DNA and protein nuclear content during the prenatal cerebellar histogenesis in the rat. Effects of maternal protein malnutrition. *Cellular and Molecular Biology*, 26, 405–413.
- Bieri, J. G. (1980). Second report of the ad hoc committee on standards for nutritional studies. *Journal of Nutrition*, 110, 1726. doi:10.1093/jn/110.8.1726
- Borre, Y. E., O'Keefe, G. W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: Implications for brain disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 20, 509–518. doi:10.1016/j.molmed.2014.05.002
- Bouayed, J., Rammal, H., Dicko, A., Younos, C., & Soulimani, R. (2007). Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *Journal of the Neurological Sciences*, 262, 77–84. doi:10.1016/j.jns.2007.06.028
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 16050–16055. doi:10.1073/pnas.1102999108
- Bridgewater, L. C., Zhang, C., Wu, Y., Hu, W., Zhang, Q., Wang, J., ... Zhao, L. (2017). Gender-based differences in host behavior and gut microbiota composition in response to high fat diet and stress in a mouse model. *Scientific Reports*, 7, 10776. doi:10.1038/s41598-017-11069-4
- Bullock, P., Gemzik, B., Johnson, D., Thomast, P., & Parkinson, A. (1991). Evidence from dwarf rats that growth hormone may not regulate the sexual differentiation of liver cytochrome P450 enzymes and steroid 5 α -reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 5227–5231. doi:10.1073/pnas.88.12.5227
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 1415–1422. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.05.001
- Chávez Muñoz, M. (2010). *Composición de Alimentos*. Segunda (Ed.). México, DF: Mc Graw Hill.
- Chu, Y.-F., Brown, P. H., Lyle, B. J., Chen, Y., Black, R. M., Williams, C. E., ... Cheng, I. H. (2009). Roasted coffees high in lipophilic antioxidants and chlorogenic acid lactones are more neuroprotective than green coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 9801–9808. doi:10.1021/jf902095z
- Cowan, T. E., Palmnäs, M. S., Yang, J., Bomhof, M. R., Ardell, K. L., Reimer, R. A., ... Shearer, J. (2014). Chronic coffee consumption in the diet-induced obese rat: Impact on gut microbiota and serum metabolomics. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25, 489–495. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.12.009
- Cruz-Rizzolo, R. J., Limieri, L. L., de Paiva, I. R., Ribeiro, J. O. B., Pimenta, T. F., Pinato, L., & Liberti, E. A. (2017). Protein malnutrition during gestation and early life decreases neuronal size in the medial prefrontal cortex of post-pubertal rats. *IBRO Reports*, 3, 65–71. doi:10.1016/j.ibror.2017.08.002
- Cueva, C., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Walton, G. E., Gibson, G. R., Martín-Álvarez, P. J., & Moreno-Arribas, M. V. (2013). In vitro fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: Changes in microbial groups and phenolic metabolites. *FEMS Microbiology Ecology*, 83, 792–805. doi:10.1111/1574-6941.12037
- Czerniak, R. (2001). Gender-based differences in pharmacokinetics in laboratory animal models. *International Journal of Toxicology*, 20, 161–163. doi:10.1080/109158101317097746
- Datt, S. K., Swati, K., Singh, T. N., & Surekha, A. (2012). Chemical composition, functional properties and processing of carrot-a review. *Journal of Food Science and Technology*, 49, 22–32. doi:10.1007/s13197-011-0310-7
- Dische, E. (1983). *Physiological studies on the herbicide "Cotorane" S.S. Roushdy*. Cairo, Egypt: University of Cairo.
- Elaine, M., & Katja, H. (2012). *Human anatomy & physiology*. (8th ed.). Pearson (Ed.). San Francisco, California: Benjamin Cummings.
- Esmail, A.-S. A. (2017). Nutritional and therapeutic importance of daucus carota-A review. *Journal of Pharmacy*, 7, 72–82.
- Ferlemi, A.-V., Mermigki, P. G., Makri, O. E., Anagnostopoulos, D., Koulakioti, N. S., Margariti, M., & Lamari, F. N. (2015). Cerebral area differential redox response of neonatal rats to selenite-induced oxidative stress and to concurrent administration of highbush blueberry leaf polyphenols. *Neurochemical Research*, 40, 2280–2292. doi:10.1007/s11064-015-1718-7
- Filosa, S., Meo, F. S., & Crispi, S. (2018). Polyphenols-gut microbiota interplay and brain neuromodulation. *Neural Regeneration Research*, 13, 2055–2059. doi:10.4103/1673-5374.241429
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Fukuno, S., Nagai, K., Horii, A., Yamamoto, K., & Konishi, H. (2018). Pharmacokinetics and metabolic elimination of tolbutamide in female rats: Comparison with male rats. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 39, 321–327. doi:10.1002/bdd.2148
- Fukushima, A., Hagiwara, H., Fujioka, H., Kimura, F., Akema, T., & Funabashi, T. (2015). Sex differences in feeding behavior in rats: The relationship with neuronal activation in the hypothalamus. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 88. doi:10.3389/fnins.2015.00088
- Gonthier, M. P., Verny, M. A., Besson, C., Révész, C., & Scalbert, A. (2003). Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *Journal of Nutrition*, 133, 1853–1859. doi:10.1093/jn/133.6.1853
- Griffin, W. S. T., Woodward, D. J., & Chanda, R. (2018). Malnutrition and brain development: Cerebellar weight, DNA, RNA, protein and histological correlations. *Journal of Neurochemistry*, 28, 1269–1279. doi:10.1111/j.1471-4159.1977.tb12320.x
- Gul, Z., Demircan, C., Bagdas, D., & Buyukuysal, R. L. (2016). Protective effects of chlorogenic acid and its metabolites on hydrogen peroxide-induced alterations in rat brain slices: A comparative study with resveratrol. *Neurochemical Research*, 41, 2075–2085. doi:10.1007/s11064-016-1919-8
- Huang, K., Liang, X., Zhong, Y., He, W., & Wang, Z. (2014). 5-Caffeoylquinic acid decreases diet-induced obesity in rats by modulating PPAR α and LXR α transcription. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 1903–1910. doi:10.1002/jsfa.6896
- Jacobo-Velázquez, D. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2012). An alternative use of horticultural crops: Stressed plants as biofactories of bioactive phenolic compounds. *Agriculture*, 2, 259–271. doi:10.3390/agriculture2030259
- Jang, Y. J., Kim, J., Shim, J., Kim, C. Y., Jang, J. H., Lee, K. W., & Lee, H. J. (2013). Decaffeinated coffee prevents scopolamine-induced memory impairment in rats. *Behavioural Brain Research*, 15, 113–119. doi:10.1016/j.bbr.2013.02.003
- Jasarevic, E., Morrison, K. E., & Bale, T. L. (2016). Sex differences in the gut microbiome– Brain axis across the lifespan. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 371, 1–11. doi:10.1098/rstb.2015.0122
- Kovacs, A., Ben-Jacob, N., Tayem, H., Halperin, E., Iraqi, F. A., & Gophna, U. (2011). Genotype is a stronger determinant than sex of the mouse gut microbiota. *Environmental Microbiology*, 61, 423–428. doi:10.1007/s00248-010-9787-2
- Kwon, S.-H., Lee, H.-K., Kim, J.-A., Hong, S.-I., Kim, H.-C., Jo, T.-H., ... Jang, C.-G. (2010). Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *European Journal of Pharmacology*, 649, 210–217. doi:10.1016/j.ejphar.2010.09.001
- Lay, C., Rigottier-Gois, L., Holmström, K., Rajilic, M., Vaughan, E. E., de Vos, W. M., ... Doré, J. (2005). Colonic microbiota signatures across five Northern European countries. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4153–4155. doi:10.1128/AEM.71.7.4153-4155.2005
- Leal, C. A. M., Leal, D. B. R., Adefegha, S. A., Morsch, V. M., Beckmann, D. V., Castilhos, L. G., ... Schetinger, M. R. C. (2016). Effects of chlorogenic acid on adenine nucleotides hydrolyzing enzyme activities and expression in platelets of rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 81, 363–370. doi:10.1016/j.biopha.2016.04.003
- Lee, W. J., & Zhu, B. T. (2006). Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis*, 27, 269–277. doi:10.1093/carcin/bgi206
- Liu, X., Blouin, J., Santacruz, A., Lan, A., Andriaamihaja, M., Wilkanowicz, S., ... Davila, A. (2014). High-protein diet modifies

- colonic microbiota and luminal environment but not colonocyte metabolism in the rat model: The increased luminal bulk connection. *The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 307, 459–470. doi:10.1152/ajpgi.00400.2013
- Ma, Y., Gao, M., & Liu, D. (2015). Chlorogenic acid improves high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in Mice. *Pharmaceutical Research*, 32, 1200–1209. doi:10.1007/s11095-014-1526-9
- Markesbery, W. R., & Lovell, M. A. (2007). Damage to lipids, proteins, DNA, and RNA in mild cognitive impairment. *Archives of Neurology*, 64, 954–956. doi:10.1001/archneur.64.7.954
- Molan, A.-L., Liu, Z., & Kruger, M. (2010). The ability of blackcurrant extracts to positively modulate key markers of gastrointestinal function in rats. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1726–1735. doi:10.1007/s11274-010-0352-4
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11, 47–60. doi:10.1016/0165-0270(84)90007-4
- Morse, M., & Carter, E. (1949). The synthesis of nucleic acid in cultures of *Escherichia coli*, strain B and B/R. *Journal of Bacteriology*, 58, 317. doi:10.1128/JB.58.3.317-326.1949
- Mubarak, A., Bondonno, C. P., Liu, A. H., Considine, M. J., Rich, L., Mas, E., & Hodgson, J. M. (2012). Acute effects of chlorogenic acid on nitric oxide status, Endothelial function, and blood pressure in healthy volunteers: A randomized trial. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9130–9136. doi:10.1021/jf303440j
- Org, E., Mehrabian, M., Parks, B., Shipkova, P., Liu, X., Drake, T. A., & Lusic, A. J. (2016). Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice. *Gut Microbes*, 7, 313–322. doi:10.1080/19490976.2016.1203502
- Prediger, R. D. S., Fernandes, M. S., Rial, D., Wopereis, S., Pereira, V. S., Bosse, T. S., & Costa-Campos, L. (2008). Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 465–473. doi:10.1016/j.jep.2008.09.018
- Rendeiro, C., Vauzour, D., Rattray, M., Waffo-Téguo, P., Mérillon, J. M., Butler, L. T., & Spencer, J. P. E. (2013). Dietary levels of pure flavonoids improve spatial memory performance and increase hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *Plos One*, 8. doi:10.1371/journal.pone.0063535
- Santacruz, A., Marcos, A., Wärnberg, J., Martí, A., Martín-Matillas, M., Campoy, C., & Sanz, Y. (2012). Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity*, 17, 1906–1915. doi:10.1038/oby.2009.112
- Santana-Gálvez, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, A. D. (2017). Chlorogenic acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. *Molecules*, 22, 358. doi:10.3390/molecules22030358
- Santana-Gálvez, J., Pérez-Carrillo, E., Velázquez-Reyes, H. H., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2016). Application of wounding stress to produce a nutraceutical-rich carrot powder ingredient and its incorporation to nixtamalized corn flour tortillas. *Journal of Functional Foods*, 27, 655–666. doi:10.1016/J.JFF.2016.10.020
- Santana-Gálvez, J., Santacruz, A., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. (2019). Postharvest wounding stress in horticultural crops as a tool for designing novel functional foods and beverages with enhanced nutraceutical content: Carrot juice as a case study. *Journal of Food Science*, 84 (5), 1151–1161. doi:10.1111/1750-3841.14588
- Shukitt-Hale, B., Galli, R. L., Meterko, V., Carey, A., Bielinski, D. F., McGhie, T., & Joseph, J. A. (2005). Dietary supplementation with fruit polyphenolics ameliorates age-related deficits in behavior and neuronal markers of inflammation and oxidative stress. *Age*, 27, 49–57. doi:10.1007/s11357-005-4004-9
- Surjadinata, B. B., Jacobo-Velázquez, A. D., & Cisneros-Zevallos, L. (2017). UVA, UVB and UVC light enhances the biosynthesis of phenolic antioxidants in fresh-cut carrot through a synergistic effect with wounding. *Molecules*, 22, 668. doi:10.3390/molecules22040668
- Wan, C.-W., Wong, C. N.-Y., Pin, W.-K., Wong, M. H.-Y., Kwok, C.-Y., Chan, R. Y.-K., & Chan, S.-W. (2012). Chlorogenic acid exhibits cholesterol lowering and fatty liver attenuating properties by up-regulating the gene expression of PPAR- α in hypercholesterolemic rats induced with a high-cholesterol diet. *Phytotherapy Research*, 27, 545–551. doi:10.1002/ptr.4751
- Warren, M. A., & Bedi, K. S. (1984). A quantitative assessment of the development of synapses and neurons in the visual cortex of control and undernourished rats. *Journal of Comparative Neurology*, 227, 104–108. doi:10.1002/cne.902270111
- Yunes, R. A., Poluektova, E. U., Dyachkova, M. S., Klimina, K. M., Kovtun, A. S., Averina, O. V., ... Danilenko, V. N. (2016). GABA production and structure of *gadB/gadC* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota. *Anaerobe*, 42, 197–204. doi:10.1016/j.anaerobe.2016.10.011

*Original Article***Nutritional status evaluation and nutrient intake in adult patients with pulmonary tuberculosis and their contacts**

Eduardo Campos-Góngora¹, Julieta López-Martínez¹, Joselina Huerta-Oros², Gerardo I. Arredondo-Mendoza¹, Zacarías Jiménez-Salas¹

¹ *Universidad Autónoma de Nuevo León, Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública; Monterrey, Nuevo León, México*

² *Universidad de Monterrey, Departamento de Nutrición; Monterrey, Nuevo León, México*

Abstract

Introduction: Malnutrition is a common status in patients with tuberculosis (TB). Because TB is disseminated through the sputum of infected persons, individuals who maintain relations with a TB patient are at high risk of infection; this risk is greater when contacts present an inadequate nutritional status. The aim of this work was to analyse and compare the nutritional status and macro and micronutrient intake of TB patients and their household contacts.

Methodology: A cross-sectional study was carried out in TB patients from Nuevo Leon, México, and their household contacts. Thirty-nine patients diagnosed with TB and 62 contacts were evaluated. Anthropometric evaluation was performed considering weight, height, body mass index (BMI) and waist-hip ratio (WHR); nutrient intake was evaluated by applying 24-hour dietary recalls.

Results: According to anthropometric assessment, the study population showed a greater trend towards being overweight and obese; 62% of TB patients and contacts had this type of malnutrition, while only 8% of individuals were undernourished. A greater tendency towards malnutrition was observed in the TB patient group.

Conclusions: TB patients and their contacts presented as overweight and obese. Both groups showed similar patterns in macro and micronutrient intake. Implications of deficiencies in the intake of these nutrients are discussed on the basis of their effects on individual health.

Key words: Tuberculosis; nutritional status; nutrient intake; TB-patients; household contacts.

J Infect Dev Ctries 2019; 13(4):303-310. doi:10.3855/jidc.11267

(Received 24 January 2019 – Accepted 04 March 2019)

Copyright © 2019 Campos-Góngora *et al.* This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Tuberculosis (TB) is a bacterial infection caused by *Mycobacterium tuberculosis* that primarily affects the lungs [1]. The main mechanism of bacterial spread and transmission is by air through the sputum of infected individuals [2]. Annually worldwide, TB causes approximately three million deaths and infects between one and two billion people [3]. The population infected with TB often is malnourished as indicated by decreases in the level of proteins, anthropometric indexes and micronutrient status [4]. Due to the mechanisms involved in disease transmission, people who are closely related to TB patients are at increased risk of infection; in addition, if the contact presents some type of malnutrition, the risk of infection increases because their immune system is weakened [1]. Household contacts are defined as individuals who maintain relations with a TB patient [5]. Some studies suggest that TB is related to low levels of micro-nutrients, such as zinc [6,7], vitamin A [1] and vitamin D [8]. Good

nutrition requires proper intake of macro and micro-nutrients [4]; however, the nutritional status and, therefore, the health of individuals could be influenced by several factors, such as socio-economic status, urban environment, eating habits, education and access to health services. Considering that the early diagnosis of inadequate nutritional status is necessary to prevent the contagion of the population that is in contact with TB patients [9,10], the objective of this research was to evaluate and compare the nutritional status and the macro and micronutrient intake of patients diagnosed with pulmonary TB and their contacts.

Methodology*Study Population*

A cross-sectional study was performed in TB patients from Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) Clinics of Nuevo Leon, México and their contacts. The research was conducted in 39 patients diagnosed with TB and 62 contacts in the age range

between 15 and 88 years. This study did not include women who are pregnant or breast-feeding, as well as anyone recovering from chronic illness or surgery. The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Autonomous University of Nuevo León, School of Public Health and Nutrition, México. All subjects agreed to participate in the study, stating their agreement by signing the informed consent.

Anthropometric evaluation

An experienced nutritionist assessed the anthropometric data of participants in the study by determining the weight, height, body mass index (BMI) and waist-hip ratio (WHR). Subjects were weighed without shoes and lightly clothed using a Tanita electronic digital scales (Tanita Corporation of America, Inc., USA), while height was recorded using a conventional stadiometer (Seca 213, USA). Body mass index (BMI) was calculated by dividing body weight (expressed in kilograms) by the square of height (in meters): kg/m². Nutritional status was determined based on BMI cut off points by the World Health Organization (WHO): Global Database on Body Mass Index (BMI). Available from: <http://www.who.int/nutrition/databases/bmi/en/> [11]. Waist and hip circumferences were measured according to the WHO recommendations, using an insertion tape. Waist circumference was measured at the midpoint between the lower rib and the upper margin of the iliac crest, and the hip circumference was denoted as the widest circumference over the buttocks and below the iliac crest. WHR (i.e. the waist circumference divided by the hip circumference) was calculated with the values corresponding to waist and hip measurements [12].

Dietary assessment

Food intake was calculated applying a 24-hour dietary recall to patients and contacts to estimate the intake of energy, protein, carbohydrates, fiber, lipids, cholesterol, fat (saturated, monounsaturated, polyunsaturated), minerals as calcium, phosphorus, iron, magnesium, sodium, potassium, zinc and vitamins (retinol, ascorbic acid, thiamin, riboflavin, niacin, pyridoxine, folic acid and cobalamin). The 24-hour diet recall was carried out by a nutritionist on three different occasions during home visits of participants. Each 24-hour recall was conducted using a standardized protocol, with a complete list of all food and beverages consumed during the previous day and detailed descriptions of all the food and beverages consumed, including brand names and cooking methods.

An estimate of the amount of all foods and beverages consumed was recorded by household measuring and serving utensils like spoons, plates or cups. Food Processor Software® incorporating the Mexican food composition tables was used to calculate the nutrient intake from dietary recalls. For the calculation of the nutrient adequacy ratio, the nutrient recommendations for Mexican population [13] were used, applying the formula: (Patient food intake ×100) / Nutrient recommendations.

Other measures

In order to discover other factors that could influence the health of TB patients and their contacts, a structured sociodemographic questionnaire was included to obtain information regarding socio-demographics and lifestyle risk factors such as gender, age, kinship, perceived income, smoking, educational level, public services and access to health services of subjects.

Statistical analyses

Data analysis was performed using the statistical software packages MS Excel (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA) or IBM SPSS Statistics Version 20.0. For the descriptive analysis of variables, means and standard deviations were calculated. The normal distribution of the quantitative variables was determined using the Kolmogorov-Smirnov test; *p* values > 0.05 were considered as variables with a normal distribution. Student's t-test or Wilcoxon's test was used to compare the macro and micronutrient intake of TB patients and their household contacts. Statistical significance was determined at *p* < 0.05. Data corresponding to each variable are expressed as the means ± standard deviation unless otherwise indicated.

Results

In the present study, there was a prevalence of males (69.2%) in the TB patient group, while in the contact group, females were prevalent (68%). In this population, 74% of TB patients and 86% of the contacts were 19 to 74 years old; 23% and 10% of TB patients and contacts, respectively, were > 65 years old; and 3% and 5% were < 18 years old. Regarding to socioeconomic factors, 12% of the study population survived with a salary less than or equal to the monthly minimum wage, corresponding to 2650.80 pesos (Mexican national currency), whereas 20.8% survived with two minimum wages per month, 30.9% with three minimum wages, 23.2% with 4 or more- minimal wages per month and 12.4% of the participants did not disclose

Table 1. Anthropometric assessment according to BMI in patients with tuberculosis and contacts.

	TB patients (n=39)		Contacts (n=62)		Both groups	
	Frequency	%	Frequency	%	Frequency	%
Underweight	6	15.4	2	3.2	8	7.9
Normal	15	38.5	15	24.2	30	29.7
Overweight	13	33.3	24	38.7	37	36.3
Obesity	5	12.8	21	33.9	26	25.7
Total	39	100	62	100	101	100

BMI, Body Mass Index: weight (kg)/ height (m²): <18.5 = underweight, 18.5 – 24.9 = normal, >25 = overweight y >30 = obesity; World Health Organization; *No significant differences were found between the characteristics of patients and contacts (p>0.05) for all comparisons using Student's T test.

their income. These data indicate that a higher percentage (62%) of TB patients and risk contacts live on a minimal income. There were no notable differences in the academic level of participants, with the exception of the percentage of TB patients and contacts that stated that they had not completed elementary school (51.3% and 30.7%, respectively). The rest of the participants stated different levels of study: Elementary School (12.8% and 17.3% for TB patients and contacts, respectively), Junior High School (25.7% and 33.8%) and High School (10.2% and 12.9%). With respect to the marital status of the participants, slight differences were observed. TB patients reported a civil status corresponding to single (25.6%) and married/free union (56.4%), while household contacts reported 38.7% and 54.8% for single or married/free union, respectively. A minor percentage of TB patients (12.8%) and contacts (3.2%) were divorced, and 5.1% and 3.2% of TB patients and contacts, respectively, were widowed. The progression of disease in patients was between 6 months and 2 years. Since diagnosis, TB patients have been in medical management as established through social security services.

Considering the recommendations made by WHO [14] and Fair *et al.* [15], and because 90.3% of the individuals considered as contacts in this study were

mostly relatives: 37% children, 12.9% brothers/sisters, 25.8% spouses, 14.5% father/mother, (the rest of the contacts (10%) were relatives: uncles or grandchildren), the contact group corresponds truly to "Household contact": a person who shared the same enclosed living space for one or more nights or for frequent or extended periods during the day with the index case during the 3 months before commencement of the current treatment episode [14].

According to anthropometric assessment, most of the study population showed poor nutrition, and only approximately 30% of TB patients and contacts showed a normal BMI. The study population showed a greater trend towards overweight and obesity; while only 8% of individuals were undernourished. Anthropometric assessment of TB patients showed a greater tendency towards malnutrition than contacts (Table 1). Patients and contacts showed a predominately normal WHR (51%); however, 43% of the study population presented android-type obesity (WHR above 0.85 for females and above 0.90 for males).

TB patients and household contacts showed a deficiency in energy consumption by approximately 19% and 15% nutrient intake, respectively. Both groups showed a greater consumption of proteins and lipids than carbohydrates. It is very interesting to note the gap in the consumption of these elements and total fibre

Table 2. Total daily intake of energy and macronutrients in TB patients and contacts.

Nutrients	TB patients (n=39)			Contacts (n=62)			P value*
	Mean	SD	Adequacy ratio (%)	Mean	SD	Adequacy ratio (%)	
Energy ¹	1862	537	81	1861	519	85	0.992 ^a
Proteins ²	69	22	122	69	22	136	0.994 ^a
Carbohydrates ²	230	63	66	228	63	70	0.882 ^a
Fibre ²	13	4	36	11	4	32	0.072 ^a
Lipids ²	75	30	97	76	31	103	0.972 ^a
Cholesterol ³	379	216	155	374	216	151	0.897 ^a
Fat							
Saturated ²	23	10	88	23	11	95	0.786 ^a
Monounsaturated ²	32	16	123	31	15	124	0.726 ^a
Polyunsaturated ²	8	4	31	9	5	36	0.860 ^b

SD, Standard Deviation; Adequacy ratio: ≤ 89.99% deficiency, 90-110% normal and ≥ 110.1% excess; Units expressed in kilocalories¹, grams² or milligrams³;

*Student's T-test^a or Wilcoxon test^b were used.

intake, for which the adequacy percentage was 36% and 32% for patients and contacts, indicating a greater deficiency. In the fat consumption analysis, it was observed that lipid intake was very close to the percentage of adequacy (97% and 103%) in TB patients and contacts groups, respectively, whereas the intake of cholesterol, monounsaturated and polyunsaturated fats was similar in both groups. Full macronutrients intakes are presented in Table 2.

Table 3 shows the total daily intake of micronutrients in TB patients and contacts. Data indicate that patients with pulmonary TB had deficiencies in the consumption of some minerals, such as calcium, magnesium and zinc, according to the percentage of adequacy. The same trend was observed in the contact group. In the rest of the minerals analysed (phosphorus, iron, sodium and potassium), there were no differences between the values determined for both groups; of them, only potassium presented values below the daily requirement.

Both patients and contacts had low intake levels of retinol, ascorbic acid, niacin, pyridoxine and folic acid; however, there was an excess in the consumption of thiamine, riboflavin and cobalamin in both groups (Table 3). Intake levels of vitamin A (retinol) were deficient in TB patients and contacts with values of 86% adequacy in both groups. Similarly, levels of ascorbic acid in TB patients and contacts were low; even though the statistical analysis indicated that there were no differences in the intake values between both groups, their adequacy percentage was 78% and 60% for

patients and contacts, respectively. Likewise, pyridoxine (vitamin B6) levels were below the nutritional recommendations, reaching values of 31% and 34%, for patients and contacts groups. With respect to folic acid intake, both TB patients and contacts showed a lack of intake; their percentage of adequacy reached values of 57% and 52%, respectively.

Discussion

Frequently, TB disease is associated with factors such as gender, age, education, disposable income, civil status, public services and access to health services. In our study population there were no differences in such factors, when the population was separated in TB patients group and contacts group. It has been suggested that there is an association between TB and low income [16] due to the costs of treatment. A common characteristic is that people living in rural areas have low income with respect to those who live in urban areas. Moreover, it has been reported that in the states and economical regions of Mexico with lower income, the number of registered TB cases is greater for men than for women, indicating that such differences correspond not only to biological or epidemiological characteristics but also to socioeconomic and cultural aspects and access to health systems [17]. However, it has been observed that people with little or no formal education are socially, geographically and/or economically marginalized and present with a compromised health status associated with TB morbidity and mortality [17]. In the present study, only

Table 3. Total daily intake of micronutrients studied in TB patients and contacts.

	TB patients (n=39)			Contacts (n=62)			P value*
	Mean	SD	Adequacy ratio (%)	Mean	SD	Adequacy ratio (%)	
Minerals¹							
Calcium	837	341	77	831	370	79	0.944 ^a
Phosphorus	865	314	125	844	293	121	0.762 ^a
Iron	17.6	8.9	187	15.7	5.0	142	0.681 ^b
Magnesium	159	56	42	149	49.3	45	0.392 ^b
Sodium	892	624	179	868	545	175	0.920 ^b
Potassium	1765	686	89	1650	561	83	0.677 ^b
Zinc	6.37	3.4	66	6.07	2.9	72	0.662 ^a
Vitamins²							
Retinol	696.4	853	86	631	926	86	0.550 ^b
Ascorbic acid	64.96	63	78	46.33	32	60	0.563 ^b
Thiamine	1.28	0.55	112	1.23	0.39	110	0.878 ^b
Riboflavin	1.35	0.45	112	1.28	0.48	113	0.273 ^b
Niacin	13.1	6.13	87	12.2	4.92	85	0.519 ^b
Pyridoxine	1.01	0.48	69	0.90	0.39	66	0.267 ^a
Folic acid	226	93.62	57	207	125.6	52	0.127 ^b
Cobalamin	6.68	9.43	280	5.82	9.26	243	0.609 ^b

SD, Standard Deviation; Adequacy ratio: $\leq 89.99\%$ deficiency, 90-110% normal and $\geq 110.1\%$ excess; Units expressed in milligrams¹ or micrograms²;

*Student's T-test^a or Wilcoxon test^b were used.

subjects living in the Monterrey City Metropolitan area were included. In general, the economic income average of the population living in this area is not below the minimum wage, in agreement with what was declared by the participants. Because monetary income is associated with the education level of the people, it is possible that this effect could explain why almost half of TB patients (51.3%) reported that they had not completed elementary school.

The determination of nutritional status in exposed populations is considered as very important in the strategy to prevent TB infection [9]. In our study, both the prevalence of overweight and obesity was higher in contacts than in TB patients. Altogether, the prevalence of overweight-obesity in both groups reached values of 72.6% (contact group) and 46.1% (patient group). Important studies estimated that in the Mexican population, the prevalence of overweight-obesity ranges from 68% to 80% in the male and female populations, respectively [18-20]; in agreement, the values observed in the group of contacts were in this range, whilst in the group of patients, the percentage value found was almost half of that estimated for the general population. The results found in this study are consistent with other studies reporting that patients with active TB have a lower body mass index (BMI) than healthy controls. It is difficult to determine whether the presence of TB is due to poor nutritional status and, therefore, impaired immune status or, if this condition is the result of disease. A significant loss of body weight in TB patients has been described in the process of disease progression and treatment and, as a consequence, patients have a lower BMI [21-23]. Malnutrition in patients with TB may be caused by anorexia nervosa and/or hyporexia, because these disorders are characterized by the restriction of food intake resulting in the loss of body weight [24]. The waist circumference and WHR are considered as important parameters for a better anthropometric assessment [12,25]. Patients and contacts showed a predominately normal WHR; however, it is interesting to note that 43% of the study population presented an android-type obesity (abdominal obesity). This type of obesity is associated with factors that contribute to a greater risk of developing chronic diseases, such as cardiovascular complications, insulin resistance, type 2 diabetes, cancer and metabolic syndrome [20,25].

Previous reports show that deficiency of single or multiple nutrients can reduce an individual's resistance to infections [26]. On the other hand, malnutrition and tuberculosis are both problems mostly in developing countries; poor nutrition leads to protein/energy

malnutrition and micronutrient deficiencies that lead to immunodeficiency, increasing the risk for developing TB [27]. In our study, both TB patients and household contacts showed a deficiency in the consumption of energy, carbohydrates and fiber, and a greater consumption of proteins and lipids. Likewise, deficiencies in the consumption of micronutrients (minerals and vitamins) were present in both groups. We observed that in general, our population showed deficiencies in the intake of some minerals as calcium, magnesium and zinc. The importance of the uptake of minerals to protect from TB infection is well documented. Calcium plays an important role in the control of TB infection; several studies indicated that macrophages and monocytes have diminished ability to kill TB bacteria when levels of intra and extracellular calcium are reduced [28,29]. In addition, it has been shown that hypocalcaemia is very common in patients with TB [30]. Magnesium is a cofactor of many enzymes involved in biological processes and plays an important role in the immune response. Because it is a cofactor in the synthesis of immunoglobulins, it is involved in the adherence of immune cells, such as antibody-dependent cytotoxicity, and it participates in the IgM response and binding lymphocytes, such as T helper-B cell adhesion [31]. In our study, both patients and contacts had poor magnesium intake with their adequacy percentage less than 50%, making it necessary to increase their intake of foods rich in magnesium. On the other hand, zinc is associated with weight loss and recurrent infections due to dysfunction of the immune system affecting the growth and function of T and B cells, involved in the regulation of genes of lymphocytes, as well as in the development and normal function of neutrophils [32]. Therefore, this mineral is considered to play a fundamental role in the control and prevention of several infections, plus an essential role in vitamin A metabolism [33]. Ghulam *et al.* [6] reported that serum zinc levels are diminished in patients with pulmonary TB. This situation is similar to TB patients in this research, however, it is noteworthy that in our study, mineral intake was calculated using 24-hours reminder questionnaires; there was no measurement of serum levels, which would be important for future research.

Vitamin deficiencies are common in patients with tuberculosis [34,35]. In our study, the population corresponding to both groups, TB patients and contacts, presents deficiencies in vitamin A, ascorbic acid, niacin, folic acid, and pyridoxine intake. Regarding to vitamin A, some authors have found that severe TB was associated with vitamin A deficiency [36]. Such

deficiency is associated with poor nutrition, possibly as result of loss of appetite, intestinal malabsorption and/or urinary loss of vitamin A in TB patients. Although these factors could be responsible for the low intake of retinol in our population, we must consider that in the group of contacts (not TB patients), intake values were similar, which suggests that this could be attributed to poor eating habits of the population in this region. It is very important to note that scientific evidence shows that zinc deficiency is related to vitamin A deficiency [37], which can be explained by two mechanisms: the first is the oxidative conversion of retinol to retinal because this step requires the action of the zinc-dependent retinol dehydrogenase enzyme, and the second is the hepatic synthesis of the retinol binding protein because the mobilization of retinol in the liver requires a suitable concentration of zinc [38]. Considering prior research, it is possible that in addition to the results of inadequate intake of vitamin A observed in our population, there was a greater decrease in the levels of vitamin A in the study population due to the zinc intake in both study groups being below the daily recommendation. Vitamin C acts as a physiological antioxidant, protecting host cells against oxidative stress caused by infections and increasing the immune response against diverse viral and bacterial infections, including pneumonia and the common cold [39,40]. Additionally, it is reported that vitamin C supplementation is necessary to improve the health of TB patients and to prevent oxidative damage, including the toxic effects of anti-tuberculosis drugs [41,42]. Due to the role of this vitamin, it is extremely important that both TB patients and contacts with poor intake (as a preventive action) increase their consumption of foods rich in vitamin C to strengthen their immune system.

For the TB treatment, generally isoniazid is included in the first-line anti-tuberculosis medication (it has been used for more than 50 years). This drug is associated with hepatotoxicity risk and diseases such as hepatitis and peripheral neuropathy [43,44]. Additionally, it has been demonstrated that if isoniazid is given alone it will rapidly lead to drug resistance. This involves mechanisms such as increased activity of efflux pumps and/or the generation of spontaneous mutations in the *KatG* gene (that encoded the catalase-peroxidase enzyme, which acts as an isoniazid activator) [45]. Isoniazid has a competitive inhibition mechanism to pyridoxine, whose function is to serve as a precursor of pyridoxal phosphate and pyridoxamine phosphate, coenzymes that play an essential role in protein metabolism, synthesis of lipids and coenzyme A, and biosynthesis of synaptic transmitters [46]. There

is scientific evidence that the side effects of isoniazid can be prevented by the administration of pyridoxine [46,47], and simultaneous oral administration of pyridoxine with isoniazid in TB patients, or in children who have a poor nutritional history and pyridoxine deficit, prior to therapy with isoniazid, are recommended [48,49]. It is highly important to consider that 29% of TB patients in this study were using isoniazid as anti-TB treatment, and both TB patients and contacts showed a low vitamin B6 intake. Therefore, it is recommended that both groups increase their intake of vitamin B6, especially those in the TB patient group, in order to prevent possible side-effects of isoniazid treatment. Regarding folic acid intake, the adequacy ratio was ca. 50% in both study groups, although the different groups showed no significant differences in their consumption. It is important that both TB patients and contacts increase their intake of folic acid, because it has demonstrated that folic acid deficiency affects immune capacity through a mechanism that involves the reduction of circulating T lymphocytes, and thus, lowering resistance to infections (reviewed in Maggini *et al.*) [50].

In the current study, we observed that most participants presented a condition of overweight and obesity; however, this is inconsistent with their low energy and carbohydrate intake. Such inconsistency could be explained because our results were based on the last 24 hours of dietary nutrient recall. Therefore, for future research, biomarkers such as serum micronutrients or lipid blood profiles should be accurately measured so that the nutritional status of the participants can be accurately determined. Despite the limitations, the present study revealed that macro and micronutrient intake (specifically, vitamins and minerals) was deficient both in TB patients and in household contacts, and the results agree with data found in the literature. Considering the importance of nutrition on preventing the development of active TB, we recommend more investigations on human TB: with greater populations, studying long-term effects, and on different life stages and different types of populations. In addition, we suggest the establishment of strategies aimed at promoting a balanced diet among household contacts: people who have close contact with patients with infectious TB.

Conclusion

Based on the findings of this study, we concluded that both TB patients and household contacts present problems of poor nutrition. Most participants presented with a condition of overweight and obesity, similar to

that found in a large part of the Mexican population. In the same way, the present study revealed that macro and micronutrient intake (specifically vitamins and minerals) was deficient both in TB patients and in household contacts, placing this population at a great risk to TB infection.

Acknowledgements

This work was supported by the PRODEP-SEP México Program (Grant number: PROMEP/103.5/04/757, to E.C.-G.). The authors would like to thank especially to the participants of this study.

Authors' contributions

ECG designed the research protocol and the original analysis plan, secured the funding for the work, corrected and contributed to all versions of the manuscript; JLM designed and carried out the analysis, wrote the first draft and contributed to all versions of the manuscript; JHO and GIAM worked in the data analysis and contributed also to the later drafts; ZJS worked on the original idea for the study, revised the drafts and contributed to later drafts, before submission to Journal. All five authors approved the present manuscript.

References

- Grobler L, Nagpal S, Sudarsanam TD, Sinclair D (2016) Nutritional supplements for people being treated for active tuberculosis. *Cochrane Database Syst Rev* 6: CD006086.
- Jensen PA, Lambert LA, Iademarco MF, Ridzon R, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2015) Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care settings, 2005. *MMWR Recomm Rep* 54: 1-141.
- Maulén NP (2011) Virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Med Chile* 139: 1605-1610. [Article in Spanish].
- Miyata S, Tanaka M, Ihaku D (2012) Usefulness of the malnutrition screening tool in patients with pulmonary tuberculosis. *Nutrition* 28: 271-274.
- Oliveira SP, Carvalho MDB, Pelloso SM, Caleffi-Ferracioli KR, Siqueira VLD, Scodro RBL, Cardoso RF (2017) Influence of the identification of contacts on the adherence of index tuberculosis cases to treatment in a high incidence country. *Int J Infect Dis* 65: 57-62.
- Ghulam H, Kadri SM, Manzoor A, Waseem Q, Aatif MS, Khan GQ, Manish K (2009) Status of zinc in pulmonary tuberculosis. *J Infect Dev Ctries* 3: 365-368. DOI: <https://doi.org/10.3855/jidc.244>
- Visser ME, Grewal HM, Swart EC, Dhansay MA, Walzl G, Swanevelder S, Lombard C, Maartens G (2011) The effect of vitamin A and zinc supplementation on treatment outcomes in pulmonary tuberculosis: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 93: 93-100.
- Arnedo-Pena A, Juan-Cerdán JV, Romeu-García A, García-Ferrer D, Holguín-Gómez R, Iborra-Millet J, Herrero-Carot C, Piñana MJ, Bellido-Blasco J, Ferrero-Vega JA, Adsuara LS, Silvestre ES, Ferrer NM, Bartual VR (2011) Latent tuberculosis infection, tuberculin skin test and vitamin D status in contacts of tuberculosis patients: a cross-sectional and case-control study. *BMC Infect Dis* 11: 349.
- World Health Organization (WHO) (2013) Guideline: Nutritional care and support for patients with tuberculosis. Geneva (Switzerland). Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK189867/>. Accessed: 19 September 2018.
- Fox GJ, Barry SE, Britton WJ, Marks GB (2013) Contact investigation for tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 41: 140-156.
- World Health Organization (WHO) (2013) BMI cut off points by the World Health Organization: Global Database on Body Mass Index (BMI). Geneva (Switzerland). Available <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>. Accessed: 04 April 2019.
- World Health Organization (WHO) (2008) Waist circumference and waist-hip ratio: Report of a WHO expert consultation. Geneva (Switzerland). Technical report, World Health Organization. Available https://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_report_waistcircumference_and_waisthip_ratio/en/. Accessed: 10 October 2018.
- Bourges H, Casanueva E, Rosado JL (2005) Recommendations of ingestion of nutrients for the Mexican population. *Physiological Bases*, 1st edition. México: Editorial Médica Panamericana S.A. 430 p. [Book in Spanish].
- World Health Organization (WHO) (2012) Recommendations for investigating contacts of persons with infectious tuberculosis in low- and middle-income countries. Geneva (Switzerland). Available <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK179062/>. Accessed: 08 October 2018.
- Fair E, Miller CR, Ottmani SE, Fox GJ, Hopewell PC (2015) Tuberculosis contact investigation in low- and middle-income countries: standardized definitions and indicators. *Int J Tuberc Lung Dis* 19: 269-272.
- Tanimura T, Jaramillo E, Weil D, Raviglione M, Loonroth K (2014) Financial burden for tuberculosis patients in low- and middle-income countries: a systematic review. *Eur Respir J* 43: 1763-1775.
- Sanchez-Barriga JJ (2015) Mortality trends and risk of dying from pulmonary tuberculosis in the 7 socioeconomic regions and the 32 States of Mexico, 2000-2009. *Arch Bronconeumol* 51: 16-23.
- Rtveladze K, Marsh T, Barquera S, Sanchez Romero LM, Levy D, Melendez G, Webber L, Kilpi F, McPherson K, Brown M (2014) Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden. *Public Health Nutr* 17: 233-239.
- Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M (2012) National survey of health and nutrition 2012. National results. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX) [Article in Spanish]. Available <https://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012Resultados Nacionales.pdf> Accessed: 20 December 2018.
- Salas R, Bibiloni MM, Ramos E, Villarreal JZ, Pons A, Tur JA, Sureda A (2014) Metabolic syndrome prevalence among Northern Mexican adult population. *PLoS One* 20: e105581.
- Frediani JK, Sanikidze E, Kipiani M, Tukvadze N, Hebbar G, Ramakrishnan U, Jones DP, Easley KA, Shenvi N, Kempker RR, Tangpricha V, Blumberg HM, Ziegler TR (2016) Macronutrient intake and body composition changes during anti-tuberculosis therapy in adults. *Clin Nutr* 35: 205-212.

22. Mupere E, Parraga IM, Tisch DJ, Mayanja HK, Whalen CC (2012) Low nutrient intake among adult women and patients with severe tuberculosis disease in Uganda: a cross-sectional study. *BMC Public Health* 12: 1050.
23. Bernabe-Ortiz A, Carcamo CP, Sanchez JF, Rios J (2011) Weight variation over time and its association with tuberculosis treatment outcome: a longitudinal analysis. *PLoS One* 6: e18474.
24. Portillo K, Morera J (2012) Nutritional status and eating disorders: neglected risks factor for nontuberculous mycobacterial lung disease? *Med Hypotheses* 78: 39-41.
25. Huxley R, Mendis S, Zheleznyakov E, Reddy S, Chan J (2010) Body mass index, waist circumference and waist:hip ratio as predictors of cardiovascular risk – a review of the literature. *Eur J Clin Nutr* 64: 16-22.
26. Papatthakis P, Piwoz E (2013) USAID/Africa's health for 2010. Washington, DC: Agency for International Development; 2008. Nutrition and tuberculosis: a review of the literature and considerations for TB control programs. Available http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNADL992.pdf. Accessed: 03 October 2018
27. Kant S, Gupta H, Ahluwalia S (2015) Significance of nutrition in pulmonary tuberculosis. *Crit Rev Food Sci Nutr* 55: 955-963.
28. Stober CB, Lammas DA, Li CM, Kumararatne DS, Lightman SL, McArdle CA (2001) ATP-mediated killing of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin within human macrophages is calcium dependent and associated with the acidification of mycobacteria-containing phagosomes. *J Immunol* 166: 6276-6286.
29. Majeed M, Perskvist N, Ernst JD, Orselius K, Stendahl O (1998) Roles of calcium and annexins in phagocytosis and elimination of an attenuated strain of *Mycobacterium tuberculosis* in human neutrophils. *Microb Pathog* 24: 309-320.
30. Chan TY, Chan CH (1994) Abnormal calcium and vitamin D metabolism in tuberculosis. *Trop Geogr Med* 46: 280-282.
31. Tam M, Gómez S, González-Gross M, Marcos A (2003) Possible roles of magnesium on the immune system. *Eur J Clin Nutr* 57: 1193-1197.
32. Prasad AS (2008) Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Mol Med* 14: 353-357.
33. Ali W, Ahmad I, Srivastava VK, Prasad R, Kushwaha RA, Saleem M (2014) Serum zinc levels and its association with vitamin A levels among tuberculosis patients. *J Nat Sci Biol Med* 5: 130-134.
34. Oh J, Choi R, Park HD, Lee H, Jeong BH, Park HY, Jeon K, Kwon OJ, Koh WJ, Lee SY (2017) Evaluation of vitamin status in patients with pulmonary tuberculosis. *J Infect* 74: 272-280.
35. Tyagi G, Singh P, Varma-Basil M, Bose M (2017) Role of Vitamins B, C, and D in the fight against tuberculosis. *Int J Mycobacteriol* 6: 328-332.
36. Pakasi TA, Karyadi E, Wibowo Y, Simanjuntak Y, Suratih NM, Salean M, Darmawidjaja N, van der Meer JW, van der Velden K, Dolmans WM (2009) Vitamin A deficiency and other factors associated with severe tuberculosis in Timor and Rote Islands, East Nusa Tenggara Province, Indonesia. *Eur J Clin Nutr* 63: 1130-1135.
37. Karyadi E, West CE, Schultink W, Nelwan RH, Gross R, Amin Z, Dolmans WM, Schlebusch H, van der Meer JW (2002) A double-blind, placebo-controlled study of vitamin A and zinc supplementation in persons with tuberculosis in Indonesia: effects on clinical response and nutritional status. *Am J Clin Nutr* 75: 720-727.
38. Christian P, West KP (1998) Interactions between zinc and vitamin A: an update. *Am J Clin Nutr* 68 Suppl 2: 435-441.
39. Hemilä H, Louhiala P (2013) Vitamin C for preventing and treating pneumonia. *Cochrane Database Syst Rev* 8: CD005532.
40. Hemilä H, Chalker E (2013) Vitamin C for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database Syst Rev* 31: CD000980.
41. Pawar BD, Suryakar AN, Khandelwal AS (2011) Effect of micronutrients supplementation on oxidative stress and antioxidants in pulmonary tuberculosis. *Biomed Res* 22: 455-459.
42. Miric D, Katanic R, Miric B, Kistic B, Popovic-Katanic N, Nestorovic V (2013) Changes in vitamin C and oxidative stress status during the treatment of tuberculous meningitis. *Int J Tuberc Lung Dis* 17: 1495-500.
43. Cojutti P, Duranti S, Isola M, Baraldo M, Viale P, Bassetti M, Pea F (2016) Might isoniazid plasma exposure be a valuable predictor of drug-related hepatotoxicity risk among adult patients with TB? *J Antimicrob Chemother* 71: 1323-1329.
44. Raghu R, Karthikeyan S (2016) Zidovudine and isoniazid induced liver toxicity and oxidative stress: Evaluation of mitigating properties of silibinin. *Environ Toxicol Pharmacol* 46: 217-226.
45. Machado D, Couto I, Perdigo J, Rodrigues L, Portugal I, Baptista P, Veigas B, Amaral L, Viveiros M (2012) Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 7: e34538.
46. Snider Jr DE (1980) Pyridoxine supplementation during isoniazid therapy. *Tubercle* 61: 191-196.
47. Zhou Y, Jiao Y, Wei YH, Zhang GR, Zhang JP, Ren JX, Zhang F, Zhang GQ, Duan HG, Wu XA (2013) Effects of pyridoxine on the intestinal absorption and pharmacokinetics of isoniazid in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 38: 5-13.
48. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2016) Highlights from the 2016 treatment of drug-susceptible tuberculosis guidelines 2016. Available <https://www.cdc.gov/tb/topic/treatment/guidelinehighlights.htm> Accessed: 12 November 2018
49. Rodà D, Rozas L, Fortuny C, Sierra C, Noguera-Julian A (2016) Impact of the increased recommended dosage of isoniazid on pyridoxine levels in children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J* 35: 586-589.
50. Maggini S, Wintergerst ES, Beveridge S, Hornig DH (2007) Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *Br J Nutr* 98 Suppl 1: 29-35.

Corresponding author

Professor Eduardo Campos Góngora, PhD.
 Head of Proteomics Lab; Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública; Universidad Autónoma de Nuevo León.
 Av. Dr. Eduardo Aguirre Pequeño/Yuriria,
 Col. Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, México.
 CP. 64460
 Tel: +(81) 1340 4890, 1340 4891, ext: 3062
 Fax: +(81) 8348 6080
 Email: educampos@hotmail.com; eduardo.camposg@uanl.mx

Conflict of interests: No conflict of interests is declared.