

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA SALUD Y
BIOMEDICINA CICSaB**



POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS

**CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA
SINÉRGICA CON AINES DEL TEJATE EN MODELOS MURINOS.**

TESIS QUE PRESENTA

M. EN C. MARÍA LEONOR GONZÁLEZ RIVERA

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS BÁSICAS**

CO - DIRECTORES DE TESIS

DR. JESÚS FLAVIO MARTÍNEZ MORALES

DR. OTHONIEL HUGO ARAGÓN MARTÍNEZ

Mayo del 2022



Capacidad antioxidante y actividad antinociceptiva sinérgica con AINES del tejate en modelos murinos. De María Leonor González Rivera. Está licenciado bajo una [Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) .

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se llevó a cabo en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la dirección del Dr. Jesús Flavio Martínez Morales y del Dr. Othoniel Hugo Aragón Martínez.

Este proyecto se realizó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT-Salud 257875.

María Leonor González Rivera contó con una beca CONACyT con número de registro 584981.

Tesis que presenta

M. EN C. MARÍA LEONOR GONZÁLEZ RIVERA

Para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biomédicas Básicas

Co - directores de tesis

Dr. Jesús Flavio Martínez Morales

Dr. Othoniel Hugo Aragón Martínez

Asesores internos

Dra. Othir Gidalti Galicia Cruz

Dra. Saray Aranda Romo

Asesor externo

Dr. Juan Ramón Zapata Morales

Jurado

Dra. Leticia Guadalupe Yáñez Estrada

Dra. Patricia Elizabeth Cossío Torres

Dra. Othir Gidalti Galicia Cruz

Dra. Saray Aranda Romo

Dr. Juan Ramón Zapata Morales

Sinodal Suplente: Dra. Esther Layseca Espinosa

Mayo del 2022

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

La capacidad antioxidante es la habilidad que poseen algunas moléculas para neutralizar radicales libres, algunos ejemplos son, los carotenoides, los tocoferoles, los tocotrienoles, los ascorbatos y los fenoles (Floegel et al. 2011; Kumar et al. 2014). Una actividad antioxidante alta se asocia con efectos benéficos, tales como la protección cardiovascular. Se conoce que la enfermedad cardiovascular es la principal causa de las enfermedades no comunicables y es responsable del 50 % de las muertes en países desarrollados y del 23% en países en vías de desarrollo, como es el caso de México (WHO 2014; Mawardi et al. 2015; INEGI 2020). Debido a lo anterior, los consumidores, la industria alimenticia e investigadores han mostrado un gran interés en el valor antioxidante de los productos alimenticios (Del Pino-García et al. 2015). Existen varios métodos para determinar la capacidad antioxidante, uno de ellos es el 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6 ácido sulfónico) (ABTS). Una versión de este método involucra la generación de un radical catiónico ABTS^{•+} estable, la reacción con antioxidantes de una muestra problema (Re et al. 1999) y la lectura espectrofotométrica del radical catiónico residual a las longitudes de onda de 414, 645, 734 y 815 nm (Opitz et al. 2014a). Sin embargo, no existen trabajos científicos que describan un procedimiento de validación completa de esta técnica (Re et al. 1999; Janaszewska and Bartosz 2002; Nenadis et al. 2007; Rivero-Pérez et al. 2007; Wangcharoen and Morasuk 2007; Barton 2010; Raudonis et al. 2010; Floegel et al. 2011; Raudonis et al. 2012; Prasetyo et al. 2013; Opitz et al. 2014a, 2014b; Del Pino-García et al. 2015; Leo et al. 2016; Rubio et al. 2016; Lee et al. 2017; Mennah-Govela and Bornhorst 2017; Niero et

al. 2017; Bampali et al. 2018; Camelo-Méndez et al. 2018). La optimización y la validación completa de cualquier método son necesarias para asegurar la confiabilidad, idoneidad, exactitud y precisión de los resultados (ICH 2005; Rivero-Pérez et al. 2007; Raudonis et al.2012; NOM-177-SSA1-2013 2013; Opitz et al. 2014b; Gómez Ruiz et al. 2016; USDHHS et al. 2018). Existen guías utilizadas para garantizar la validez de las determinaciones cuantitativas como la descrita por la administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos, la conferencia internacional de armonización y la normatividad mexicana (ICH 2005; NOM-177-SSA1-2013; USDHHS et al. 2018). Es importante que, durante la validación analítica del método, los estándares de calibración y los controles de calidad sean preparados en la misma matriz que la muestra problema, por ejemplo, se deberá utilizar el agua para bebidas preparadas en este diluyente (van de Merbel 2008; Thakare et al. 2016; USDHHS et al. 2018). También, los estándares de calibración deben prepararse por adición del analito en una matriz artificial (subrogada), cuando las muestras libres de analito de la matriz auténtica no están disponibles (van de Merbel 2008; Thakare et al 2016; USDHHS et al 2018). Es conocido que la presencia de iones en una matriz subrogada o medio de reacción puede alterar la reacción cinética debido al uso de solución salina amortiguadora de fosfatos durante las pruebas con antioxidantes (Gonzalez-Rivera et al. 2018).

El método de ABTS^{*+} es útil para evaluar el potencial antioxidante de productos naturales y alimentos que se encuentran constituidos por los mismos, por ejemplo, el tejate. Éste es una bebida tradicional mexicana oriunda de la región zapoteca de los valles centrales de Oaxaca, cuyo nombre proviene de las palabras náhuatl *textli* (harina) y *atl* (agua) que significa agua harinosa (Soleri &

Cleveland 2007). Desde épocas ancestrales ha sido consumida en ceremonias de la siembra y la cosecha de maíz, en jornadas arduas de trabajo y ha sido asociada con las festividades que rodean a la Semana Santa. Actualmente, el tejate es una bebida popularmente consumida por Oaxaqueños y migrantes mexicanos que viven en los Estados Unidos de América (Soleri, Cleveland, Aragón Cuevas, 2008).

Esta bebida tradicional está conformada por las semillas de *Theobroma cacao* (cacao), *Theobroma bicolor* y *Pouteria sapota* (mamey), la flor de *Quararibea funebris* (La Llave) Vischer (rosita de cacao), los granos nixtamalizados del *Zea mays* (maíz), agua y azúcar (Sotelo et al. 2012). Algunos de estos componentes han mostrado poseer propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y analgésicas como es el caso del *Theobroma cacao* y el *Zea mays* (Avendaño Arrazate et al. 2021; Bowden et al. 2017; Owoyele et al. 2010; Pérez-Mora et al. 2018; Selmi et al. 2006). La semilla de *Theobroma cacao* es una fuente rica de polifenoles con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que reducen la activación de monocitos y neutrófilos y disminuyen el nivel de mediadores proinflamatorios, tales como citocinas, eicosanoides, plaquetas y óxido nítrico (Ellinger & Stehle 2016). Un producto derivado de esta semilla conocido como cocoa, al ser utilizado al 10% (p/p), mostró efectos antinociceptivos al inhibir la hiperalgesia térmica inducida por la capsaicina a una temperatura de 44°C en ratas hembra (Bowden et al. 2017). Además, en pacientes con periodontitis, el consumo de cocoa al 78% durante un periodo de 4 semanas, incrementó la capacidad antioxidante y disminuyó la peroxidación lipídica (Roodgaryan et al. 2015).

La semilla de *Theobroma bicolor*, conocida como macambo, bacau y pataste, posee capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales con niveles inferiores a los del *Theobroma cacao* (Pérez-Mora et al. 2018; Avedaño Arrazate et al. 2021). Los granos del *Zea mays*, tienen propiedades antioxidantes y la cáscara del *Zea mays* propiedades analgésicas (Bowden et al. 2017; Owoyele et al. 2010; Selmi et al. 2006; Salinas Moreno et al. 2012). Otro componente del tejate con propiedades benéficas es la semilla de mamey, la cual al ser extraída en metanol al 70 % (v/v), mostró niveles de actividad antioxidante de 22.7 a 41.8 $\mu\text{mol Fe (II)/g}$ de la semilla (Aragón-Martínez et al. 2017).

Considerando las propiedades benéficas de los productos naturales que constituyen a la bebida tradicional, se podría suponer que el tejate las presenta. Hasta ahora, no existen artículos científicos que se enfoquen en el estudio de la capacidad antioxidante y el efecto antinociceptivo del tejate. Por otro lado, resultaría de gran interés conocer si la bebida tradicional presenta interacción con fármacos con actividad antinociceptiva, como los antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Dentro de esta familia de fármacos se encuentran el ketorolaco y naproxeno (Alonso Castro et al. 2017; Zapata Morales et al. 2016), los cuales, actúan inhibiendo la enzima ciclooxigenasa 2, disminuyendo los niveles de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos y produciendo un efecto antinociceptivo (Cooper et al. 2019).

JUSTIFICACIÓN

Estudios de productos a base de cacao mostraron un aumento sobre la capacidad antioxidante y una reducción del estrés oxidativo en condiciones clínicas y en humanos sanos.

Una bebida tradicional mexicana con gran relevancia tradicional y cultural que se encuentra constituida por las semillas de cacao es el tejate. Esta bebida contiene otros componentes con capacidad antioxidante como las semillas de mamey y los granos del *Zea mays*. Además, la cáscara del *Zea mays* y el producto derivado de la semilla del *Theobroma cacao*, conocido como cocoa, poseen propiedades antinociceptivas y antiinflamatorias.

Otros compuestos químicos que podrían contribuir a la capacidad antioxidante del tejate, son los fenoles dada su presencia en las semillas de *Theobroma cacao* y *Theobroma bicolor* (Pérez-Mora et al. 2018; Avedaño Arrazate et al. 2021).

No existen reportes científicos que se enfoquen en el estudio de la capacidad antioxidante y el efecto antinociceptivo del tejate. Sin embargo, debido a la presencia de productos naturales con estas propiedades en el tejate, es posible que esta bebida tradicional también las posea. Es importante, investigar los beneficios de bebidas tradicionales como el tejate para contrarrestar el estrés oxidativo que se encuentra presente en condiciones clínicas en las que coexisten dolor e inflamación. Además, es imprescindible evaluar las interacciones del tejate con fármacos debido a que podrían existir alteraciones en los perfiles farmacodinámicos y farmacocinéticos que podrían impactar en la efectividad de los tratamientos (Singh, 1999). Resultaría de gran utilidad evaluar la interacción antinociceptiva del tejate con fármacos empleados en el tratamiento del dolor como los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), por ejemplo, el ketorolaco y naproxeno.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Tiene el tejate capacidad antioxidante y efectos antinociceptivos que se potencian con AINES?

HIPÓTESIS

El tejate tiene capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo* y efectos antinociceptivos en modelos murinos y una acción sinérgica con el ketorolaco y naproxeno.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad antioxidante del tejate *in vitro* e *in vivo* y su efecto antinociceptivo en modelos murinos y su probable sinergismo antinociceptivo con el ketorolaco y naproxeno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo* del tejate utilizando los métodos validados de la decoloración del radical catiónico ABTS^{*+} y el de FRAP y el contenido de fenoles totales *in vitro* utilizando el método de Folin Ciocalteau.
2. Evaluar el efecto antinociceptivo del tejate en el modelo murino de dolor visceral inducido con el ácido acético.
3. Determinar si existe interacción antinociceptiva del tejate con los AINES ketorolaco y naproxeno en el modelo murino de dolor visceral inducido con el ácido acético.

METAS

1. Cuantificar la capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo* y el contenido de fenoles totales *in vitro* del tejate utilizando los métodos validados de ABTS⁺, FRAP y Folin Ciocalteau.
2. Cuantificar el consumo de alimento y bebida, consumo de calorías, el peso corporal, flujo urinario, la creatinina plasmática, aclaramiento de creatinina, la concentración de alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa en los grupos tejate o control.
3. Evaluar las diferencias en la capacidad antioxidante *in vivo* del tejate *versus* el grupo control utilizando pruebas estadísticas apropiadas.
4. Determinar el efecto antinociceptivo del tejate en el modelo murino de dolor visceral inducido por el ácido acético mediante la cuantificación del número de las contorsiones abdominales durante 30 minutos.
5. Establecer las diferencias de los grupos experimentales mediante el análisis estadístico de ANOVA de 1 vía seguido de la prueba de Dunnett.
6. Determinar el efecto antinociceptivo del ketorolaco y naproxeno mediante el cálculo del % del efecto antinociceptivo máximo y la dosis efectiva 50 (DE₅₀).
7. Calcular la DE₅₀ del tejate mediante un análisis de regresión lineal.
8. Determinar la interacción del tejate con los AINES a partir de las DE₅₀ teóricas y experimentales de un análisis isoblográfico y el índice de interacción.

MÉTODOS Y TÉCNICAS

Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo* del tejate.

La capacidad antioxidante *in vitro* fue evaluada en las soluciones del tejate de 120, 240, 480 y 650 g/L (n=6) y en concentraciones de sacarosa equivalentes

al contenido de carbohidratos totales en las soluciones del teñate de 102, 204, 408 y 552 g/L (n=6/concentración de lote distinto del teñate comercial) utilizando el agua potable como diluyente. La sacarosa fue utilizada con la finalidad de evaluar su contribución a la capacidad antioxidante y fenoles totales del teñate.

La evaluación *in vivo* de la capacidad antioxidante del teñate fue realizada en ratas Wistar tratadas con una concentración de 102 g/L de la sacarosa (control) o 120 g/L de teñate. En el sexto día, las ratas fueron colocadas en una jaula metabólica para determinar el consumo de alimento y bebida y el volumen de orina. En el octavo día, a los animales se les realizó una punción intracardiaca para obtener una muestra sanguínea a partir de la cual se separó el plasma para posteriormente, determinar los niveles de alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y la capacidad antioxidante.

Los métodos utilizados para evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo* fueron la decoloración del radical catiónico ABTS^{•+} y FRAP.

El método de la decoloración del radical catiónico ABTS^{•+} fue optimizado y validado de acuerdo con la guía de la validación de métodos analíticos de la administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos en las matrices de agua y solución salina amortiguadora (PBS) pH 7.4 para cuantificar las muestras problema de teñate en agua o las muestras plasmáticas, respectivamente. El procedimiento estandarizado consistió en la adición de 3 µL de la muestra problema (el ácido ascórbico, el agua, el PBS y el sobrenadante de la bebida de teñate o el plasma) a 300 µL de la solución de ABTS^{•+} y la lectura de la muestra a 730 nm. Los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante fueron reportados en unidades de µmol de equivalentes de ácido ascórbico/L y como el porcentaje (%) de la inhibición del radical catiónico ABTS^{•+}.

El método de FRAP utilizado fue el publicado por nuestro equipo de trabajo en el 2018 (Gonzalez-Rivera et al. 2018).

El método de Folin Ciocalteu fue empleado para determinar el contenido de fenoles totales. La metodología fue la de Abramovic y cols. con algunas modificaciones (Abramovič et al. 2017). El procedimiento consistió en la mezcla de 20 μ L de la muestra problema (ácido salicílico, agua o sobrenadante de la bebida de tejate), 280 μ L de agua y 50 μ L del reactivo de Folin Ciocalteu al 50% (v/v), seguido de la adición de 50 μ L de carbonato de sodio al 20% (p/v). La lectura de las muestras se realizó a 760 nm.

Evaluación del efecto antinociceptivo del tejate solo y en combinación con AINES.

El efecto antinociceptivo del tejate (25, 50, 200 y 400 mg/kg) y de los controles positivos, el ketorolaco (1.25, 2.5, 5 y 10 mg/kg) y el naproxeno (10, 25, 50 y 250 mg/kg) fueron evaluados en ratones Balb/C con el modelo de dolor visceral inducido por el ácido acético. Por otro lado, se estimó la dosis a la cual se obtiene el 50 % del efecto antinociceptivo (DE_{50}) y ésta se calculó de los datos transformados de la curva dosis-respuesta a log de la dosis-respuesta de cada componente evaluado. La DE_{50} del tejate, ketorolaco y naproxeno fue usada para realizar la combinación 1:1 del tejate- ketorolaco y tejate-naproxeno y a partir de ésta se realizaron las diluciones de 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16.

La interacción farmacodinámica del ketorolaco y naproxeno con el tejate fue realizada empleando isobologramas. Los anteriores, fueron obtenidos de la unión de los valores de la DE_{50} del tejate y de la DE_{50} del ketorolaco o naproxeno,

los cuales fueron graficados en los ejes de las abscisas (eje X) y ordenadas (eje Y), respectivamente.

El valor de la DE₅₀ de la combinación del tejate y AINES fue determinado a partir del análisis de la regresión lineal del log de la curva dosis-respuesta (seis animales /dosis y al menos 4 dosis) y comparado con una t de Student al valor de la DE₅₀ aditiva teórica (Miranda, Pinardi 2009; Tallarida 2002). Los valores de la DE₅₀ teórica y experimental de la combinación del tejate - ketorolaco o tejate - naproxeno fueron utilizados para estimar el índice de interacción (γ) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\gamma = \frac{a}{A} + \frac{b}{B}$$

En esta expresión, las letras mayúsculas A y B corresponden a la DE₅₀ teórica individual del tejate o del AINE, respectivamente. Las letras minúsculas a y b representan la dosis del tejate o del AINE en la combinación que produce el nivel del efecto deseado. Un valor próximo a 1 indica un efecto aditivo, un valor mayor a 1 indica antagonismo y un valor menor a 1 indica sinergismo (Tallarida 2002).

RESULTADOS OBTENIDOS

La validación analítica del ensayo del ABTS^{•+} presentó una relación inversa, rango aceptable, selectividad, precisión, exactitud, precisión a corto y largo plazo, selectividad, identidad y corto tiempo de análisis.

La evaluación *in vitro* del tejate mostró que tiene capacidad antioxidante y fenoles totales dependientes de la concentración del tejate e *in vivo* aumentó la

capacidad antioxidante después de 7 días de consumo respecto al grupo tratado con sacarosa (102 g/L) únicamente en el método del ABTS⁺. Por otro lado, no existieron diferencias en los parámetros restantes evaluados en los grupos de las ratas tratadas con tejate o sacarosa.

El tejate presentó efectos antinociceptivos e interacción sinérgica con AINES.

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se demostró por primera vez que la bebida tradicional tejate tiene actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* y efectos antinociceptivos e interacción sinérgica con AINES (ketorolaco y el naproxeno) en un modelo agudo de dolor visceral. Cabe destacar que estas propiedades podrían variar dependiendo de los componentes que se utilicen, la estación del año en el que se recolecten los ingredientes del tejate y la preparación de la bebida tradicional.

REFERENCIAS

Abramovič H, Grobin B, Poklar Ulrih N, Cigić B (2017). The methodology applied in DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu assays has a large influence on the determined antioxidant potential. *Acta Chim Slov* 64:491–499. <https://doi.org/10.17344/acsi.2017.3408>.

Aragon Martinez OH, Martinez Morales F, Alonso Castro AJ, Gonzalez Rivera ML, Isiordia Espinoza MA & Galicia Cruz OG (2017). Could the Seed of Mamey Sapote Relieve the Postoperative Pain? *Transylvanian Review*, Vol XXV, No. 22, 5989-5996.

Avendaño Arrazate CH, Campos Rojas E, López Palestina CU, Martínez Bolaños M, Caballero Pérez JF, Báez Alonso M, Ariza Flores R, Cadena Iñiguez J (2021). Actividad antioxidante en genotipos de *Theobroma* spp. (Malvaceae) en México. *Revista de Biología Tropical*, 69 (2): 507-523. [DOI: 10.15517/rbt.v69i2.41626](https://doi.org/10.15517/rbt.v69i2.41626).

Bampali E, Graikou K, Aligiannis N, Chinou I (2018). Kainari, a unique greek traditional herbal tea, from the island of Lesvos: chemical analysis and antioxidant and antimicrobial properties. *Evid Based Complement Alternat Med* 2018:6802753. [DOI: 10.1155/2018/6802753](https://doi.org/10.1155/2018/6802753).

Barton HJ (2010). A "zero sample concentration approach": standardization of methods for the estimation of total antioxidant activity by the use of extrapolation to zero sample concentration. A novel standard. 1. ABTS cation radical scavenging. *J Agric Food Chem* 58:8918-8926. [DOI: 10.1021/jf101066w](https://doi.org/10.1021/jf101066w).

Bowden LN, Rohrs EL, Omoto K, Durham PL, Holliday LS, Morris AD, Allen KD, Caudle RM & Neubert JK (2017). Effects of cocoa-enriched diet on orofacial pain in a murine model. *Orthod Cranio fac Res*, 20 (Suppl 1), 157–161. [DOI: 10.1111/ocr.12149](https://doi.org/10.1111/ocr.12149).

Camelo-Méndez GA, Vanegas-Espinoza PE, Escudero-Gilete ML, Heredia FJ, Paredes-López O, Del Villar-Martínez AA (2018). Colorimetric Analysis of Hibiscus Beverages and their Potential Antioxidant Properties. *Plant Foods Hum Nutr* 73:247-252. [DOI: 10.1007/s11130-018-0672-3](https://doi.org/10.1007/s11130-018-0672-3).

Cooper C, Chapurlat R, Al-Daghri N, Herrero-Beaumont G, Bruyère O, Rannou F, Roth R, Uebelhart D, Reginster JY (2019). Safety of Oral Non-Selective Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Osteoarthritis: What Does the

Literature Say?. *Drugs & Aging* 36 (Suppl 1): S15-S24. [DOI: 10.1007/s40266-019-00660-1](https://doi.org/10.1007/s40266-019-00660-1).

Del Pino-García R, García-Lomillo J, Rivero-Pérez MD, González-SanJosé ML, Muñiz P (2015). Adaptation and Validation of QUick, Easy, New, CHEap, and Reproducible (QUENCHER) Antioxidant Capacity Assays in Model Products Obtained from Residual Wine Pomace. *J Agric Food Chem* 63:6922-6931. [DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01644](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01644).

Ellinger S, & Stehle P (2016). Impact of Cocoa Consumption on Inflammation Process-A Critical Review of Randomized Controlled Trials. *Nutrients*, 8, 321. [DOI: 10.3390/nu8060321](https://doi.org/10.3390/nu8060321).

Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 24:1043-1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>.

Gonzalez-Rivera ML, Martinez-Morales F, Alonso-Castro AJ, Lopez-Rodriguez JF, Zapata-Morales JR, Aranda Romo S, Aragon-Martinez OH (2018). Validated and rapid measurement of the ferric reducing antioxidant power in plasma samples. *Chem Pap* 72:2561-2574. <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0512-9>.

Gómez Ruiz B, Roux S, Courtois F, Bonazzi C (2016). Spectrophotometric method for fast quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in simple matrix for kinetics measurements. *Food Chem* 211:583-589. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.107>.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2020, 29, 10). Características de las defunciones registradas en México durante el 2019.

CARACTERÍSTICAS DE LAS DEFUNCIONES REGISTRADAS EN MÉXICO DURANTE 2019 (inegi.org.mx).

International Conference on Harmonization (ICH) (2005). In: International conference on harmonization of technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use, validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva, Switzerland.

Janaszewska A, Bartosz G (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. Scand J Clin Lab Invest 62:231-236. [DOI: 10.1080/003655102317475498](https://doi.org/10.1080/003655102317475498).

Kumar S, Sandhir R, Ojha S (2014). Evaluation of antioxidant activity and total phenol in different varieties of *Lantana camara* leaves. BMC Research Notes 7:560. [DOI: 10.1186/1756-0500-7-560](https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-560).

Lee SG, Wang T, Vance TM, Hubert P, Kim DO, Koo SI, Chun OK (2017). Validation of analytical methods for plasma total antioxidant capacity by comparing with urinary 8-isoprostane level. J Microbiol Biotechnol 27:388-394. [DOI: 10.4014/jmb.1604.04053](https://doi.org/10.4014/jmb.1604.04053).

Leo F, Rossodivita AN, Segni CD, Raimondo S, Canichella S, Silvestrini A, Miggiano GA, Meucci E, Mancini A (2016). Frailty of Obese Children: Evaluation of Plasma Antioxidant Capacity in Pediatric Obesity. Exp Clin Endocrinol Diabetes 124:481-486. [DOI: 10.1055/s-0042-105280](https://doi.org/10.1055/s-0042-105280).

Mawardi HH, Elbadawi LS, Sonis ST (2015). Current understanding of the relationship between periodontal and systemic diseases. Saudi Med J 36:150-158. [DOI: 10.15537/smj.2015.2.9424](https://doi.org/10.15537/smj.2015.2.9424).

Mennah-Govela YA, Bornhorst GM (2017). Fresh-Squeezed Orange Juice Properties Before and During In Vitro Digestion as Influenced by Orange Variety

and Processing Method. J Food Sci 82:2438-2447. [DOI: 10.1111/1750-3841.13842](https://doi.org/10.1111/1750-3841.13842).

Mexican Official Norm NOM-177-SSA1-2013 (2013). Tests and procedures to prove that a medication is interchangeable. Official Journal of the Federation, Mexico City.

Miranda H.F., & Pinardi G (2009). Lack of effect of naltrexone on the spinal synergism between morphine and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Pharmacological Reports. 61: 268-274. [DOI: 10.1016/s1734-1140\(09\)70031-3](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(09)70031-3).

Nenadis N, Lazaridou O, Tsimidou MZ (2007). Use of reference compounds in antioxidant activity assessment. J Agric Food Chem 55:5452-5460. [DOI: 10.1021/jf070473q](https://doi.org/10.1021/jf070473q).

Niero G, Penasa M, Currò S, Masi A, Trentin AR, Cassandro M, De Marchi M (2017). Development and validation of a near infrared spectrophotometric method to determine total antioxidant activity of milk. Food Chem 220:371-376. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.10.024](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.024).

Opitz SE, Smrke S, Goodman BA, Keller M, Schenker S, Yeretian C (2014b). Antioxidant Generation during Coffee Roasting: A Comparison and Interpretation from Three Complementary Assays. Foods 3:586-604. [DOI: 10.3390/foods3040586](https://doi.org/10.3390/foods3040586)

Opitz SEW, Smrke S, Goodman BA, Yeretian C (2014a). Chapter 26 - Methodology for the Measurement of Antioxidant Capacity of Coffee: A Validated Platform Composed of Three Complementary Antioxidant Assays. In: Predy V (ed) Processing and Impact on Antioxidants in Beverages. Academic Press, Elsevier, Massachusetts, pp 253-264. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00026-X>.

Owoyele BV, Negedu MN, Olaniran SO, Onasanwo SA, Oguntoye SO, Sanya JO, Oyeleke SA, Ibidapo AJ & Soladoye AO (2010). Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of Aqueous Extract of Zea mays Husk in Male Wistar Rats. *J Med Food*, 13 (2), 343–347. [DOI: 10.1089/jmf.2008.0311](https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0311).

Pérez-Mora W, Jorrin-Novo JV, Melgarejo LM (2018). Substantial equivalence analysis in fruits from three *Theobroma* species through chemical composition and protein profiling. *Food Chemistry* 240: 496-504. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.07.128](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.128).

Prasetyo EN, Knes O, Nyanhongo GS, Guebitz GM (2013). Developing SyrinOX total antioxidant capacity assay for measuring antioxidants in humans. *Int J Exp Pathol* 94:25-33. [DOI: 10.1111/iep.12001](https://doi.org/10.1111/iep.12001).

Raudonis R, Bumblauskiene L, Jakstas V, Pukalskas A, Janulis V (2010). Optimization and validation of post-column assay for screening of radical scavengers in herbal raw materials and herbal preparations. *J Chromatogr A* 1217:7690-7698. [DOI: 10.1016/j.chroma.2010.10.017](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.017).

Raudonis R, Raudone L, Jakstas V, Janulis V (2012). Comparative evaluation of post-column free radical scavenging and ferric reducing antioxidant power assays for screening of antioxidants in strawberries. *J Chromatogr A* 1233:8-15. [DOI: 10.1016/j.chroma.2012.02.019](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.019).

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).

Rivero-Pérez MD, Muñiz P, Gonzalez-Sanjósé ML (2007). Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity,

and biomarkers of oxidative stress methodologies. J Agric Food Chem 55:5476-5483. [DOI: 10.1021/jf070306q](https://doi.org/10.1021/jf070306q).

Roodgaryan R, Jenabian N, Moghadamnia AA, Pouramir M, Khadir F (2015). Clinical and biochemical effects of dark chocolate in moderate chronic periodontitis. Caspian J Dent Res 4: 43-9. <https://cldr.ir/>

Rubio CP, Hernández-Ruiz J, Martínez-Subiela S, Tvarijonaviciute A, Arnao MB, Ceron JJ (2016). Validation of three automated assays for total antioxidant capacity determination in canine serum samples. J Vet Diagn Invest 28:693-698. [DOI: 10.1177/1040638716664939](https://doi.org/10.1177/1040638716664939).

Salinas Moreno Y, Pérez Alonso JJ, Vázquez Carrillo G, Aragón Cuevas F, Velázquez Cardelas (2012). ANTHOCYANINS ANTIOXIDANT ACTIVITY IN MAIZE GRAINS (*Zea mays L.*) OF CHALQUEÑO, ELOTES CÓNICOS AND BOLITA RACES. AGROCIENCIA 46: 693-706.

Selmi C, Mao TK, Keen CL, Schmitz HH & Eric Gershwin M (2006). The Anti-inflammatory Properties of Cocoa Flavanols. J Cardiovasc Pharmacol., 47, Supplement 2, S163-71. [DOI: 10.1097/00005344-200606001-00010](https://doi.org/10.1097/00005344-200606001-00010).

Singh BN (1999). Effects of Food on Clinical Pharmacokinetics. Clinic Pharmacokinet, 37 (3), 213-255. [DOI: 10.2165/00003088-199937030-00003](https://doi.org/10.2165/00003088-199937030-00003).

Soleri D, Cleveland DA (2007). Tejate: Theobroma Cacao and T. bicolor in a Traditional Beverage from Oaxaca, Mexico. Food and Foodways 15:107-118. <https://doi.org/10.1080/07409710701260131>.

Soleri D, Cleveland DA, Aragón Cuevas F (2008). Food globalization and local diversity: The case of tejate, a traditional maize and cacao beverage from Oaxaca, Mexico. Curr Anthropol 49:281–290. <https://doi.org/10.1086/527562>.

Sotelo A, Soleri D, Wachter C, Sánchez-Chinchillas A, Argote RM (2012). Chemical and nutritional composition of tejate, a traditional maize and cacao beverage from the Central Valleys of Oaxaca, Mexico. *Plant Foods Hum Nutr* 67:148-155. [DOI: 10.1007/s11130-012-0281-5](https://doi.org/10.1007/s11130-012-0281-5).

Tallarida RJ (2002). The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain* 98; 163-168. [DOI: 10.1016/s0304-3959\(02\)00041-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(02)00041-6).

Thakare R, Chhonker YS, Gautam N, Alamoudi JA, Alnouti Y (2016). Quantitative analysis of endogenous compounds. *J Pharm Biomed Anal* 128:426-437. [DOI: 10.1016/j.jpba.2016.06.017](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.017).

US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine (USDHHS, FDA, CDER, and CVM) (2018). Bioanalytical method validation: guidance for industry. United State of America, Maryland. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.Pdf>. Accessed 20 August 2018

Van de Merbel NC (2008). Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques. *Trends Anal Chem* 27:924–933. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.002>

Wangcharoen W, Morasuk W (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of holy basil. *Songklanakarin J Sci Technol* 29:1407-1415. <http://rdo.psu.ac.th/sjstweb/index.php>.

World Health Organization (WHO) (2014). Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva, Switzerland.