



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ABSORCIÓN, BIOTRANSFORMACIÓN Y EXCRECIÓN DE
POLIFENOLES PROVENIENTES DE BEBIDAS
ELABORADAS CON FRUTOS ROJOS EN RATAS
ALIMENTADAS CON UNA DIETA OBESOGÉNICA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ANA PAOLA CASTAÑÓN SERVÍN

DIRIGIDA POR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

CODIRIGIDA POR

M.C. ANA MARÍA SOTELO GONZÁLEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2023.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Absorción, biotransformación y excreción de
polifenoles provenientes de bebidas elaboradas con
frutos rojos en ratas alimentadas con una dieta
obesogénica.

por

Ana Paola Castañón Servín

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQLIN-251578



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ABSORCIÓN, BIOTRANSFORMACIÓN Y EXCRECIÓN DE
POLIFENOLES PROVENIENTES DE BEBIDAS
ELABORADAS CON FRUTOS ROJOS EN RATAS
ALIMENTADAS CON UNA DIETA OBESOGÉNICA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

ANA PAOLA CASTAÑÓN SERVÍN

DIRIGIDA POR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

CODIRIGIDA POR

M.C. ANA MARÍA SOTELO GONZÁLEZ

SINODALES

**Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO
DIRECTOR**

**M.C. ANA MARÍA SOTELO GONZÁLEZ
CODIRECTOR**

**Dra. IZA FERNANDA PÉREZ RAMÍREZ
SINODAL**

**Dra. MINERVA RAMOS GOMEZ
SINODAL**

Four horizontal lines with handwritten signatures in blue ink above them, corresponding to the four sinodal members listed on the left.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Obesidad.....	1
1.2 Estrés oxidativo en la obesidad.....	2
1.3 Capacidad antioxidante.....	3
1.4 Compuestos polifenólicos	4
1.5 Metabolismo de los compuestos polifenólicos	5
1.5.1 Absorción de los compuestos polifenólicos	6
1.5.2 Biotransformación de los compuestos polifenólicos	7
1.5.3 Excreción de los compuestos polifenólicos	9
1.6 Frutos rojos	9
1.6.1 Fresa.....	10
1.6.2 Mora azul	11
1.7 Biomarcadores de consumo de compuestos polifenólicos.....	12
2. HIPÓTESIS	1
3. OBJETIVOS	2
3.1 General	2
3.2 Específicos.....	2
4. METODOLOGÍA.....	3
4.1 Material de estudio.....	3
4.2 Métodos	4
4.2.1 Determinaciones en muestras de orina obtenidas de ratas alimentadas con una dieta obesogénica y suplementadas con bebidas elaboradas con frutos rojos	4

4.2.1.1 Extracción de compuestos polifenólicos.....	4
4.2.1.2 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales	4
4.2.1.3 Determinación del contenido de flavonoides totales	5
4.2.1.4 Identificación del perfil de metabolitos de polifenoles	5
4.2.1.5 Determinación de la capacidad antioxidante.....	6
4.2.2 Análisis estadístico.	7
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
5.1 Cuantificación urinaria de compuestos fenólicos totales en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas de decocciones de frutos rojos.	8
5.3 Perfil de metabolitos de polifenoles urinarios en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas de decocciones de frutos rojos.	12
5.4 Capacidad antioxidante en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas de decocciones de frutos rojos.	22
5. CONCLUSIONES.....	26
7. REFERENCIAS	27
ANEXOS.....	34
Anexo 1. Consumo promedio de polifenoles totales en la dieta de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas de decocciones de frutos rojos.....	34
Anexo 2. Top 25 de los discriminantes del Componente 1 del Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales Dispersos de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementado con bebidas a base de decocciones de frutos rojos.	35
Anexo 3. Top 25 de los discriminantes del Componente 2 del Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales Dispersos de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementado con bebidas a base de decocciones de frutos rojos.	36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Metabolitos urinarios de polifenoles en ratas alimentadas con una dieta rica en grasa y fructosa, suplementadas con bebidas de fresa, mora azul y mezcla de fresa-mora azul.	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Biotransformación de los compuestos polifenólicos.	8
2. Contenido de polifenoles totales en orina de animales alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas de decocciones de frutos rojos.	9
3. Concentración de flavonoides totales en orina de animales alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con las bebidas de decocciones de frutos rojos.	11
4. Gráfico bidimensional del modelo de análisis de componentes principales (A) y gráfico de doble proyección (B) de metabolitos de polifenoles.	17
5. Gráfico bidimensional del modelo de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales dispersos (sPLS-DA; A), características discriminantes del componente 1 del sPLS-DA (B) y características discriminantes del componente 2 del sPLS-DA (C) de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas a base de decocciones de frutos rojos.	19
6. Gráfico de clúster de K-means de metabolitos de polifenoles urinarios de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas a base de decocciones de frutos rojos.	20
7. Análisis jerárquico de clúster (A) y componentes discriminantes de K-means (B) de metabolitos de polifenoles urinarios de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas a base de decocciones de frutos rojos.	21
8. Capacidad de atrapamiento del radical DPPH.	23
9. Capacidad de atrapamiento del radical ABTS.	24

RESUMEN

La fresa y mora azul son los frutos rojos más consumidos a nivel mundial debido a sus características organolépticas y su alto contenido de polifenoles. En un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, se elaboraron bebidas a base de decocciones de fresa, mora azul y fresa-mora azul, las cuales presentaron alta concentración de compuestos polifenólicos. Dichas bebidas se evaluaron en modelos animales de ratas suplementadas durante 18 semanas con las bebidas y alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa, encontrando que disminuyeron los niveles de triglicéridos en suero y mejoró la resistencia a insulina. Sin embargo, se desconoce qué polifenoles podrían estar asociados a los efectos benéficos observados. El objetivo de este proyecto fue analizar la absorción de polifenoles mediante su excreción en orina, así como su capacidad antioxidante. Se realizó la extracción de los metabolitos para determinar el contenido de polifenoles totales y el perfil de metabolitos por medio de cromatografía de líquidos de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas de cuadrupolo/tiempo-de-vuelo. Se determinó la capacidad antioxidante en orina por medio de la capacidad de atrapamiento por DPPHy ABTS. Se identificaron 50 metabolitos asociados al metabolismo de polifenoles, en donde la excreción de metabolitos de elagitaninos aumento con la bebida de fresa; las bebidas de mora azul y fresa-mora azul aumentaron la excreción de enterolactona. La suplementación con la bebida de mora azul mostró mayor capacidad antioxidante comparado con la bebida de fresa. Las bebidas elaboradas con decocciones de frutos rojos presentan un alto contenido y variedad de polifenoles biodisponibles con capacidad antioxidante, lo cual podría asociarse con los beneficios observados en el control de la obesidad y sus complicaciones.

1. ANTECEDENTES

1.1 Obesidad

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2021) define a la obesidad como la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Actualmente, la obesidad se considera una enfermedad crónica de dos tipos, endógena si es provocada por la alteración de alguna glándula endócrina o exógena si se debe a un exceso en la ingesta de alimentos con alto contenido calórico y hábitos sedentarios (SSA, 2018).

Este tipo de enfermedad afecta a todos los sectores de la población, desde niños hasta adultos mayores y, en los últimos años, ha aumentado exponencialmente, lo que es preocupante ya que la obesidad es un factor de riesgo importante para el desarrollo de distintas enfermedades crónicas (OMS, 2021). En el año 2008 una de cada diez personas mayores de 20 años era obesa en el mundo (Hernández, 2019); mientras que en el 2016 se estimó que más de 650 millones de adultos eran obesos, lo que correspondía al 13% de la población mundial, por lo que la prevalencia de obesidad aumentó tres veces en comparación con la década anterior, fenómeno que fue observado tanto en países de altos nivel socioeconómico como en países en vías de desarrollo (OMS, 2021).

En el año 2018, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) dio a conocer que dentro de la población mexicana la cifra de obesidad en niños en edades de 5 a 11 años fue del 17.5%, mientras que en edades de 12 a 19 años representaba el 14.6%. Con respecto a los adultos de 20 años y más, el porcentaje de personas con obesidad fue del 36.1% (SSA, 2018).

La obesidad, al ser un desbalance entre el consumo de alimentos y del gasto energético, produce la acumulación de triglicéridos en el tejido adiposo, generando procesos de estrés oxidativo (EO) debido a la expansión del tejido adiposo, lo que

conduce a la disminución del suministro de oxígeno de algunos adipocitos hasta llegar a la necrosis. La muerte del tejido desencadena procesos inflamatorios con el fin de eliminar las células dañadas; sin embargo, al tener una continua acumulación de ácidos grasos, es posible que se produzca una inflamación sistémica (León-Pedroza y col., 2015).

1.2 Estrés oxidativo en la obesidad

En el metabolismo celular se producen comúnmente radicales libres, los cuales son especies altamente reactivas ya que contienen uno o más electrones no apareados, por lo que tienden a interactuar con moléculas donando o capturando electrones con el fin de formar una configuración más estable. El anión superóxido, el óxido nítrico, el dióxido de nitrógeno, los radicales hidroxilos, entre otros, son radicales libres cuyo efecto es provocar daño oxidativo en tejidos, así como ciertas alteraciones en la estructura de diversas biomoléculas (Carvajal, 2019).

Cuando el cuerpo se encuentra dentro de una condición de salud normal, la cantidad de radicales libres es baja ya que el cuerpo cuenta con sistemas antioxidantes que inhiben los mecanismos de activación de los radicales o activan mecanismos de neutralización de su acción oxidante, protegiendo los tejidos de daño oxidativo (Quirós y col., 2011). Sin embargo, existen condiciones en las que estos sistemas no son suficientes para contrarrestar a las especies reactivas, generando un estado sistémico de EO.

El EO está asociado al desarrollo de distintos padecimientos como lo es el cáncer, las enfermedades cardíacas, las enfermedades neurodegenerativas y la diabetes *mellitus* (Forman y Zhang, 2021). En un estado de salud sano, los adipocitos almacenan y utilizan energía, a la vez que regulan otros tejidos metabólicos, sin embargo, cuando existe obesidad, se da un aumento de las especies reactivas del oxígeno en el tejido adiposo, las cuales pueden alterar la diferenciación de los adipocitos y su función. Por lo tanto, el tejido adiposo se expande, provocando un

incremento de la lipotoxicidad, inflamación, fibrosis, hipoxia, una secreción alterada de adipocinas y una disfunción mitocondrial (Longo y col., 2019, Perez-Torres y col., 2021).

1.3 Capacidad antioxidante

El EO puede provocar daños significativos en las células a través de las especies reactivas y radicales libres, los cuales modifican las estructuras de las macromoléculas, promoviendo un estado inflamatorio, la inducción de apoptosis y otros mecanismos celulares (Forman y Zhang, 2021).

Los mecanismos endógenos de defensa antioxidante con los que cuenta el organismo son diversos y altamente efectivos, entre ellos se encuentran proteínas que transportan radicales libres, enzimas reductoras, cosustratos antioxidantes que reducen parcialmente a los radicales libres; sin embargo, a través de la dieta es posible adquirir antioxidantes exógenos, como los compuestos polifenólicos (Liguori y col., 2018).

Los polifenoles actúan captando radicales libres al donar protones (H^+) o electrones (e^-) a las reacciones encargadas de formar nuevos radicales libres o actuando como quelantes de metales, ya que los grupos hidroxilos de su estructura secuestran iones metales impidiendo que catalicen las reacciones de oxidación. La función antioxidante de los polifenoles consiste en la reducción de las especies reactivas del oxígeno (EROS) por medio de la inhibición de enzimas oxidantes. Dichos polifenoles como la apocinina, el resveratrol y la curcumina inhiben la NADPH oxidasa disminuyendo la formación de O_2^- . Así mismo, distintos compuestos fenólicos pueden inhibir la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa y la óxido nítrico sintasa (Yahfoufi y col., 2018).

La función antioxidante de los compuestos bioactivos puede evaluarse por medio de técnicas de laboratorio como la capacidad antioxidante total tanto en fluidos, tejidos

o células. Los métodos de evaluación se basan en la inhibición del poder oxidante de una molécula, en donde se valora la habilidad de los compuestos antioxidantes presentes en las muestras para reducir las especies oxidantes introducidas. Los compuestos polifenólicos y sus metabolitos se reconocen por su alta capacidad antioxidante debido a los mecanismos anteriormente mencionados, así como por la estimulación de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa (Yahfoufi y col., 2018), por lo que son estudiados en gran medida con el fin de demostrar sus efectos benéficos a la salud en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y en la obesidad (Cipolletti y col., 2018).

1.4 Compuestos polifenólicos

Los compuestos polifenólicos son moléculas de origen vegetal que se producen a partir del metabolismo secundario de las plantas y cuya regulación se encuentra mediada ambientalmente. Estas sustancias químicas se producen inicialmente como metabolitos secundarios de las plantas, variando su cantidad en las distintas etapas de madurez o condiciones de estrés en las que se encuentre la misma, como la presencia de plagas, ya que los compuestos polifenólicos también actúan como mecanismo de defensa ante ellas (Leri y col., 2020).

Los polifenoles se clasifican de diversas maneras a partir de su estructura, ya que este tipo de compuestos se encuentran conformados por un distinto número de anillos aromáticos y una gran variedad de grupos funcionales. Entre dichos compuestos se encuentran las subfamilias de flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos, estilbenos y taninos (Fabbrini y col., 2022). Los flavonoides son los compuestos polifenólicos más abundantes y se dividen en los subgrupos flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles. Los ácidos fenólicos son derivados del ácido hidroxibenzoico y del ácido hidroxicinámico (Singla y col., 2019).

Los compuestos polifenólicos aportan distintos atributos organolépticos, contribuyendo en el color, olor y sabor de los alimentos y las bebidas que los

contienen, por lo que en los últimos años se han utilizado ampliamente como aditivos alimenticios. Además de esto, los compuestos polifenólicos tienen diversas propiedades con beneficios a la salud al inhibir la proliferación celular y propiedades antiinflamatorias, antibióticas, entre otras. De manera importante, destaca su capacidad antioxidante ya que, debido a ésta, los polifenoles brindan un efecto protector ante enfermedades relacionadas al EO, como lo son las enfermedades cardiovasculares (Pap y col., 2021).

1.5 Metabolismo de los compuestos polifenólicos

Se conoce como metabolismo al conjunto de reacciones químicas que son llevadas a cabo en el interior de las células y que involucran sustancias tanto exógenas como endógenas (Lozano y col., 2011). Los compuestos polifenólicos son transformados en distintas etapas tras su ingesta, iniciando por la desglicosilación en la cavidad bucal, proceso que metaboliza una baja cantidad de polifenoles (Lavefve y col., 2020). Posteriormente, cuando los polifenoles llegan al intestino delgado, algunos de ellos sufren modificaciones estructurales para poder ser absorbidos por difusión pasiva. Cuando los polifenoles cuentan con un grupo glucósido deben hidrolizarse para su transformación en agliconas; este proceso puede realizarse por dos enzimas, la lactasa-florizina hidrolasa (LPH) o la β -glucosidasa citosólica (CBG).

La LPH, al encontrarse al borde de los enterocitos, desglicosila polifenoles favoreciendo así su ingreso (Marhuenda-Muñoz y col., 2019). Para que la CBG pueda actuar, es necesario que los compuestos polifenólicos sean transportados a través del epitelio por medio de transportadores de azúcar como lo es la glicoproteína P y los cotransportadores de sodio y glucosa (SGLT1) (Hussain y col., 2019), ya que la CBG se encuentra dentro del eritrocito.

Sólo las agliconas y algunos glucósidos intactos son absorbidos en el intestino delgado; por consiguiente, los polifenoles que no son absorbidos debido a su patrón de glicosilación y del grado de polimerización, llegan al colon en donde diferentes

microorganismos presentes degradan los compuestos, destruyendo los anillos aromáticos y liberando agliconas absorbibles. Los metabolitos microbianos que se absorben en el colon son transportados al hígado a través de la vena porta, para finalmente someterse a excreción fecal (Hussain y col., 2019). Adicionalmente, la microbiota colónica también puede actuar sobre las agliconas para la formación de nuevas moléculas, que son absorbidas y distribuidas en el organismo (Marhuenda-Muñoz y col., 2019). Una vez absorbidas, los polifenoles y sus metabolitos llegan a hígado, ya que son metabolizados como xenobióticos, en donde sufren diversas reacciones metabólicas de biotransformación, las cuales se clasifican en reacciones de fase I y reacciones de fase II (Fabbrini y col., 2022).

1.5.1 Absorción de los compuestos polifenólicos

La absorción es el proceso que se lleva a cabo tras la digestión de los alimentos, cuando los nutrientes atraviesan el lumen intestinal con el fin de llegar al torrente sanguíneo. Éste se realiza principalmente en el intestino delgado, habiendo mayor absorción en el duodeno y el yeyuno, aunque el lugar en donde se absorba dependerá del tipo de compuesto (Barrett y col., 2013).

Para que los compuestos polifenólicos sean absorbidos, es necesario que muchos de ellos sean biotransformados ya que ciertas características estructurales como el grado de glicosilación, acetilación, metilación, polimerización y solubilidad hacen que sean difíciles de absorber. Existen compuestos polifenólicos que cuentan con glicosilaciones, los cuales como se mencionó en el apartado anterior, son hidrolizados enzimáticamente para generar agliconas, las cuáles pueden ser absorbidas en la luz intestinal. Si bien los flavonoides acetilados pueden ser absorbidos en el intestino delgado sin ninguna modificación; la mayoría de los polifenoles necesitan ser metabolizados por la microbiota colónica para ser absorbidos (Gutiérrez y col., 2016).

La absorción de compuestos polifenólicos se lleva a cabo en menor medida en la boca y en el estómago, seguido del intestino delgado, siendo el colón el lugar en donde se absorben la mayor cantidad de metabolitos fenólicos. En la literatura se ha reportado que únicamente se absorbe en el intestino delgado del 5 al 10% del total de polifenoles consumidos, mientras que; el 90 a 95% de estos compuestos terminará en la luz del intestino grueso junto con otros conjugados excretados por la bilis (Sharif y col., 2020).

1.5.2 Biotransformación de los compuestos polifenólicos

La biotransformación que sufren los polifenoles (Figura 1) es el cambio de compuestos lipofílicos en compuestos hidrofílicos y se lleva a cabo con el fin de que los polifenoles puedan ser absorbidos y excretados fácilmente (Hussain y col., 2019). Cuando los compuestos polifenólicos más simples son absorbidos, sufren dos fases de biotransformación diferentes. Las biotransformaciones de fase I incluyen oxidaciones, reducciones o hidrólisis, mientras que la biotransformación de fase II también llamada conjugación, genera reacciones de metilación, glucuronidación y sulfatación (Sharif y col., 2020).

La biotransformación de fase I tiene como finalidad incrementar la polaridad del compuesto para hacerlo más soluble por medio de la adición de grupos amino, carboxilo e hidroxilo. Así mismo, en esta fase las reacciones de hidrólisis actúan sobre los grupos funcionales ésteres carboxílicos, amidas y lactonas por medio del uso de enzimas como LPH que hidroliza la galactosa y la glucosa (Hussain y col., 2019).

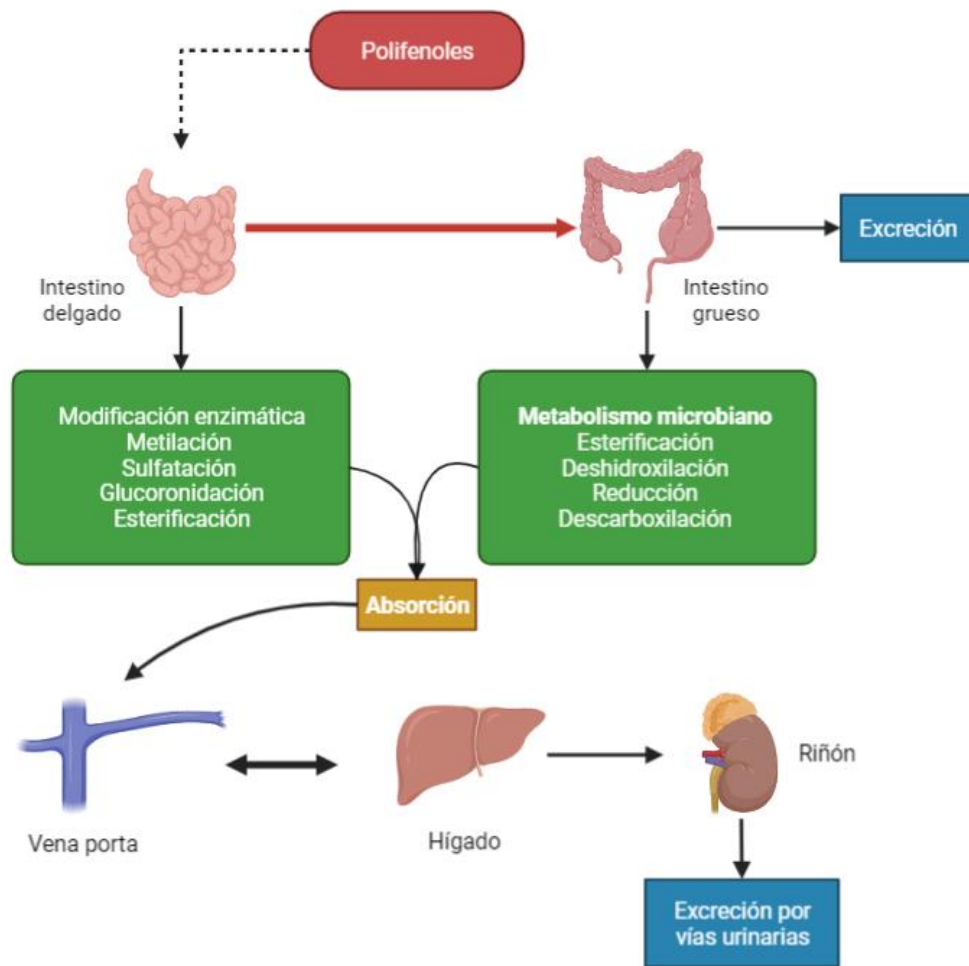


Figura 1. Biotransformación de los compuestos polifenólicos. Adaptado de Cipolletti y col., 2018.

El proceso de biotransformación de fase II mejora significativamente la absorción de las moléculas al incorporar radicales químicos pertenecientes a moléculas endógenas. En la glucuronidación, la enzima UDP glucuronil transferasa reacciona con fenoles y alcoholes alifáticos (Gutiérrez y col., 2016). La reacción de metilación realizada por la enzima catecol O-metiltransferasa (COMT), a diferencia de las demás reacciones, disminuye la hidrosolubilidad de los compuestos fenólicos y los hace más resistentes a reacciones metabólicas y, por lo tanto, es necesario que se realice la glucoronidación y sulfatación de sus estructuras para su eliminación (Hussain y col., 2019).

1.5.3 Excreción de los compuestos polifenólicos

Los polifenoles que no pudieron ser absorbidos en el intestino delgado terminan siendo excretados a través de la bilis en las heces. Mientras que los polifenoles que fueron absorbidos, biotransformados y que se encuentran en circulación son eliminados del torrente sanguíneo por medio de su excreción en la orina. El perfil de metabolitos polifenólicos excretados puede ser variado ya que depende de distintos factores tales como la edad, el estrés, las enfermedades, la dieta, el tipo de microbiota colónica en el huésped y la cantidad de moléculas transportadoras (Quirós y col., 2011). Como ya se mencionó en apartados anteriores, los polifenoles pueden generar beneficios a la salud al transformarse y absorberse en el organismo, por lo tanto, se sugiere el aumento de su consumo en la dieta. Este incremento puede obtenerse mediante el consumo de plantas que presenten un gran contenido de compuestos polifenólicos como lo son las bayas o frutos rojos (Silva, 2020).

1.6 Frutos rojos

Los frutos rojos contienen una gran cantidad de fitoquímicos con capacidad antioxidante, cuyo consumo contribuye en la disminución del riesgo de desarrollar enfermedades crónico degenerativas; por este motivo, dichos frutos se consideran dentro de la categoría de alimentos funcionales, la cual se define como alimentos naturales o elaborados que, además de tener propiedades nutricionales, desempeñan funciones específicas para prevenir o reducir el riesgo de contraer enfermedades (Restrepo y col., 2010).

Entre los compuestos antioxidantes presentes en los frutos rojos se encuentran la vitamina C, la vitamina E y los compuestos polifenólicos (Olas, 2018). En los últimos años se ha extendido el interés por investigar el contenido de antioxidantes en frutos rojos como la fresa y mora azul, siendo ambas fuentes importantes de compuestos

polifenólicos como los flavonoides, especialmente de antocianinas (Miller y col., 2019).

1.6.1 Fresa

La fresa es una infrutescencia perteneciente a la familia de las rosáceas. En México, esta frutilla alcanzó un alto consumo anual per cápita correspondiente a 7.7 kg de frutilla en el año 2020 (SIAP, 2020). Fotirić y col. (2019) cuantificaron 11 compuestos polifenólicos en tres variedades de fresa, siendo el ácido ferúlico, la quercetina y la quercetina 3-O-galactósido los compuestos con mayor concentración. Cabe destacar que los principales compuestos flavonoles identificados en las fresas son glucósidos y glucorónidos de quercetina y kaempferol (Baby y col., 2018).

Las antocianinas son otro tipo de compuestos importantes presentes en las fresas, siendo la pelargonidina 3-O-glucósido el componente mayoritario de esta familia. Los elagitaninos son compuestos poliméricos pertenecientes a la familia de taninos hidrolizables que se encuentran en altas concentraciones en la fresa y, debido a su gran capacidad antioxidante, resultan ser compuestos de gran interés en el desarrollo de alimentos y bebidas funcionales (Luca y col., 2019). Otro tipo de polifenoles presentes en las fresas son las proantocianinas, los cuales se clasifican como taninos condensables; y que han demostrado inducir efectos antiinflamatorios, anticancerígenos y antienvjecimiento (Lin y col., 2023).

En nuestro grupo de trabajo, Sotelo-González y col. (2023) demostraron que la suplementación durante 18 semanas con una bebida de decocción de fresa rica en polifenoles en un modelo de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa disminuyó la hipertrigliceridemia y la acumulación de triglicéridos hepáticos. Sandoval-Salazar y colaboradores (2019) informaron que la suplementación durante 8 semanas con 0.2% de un extracto de fresa a ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, disminuyó la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas.

1.6.2 Mora azul

La mora azul es un fruto que pertenece al género *Vaccinium*, que se obtiene a partir de un arbusto caducifolio. En México, este fruto es consumido principalmente en una mezcla con otros frutos conocido como frutas del bosque, el cual incluye zarzamora, frambuesa y mora azul. Para el año 2016, la demanda total del consumo nacional de esta mezcla de frutos fue de 231.09 toneladas (SAGARPA, 2017); mientras que el consumo anual per cápita de la mora azul fue de 101 g en 2020 (SIAP, 2020).

La mora o arándano azul contiene una gran cantidad de compuestos, siendo especialmente rica en antocianinas, las cuales son responsables de su color característico. Así mismo, este fruto presenta un alto contenido de flavonoides, taninos y otros ácidos fenólicos, siendo estos compuestos a los que se les atribuye las propiedades del arándano para disminuir el daño provocado por las enfermedades cardiovasculares, el envejecimiento y algunas actividades antitumorales (Silva y col., 2020).

Con respecto a su contenido de compuestos polifenólicos, Fotirić y col. (2019) comprobaron que existe un mayor contenido de compuestos fenólicos totales y antocianinas en este tipo de baya (2.27–6.26 g eq AG/kg) (equivalentes de ácido gálico) en comparación de la fresa (1.18–2.27 g eq AG/kg), razón por la cual se ha prestado especial interés en la elaboración de productos a base de este fruto.

Diversos estudios *in vivo* y clínicos han realizado investigaciones con el fin de probar los efectos anti obesogénicos de la mora azul en fresco y de sus extractos. En nuestro grupo de trabajo, se demostró que la suplementación con bebidas elaboradas a base de decocción de mora azul previene el desarrollo de hipertrigliceridemia asociada a la obesidad en un modelo *in vivo* (Sotelo-González y col., 2023). Lo anterior podría estar relacionado a la capacidad antioxidante de sus compuestos polifenólicos, principalmente de las antocianinas, las cuales han demostrado efectos benéficos en la reducción del estrés oxidativo y la inflamación.

Wu y colaboradores (2018) demostraron lo anterior mediante un estudio con ratones C57BL/6 con obesidad inducida mediante una dieta rica en grasas, los cuales fueron suplementados con antocianinas de zarzamora y mora azul, disminuyendo los niveles lipídicos en suero e hígado, además de un incremento de la actividad enzimática de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa.

1.7 Biomarcadores de consumo de compuestos polifenólicos

Un biomarcador es una molécula indicadora de exposición, efecto o estado de enfermedad que puede ser medida en muestras de sangre, plasma, orina, saliva, heces y tejidos (Corella y col., 2015). Los polifenoles producen una serie de metabolitos comunes en la circulación que pueden formarse a partir de otras fuentes de la dieta, por lo que la cantidad de biomarcadores que se tienen de los compuestos fenólicos es limitada. Actualmente, se conoce que la quercetina urinaria puede servir como biomarcador del flavonoide quercetina, asimismo, el ácido isoferúlico es un biomarcador de la ingesta de ácido cafeico ya que solo se produce a partir de la 4-metoxilación del ácido cafeico (Spencer y col., 2008).

Con respecto a los biomarcadores de alimentos, se ha identificado que la epicatequina, el ácido clorogénico y el ácido gálico funcionan como biomarcadores de la ingesta de té, café y vino, respectivamente (Spencer y col., 2008), mientras que el ácido gálico y el ácido 4-O-metilgálico, la isoramnetina, el kaempferol, lahesperidina, la naringenina y la floretina urinarios pueden usarse para la cuantificación de la ingesta de jugos de frutas (Mennen y col., 2006). Ulaszewska y colaboradores (2020) reportaron diferentes metabolitos biomarcadores del consumo de diferentes matrices de frutos rojos como la fresa y mora azul, encontrados en estudios clínicos. Para el consumo de mora azul, principalmente se encontraron glucósidos de delfinidina y malvidina, algunos productos del metabolismo de fase II como el glucurónido de delfinidina, malvidina, peonidina y petunidina, así como algunos derivados de los ácidos benzoico, ferúlico, fenilpropiónico, ácido

fenilvalérico y de la fenil valerolactona. Respecto a la fresa, se encontraron principalmente metabolitos de la pelargonidina como glucurónido de pelargonidina, pelargonidina-3-O-glucósido y sulfato de pelargonidina. Por otro lado, se reportaron además compuestos aromáticos tales como furaneol y el mesifurano característicos de la fresa, así como también diferentes metabolitos microbianos tales como la urolitina B y A, tanto en sus formas glucoronizadas como urolitina B y A glucurónido.

2. HIPÓTESIS

Las bebidas elaboradas por nuestro grupo de trabajo, con decocciones de fresa y mora azul presentan un alto contenido de compuestos polifenólicos biodisponibles, los cuales al metabolizarse y excretarse mantendrán capacidad antioxidante, demostrando que el consumo de las bebidas funcionales, administradas a ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa, puede aumentar el potencial antioxidante.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Cuantificar los compuestos fenólicos e identificar los metabolitos absorbidos, así como la capacidad antioxidante en orina de ratas suplementadas con bebidas elaboradas con decocciones de frutos rojos y alimentadas con una dieta obesogénica.

3.2 Específicos

- Determinar la absorción de los compuestos polifenólicos consumidos por los animales suplementados con las bebidas elaboradas con decocciones de frutos rojos a partir de la cuantificación de compuestos fenólicos totales y flavonoides en muestras de orina.
- Caracterizar el perfil de metabolitos de polifenoles en muestras de orina obtenidas de ratas alimentadas con una dieta obesogénica y suplementadas con bebidas elaboradas con frutos rojos.
- Identificar biomarcadores de consumo asociados con el consumo de bebidas ricas en polifenoles elaboradas con decocciones de frutos rojos.
- Evaluar la disminución del estrés oxidativo que tienen los metabolitos polifenólicos excretados en orina de ratas suplementadas con las bebidas elaboradas con decocciones de frutos rojos por medio de su capacidad antioxidante.

4. METODOLOGÍA

4.1 Material de estudio

Este proyecto de investigación formo parte de un proyecto integral que se lleva a cabo en el Laboratorio de Bioquímica Molecular; por lo que, las muestras de orina que se analizaron se obtuvieron de un proyecto previamente registrado (Sotelo-González y col. 2023; número de registro al Comité de Bioética CBQ20/091). Durante dicho proyecto se elaboraron bebidas a base de decocciones de frutos de fresa, mora azul y fresa-mora azul (50/50), cortando rebanadas de 0.5 cm de espesor de dichos frutos, que se dejaron secar en un horno de circulación de aire forzado (Binder, BF 400) a 45 °C de 48 a 72 h. Posteriormente se usaron 50 g de cada fruta seca y se sometieron a un proceso de extracción con 1000 mL de agua a 95 °C con agitación constante durante 15 min. Las decocciones se filtraron y se ajustaron a un volumen de 1000 mL.

Las bebidas se evaluaron en un modelo *in vivo* con ratas macho Wistar de 160-180 g aleatorizadas en cinco grupos de 10 ratas cada uno: (i) control sano (alimentado con una dieta estándar), (ii) control obeso (alimentado con una dieta alta en grasa (20%) y fructosa (18%)), (iii) obeso + bebida de fresa, (iv) obeso + bebida de mora azul y (v) obeso + bebida de fresa-mora azul. Los animales de los grupos control consumieron agua potable *ad libitum*; mientras que, los animales de los grupos tratamiento recibieron las bebidas correspondientes de manera *ad libitum* durante 12 h al día. Tras 18 semanas de tratamiento, las ratas se alojaron en jaulas metabólicas para la recolección de orina y posteriormente se sacrificaron. Las muestras de orina se congelaron a -80 °C para su posterior análisis.

4.2 Métodos

4.2.1 Determinaciones en muestras de orina obtenidas de ratas alimentadas con una dieta obesogénica y suplementadas con bebidas elaboradas con frutos rojos

4.2.1.1 Extracción de compuestos polifenólicos

Se realizó la extracción de compuestos polifenólicos a partir de las muestras de orina utilizando cartuchos de extracción en fase sólida de 60 mg/ 3 mL (Supel-Select HLB SPE, 54184-U, Millipore Sigma, San Luis, Misuri, EUA). Para lo anterior, se activaron los cartuchos agregando 3 mL de metanol, seguidos de 3 mL de agua destilada. Posteriormente, se adicionaron 2 mL de muestra de orina, se realizó la elución de los compuestos de interés con 2 mL de una solución acuosa de ácido fórmico 1.5 M, 2 mL de agua:metanol 95:1 (v/v) y posteriormente metanol:ácido fórmico 99:1 (v/v). El eluyente se llevó a sequedad en un concentrador a vacío (Speedvac Savant, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachussets, EUA) a 35 °C y se resuspendió en 500 µL de metanol para su posterior caracterización (Roura y col., 2006 con modificaciones).

4.2.1.2 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales

La determinación de compuestos fenólicos totales se realizó por medio de un método espectrofotométrico. Se tomaron 10 µL de muestra y se mezclaron con 25 µL de reactivo de Folin Ciocalteu 1 N, 125 µL de carbonato de sodio al 5% y 40 µL de agua en una microplaca. La mezcla de reacción se dejó reposar a temperatura ambiente y a obscuras durante 30 min. Posteriormente, se realizó la lectura de las absorbancias a 765 nm en un lector de microplacas (Singleton y col., 1999; Roura y col., 2006). Se realizó una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar (0-0.011 mg/mL). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por mg de creatinina. Cabe mencionar que en el proyecto previo se realizó la determinación de creatinina en orina, dato que se utilizó para normalizar los

resultados de polifenoles en orina, ya que el volumen de orina presentó alta variabilidad.

4.2.1.3 Determinación del contenido de flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales se realizó por medio de un método espectrofotométrico. Se mezclaron 100 μL de la muestra de orina con 25 μL de agua, después se adicionaron 7.5 μL de NaNO_2 al 5 % dejando reposar la solución por 6 min para posteriormente adicionar 15 μL de AlCl_3 al 10 %, y reposando nuevamente durante otros 5 min. A continuación, se añadieron 50 μL de NaOH 1 M y finalmente el volumen se completó con 52.5 μL de agua destilada. Se midió la absorbancia a 510 nm y se realizó una curva de calibrado utilizando (+)-catequina como estándar externo. Los resultados obtenidos se expresaron en mg de (+)-catequina por mL de orina (Heimler y col., 2006).

4.2.1.4 Identificación del perfil de metabolitos de polifenoles

Las muestras obtenidas se caracterizaron por medio de un sistema de cromatografía de líquidos de ultra resolución acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo con una fuente de Ionización de electrospray, (UPLC-ESI-QToF MS^E, Vion, Waters Corporation, Milford, Massachussets, EUA). Las muestras se filtraron (Captiva syringe filter, PVDF, 0.45 μm , 13 mm) e inyectaron en una columna C18 BEH Acquity (2.1 x 100 mm, 1.7 μm) a 35 °C. El volumen de inyección fue de 2 μL y las muestras se mantuvieron a 4 °C en el automuestrador. La fase móvil consistió en (A) agua con 0.1% de ácido fórmico y (B) acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico a un flujo de 0.5 mL/min. Las condiciones del gradiente fueron las siguientes: 0% B a 0 min, 15% B a 2.5 min, 21% B a 10 min, 90% B a 12 min y 95% B a 13 min. Posteriormente, se regresó a las condiciones iniciales (0% B) a los 15 min y se mantuvieron durante 2 min para re-equilibrar el sistema, con un tiempo total de corrida de 17 min por muestra.

Las condiciones del ESI-QToF MS^E fueron las siguientes: se realizó la adquisición de espectros de masas en modo de ionización negativo (ESI-) en un rango de masas de 100-1200 Da, voltaje de capilar a 2 kV voltaje del cono a 40 eV, energía baja de colisión a 6 V, energía alta de colisión a 15-45 V, temperatura de la fuente de ionización a 120 °C, temperatura del gas de desolvatación (N₂) a 450 °C, flujo del gas de desolvatación a 800 L/h, flujo del gas del cono (N₂) a 50 L/h. La identificación de los metabolitos de polifenoles se realizó en el software UNIFI (Waters Co., New York, EUA) por medio del análisis de la masa exacta del ion molecular (error de masas <5 ppm), distribución isotópica del ion molecular y patrón de fragmentación (Reynoso-Camacho y col. 2021).

4.2.1.5 Determinación de la capacidad antioxidante

Se realizó la determinación de la capacidad antioxidante urinaria por medio de los ensayos de atrapamiento de los radicales DPPH^{•+} (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ABTS^{•+} [2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzo-tiazolin-6-sulfónico)]. Para el ensayo de DPPH^{•+}, se preparó el radical mezclando DPPH con metanol hasta obtener una absorbancia de entre 0.750 y 0.780 a 517 nm. Posteriormente, se mezclaron 20 µL de orina con 200 µL de la solución de DPPH^{•+}, se incubó a temperatura ambiente durante 6 min y se midieron las absorbancias a 517 nm (Brand-Williams y col., 1995). Se realizó la curva de calibración con ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroma-2-carboxílico (Trolox; 0.0125-0.2 mg/mL). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de Trolox/mg de creatinina.

Para el ensayo de ABTS, se preparó el radical mezclando 5 mL de ABTS^{•+} 7 mM con 88 µL de una solución etanólica de persulfato de potasio 140 mM, ajustando su absorbancia con etanol a 0.700 a 734 nm. Posteriormente, se mezclaron 50 µL de orina con 150 µL de la solución de ABTS^{•+}, se incubaron a temperatura ambiente durante 6 min y se realizó la determinación de las absorbancias a 734 nm (Re y col.,

1999). Se realizó una curva de calibración con trolox (0.0125-0.2 mg/mL). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de trolox/mg de creatinina.

4.2.2 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se expresaron como media \pm error estándar de diez réplicas. Se evaluó si las variables eran paramétricas o no paramétricas por medio de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov (distribución de datos) y de Levene (homocedasticidad). Las variables paramétricas se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor seguido por la prueba de Tukey. Para las variables no paramétricas se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguido de Wilcoxon. Se construyeron modelos de análisis multivariados mediante análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales dispersos (sPLS-DA) y análisis de clústers de K-medias con los datos normalizados, transformados por raíz cuadrada y auto-escalados. Todos los análisis estadísticos univariados se realizaron con el software JMP versión 11 (JMP Statistical Discovery LLC, SAS Institute, Carolina del Norte, EUA); mientras que, los análisis multivariados se realizaron con el software en línea Metaboanalyst versión 5 (<https://www.metaboanalyst.ca>; Universidad de Alberta, Canadá).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Cuantificación urinaria de compuestos fenólicos totales en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas de decocciones de frutos rojos.

En nuestro grupo de investigación se formularon y desarrollaron bebidas a base de decocciones de frutos rojos, las cuales mostraron un alto contenido y diversidad de compuestos fenólicos. De manera interesante, la suplementación crónica con dichas bebidas en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa (DAGF) durante 18 semanas previno el desarrollo de algunas alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad, tales como hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina (Sotelo-González, 2020). El presente proyecto de investigación se diseñó y se llevó a cabo con el fin de identificar si los componentes polifenólicos de las bebidas desarrolladas fueron absorbidos y metabolizados y, si estos metabolitos, proveen una capacidad antioxidante *in vivo*.

En la Figura 2 se presentan los resultados de la cuantificación de polifenoles totales en las muestras de orina de ratas alimentadas con una DAGF suplementada con las bebidas de decocciones de frutos rojos. Las ratas alimentadas con la DAGF mostraron una concentración de polifenoles totales 3.5 veces menor en comparación con el grupo control (alimentado con la DE). La presencia de fenoles totales en la orina de los animales alimentados con DE y DAGF puede relacionarse con la harina de soya contenida en la dieta Laboratory Rodent Diet 5001, ya que los productos a base de este grano contienen compuestos fenólicos como las isoflavonas y antioxidantes añadidos como terbutil hidroquinona (Peellizzon y Ricci, 2020).

Cabe mencionar que si bien se observó un consumo diario de alimento fue similar entre ambos grupos control durante todo el experimento (DE: 23.3 g/día y DAGF: 22.1 g/día), los animales alimentados con la DAGF consumieron proporcionalmente una menor cantidad de alimento estándar, ya que esta dieta está compuesta por

62% alimento estándar, 20% manteca de cerdo y 18% fructosa. Es por ello por lo que se llevó a cabo la determinación del consumo diario de polifenoles aportados por la dieta y las bebidas, resultados en donde se observa que el grupo DAGF consumió 1.42 veces menos polifenoles totales en comparación con el grupo DE (Figura A1).

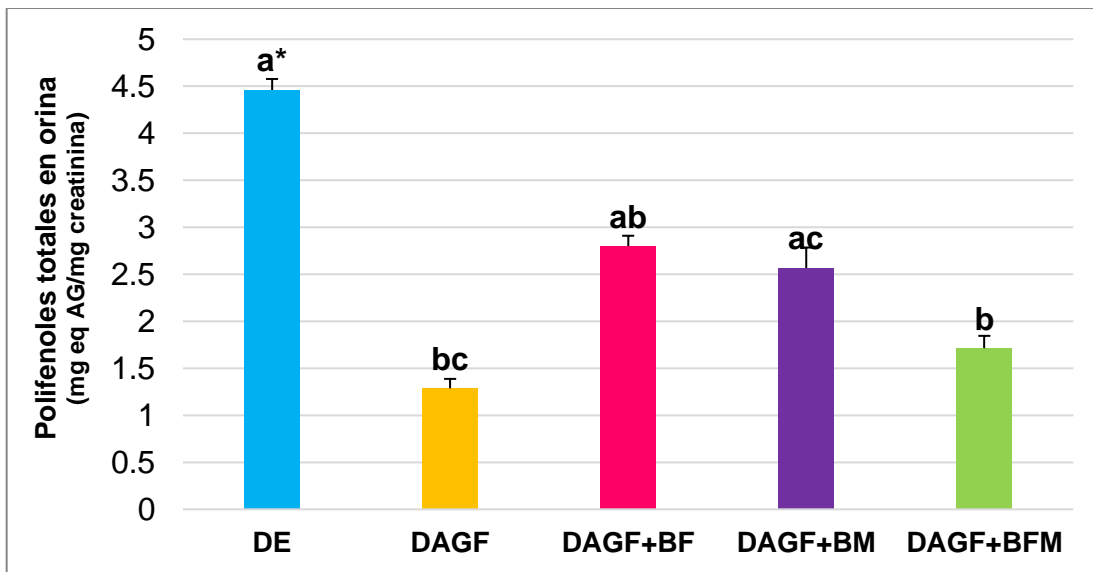


Figura 2. Contenido de polifenoles totales en orina de animales alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas de decocciones de frutos rojos. Los valores representan la media \pm el error estándar de los grupos de animales. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$) por prueba de Tukey o Friedman. *Indica diferencias significativas ($p < 0.05$) en comparación con el grupo DAGF mediante la prueba de Dunnett o Wilcoxon. AG: ácido gálico, DE: dieta estándar, DAGF: dieta alta en grasa y fructosa, BF: bebida de fresa, BM: bebida de mora azul, BFM: bebida de fresa y mora azul, $n = 10$.

En cuanto a los animales suplementados con las bebidas de decocciones de fresa, mora azul y fresa-mora azul, estos mostraron un aumento en la excreción urinaria de polifenoles totales de 2.2, 2.0 y 1.3 veces más con respecto al grupo alimentado con DAGF, respectivamente. Sin embargo, todos los grupos suplementados con las bebidas mostraron una excreción de polifenoles totales significativamente menor en comparación con el grupo control (DE), a pesar de que los animales suplementados con las bebidas tuvieron un consumo similar de alimento, pero mayor de polifenoles debido a las bebidas que el grupo control, (Figura A1). Lo anterior puede deberse a las diferencias estructurales entre los polifenoles de la dieta y de las bebidas, ya

que es conocido que la estructura química de dichos compuestos determina su absorción y metabolismo (Dini y Grumetto, 2022), siendo que las isoflavonas presentes en los productos a base de soya suelen presentarse como agliconas o glucósidos, teniendo una tasa de absorción mayor a otros polifenoles más complejos (Di Lorenzo y col., 2021), lo que pudo favorecer la alta concentración de sus metabolitos.

Sumado a lo anterior, el consumo de bebida y dieta que tuvieron los animales experimentales pudo influir en la excreción total de metabolitos fenólicos debido a que en el presente estudio los animales tuvieron un libre consumo de alimento y bebida. Cladis y col. (2020 y 2021) determinaron por medio de dos estudios en ratas que, distintas dosis de extractos de mora azul o del fruto entero, generaban variación en las excreciones urinarias de metabolitos durante un período de 90 días. A dosis bajas o medias de 50 y 250 mg de polifenoles totales/kg de peso corporal/día, respectivamente, la máxima producción de metabolitos se dio a los 7 días; mientras que, a dosis altas de 1,000 mg de polifenoles totales/kg de peso corporal/día hubo un aumento constante en la producción de metabolitos a lo largo del estudio. Estas variaciones se adjudicaron a que la microbiota intestinal se modificó debido a las dosis para adaptarse a cargas fenólicas más elevadas. Por lo tanto, debido a que los animales experimentales no consumieron las mismas cantidades de alimento y bebida, se puede esperar que no exista una relación clara entre el consumo de polifenoles y el contenido total de metabolitos polifenólicos en la orina de los grupos de ratas de este estudio.

Por otro lado, la excreción urinaria de flavonoides totales mostró una tendencia distinta a la observada en la excreción urinaria de polifenoles totales. Como se observa en la Figura 3, la concentración urinaria de flavonoides fue similar entre los dos grupos controles (DE y DAGF), no se observaron diferencias estadísticas significativas a pesar de que el consumo de alimento estándar y de polifenoles totales fue diferente, lo cual se describió previamente.

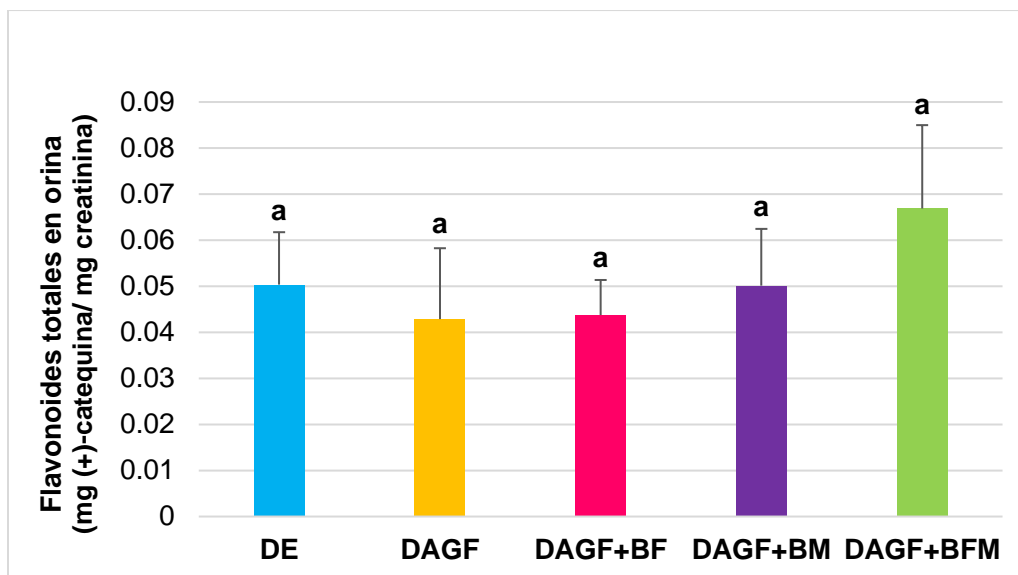


Figura 3. Concentración de flavonoides totales en orina de animales alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con las bebidas de decocciones de frutos rojos. Los valores representan la media \pm el error estándar de los grupos de animales. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$) por prueba de Tukey o Friedman. *Indica diferencias significativas ($p < 0.05$) en comparación con el grupo DAGF mediante la prueba de Dunnet o Wilcoxon. AG: ácido gálico, DE: dieta estándar, DAGF: dieta alta en grasa y fructosa, BF: bebida de fresa, BM: bebida de mora azul, BFM: bebida de fresa y mora azul, $n=10$.

Diversos estudios han reportado diferentes subclases de flavonoides, tales como flavanoles, flavonoles y antocianinas, en los frutos rojos de fresa y mora azul (Miller y col., 2019); sin embargo, a pesar de estas diferencias estructurales, su consumo por 18 semanas no aumentó la excreción urinaria de flavonoides (Figura 3). Talavéra y colaboradores (2005) realizaron un estudio con ratas, las cuales consumieron una dieta control y una dieta suplementada con un extracto de zarzamora, encontrando que las antocianinas nativas, las cuales son flavonoides, así como sus metabolitos metilados y glucuronidados, se excretan en la orina. Sin embargo, estos autores reportaron que la concentración urinaria es baja en comparación con la cantidad ingerida, encontrándose un alto contenido en el yeyuno, zona del intestino delgado donde se presenta la mayor tasa de metabolismo y absorción.

Para identificar el perfil de compuestos polifenólicos totales en orina y observar posibles diferencias entre tratamientos, se llevó a cabo el análisis de las muestras

por medio de UPLC-ESI-QToF MS^E, el cual permite no solo a cuantificar polifenoles sino también a identificar y caracterizar polifenoles y sus metabolitos en fluidos biológicos como lo es la orina (Buszewski y Baranowska, 2022).

5.3 Perfil de metabolitos de polifenoles urinarios en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas de decocciones de frutos rojos.

Los metabolitos de las plantas, específicamente los polifenoles, son conocidos por ser responsables de diversos beneficios para la salud (Yaskolka y col., 2021). Por ende, en las últimas décadas se ha incrementado la investigación del metaboloma alimentario, ya que se buscan características y patrones de fragmentación que relacionen estructuralmente a los metabolitos con sus compuestos de origen o para determinar su bioactividad (Van Duynhoven y col., 2011).

En el Cuadro 1 se enlistan los compuestos identificados en las muestras de orina de las ratas alimentadas con una DAGF suplementada con bebidas de decocciones de frutos rojos. Estos compuestos se identificaron mediante un análisis dirigido por medio de la comparación del ion pseudo molecular y sus fragmentos más importantes con aquellos reportados previamente en bases de datos y literatura especializada. Se identificaron 50 metabolitos de polifenoles, incluidos 3 metabolitos de ácidos hidroxibenzoico, 7 metabolitos de ácidos hidroxicinámico, 7 metabolitos de elagitaninos, 2 metabolitos de flavanoles, 1 metabolito de flavonoles, 2 metabolitos de flavanonas, 1 metabolito del ácido gálico, 11 metabolitos de isoflavonas, 2 metabolitos del ácido fenilacético, 3 metabolitos del ácido fenilpropanoico, 2 metabolitos del ácido fenilvalérico, 3 metabolitos de valerolactonas, 3 metabolitos de lignanos y 2 tipos de otros polifenoles.

Cuadro 1. Metabolitos urinarios de polifenoles en ratas alimentadas con dietas ricas en grasas y fructosa, suplementadas con bebidas de fresa, mora azul y una mezcla de fresa-mora azul.

Identificación provisional	Rt (min)	Fórmula molecular	Masa esperada (Da)	Masa observada (Da)	Error de masa (ppm)	Aducto	(µg/mg de creatinina)				
							DE	DAGF	DAGF+BF	DAGF+BM	DAGF+BFM
Metabolitos de ácidos hidroxibenzoicos											
Ácido hipúrico	3.37	C ₉ H ₉ NO ₃	179.0582	178.0504	-3.4285	[M-H] ⁻	0.051 ± 0.007b [†]	0.025 ± 0.004b	0.035 ± 0.006b [†]	0.096 ± 0.012a [†]	0.043 ± 0.010b [†]
Sulfato de ácido vanílico	3.93	C ₈ H ₈ O ₇ S	247.9991	246.9929	4.3453	[M-H] ⁻	ND	ND	0.040 ± 0.004	ND	ND
Ácido hidroxihipúrico	4.96	C ₉ H ₉ NO ₄	195.0532	194.0460	0.8356	[M-H] ⁻	ND	ND	0.012 ± 0.002	ND	ND
Metabolitos de ácidos hidroxicinámicos											
Glucurónido de ácido cafeico	2.56	C ₁₅ H ₁₆ O ₁₀	356.0743	355.0675	1.3356	[M-H] ⁻	ND	ND	0.002 ± 0.000a	0.004 ± 0.001a	ND
Sulfato de ácido ferúlico	2.88	C ₁₀ H ₁₀ O ₇ S	274.0147	273.0061	-4.8980	[M-H] ⁻	ND	ND	0.194 ± 0.082a	0.132 ± 0.020a	0.044 ± 0.004a
Sulfato de ácido cumárico	3.12	C ₉ H ₈ O ₆ S	244.0042	242.9963	-2.4014	[M-H] ⁻	ND	ND	0.022 ± 0.002	ND	ND
Sulfato de ácido cafeico	3.80	C ₉ H ₈ O ₇ S	259.9991	258.9917	-0.3509	[M-H] ⁻	ND	ND	0.025 ± 0.002a	0.005 ± 0.000a	ND
Ácido dihidrocumárico	3.81	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.0630	165.0555	-1.2603	[M-H] ⁻	ND	ND	0.116 ± 0.009a	0.036 ± 0.007a	ND
Ácido cumárico	4.23	C ₉ H ₈ O ₃	164.0473	163.0397	-2.2924	[M-H] ⁻	0.015 ± 0.001b [†]	0.005 ± 0.001e	0.018 ± 0.001a [†]	0.008 ± 0.001d [†]	0.011 ± 0.002c [†]
Ácido dimetil elálgico	9.35	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	330.0376	329.0318	4.5590	[M-H] ⁻	ND	ND	0.011 ± 0.001	ND	ND
Metabolitos de elagitaninos											
Dimetilurrolitina D sulfato	3.53	C ₁₅ H ₁₂ O ₉ S	368.0202	367.0136	1.8186	[M-H] ⁻	ND	ND	0.004 ± 0.001	ND	ND
Metilurrolitina D glucurónido	3.77	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	450.1162	449.1098	2.0200	[M-H] ⁻	ND	ND	0.086 ± 0.0006	ND	ND
Urolitina C	4.71	C ₁₃ H ₈ O ₅	244.0372	243.0300	0.3044	[M-H] ⁻	ND	ND	0.196 ± 0.011	ND	ND
Metilurrolitina A	5.18	C ₁₄ H ₁₀ O ₄	242.0579	241.0503	-1.3359	[M-H] ⁻	ND	ND	0.026 ± 0.004	ND	ND
Urolitina B glucurónido	6.62	C ₁₉ H ₁₆ O ₉	388.0794	387.0738	4.1636	[M-H] ⁻	ND	ND	2.910 ± 0.171	ND	ND
Urolitina A	9.32	C ₁₃ H ₈ O ₄	228.0423	227.0347	-1.0854	[M-H] ⁻	ND	ND	8.251 ± 0.496a	ND	2.326 ± 0.246b
Urolitina B	11.20	C ₁₃ H ₈ O ₃	212.0473	211.0404	1.4379	[M-H] ⁻	ND	ND	5.936 ± 0.416a	ND	1.816 ± 0.140a
Metabolitos de flavanoles											
(Epi)-catequina glucurónido	1.14	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	466.1111	465.1033	-1.2718	[M-H] ⁻	ND	ND	ND	0.013 ± 0.000a	0.010 ± 0.004a
Metil-(epi)-catequina glucurónido	2.94	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₂	480.1268	479.1196	0.2521	[M-H] ⁻	0.002 ± 0.000ab [†]	0.002 ± 0.000b	0.044 ± 0.007ab [†]	0.055 ± 0.004a [†]	0.051 ± 0.006a [†]
Metabolitos de flavonoles											
Dimetil quercetina	11.12	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.0740	329.0681	4.2260	[M-H] ⁻	0.312 ± 0.025a [†]	0.197 ± 0.034ab	0.313 ± 0.022a [†]	0.084 ± 0.007b [†]	0.212 ± 0.019ab
Metabolitos de flavanonas											
Diglucurónido de apigenina	2.94	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₇	622.1170	621.1094	-0.5710	[M-H] ⁻	0.027 ± 0.004a [†]	0.005 ± 0.002b	0.024 ± 0.002ab [†]	0.026 ± 0.002a [†]	0.026 ± 0.002ab [†]
Glucurónido de apigenina	4.44	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	446.0849	445.0757	-4.3859	[M-H] ⁻	7.378 ± 0.570ab	6.371 ± 1.234b	9.137 ± 0.298a [†]	6.744 ± 1.075b	7.766 ± 0.909ab [†]
Metabolitos del ácido gálico											
Sulfato de metilpirogalo	3.77	C ₇ H ₈ O ₆ S	220.0042	218.9965	-1.7285	[M-H] ⁻	ND	ND	0.006 ± 0.001	ND	ND
Metabolitos de isoflavonas											
Glucurónido de dihidroaidzeína	4.24	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.1056	431.0965	-4.2433	[M-H] ⁻	0.403 ± 0.022b	0.379 ± 0.099b	0.480 ± 0.020ab	0.531 ± 0.090a [†]	0.483 ± 0.031ab
Dihidroaidzeína	4.67	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256.0736	255.0664	0.5466	[M-H] ⁻	0.014 ± 0.001a [†]	0.005 ± 0.001b	0.013 ± 0.001a [†]	0.011 ± 0.002ab [†]	0.013 ± 0.002ab [†]
Glucurónido de genisteína	5.20	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	446.0849	445.0760	-3.7303	[M-H] ⁻	0.631 ± 0.020a	0.473 ± 0.093ab	0.437 ± 0.015ab	0.416 ± 0.054ab	0.432 ± 0.020b
Glucurónido de gliciteína	5.52	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	460.1006	459.0916	-3.7453	[M-H] ⁻	2.374 ± 0.763ab	2.553 ± 0.356b	2.680 ± 0.278ab	3.064 ± 0.374ab [†]	3.169 ± 0.131a [†]
Equol glucuronido	5.69	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	418.1264	417.1173	-4.3003	[M-H] ⁻	12.105 ± 0.583a	9.953 ± 1.917a	10.587 ± 0.691a	9.586 ± 1.650a	9.520 ± 1.838a
Hidroxi equol	8.13	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	258.0892	257.0808	-4.3725	[M-H] ⁻	0.018 ± 0.001a [†]	0.011 ± 0.001b	0.015 ± 0.003ab [†]	0.013 ± 0.001ab [†]	0.026 ± 0.004ab [†]
Hidroxicligneteína	8.59	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.0634	299.0552	-3.0659	[M-H] ⁻	0.042 ± 0.002a [†]	0.032 ± 0.003b	0.037 ± 0.002ab [†]	0.038 ± 0.003ab [†]	0.034 ± 0.004b
Hidroxigenisteína	9.16	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.0477	285.0396	-2.9990	[M-H] ⁻	0.011 ± 0.001a [†]	0.008 ± 0.001b	0.008 ± 0.001ab	0.011 ± 0.002a	0.011 ± 0.002ab [†]
Equol	11.22	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	242.0943	241.0862	-3.3874	[M-H] ⁻	0.051 ± 0.003a [†]	0.032 ± 0.003b	0.037 ± 0.002ab	0.040 ± 0.005ab [†]	0.037 ± 0.004b [†]
Metilequol	11.42	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	272.1049	271.0976	0.1402	[M-H] ⁻	0.004 ± 0.001a [†]	0.003 ± 0.000b	0.003 ± 0.000ab [†]	0.004 ± 0.001ab [†]	0.003 ± 0.000a [†]
Hidroxiidzeína	11.62	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.0528	269.0451	-1.7580	[M-H] ⁻	12.948 ± 1.043bc	11.437 ± 2.001c	12.847 ± 1.431bc	14.747 ± 2.123b [†]	17.477 ± 1.764a [†]

Metabolitos del ácido fenilacético											
Ácido hidroxifenilacético	2.75	C ₈ H ₈ O ₃	152.0473	151.0394	-4.4361	[M-H] ⁻	ND	ND	0.089 ± 0.007a	0.079 ± 0.008a	ND
Ácido metoxifenilacético	4.55	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.0630	165.0555	-1.0746	[M-H] ⁻	0.154 ± 0.010ab	0.136 ± 0.023ab	0.37 ± 0.009ab [†]	0.064 ± 0.007a [†]	0.268 ± 0.041b [†]
Metabolitos del ácido fenilpropanoico											
Sulfato de ácido dihidroferúlico	3.47	C ₁₀ H ₁₂ O ₇ S	276.0304	275.0223	-2.7228	[M-H] ⁻	0.053 ± 0.005a [†]	0.016 ± 0.005d	0.021 ± 0.003cd	0.026 ± 0.003c [†]	0.042 ± 0.005b [†]
Ácido fenilpropiónico	4.39	C ₉ H ₁₀ O ₂	150.0681	149.0607	-0.4333	[M-H] ⁻	ND	ND	0.030 ± 0.003	ND	ND
Ácido dihidroferúlico	5.00	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	196.0736	195.0662	-0.4924	[M-H] ⁻	ND	ND	0.085 ± 0.006	ND	ND
Metabolitos del ácido fenilvalérico											
Ácido dihidroxifenilvalérico	3.93	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	210.0892	209.0823	1.9848	[M-H] ⁻	ND	ND	0.045 ± 0.002b	0.133 ± 0.010a	ND
Sulfato de ácido dihidroxifenilvalérico	10.98	C ₁₁ H ₁₄ O ₇ S	290.0460	289.0388	0.2431	[M-H] ⁻	0.027 ± 0.004bcd [†]	0.012 ± 0.004d	0.054 ± 0.004ab [†]	0.051 ± 0.005bc [†]	0.022 ± 0.003cd [†]
Metabolitos de la valerolactona											
Sulfato de dihidroxifenilvalerolactona	3.18	C ₁₁ H ₁₂ O ₇ S	288.0304	287.0238	2.3654	[M-H] ⁻	ND	ND	0.259 ± 0.018a	0.212 ± 0.029ab	0.121 ± 0.013b
Dihidroxifenilvalerolactona	3.24	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	208.0736	207.0672	4.3184	[M-H] ⁻	ND	ND	0.055 ± 0.005ab	0.142 ± 0.035a	0.047 ± 0.009b
Metoxihidroxifenilvalerolactona	11.43	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222.0892	221.0819	0.0663	[M-H] ⁻	1.898 ± 0.108a	1.745 ± 0.140a	1.652 ± 0.059ab [†]	1.201 ± 0.097b [†]	0.676 ± 0.039b [†]
Metabolitos de lignanos											
Enterodiol	9.09	C ₁₈ H ₂₂ O ₄	302.1518	301.1458	4.1634	[M-H] ⁻	ND	ND	0.016 ± 0.001ab	0.007 ± 0.003b	0.027 ± 0.003a
Sulfato de enterolactona	9.89	C ₁₈ H ₁₈ O ₇ S	378.0773	377.0705	1.2812	[M-H] ⁻	0.234 ± 0.006ab	0.153 ± 0.013ab	0.349 ± 0.018ab	0.084 ± 0.011b	0.102 ± 0.009ab
Enterolactona	11.18	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	298.1205	297.1132	-0.1737	[M-H] ⁻	4.262 ± 0.193ab [†]	2.983 ± 0.300b	3.120 ± 0.246b	9.023 ± 0.443a [†]	7.597 ± 1.055a [†]
Metabolitos de otros polifenoles											
Sulfato de catecol	2.22	C ₆ H ₆ O ₅ S	189.9936	188.9858	-2.8666	[M-H] ⁻	ND	ND	0.305 ± 0.024	ND	ND
Catecol	2.38	C ₆ H ₆ O ₂	110.0368	109.0297	2.1231	[M-H] ⁻	ND	ND	0.012 ± 0.001	ND	ND

Los datos se muestran como ± desviación estándar de diez réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre muestras mediante la prueba de Tukey o Friedman. [†]Indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en comparación con el grupo DAGF mediante la prueba de Dunnet o Wilcoxon. DE: dieta estándar; DAGF: dieta rica en grasas y fructosa; BF: bebida de fresa; BM: bebida de mora azul; BFM: bebida de fresa y mora azul, ND: no detectado.

Cabe destacar que algunos metabolitos urinarios se identificaron en todos los grupos experimentales, tales como metabolitos de isoflavonas y flavanonas, indicando su asociación con el consumo del alimento estándar proporcionado. El perfil de polifenoles de los grupos controles (DE y DAGF) fue similar, pero en diferentes concentraciones, siendo que las mayores concentraciones se presentaron en los animales alimentados únicamente con la dieta estándar (Cuadro 2), observando una tendencia similar a la mostrada previamente en la cuantificación de polifenoles totales en orina (Figura 2).

En el presente estudio se encontraron distintos ácidos fenólicos de manera sulfatada o metilada, provenientes de procesos metabólicos de fase II que facilitan su eliminación (Lavefve y col., 2020) como los ácidos cafeico, ferúlico, vanílico y elágico, que se encontraron únicamente en los animales suplementados con las bebidas de frutos rojos.

La bebida de fresa se destacó por presentar metabolitos como dimetilurolitina D sulfato, metilurolitina D glucorónido, urolitina C, metilurolitina A, urolitina B glucurónido, sulfato de metilpirogalo, ácido hidroxihipúrico, sulfato de catecol, ácido dihidroxifenilvalérico, ácido fenilpropiónico, ácido dihidroferúlico y sulfato de catecol. Si bien algunos de estos compuestos fueron detectados en las ratas suplementadas con la bebida de fresa y de fresa-mora azul, éstos se observaron en una mayor concentración con el consumo de la bebida a base de 100% fresa. Las urolitinas son componentes característicos de la degradación microbiana del ácido elágico y sus polímeros (elagitaninos) en el colon, por lo que diversos estudios han identificado urolitinas con el consumo de distintas bayas (Lee y col., 2018; Chen y col., 2022), la urolitina A se ha detectado en mayor concentración con el consumo de fresas (Chandra y col., 2019).

Por otro lado, el consumo de las bebidas de mora azul y fresa-mora azul aumentó la excreción urinaria de la enterolactona, un metabolito colónico derivado de los

lignanós (Mali y col., 2019), cuya concentración fue alrededor de 2.3-2.9 veces mayor que la observada con el consumo de la bebida de fresa.

Debido a la complejidad de análisis e interpretación del perfil de metabolitos urinarios de manera individual, se llevaron a cabo distintos análisis multivariados para un análisis global de los datos.

Los modelos de PCA son ampliamente utilizados para analizar el agrupamiento de individuos y para identificar compuestos discriminantes de grupos experimentales, sin usar información anticipada, eliminando variables que tengan menor variabilidad (análisis no supervisado). Por otro lado, el sPLS-DA maximiza la separación entre los grupos mediante conocimientos previos del procesamiento de las muestras al ser un método de análisis supervisado (Ruiz-Perez y col., 2020).

En el análisis de PCA se logró la mayor diferenciación de los grupos en el componente 1 (PC1), ya que en el eje de las X se recuperó el 40.9% de la varianza total; mientras que, en el componente 2 (PC2) se recuperó el 13.9% (Anexo 1). De manera interesante, se observa la discriminación entre las ratas suplementadas con la bebida de fresa (●) y el resto de los grupos experimentales en el PC1, indicando diferencias significativas en el perfil de metabolitos urinarios de polifenoles. Se obtuvo un gráfico de doble proyección ('biplot') que sobrepone el gráfico de puntuaciones de los grupos experimentales y el gráfico de influencias (componentes), revelando así los compuestos que se agrupan en dirección con cada grupo experimental. Los metabolitos discriminantes de los animales suplementados con la bebida de fresa correspondieron al sulfato de ácido cafeico, el ácido dihidrocumárico, la urolitina A y el ácido hidroxifenilacético, entre otros metabolitos urinarios de polifenoles (Figura 4B).

Por otro lado, se observa en el PC1 que las ratas alimentadas con DE (●) y DAGF (●), pertenecientes a los grupos controles, se encontraron aglomeradas (Figura 4A),

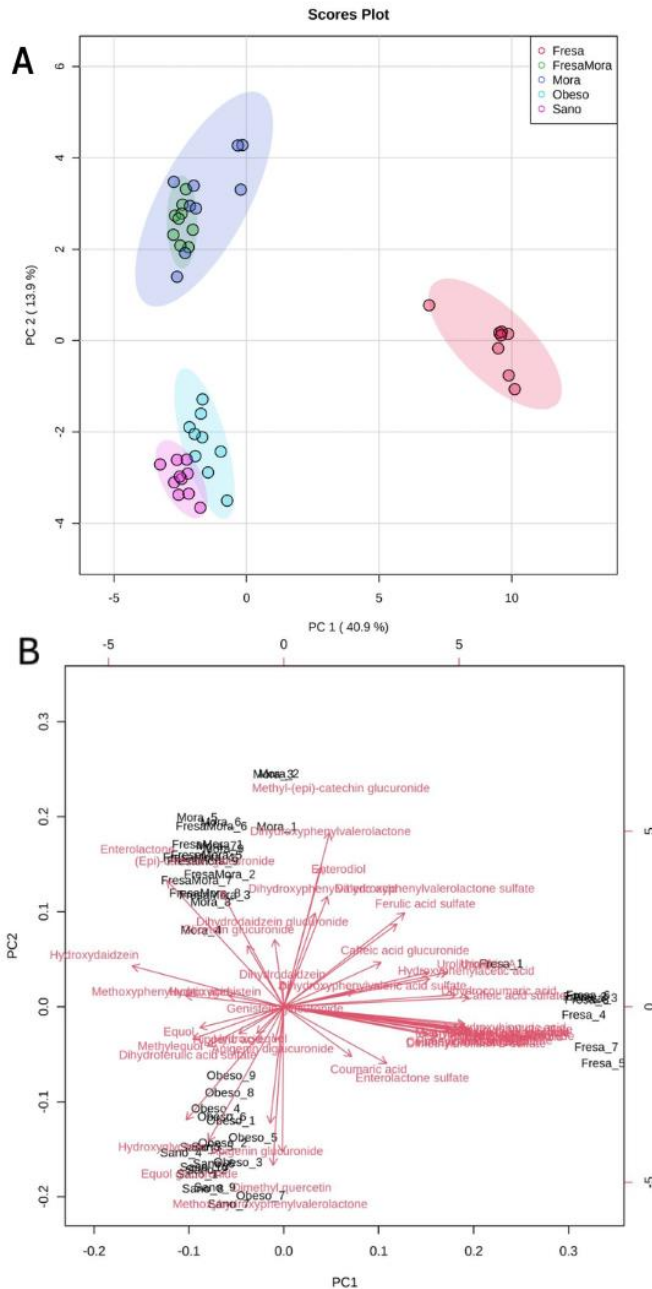


Figura 4. Gráfico bidimensional del modelo de análisis de componentes principales (A) y gráfico de doble proyección (B) de metabolitos de polifenoles de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas a base de decocciones de frutos rojos. PC: componente principal. Los datos se normalizaron por suma, se transformaron en raíz cuadrada y se auto escalaron.

indicando un perfil similar de metabolitos urinarios de polifenoles, el cual fue caracterizado principalmente por la metoxihidroxiifenilvalerolactona, la dimetil quercetina, el equol glucurónido, la apigenina glucuronido y la hidroxigliceteína

(Figura 4B). Finalmente, las ratas suplementadas con las bebidas a base de 100% mora azul (●) y 50% mora azul+50% fresa (●) se encontraron aglomeradas, y separadas de los grupos controles en el PC2 y del grupo suplementado con bebida de fresa en el PC1. Lo anterior indica que si bien, la bebida fresa-mora azul estaba conformada por la misma proporción de ambos frutos rojos, la mora azul brindó un mayor contenido de metabolitos urinarios de polifenoles en comparación con la fresa. Ambas bebidas elaboradas con mora azul presentaron a la enterolactona y la (epi)-catequina glucuronida como principales metabolitos discriminantes.

El análisis supervisado sPLS-DA del perfil urinario mostró un comportamiento similar al descrito para PCA, en el componente 1 se recuperó el 40.4% de la varianza total, mientras que en el componente 2 se recuperó el 14.1% (Figura 5A). En este caso se obtuvieron los gráficos y los valores de las cargas ('loadings') del componente 1 (Figura 5B; Anexo 2) y del componente 2 (Figura 5C; Anexo 3) para identificar los componentes discriminantes.

Considerando un punto de corte de carga ≥ 0.25 , se obtuvo que la discriminación de los grupos a través del componente 1 está explicada por 8 metabolitos urinarios de polifenoles: el catecol sulfato, la urolitina B glucurónido, la urolitina C, el ácido dihidroxiferúlico, la metilurolitina A, el sulfato de metilpirogalol, el ácido hidroxihipúrico y el sulfato de ácido cafeico. El gráfico de cargas incluye un mapa de calor ('heatmap'), en donde el grupo experimental que muestra los metabolitos indicados en color rojo presentaron la mayor concentración en comparación con el resto de los grupos experimentales, mientras que la menor concentración es indicada en color azul. Por lo tanto, se observa que los principales metabolitos discriminantes del componente 1 se muestran en mayor concentración en las ratas suplementadas con la bebida de fresa.

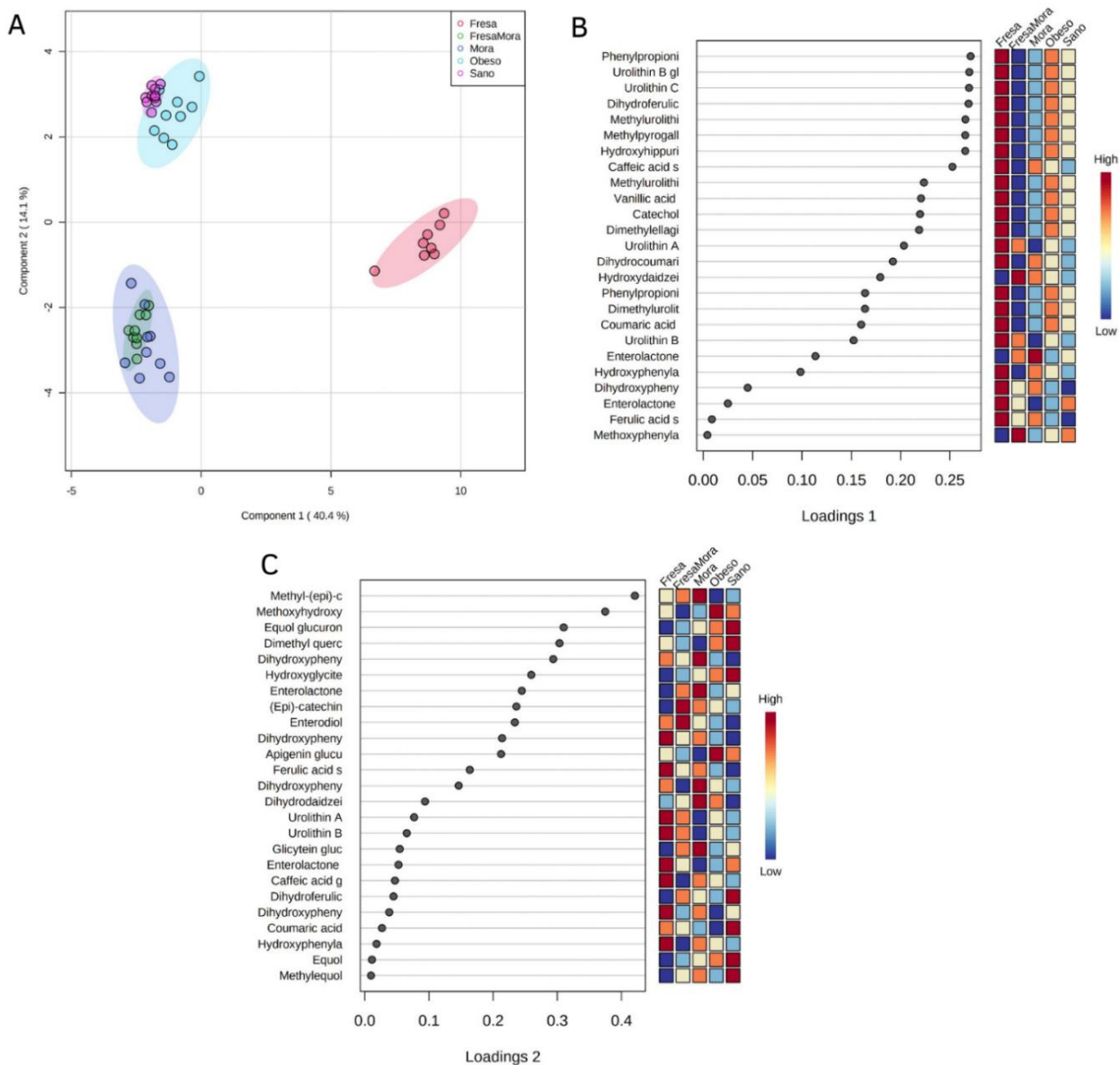


Figura 5. Gráfico bidimensional del modelo de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales dispersos (sPLS-DA; A), características discriminantes del componente 1 del sPLS-DA (B) y características discriminantes del componente 2 del sPLS-DA (C) de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas a base de decocciones de frutos rojos. sPLS-DA: Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales dispersos; PLS-DA: Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales. Los datos se normalizaron por suma, se transformaron en raíz cuadrada y se auto escalaron.

Por otro lado, los metabolitos discriminatorios del componente 2 fueron: la metil-(epi)-catequina glucurónido, la metoxihidroxifenilvalerolactona, el equol glucurónido, la dimetil quercetina, la dihidroxifenilvalerolactona, la hidroxigliciteína y la

enterolactona. Por consiguiente, los animales suplementados con la bebida de mora azul presentaron la mayor concentración de la metil-(epi)-catequina glucurónido y la dihidroxifenilvalerolactona; mientras que, el resto de metabolitos discriminatorios fueron encontrados en mayor concentración en los grupos controles (DE o DAGF). Finalmente, se llevó a cabo un análisis de aglomeración ('clustering') mediante dos herramientas, el modelo de K-means y el análisis jerárquico. El algoritmo de K-means es un método de aglomeración que, en este caso, asignó a cada rata (elemento) en un grupo o clúster con base en la similitud de sus perfiles de metabolitos urinarios de polifenoles (Chong y col., 2019). Como se observa en la Figura 6A, el diagrama de K-means confirma la presencia de tres clústers: clúster 1 (●), compuesto por las ratas alimentadas con la DE (●) y ADGF (●); clúster 2 (●), compuesto únicamente por las ratas alimentadas con la DAGF suplementada con la bebida de fresa (●); y clúster 3 (●), compuesto por las ratas alimentadas con la DAGF suplementada con la bebida de mora azul (●) o fresa-mora azul (●).

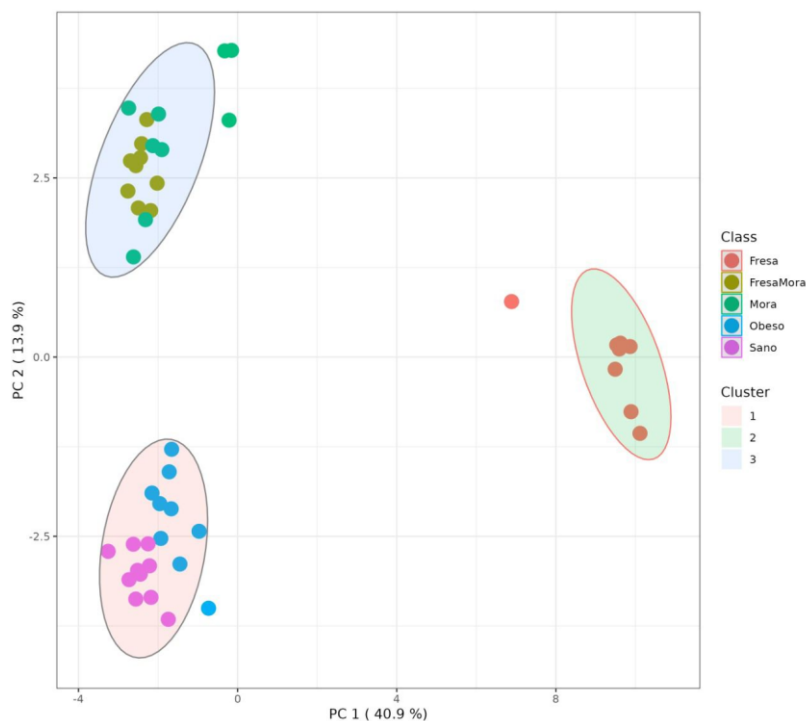


Figura 6. Gráfico de clúster de K-means de metabolitos de polifenoles urinarios de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas a base de decocciones de frutos rojos. PC: componente principal. Los datos se normalizaron por suma, se transformaron en raíz cuadrada y se auto escalaron.

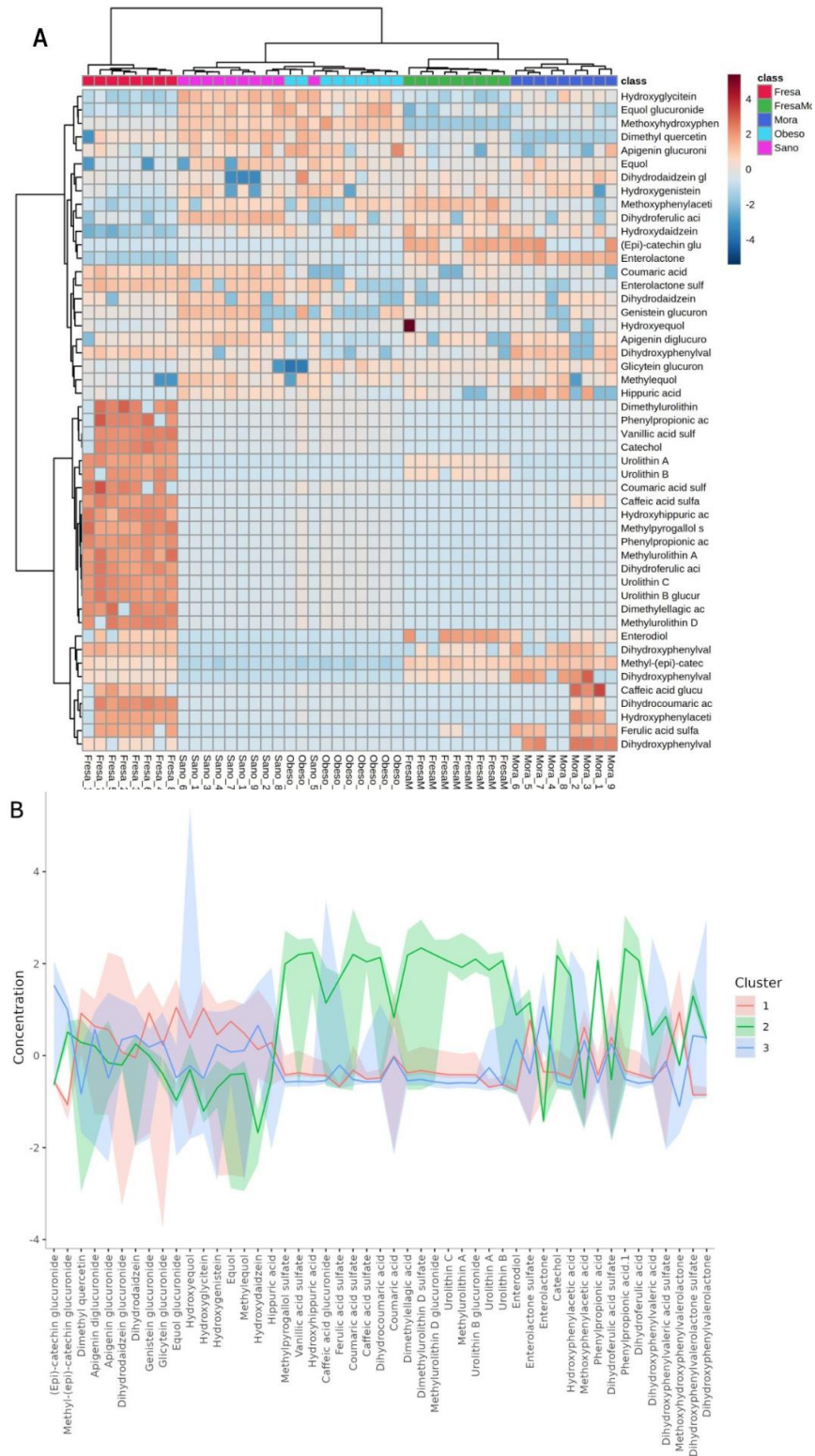


Figura 7. Análisis jerárquico de clúster (A) y componentes discriminantes de K-means (B) de metabolitos de polifenoles urinarios de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas a base de decocciones de frutos rojos. PC: componente principal. Los datos se normalizaron por suma, se transformaron en raíz cuadrada y se auto escalaron. Análisis jerárquico con algoritmo de Ward.

Lo anterior fue confirmado en el análisis jerárquico mediante un mapa de calor (Figura 7A), en el cual, la intensidad de los colores se presenta como una estimación cuantitativa de los metabolitos, variando del color azul oscuro al rojo oscuro, indicando disminución y aumento de la concentración, respectivamente. En dicho análisis se observó que los animales fueron separados en dos grandes grupos: (i) alimentados con la DAGF suplementado con la bebida de fresa (■) y (ii) el resto de los grupos experimentales, siendo este último el clúster dividido en dos subgrupos: (i) alimentados con la DE (■) y la DAGF (■) y (ii) alimentados con la DAGF suplementada con la bebida de mora azul (■) o fresa-mora azul (■). Con respecto a la jerarquización de los metabolitos urinarios, la cual se observa en la Figura 6B, el primer grupo se integra por aquellos metabolitos urinarios mayoritarios asociados con el consumo de la bebida de fresa; mientras que, los demás grupos experimentales muestran menores diferencias globales en el perfil. Lo anterior también se observa en el análisis de metabolitos por clúster del modelo de K-means (Figura 7B).

5.4 Capacidad antioxidante en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas de decocciones de frutos rojos.

Finalmente, se llevó a cabo la evaluación de la capacidad antioxidante en las muestras de orina de ratas alimentadas con una DAGF suplementada con bebidas de decocciones de frutos rojos (Figuras 7 y 8). La alimentación con una dieta obesogénica (DAGF) durante 18 semanas disminuyó la capacidad de atrapamiento de los radicales DPPH[•] y ABTS[•] en comparación con la alimentación con una DE (3.0 y 2.4 veces, respectivamente), lo cual podrá sugerir una posible disminución en la eficiencia de la defensa antioxidante, disminuyendo el equilibrio entre el sistema de defensa antioxidante natural y las especies reactivas de oxígeno (ERO).

Con respecto a la suplementación de las bebidas de frutos rojos, los metabolitos polifenólicos provenientes de las bebidas de mora azul y de fresa, aumentaron la capacidad antioxidante por DPPH en orina, respecto a la capacidad antioxidante de

la orina del grupo DAGF (3.03 y 2.68 veces, respectivamente), obteniendo niveles estadísticamente similares a la del grupo control sano (DE). Lo anterior no es acorde con el contenido y el perfil de metabolitos urinarios de polifenoles, ya que la suplementación con la bebida de fresa mostró una mayor excreción de dichos metabolitos en comparación con las bebidas de mora azul y fresa-mora azul; lo que indica que, a pesar de la menor excreción de compuestos de la bebida de mora, estos muestran una mayor capacidad antioxidante comparado con los de la bebida de fresa.

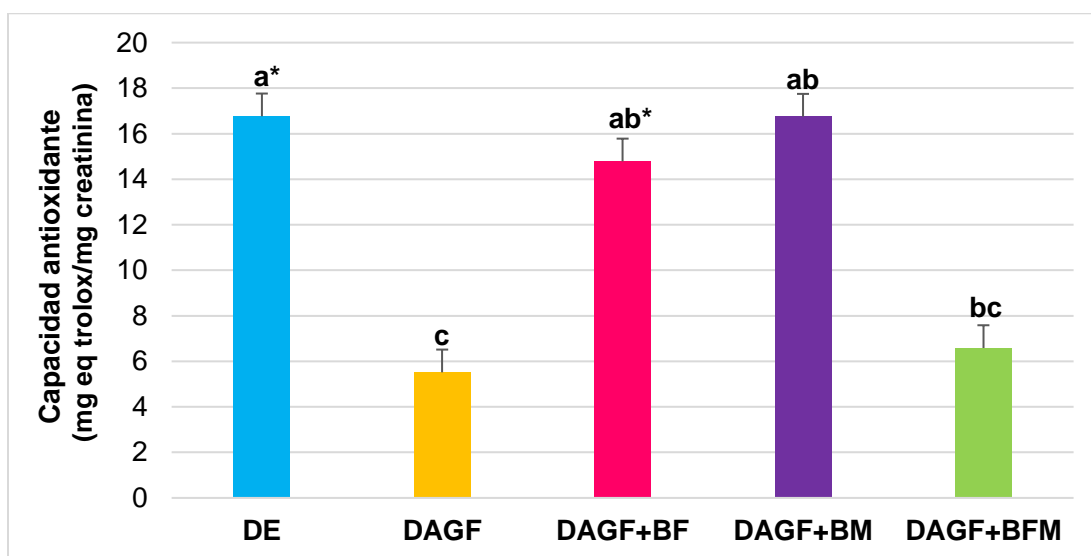


Figura 8. Capacidad de atrapamiento del radical DPPH^{•+} en orina de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas a base de decocciones de frutos rojos. Los valores representan la media \pm el error estándar de los grupos de ratas. *Indica diferencias significativas ($p < 0.05$) en comparación con el grupo DAGF mediante la prueba de Dunnett o Wilcoxon. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$) por prueba de Tukey o Friedman. AG: ácido gálico, DE: dieta estándar, DAGF: dieta alta en grasa y fructosa, BF: bebida de fresa, BM: bebida de mora azul, BFM: bebida de fresa y mora azul, n=10.

Se ha descrito en la literatura que los flavonoides y los ácidos hidroxicinámicos presentan una mayor capacidad de atrapamiento del radical DPPH^{•+} en comparación con otras familias de polifenoles, debido a la presencia de la fracción catecol en su anillo B (Moazzaen, y col., 2022). Cabe destacar que la bebida de mora azul aumentó la excreción de (epi)-catequina glucurónido y metil-(epi)-catequina glucurónido, flavanales que tienen dicha característica estructural, lo que

podría proveerle significativamente una mayor capacidad antioxidante a esta bebida en comparación a la bebida de fresa, a pesar de esta última presentar una mayor concentración de metabolitos polifenólicos totales, como las urolitinas.

Por otro lado, si bien el análisis multivariado indicó que el perfil de metabolitos urinarios de polifenoles de las ratas alimentadas con una DAGF y suplementadas con las bebidas de mora azul y de fresa-mora azul era similar, se observa que la bebida de fresa-mora azul presentó una capacidad antioxidante menor por ambos ensayos de atrapamiento de radicales, lo que podría sugerir un efecto antagonista en la combinación de los perfiles de polifenoles de la fresa y mora azul. Sin embargo, es necesario llevar a cabo futuros estudios para profundizar en estos resultados.

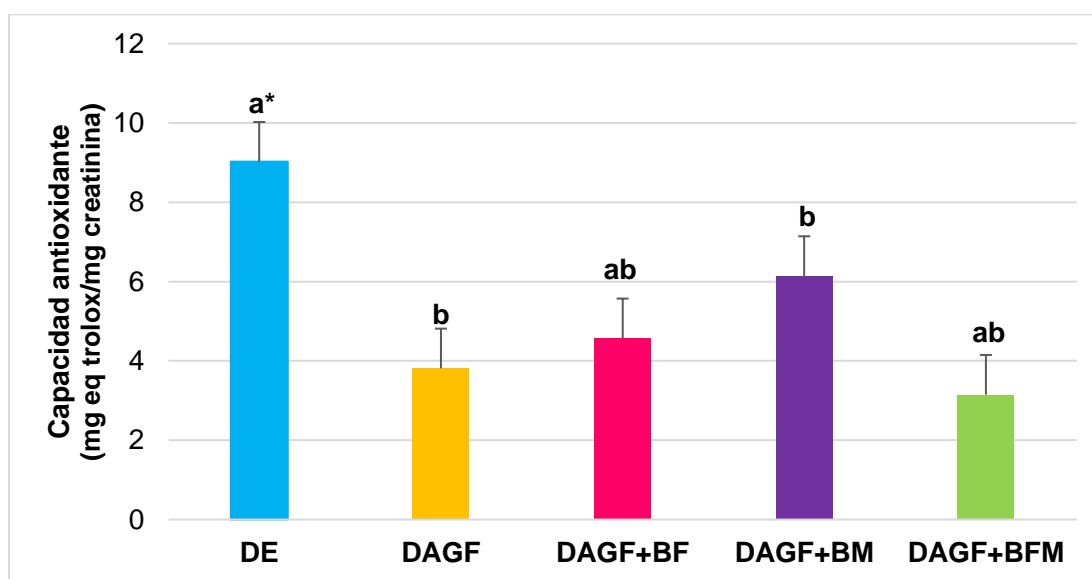


Figura 9. Capacidad de atrapamiento del radical ABTS[•] en orina de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas a base de decocciones de frutos rojos. Los valores representan la media \pm el error estándar de los grupos de animales. *Indica diferencias significativas ($p < 0.05$) en comparación con el grupo DAGF mediante la prueba de Dunnett o Wilcoxon. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$) por prueba de Tukey o Friedman. AG: ácido gálico, DE: dieta estándar, DAGF: dieta alta en grasa y fructosa, BF: bebida de fresa, BM: bebida de mora azul, BFM: bebida de fresa y mora azul, $n=10$.

Las tendencias de la capacidad antioxidante no son directamente proporcionales a la cantidad de fenoles totales en los grupos experimentales (Munteanu y Apetrei, 2021), lo cual se pudo observar en los resultados obtenidos en el ensayo de

atrapamiento del radical ABTS^{•+}, específicamente con los grupos de menor capacidad antioxidante. De acuerdo con Moazzaen y colaboradores (2022), se ha demostrado la mejora de la capacidad antioxidante de compuestos polifenólicos puros cuando existe una mayor cantidad de grupos hidroxilo o cuando se encuentra un grupo funcional carbonilo en el anillo C y en el doble enlace en flavonoides, lo cual podría reflejarse en el caso de los animales a los que solo se les suministró la dieta estándar, ya que estos consumieron significativamente mayor cantidad de alimento que el resto de los grupos. Dicha dieta presenta isoflavonas de soya como daidzeína, genisteína y gliciteína que tienen dos o tres grupos hidroxilo (Ludueña y col., 2007) que pudieron mejorar la capacidad antioxidante de estos compuestos. Además de lo anterior, la prueba ABTS puede ayudar a detectar la capacidad antioxidante de compuestos que tienen bajos potenciales redox (Munteanu y Apetrei, 2021).

5. CONCLUSIONES

La fresa y mora azul pueden ser utilizadas para la elaboración de decocciones en el desarrollo de una bebida funcional, debido a que sus polifenoles son metabolizados y absorbidos, brindando una mayor capacidad antioxidante. Si bien, el consumo de la bebida de fresa brinda una alta diversidad y concentración de metabolitos de polifenoles, estos presentan una similar capacidad antioxidante que la obtenida tras el consumo de la bebida de mora azul; lo cual refuerza la importancia de la actividad individual y sinérgica de cada componente bioactivo. Sin embargo, es necesario continuar con investigaciones científicas para entender el impacto de dichos metabolitos de polifenoles y su poder antioxidante sobre los efectos benéficos a la salud de las bebidas desarrolladas.

7. REFERENCIAS

- Baby B**, Antony P, Vijayan R. Antioxidant and anticancer properties of berries. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2018**;58(15):2491-2507.
- Barrett K**, Barman S, Boitano S, Brooks H. Ganong. Fisiología médica. 24. México: McGraw Hill **2013**;429-450.
- Brand-Williams W**, Cuvelier ME, Berset CLWT. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Tech* **1995**;28:25-30.
- Buszewski B**, Baranowska I. Medical Bioanalytics: Separation Techniques in Medical Diagnostics of Neurological Diseases and Disorders on Selected Examples. En: *Handbook of Bioanalytics*. Switzerland: Springer Cham **2022**: 49-66.
- Carvajal C**. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *SciELO* **2019**;36(1):91-100.
- Chandra P**, Rathore AS, Kay KL, Everhart JL, Curtis P, Burton-Freeman B, Cassidy A, Kay CD. Contribution of Berry Polyphenols to the Human Metabolome. *Molecules* **2019**;20:24(23):4220.
- Chen**, L., Cao, H., Huang, Q., Xiao, J., & Teng, H. Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2022**;62(28):7730-7742
- Chong J**, Wishart D, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinformatics* **2019**;68(1):e86.
- Cipolletti M**, Solar-Fernandez V, Montalesi E, Marino M, Fiocchetti M. Beyond the antioxidant activity of dietary polyphenols in cancer: the modulation of estrogen receptors (ERs) signaling. *Int J Mol Sci* **2018**;19:2-24.
- Cladis D**, Debelo H, Lachcik P, Ferruzzi M, Weaver C. Increasing Doses of Blueberry Polyphenols Alters Colonic Metabolism and Calcium Absorption in Ovariectomized Rats. *Mol Nutr Food Res* **2020**;64(12):e2000031.
- Cladis D**, Simpson A, Cooper K, Nakatsu CH, Ferruzzi M, Weaver C. Blueberry polyphenols alter gut microbiota & phenolic metabolism in rats. *Food Funct* **2021**;12(6):2442-2456.
- Corella D**, Ordovás J. Biomarcadores: antecedentes, clasificación y guía para su aplicación en epidemiología nutricional. *Rev Esp Nutr Comunitaria* **2015**;211:176-187.

Dini I, Grumetto L. Recent Advances in Natural Polyphenol Research. *Molecules* **2022**;27(24):8777.

Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients* **2021**;13(1):273.

ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 Ensanut-Presentación de resultados. [monografía en internet] México: 2018, [consultado 2023 junio 24] 1-42. Disponible en: https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf

Fabbrini M, D'Amico F, Barone M, et al. Polyphenol and Tannin Nutraceuticals and Their Metabolites: How the Human Gut Microbiota Influences Their Properties. *Biomolecules* **2022**;12(7):875.

Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov* **2021**;20(9):689-709.

Fotirić M, Dabić D, Sredojević M, Milivojević J, Gašić U, Meland M, Natić M. Chemometric characterization of strawberries and blueberries according to their phenolic profile: combined effect of cultivar and cultivation system. *Molecules* **2019**;24:4310.

Gutiérrez E, Ambriz D, Leyva N, Castillo R, Basilio-Heredia J. Review: dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Arch Latinoam Nutr* **2016**;66:87-100.

Heimler D, Vignolini P, Dini MG, Vincieri FF, Romani A. Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chem* **2006**;99:464-469.

Hernández J. Epidemiología de la obesidad y consecuencias de morbilidad. *Npunto* [serie en internet] **2019**, [consultado 2022 junio 22]; 2(17): [aprox 11 pp]. Disponible en: <https://www.npunto.es/revista/npunto-volumen-ii-numero-17-agosto-2019>

Hussain M, Hassan S, Waheed M, Javed A, Farooq M, Tahir A. Bioavailability and metabolic pathway of phenolic compounds. En: *plant physiological aspects of phenolic compounds*. IntechOpen **2019**;1:1-18.

Lavefve L, Howard L, Carbonero F. Berry polyphenols metabolism and impact on human gut microbiota and health. *Food Funct* **2020**;11:45-65.

Lee S, Keirseley KI, Kirkland R, Grunewald ZI, Fischer JG, de La Serre CB. Blueberry Supplementation Influences the Gut Microbiota, Inflammation, and Insulin Resistance in High-Fat-Diet-Fed Rats. *J Nutr* **2018**;148(2):209-219.

Leri M, Scuto M, Ontario ML, et al. Healthy effects of plant polyphenols: molecular mechanisms. *Int J Mol Sci* **2020**;21(4):1250.

León-Pedroza J, González-Tapia L, del Olmo-Gila E, Castellanos-Rodríguez D, Escobedo G, González-Chávez A. Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica. *Cirugía y Cirujanos* **2015**;83(6):543-551.

Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* **2018**;13:757-772.

Lin Y, Wang C, Cao S, Sun Z, Zhang Y, Li M, He W, Wang Y, Chen Q, Zhang Y, Wang X, Luo Y, Tang H. Proanthocyanidins Delay Fruit Coloring and Softening by Repressing Related Gene Expression during Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) Ripening. *Int J Mol Sci* **2023**;24(4):3139

Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, Beguinot F, Miele C. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci*. **2019**;20(9):2358.

Lozano A, Bacca C, Pinzón V, Rozo C. Bioquímica. Metabolismo energético, conceptos y aplicación. Colombia: Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano **2011**;(1):1-327.

Luca S, Macovei I, Bujor A, Miron A, Skalicka-Woźniak K, Aprotosoiaie A, Trifan A. Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2019**;60(4):626-659.

Ludueña B, Mastandrea C, Chichizola C, Franconi M. Isoflavonas en soja, contenido de daidzeína y genisteína y su importancia biológica. *ByPC* **2007**;71(1):54-66.

Mali A, Padhye S, Anant S, Hegde M, Kadam S. Anticancer and antimetastatic potential of enterolactone: Clinical, preclinical and mechanistic perspectives. *Eur J Pharmacol* **2019**;852:107-124.

Marhuenda-Muñoz M, Laveriano-Santos EP, Tresserra-Rimbau A, Lamuela-Raventós RM, Martínez-Huélamo M, Vallverdú-Queralt A. Microbial phenolic metabolites: which molecules actually have an effect on human health? *Nutrients* **2019**;11:2725.

Mennen LI, Sapinho D, Ito H, Bertrais S, Galan P, Hercberg S, Scalbert A. Urinary flavonoids and phenolic acids as biomarkers of intake for polyphenol-rich foods. *Br J Nutr* **2006**;96:91-198.

Miller K, Feucht W, Schmid M. Bioactive Compounds of Strawberry and Blueberry and Their Potential Health Effects Based on Human Intervention Studies: A Brief Overview. *Nutrients* **2019**;11(7):1510.

Munteanu I, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci* **2021**;22(7):3380.

Olas B. Berry Phenolic Antioxidants - Implications for Human Health? *Front Pharmacol* **2018**;9:78.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Obesidad y sobrepeso. [monografía de internet] México: **2021** [consultado 2021 agosto 23]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.

Pap N, Fidelis M, Azevedo L, Carmo M, Wang D, Mocan A, Pereira E, Xavier-Santos, D, Sant'Ana, A, Yang B, Granato D. Berry polyphenols and human health: evidence of antioxidant, anti-inflammatory, microbiota modulation, and cell-protecting effects. *Curr Opin Food Sci* **2021**;42:167-186.

Quirós A, Palafox H, Robles R, González G. Interacción de compuestos fenólicos y fibra dietaria: capacidad antioxidante y biodisponibilidad. *Rev Cienc de la Salud* **2011**;13:3-11.

Re R, Pellegrini N, Proteggent A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* **1999**;26:1231-1237.

Restrepo A, Cortés M, Rojano B. Potenciación de la capacidad antioxidante de fresa (*Fragaria ananassa* Duch) por incorporación de vitamina E utilizando la técnica de impregnación a vacío. *Vitae-Colubia* **2010**;17:135-140.

Reynoso-Camacho R, Sotelo-González AM, Patiño-Ortiz P, Rocha-Guzmán NE, Pérez-Ramírez IF. Berry by-products obtained from a decoction process are a rich source of low-and high-molecular weight extractable and non-extractable polyphenols. *Food and Bioprod Process* **2021**;127:371-387.

Roura E, Andrés-Lacueva C, Estruch R, Lamuela-Raventós RM. Total polyphenol intake estimated by a modified Folin–Ciocalteu assay of urine. *Clin Chem* **2006**;52:749-752.

Ruiz-Perez D, Guan H, Madhivanan P, Mathee K, Narasimhan G. So you think you can PLS-DA? *BMC Bioinformatics*. **2020**;21(Suppl 1):2.

Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (SAGARPA). Frutas del bosque. Arándano, frambuesa, zarzamoras mexicanas. Planeación agrícola nacional 2017-2030. [monografía de internet]. México: SAGARPA, **2017**, [consultado 2021 septiembre 28]: 1-28. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257076/Potencial-Frutas_del_Bosque.pdf

Sandoval-Salazar C, Oviedo-Solís CI, Lozoya-Gloria E, Aguilar-Zavala H, Solís-Ortiz MS, Pérez-Vázquez V, Balcón-Pacheco CD, Ramírez-Emiliano J. Strawberry Intake Ameliorates Oxidative Stress and Decreases GABA Levels Induced by High-Fat Diet in Frontal Cortex of Rats. *Antioxidants (Basel)* **2019**;8(3):70.

Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) e Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Encuesta nacional de salud y nutrición (ENSANUT) 2018. Presentación de resultados [monografía en internet] **2018** [consultado 2022 junio 22]; 1-42. Disponible en: https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquería (SIAP). Panorama Agroalimentario. [monografía de internet] México:SIAP, **2020**, [consultado 2021 noviembre 28]; 1-200. Disponible en:

https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2020/AtlasAgroalimentario-2020

Sharif M, Fu H, He Sun, Affoh R, Yu H. The impact of polyphenol on general nutrient metabolism in the monogastric gastrointestinal tract. *J Food Qual* **2020**;2020:1-12.

Silva S, Costa E, Veiga M, Morais R, Calhau C, Pintado M. Health promoting properties of blueberries: a review, *Crit Rev Food Sci Nutr* **2020**;60(2):181-200.

Singla R, Dubey A, Garg A, Sharma R, Fiorino M, Ameen S, et.al. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *J AOAC Int* **2019**;102(5),1397-1400.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol* **1999**;299:152-178.

Sotelo-González AM, Reynoso-Camacho R, Hernández-Calvillo AK, Castañón-Servín AP, García-Gutiérrez DG, Gómez-Velázquez HD, Martínez-Maldonado MA, de los Ríos EA, Pérez-Ramírez IF. Strawberry, Blueberry, and Strawberry-Blueberry blend beverages prevent hepatic steatosis in obese rats by modulating key genes involved in lipid metabolisms. *Int J Environ Res Public Health* **2023**;20(5):4418.

Spencer J, Abd El Mohsen M, Minihane A, Mathers J. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br J Nutr* **2008**;99(1):12-22.

Talavéra S, Felgines C, Texier O, Besson C, Gil-Izquierdo A, Lamaison J, Rémésy C. Anthocyanin Metabolism in Rats and Their Distribution to Digestive Area, Kidney, and Brain. *J Agric Food Chem* **2005**;53(10),3902-3908.

Ulaszewska M, Garcia-Aloy M, Vázquez-Manjarrez N. et al. Food intake biomarkers for berries and grapes. *Genes Nutr* **2020**;15:17.

Van Duynhoven J, Vaughan EE, Jacobs DM, et al. Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proc Natl Acad Sci* **2011**;108:4531-4538.

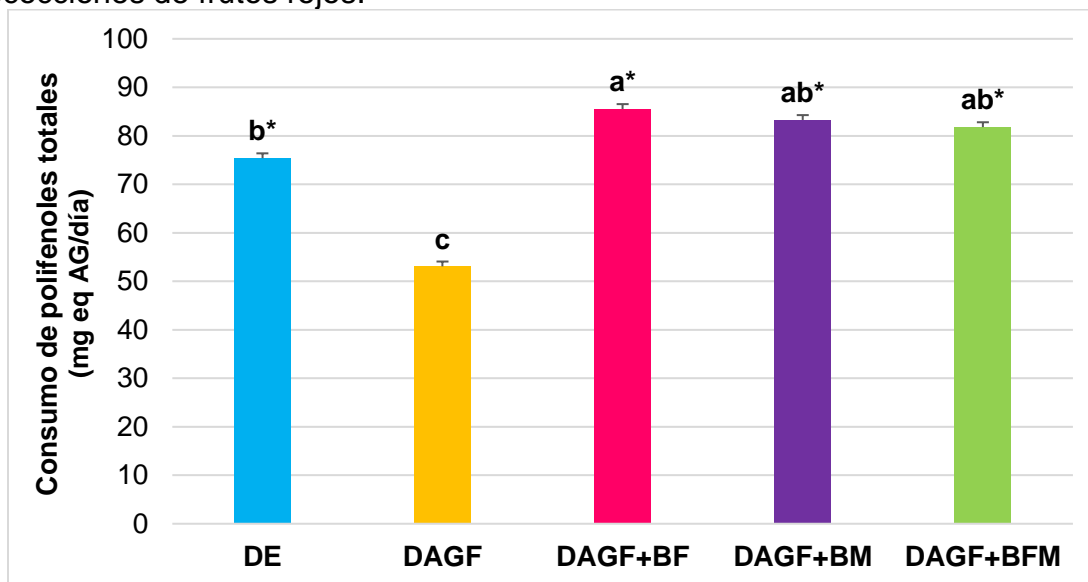
Wu T, Gao Y, Guo X, Zhang M, Gong L. Blackberry and Blueberry Anthocyanin Supplementation Counteract High-Fat-Diet-Induced Obesity by Alleviating Oxidative Stress and Inflammation and Accelerating Energy Expenditure. *Oxid Med Cell Longev* **2018**;2018:4051232.

Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients* **2018**;10(11):1618.

Yaskolka A, Tuohy K, von Bergen M, Krajmalnik-Brown R, Heinig U, Zelicha H, Tsaban G, Rinott E, Kaplan A, Aharoni A, Zeibich L, Chang D, Dirks B, Diotallevi C, Arapitsas P, Vrhovsek U, Ceglarek U, Haange SB, Rolle-Kampczyk U, Engelmann B, Lapidot M, Colt M, Sun Q, Shai I. The Metabolomic-Gut-Clinical Axis of Mankai Plant-Derived Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2021**;13(6):1866.

ANEXOS

Anexo 1. Consumo promedio de polifenoles totales en la dieta de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementada con bebidas de decocciones de frutos rojos.



Los valores representan la media \pm el error estándar. AG: ácido gálico; DE: dieta estándar; DAGF: dieta alta en grasa y fructosa; BF: bebida de fresa; BM: bebida de mora azul; BFM: bebida de fresa y mora azul. n=10.

Anexo 2. Top 25 de los discriminantes del Componente 1 del Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales Dispersos de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementado con bebidas a base de decocciones de frutos rojos.

Metabolitos urinarios	Cargas	
	Componente 1	Componente 2
Catecol sulfato	0.2710	0
Urolitina B glucuronido	0.2696	0
Urolitina C	0.2694	0
Ácido dihidroxifelúrico	0.2689	0
Metilurolitina A	0.2658	0
Sulfato de metilpirogalol	0.2656	0
Ácido hidroxihipúrico	0.2656	0
Sulfato de ácido caféico	0.2526	0
Metilurolitina D glucorónido	0.2237	0
Sulfato de ácido vanílico	0.2207	0
Catecol	0.2197	0
Ácido dimetil elágico	0.2189	0
Urolitina A	0.2034	0.0769
Ácido dihidrocumárico	0.1923	0
Hidroxidaidzeína	0.1794	0
Ácido fenilpropiónico	0.1640	0
Dimetilurolitina D sulfato	0.1639	0
Sulfato de ácido cumárico	0.1601	0
Urolitina B	0.1524	0.0654
Enterolactona	0.1137	0.2547
Ácido hidroxifenilacético	0.0986	0.0184
Sulfato de dihidroxifenilvalerolactona	0.0450	0.2139
Sulfato de enterolactona	0.0249	0.0526
Sulfato de ácido ferúlico	0.0087	0.1636
Ácido metoxifenilacético	0.0041	0

Los datos se normalizaron por suma, se transformaron en raíz cuadrada y se auto escalaron.

Anexo 3. Top 25 de los discriminantes del Componente 2 del Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales Dispersos de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa suplementado con bebidas a base de decocciones de frutos rojos.

Metabolitos urinarios	Cargas	
	Componente 1	Componente 2
Metil-(epi)-catequina glucurónido	0	0.4208
Metoxihidroxifenilvalerolactona	0	0.3746
Equol glucuronido	0	0.3099
Dimetil quercetina	0	0.3034
Dihidroxifenilvalerolactona	0	0.2936
Hidroxigliciteína	0	0.2594
Enterolactona	0.1137	0.2547
(Epi)-catequina glucurónido	0	0.2362
Enterodiol	0	0.2338
Sulfato de dihidroxifenilvalerolactona	0.0450	0.2139
Glucurónido de apigenina	0	0.2123
Sulfato de ácido ferúlico	0.0087	0.1636
Ácido dihidroxifenilvalérico	0	0.1463
Glucurónido de dihidroaidzeína	0	0.0938
Urolitina A	0.2034	0.0769
Urolitina B	0.1524	0.0654
Glucorónido de gliciteína	0	0.0545
Sulfato de enterolactona	0.0249	0.0526
Glucurónido de ácido caféico	0	0.0470
Sulfato de ácido dihidroferúlico	0	0.0448
Sulfato de ácido dihidroxifenilvalérico	0	0.0382
Ácido cumárico	0	0.0269
Ácido hidroxifenilacético	0.0986	0.0184
Equol	0	0.0112
Metilequol	0	0.0097

Los datos se normalizaron por suma, se transformaron en raíz cuadrada y se auto escalaron.