

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN ANIMAL



**CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS DE LA CÁSCARA
DE NUEZ PECANERA (*Carya illinoensis*)**

Por:

JOSÉ BALTAZAR HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para optar por el grado de:

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2016.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN ANIMAL

**CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS POLIFÉNICOS DE LA CÁSCARA DE
NUEZ PECANERA (*Carya illinoensis*)**

Por:

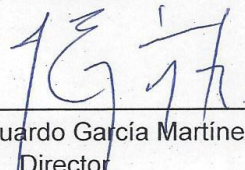
JOSÉ BALTAZAR HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

TESIS

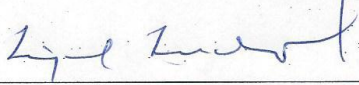
Que somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito
Parcial para obtener el título de

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

Aprobado por:



Dr. José Eduardo García Martínez.
Director

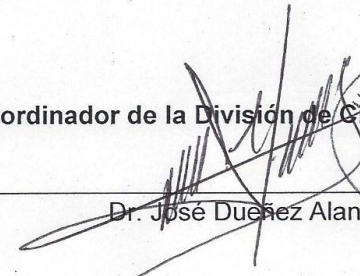


Dr. Miguel Ángel Mellado Bosque
Co- Director



M.V.Z. Leonides Gómez Narváez
Asesor

Coordinador de la División de Ciencia Animal



Dr. José Dueñez Alanís



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre de 2016.

DEDICATORIA

A mis padres, Rosario Hernández Hernández y Julia Vázquez Aguilar, por su amor y apoyo incondicional, por ser padres extraordinarios, que con sus consejos y palabras de aliento me han ayudado a lograr este sueño.

A mis hermanos Adolfo y Dylan, por ser hermanos magníficos, gracias por su gran apoyo y cariño.

A mis hermanas Margarita, Hortensia, Blanca y Leticia, gracias por su apoyo incondicional durante mi formación profesional, por su cariño infinito y por los consejos brindados.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme bendecido con la vida, por guiar mi camino, por estar siempre presente en mis acciones y haberme permitido cumplir con esta meta.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, mi Alma Terra Mater, por haberme acogido y ofrecerme la oportunidad de formarme como profesionista.

Al Dr. José Eduardo García Martínez, por haber fungido como asesor de tesis, por las enseñanzas y la confianza depositada en mi persona.

Al M.V.Z. Leónides Gómez Narváez, por el apoyo que me brindó y la asesoría en la realización de este trabajo.

A Carlos Arévalo, por su apoyo en la realización de este proyecto de investigación.

A Dulce, quien ha sido mi gran soporte, un apoyo incondicional y por tanto amor recibido.

A mis amigos Carlos, Ivonne, Jorge y Yesenia, por haberme ayudado en la realización de este trabajo de investigación.

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron en la realización de esta tesis.

MANIFIESTO DE HONESTIDAD ACADÉMICA

El suscrito, **José Baltazar Hernández Vázquez**, estudiante de la carrera de Ingeniero Agrónomo Zootecnista, con matrícula 41126251 y autor de la presente tesis, manifiesto que:

1. – Reconozco que el plagio académico constituye un delito que está penado en nuestro país.
2. - Las ideas, opiniones, datos e información publicadas por otros autores y utilizadas en la presente tesis, han sido debidamente citadas reconociendo la autoría de la fuente original.
3. – Toda la información consultada ha sido analizada e interpretada por el suscrito y redactado según su criterio y apreciación, de tal manera que no se ha incurrido en el “copiado y pegado” de dicha información.
4. - Reconozco la responsabilidad sobre los derechos de autor, de los materiales bibliográficos consultados por cualquier vía y manifiesto no haber hecho mal uso de ninguno de ellos.
5. - Entiendo que la función y alcance de mi Comité de Asesoría, está circunscrito a la orientación y guía respecto a la metodología de la investigación realizada por la siguiente tesis, así como el análisis e interpretación de los resultados obtenidos, y por lo tanto eximo de toda responsabilidad relacionada con el plagio académico a mi Comité de Asesoría y acepto que cualquier responsabilidad al respecto es únicamente por parte mía.

ATENTAMENTE



José Baltazar Hernández Vázquez
Tesista de Licenciatura / UAAAN

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Diciembre del 2016

RESUMEN

Se cuantificaron los compuestos polifenólicos del extracto acuoso de la cáscara de nuez pecanera (*Carya illinoensis*), se realizó además un análisis químico para determinar su contenido nutrimental. A través de una cromatografía líquida de alta resolución, acoplado a espectrómetro de masas HPLC/MS, se determinaron los compuestos bioactivos.

Para la cuantificación de compuestos polifenólicos del extracto acuoso de la cáscara de nuez, se realizaron dos estudios en la cual se determinaron las fracciones de taninos condensados por la técnica de HCl-butanol y taninos hidrolizables por la técnica de Folin-Ciocalteu. La sumatoria de las dos fracciones antes mencionadas proporcionó el resultado de polifenoles totales.

El extracto acuoso de cáscara de *Carya illinoensis* contiene mayor concentración (mg/g) de taninos condensados que de taninos hidrolizables, con un promedio de 37.79 y 20.38, respectivamente. Posteriormente los resultados del análisis químico evidencian que el material de estudio en cuestión posee un alto contenido de fibra cruda (promedio de 61.09 %), además de un bajo contenido de proteína cruda (PC) con un valor de 2.41 % y extracto etéreo con un valor de 1.22 % (EE).

Los compuestos bioactivos identificados fueron, Pelargodenin 3-O-glucosil-rutinocido, Apigenin 6,8 diglucosido, Epigalocatequin 7-O-glucuronido, Dimetil epigalocatequin 3-O-galato y Sesaminol.

Palabras clave: compuestos polifenólicos, nogal pecanero, extracto acuoso, compuesto bioactivo

ÍNDICE

Contenido	
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
MANIFIESTO DE HONESTIDAD ACADÉMICA	IV
RESUMEN.....	V
ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos.....	3
1.1.1 Objetivo General.....	3
1.1.2 Objetivos Específicos	3
1.2 Hipótesis.....	3
2 REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Metabolismo vegetal	4
2.2 Metabolitos secundarios.....	4
2.1.1 Biosíntesis	5
2.2.2 Función de los metabolitos secundarios en las plantas	6
2.3 Clasificación de metabolitos secundarios.....	7
2.3.1 Terpenos.....	7
2.3.2 Compuestos fenólicos	8
2.2.3 Taninos	11
2.3.4 Compuestos que contienen nitrógeno	12
2.3.5 Alcaloides	12
2.3.6 Glicósidos	13
2.4 Descripción del material vegetal	14
2.4.1 Nogal pecanero	14
2.4.2 Producción nacional.....	15
2.4.3 Cáscara de nuez pecanera (<i>Carya illinoensis</i>).....	17
2.5 Métodos de cuantificación de metabolitos secundarios	18
2.6 Métodos alternativos para el control de NGI en ovinos y caprinos.....	19
2.6.1 Agujas de óxido de cobre (AOC)	19
2.6.2 Hongos nematófagos.....	20

2.6.3 Taninos condensados (TC)	21
2.6.4 Manejo del pastoreo: pastoreo alterno y rotación de praderas.....	21
2.6.5 Selección Genética	22
2.6.6 Uso de suplemento para el control de nemátodos gastrointestinales (NGI)..	22
2.6.7 Inmunización	23
2.6.8 Antihelmínticos naturales	24
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1 Colección del material vegetal.....	26
3.2 Preparación del extracto acuoso de la cáscara de nuez pecanera.....	26
3.3 Determinación del contenido de polifenoles.....	27
3.4 Determinación de taninos hidrolizables	27
3.5 Determinación de Taninos Condensados.....	28
3.6 Cromatografía en columna utilizando amberlita XAD-16.....	28
3.7 Análisis proximal.....	29
3.7.1 Determinación de materia seca parcial.....	29
3.7.2 Determinación de materia seca total.....	29
3.7.3 Determinación de cenizas.....	30
3.7.4 Determinación de proteína cruda	30
3.7.5 Determinación de extracto etéreo.....	31
3.7.6 Determinación de fibra cruda	31
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1 Análisis proximal.....	33
4.2 Determinación de la concentración de polifenoles (mg/g).....	34
4.3 Identificación de compuestos bioactivos.....	36
4.3.1 Pelargodenin 3-O-glucosil-rutinocido	37
4.3.2 Apigenin 6,8 diglucosido	38
4.3.3 Epigallocatequin 7-O- glucuronido	39
4.3.4 Dimetil epigallocatequin 3-O- galato	39
4.3.5 Sesaminol.....	40
5 CONCLUSIONES	42
6 LITERATURA CITADA.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

No.	TÍTULO DE FIGURAS	PÁG.
2.1	Esquema simplificado de las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios y sus interrelaciones con el metabolismo primario	6
2.2	Rutas de síntesis de compuestos fenólicos	10
2.3	Datos estadísticos de la producción de nuez en México durante el periodo 2000-2014	16
2.4	Estados mexicanos con mayor producción	17
3.1	Curva patrón para la determinación de taninos hidrolizables	27
3.2	Curva patrón para la determinación de taninos condensados	28
4.1	Estructura química de Pelargonidin 3-O-glucosil rutinocido	37
4.2	Estructura química de Apigenin 6,8 diglucosido	38
4.3	Estructura química de Epigallocatequin 7-O glucuronido	39
4.4	Estructura química de Dimetil epigallocatequin 3-O galato	40
4.5	Estructura química de Sesaminol	41
No.	TÍTULO DE CUADROS	PÁG.
2.1	Clasificación taxonómica del nogal pecanero	15
2.2	Plantas con propiedades antihelmínticas	24
4.1	Análisis proximal de la cáscara de nuez pecanera (<i>Carya illinoensis</i>)	33
4.2	Fenoles totales, taninos condensados y taninos hidrolizables.	34
4.3	Compuestos bioactivos de la cáscara de nuez pecanera	36

1. INTRODUCCIÓN

Según el Comité Mexicano del Sistema Producto Nuez A.C. (COMENUEZ, 2015), la producción nacional en el año 2014 fue de 126 mil 799 toneladas de nuez pecanera, lo que colocó a nuestro país como principal productor de este producto en el mundo. Los principales productores a nivel nacional son Chihuahua, Sonora, Coahuila, Durango y Nuevo León, aportando más del 95 % de la producción nacional (Guzmán, 2014).

Coahuila contribuye con un 14 % de la producción nacional. De acuerdo con el reporte de la Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero (FND, 2014), se lograron ingresos de aproximadamente USD 259 millones por un volumen de 52,000 toneladas vendidas al extranjero.

A la fecha los residuos del nogal no son aprovechados por los nogaleros y los industriales de nuestro país, desaprovechando una oportunidad de ingresos que se estima significativa.

En los estados del norte de México donde se concentra la mayor producción de nuez es común ver a las cabras y ovejas pastoreando en los huertos de nogal, representando una fuente secundaria de ingresos para el productor que tiene como principal actividad la producción agrícola. Siendo una explotación pecuaria no tecnificada, suele presentarse problemas sanitarios en los hatos ovinos y caprinos, uno de los más comunes es la presencia de endoparásitos que merman la producción, y por ende, existe la necesidad de la desparasitación.

La mayor parte de las explotaciones ovinas y caprinas en el país son rudimentarias, caracterizadas por falta de organización en su manejo sanitario,

alimenticio, genético, reproductivo, entre otros, lo que ha significado el desarrollo de la resistencia de los endoparásitos a los antihelmínticos comerciales, todo esto conduce a plantear la idea de usar el extracto acuoso de la cáscara de nuez como una alternativa para la desparasitación de los animales, ya que es bien sabido que los vegetales, incluyendo al nogal, contienen además de los metabolitos primarios como las proteínas, carbohidratos, lípidos, entre otros, una gran cantidad de compuestos fenólicos (Guerra, 2012).

En los últimos años, el estudio de los polifenoles ha tomado gran auge, dado a que tienen efectos positivos en la salud animal, ya que poseen propiedades cicatrizantes, antimicrobianas, antioxidantes, antitumorales, anticancerígenas y antihelmínticas, entre otras.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

- Determinar el contenido de polifenoles condensados, hidrolizables y totales del extracto acuoso de la cáscara de nuez

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar compuestos bioactivos de un extracto acuoso de cáscara de nuez pecanera mediante cromatografía líquida de alta resolución, acoplado a espectrómetro de masas HPLC/MS.
- Determinar el contenido nutrimental de la cáscara de nuez pecanera mediante un análisis químico.

1.2 Hipótesis

- El extracto acuoso de la cáscara de nuez pecanera contiene mayor concentración de polifenoles condensados que hidrolizables.
- La cáscara de nuez pecanera tiene buena calidad nutrimental
- La cáscara de nuez pecanera contiene una infinidad de compuestos bioactivos

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Metabolismo vegetal

Es el conjunto de fenómenos físico-químicos que se producen en la planta, gracias a los cuales se llegan a sintetizar, en una serie de procesos anabólicos, los diversos elementos que forman el organismo, a la vez que, de manera catabólica la materia es degradada o simplificada (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones. Se denominan metabolitos primarios (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

2.2 Metabolitos secundarios

El metabolismo secundario se puede definir como la biosíntesis, la transformación y la degradación de los compuestos endógenos mediante proteínas de especialización, las cuales se han formado como resultado de los procesos de diferenciación y se clasifican según su significación biológica y función en la célula productora (Valdés y Balbín, 2000).

Las plantas, a diferencia de otros organismos, destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan

metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios, productos naturales) (Ávalos y Pérez, 2009).

Una de las principales diferencias que presentan los metabolitos secundarios con relación a los primarios es su distribución limitada en el reino vegetal; mientras que los compuestos primarios se encuentran en todo el reino y las diferencias entre especies solo son de índole cuantitativa (Ramos *et al.*, 1998).

Un metabolito secundario determinado se encuentra con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas, mientras que los metabolitos primarios están presentes en todo el reino vegetal (Taiz y Zeiger, 2006).

2.1.1 Biosíntesis

Las rutas biosintéticas que forman parte del metabolismo secundario es un tema que en los últimos años ha llamado poderosamente la atención. La síntesis específica de cada compuesto suele estar restringida a estados específicos del desarrollo respectivo de cada tipo de organismo, células especializadas y períodos de estrés causados por la deficiencia de nutrientes o por el ataque de microorganismos (García, 2004). Este fenómeno se debe a la formación, dependiente de fase, de la correspondiente enzima, lo que significa que la expresión del metabolismo secundario se basa en un proceso de diferenciación (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Atendiendo a las vías biosintéticas que les dan origen, los compuestos secundarios se dividen en tres grandes grupos: los terpenos, las sustancias fenólicas y los compuestos que contienen nitrógeno en su estructura (Valdés y Balbín, 2000).

El metabolismo primario proporciona un gran número de moléculas simples, como el ácido shiquímico, el acetato y los aminoácidos, los cuales constituyen los materiales de partida para las rutas biosintéticas del metabolismo secundario, que se presenta en la fig. 2.1 (García, 2004).

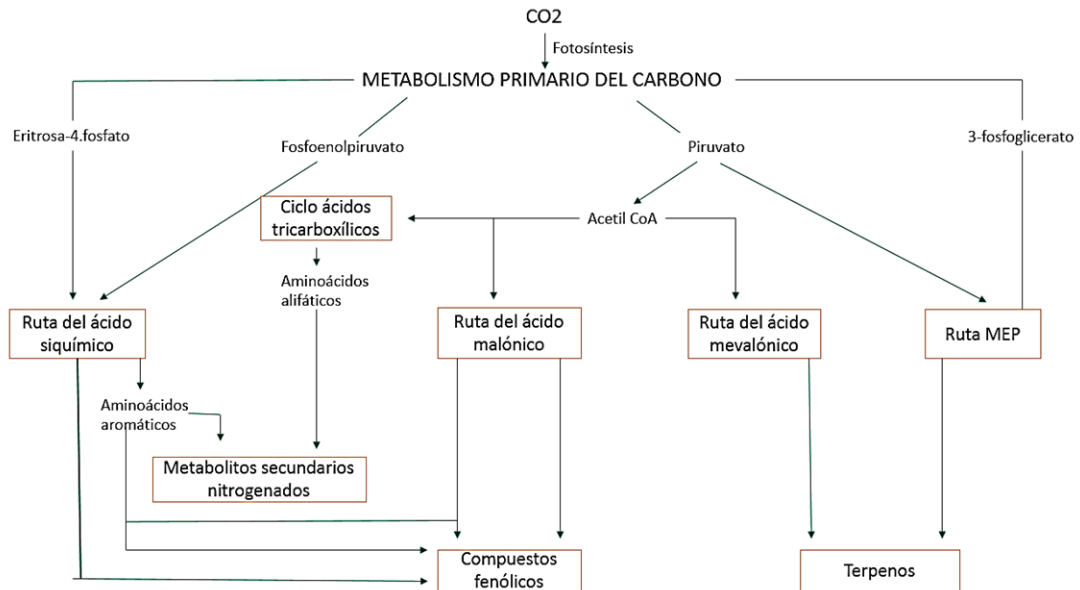


Figura 2.1. Esquema simplificado de las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios y sus interrelaciones con el metabolismo primario (Tomado de Taiz y Zeiger, 2006).

2.2.2 Función de los metabolitos secundarios en las plantas

Durante muchos años se ha creído que los metabolitos secundarios eran productos finales del metabolismo sin función o metabolitos de desecho. Sin embargo, estudios realizados por investigadores, demostraron que éstos poseen importantes funciones ecológicas para las plantas:

- Protegen a las plantas de la ingestión de los herbívoros y de la infección por patógenos microbianos.

- Sirven como atrayente de los polinizadores y dispersadores de semillas y como agentes de la competencia planta-planta.

Según los evolucionistas, las defensas vegetales surgieron a través de fenómenos de mutación hereditaria, selección natural y cambios evolutivos. Las plantas sufrieron mutaciones al azar en las rutas metabólicas básicas que dieron lugar a nuevos compuestos, que pudieron ser tóxicos para los herbívoros y microorganismos patógenos.

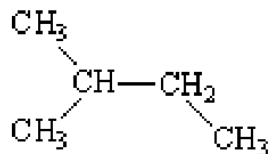
2.3 Clasificación de metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios vegetales pueden dividirse en tres grupos químicamente diferentes: terpenos, fenoles y compuestos que contienen nitrógeno (Taiz y Zeiger, 2006).

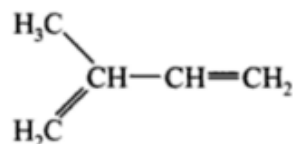
2.3.1 Terpenos

Los terpenos o terpenoides, constituyen el mayor número grupo de metabolitos secundarios. Los diferentes compuestos de esta clase son por lo general insolubles en agua. Son biosintetizados a partir de acetil CoA o de intermedios glicolíticos (Taiz y Zeiger, 2006)

Todos los terpenos se derivan de la unión de elementos de cinco carbonos que tienen el esqueleto carbonado ramificado del isopentano:



Los elementos estructurales básicos de los terpenos se conocen como unidades de isopreno:



De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades C5 y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Los terpenos son toxinas y repelentes para un gran número de insectos y mamíferos que se alimentan de las plantas, de forma que desempeñan un importante papel defensivo en el reino vegetal (Taiz y Zeiger, 2006).

Dentro de cada tipo de terpenos existen compuestos muy importantes desde el punto de vista fisiológico y ecológico, pero también importantes desde el punto de vista antropocéntrico porque son sustancias con actividades biológicas muy diversas (Taiz y Zeiger, 1991).

Todos los terpenos naturales proceden de unidades de acetato activo (acetil-Coenzima A), que se condensan y transforman para originar ácido mevalónico, unidad de cinco átomos de carbono, específica de la biosíntesis de terpenos (García, 2004).

2.3.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, también llamados fenoles o polifenoles vegetales, son sustancias que poseen al menos un anillo aromático con un radical hidroxilo sustituyente en su estructura química, o sea un grupo fenólico. El fenol

mismo se encuentra como un producto natural en el reino vegetal, pero es más común que los compuestos fenólicos tengan dos o más grupos hidroxilo.

De todos los metabolitos secundarios los polifenoles son los más ampliamente distribuidos dentro del reino vegetal (Markham, 1982).

Se reconocen 13 grupos de polifenoles y se identifican según su esqueleto básico de átomos de carbono como compuestos C_6 , que son los fenoles simples; C_6-C_1 o ácidos fenólicos; C_6-C_2 , que incluye a los ácidos fenilacéticos y acetofenonas; C_6-C_3 , que incluye a los ácidos hidroxicinámicos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas y cromonas; C_6-C_4 o naftoquinonas; $C_6-C_1-C_6$ o xantonas; $C_6-C_2-C_6$, que incluye a los estilbenos y antroquinonas; $C_6-C_3-C_6$ o flavonoides; $(C_6-C_3)_2$ o lignanos; $(C_6-C_3-C_6)_2$ o biflavonoides; $(C_6-C_3)_n$ o ligninas; $(C_6)_6$ o catecolaminas; y $(C_6-C_3-C_6)_n$ o flavolanos, también llamados taninos condensados (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Los compuestos fenólicos de las plantas son biosintetizados en diferentes rutas y, por ello, constituyen un grupo heterogéneo desde un punto de vista metabólico. Existen dos rutas básicas implicadas en este proceso: la ruta del ácido shiquímico y la ruta del ácido malónico, que se muestra en la fig. 2.2.

En los vegetales la ruta del ácido síquimico es la responsable de la biosíntesis de la mayoría de los fenoles. Por otra parte, la ruta del ácido malónico es poco empleada por plantas superiores, por lo que es más empleada por hongos y bacterias.

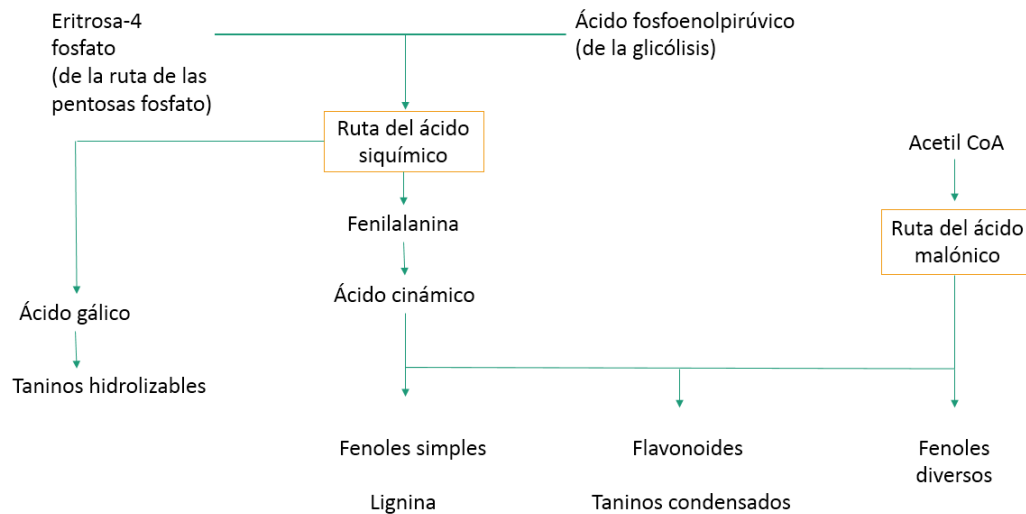


Figura 2. 2: Rutas de síntesis de compuestos fenólicos (Tomado de Ávalos y Pérez-Urria, 2009)

A partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido siquímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina).

La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales. La fenilalanina y el triptófano se encuentran entre los aminoácidos esenciales para los animales que se incorporan en la dieta. La tirosina no es esencial en el sentido de que los animales pueden sintetizarla por hidroxilación de fenilalanina.

Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los flavonoides. Su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo las principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Las antocianinas son flavonoides pigmentados responsables de la mayoría de los colores de las flores y los frutos. Por ello son importantes en la polinización y en la dispersión de semillas. Son glicósidos con un azúcar en posición 3. Cuando las antocianinas carecen de azúcar se denominan antocianidinas.

El color de las antocianinas depende del número de grupos hidroxilo y metoxilo en el anillo B y del pH de las vacuolas en las que se almacenan. Algunos ejemplos son pelargonidina (rojo-naranja), cianidina (rojo púrpura) y delphinidina (azul púrpura).

2.2.3 Taninos

Los taninos son compuestos no nitrogenados con un peso molecular entre 300 y 20,000 Da (Khanbabaee y Ree, 2001), amorfos, de sabor astringente, débilmente ácidos la mayoría de ellos se encuentran presentes en el citoplasma y las vacuolas de las células como metabolitos secundarios.

Después de las ligninas, los taninos son el segundo grupo de compuestos fenólicos presentes en las plantas, y se encuentran distribuidos principalmente en cortezas, maderas, hojas, frutos, raíces y semillas (Guerra, 2012).

Existen dos categorías: taninos condensados y taninos hidrolizables. Los taninos condensados son polímeros de unidades de flavonoides unidas por enlaces C-C, los cuales no pueden ser hidrolizados pero sí oxidados por un ácido fuerte para rendir antocianidinas. Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos que contienen ácidos fenólicos, sobre todo ácido gálico y azúcares simples; son más pequeños que los condensados y se hidrolizan más fácilmente. Generalmente son toxinas debido a su capacidad de unirse a proteínas. También actúan como repelentes alimenticios de muchos animales que evitan, en el caso

de los mamíferos, plantas o partes de plantas que contienen altas concentraciones de taninos. Esto ocurre en los frutos inmaduros en los que se concentran los taninos en la piel (Ávalos y Pérez, 2009).

2.3.4 Compuestos que contienen nitrógeno

Existen muchos metabolitos secundarios que contienen nitrógeno en su estructura. Dentro de ellos se encuentran los alcaloides y los glicósidos cianogénicos. Muchos metabolitos secundarios nitrogenados se biosintetizan a partir de aminoácidos comunes.

2.3.5 Alcaloides

Los alcaloides son una gran familia de más de 15,000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicas aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos).

Se encuentran en el 20 % aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

En estas sustancias, el átomo de nitrógeno está formando parte de un anillo heterocíclico, un anillo que contiene átomos de nitrógeno y de carbono (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Como su nombre lo sugiere, muchos alcaloides son alcalinos. A los valores normales de pH del citosol (pH 7.2) y de la vacuola (pH de 5 a 6), el átomo de nitrógeno está protonado; por tanto, los alcaloides están cargados positivamente y, por lo general, son solubles en agua.

Los alcaloides se sintetizan comúnmente de aminoácidos comunes como la lisina, tirosina y triptófano.

Actualmente se considera que la mayoría de los alcaloides actúan como defensas frente a predadores, especialmente mamíferos, debido a su toxicidad y capacidad de disuasión (Taiz y Zeiger, 2006).

2.3.6 Glicósidos

Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos. Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Las saponinas se encuentran como glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpenos. Son por tanto triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. Se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar (el terpeno sin el azúcar, por ejemplo), en cuyo caso se denominan sapogeninas glicósidos (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Los glicósidos cardiacos o cardenólidos son semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Se encuentran de forma natural en forma de glicósidos o de agliconas (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Los glicósidos cianogénicos son compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos pero se degradan cuando la planta es aplastada liberando

sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN) (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

2.4 Descripción del material vegetal

2.4.1 Nogal pecanero

El nogal pecanero (*Carya illinoensis*) del cual obtenemos la nuez encarcelada pertenece a la familia *Juglandaceae* (cuadro 2.1), que comprenden a las plantas arbóreas que producen una drupa, la cual consiste en un fruto monospermo de mesocarpio carnoso, coriáceo o fibroso rodeado de un endocarpio leñoso con una semilla en su interior, en el cual durante la fase de maduración el pericarpio y el mesocarpio se secan y el endocarpio (cáscara) y la semilla (almendra) son consideradas como la nuez. Los géneros más importantes de esta familia son *Juglans* y *Carya*, destacando en el primero el nogal de Castilla y en el segundo el nogal pecanero (Guerra, 2012).

El nogal pecanero es un árbol que puede superar los 30 metros de altura, muy vigoroso y longevo, el cual inicia su vida productiva entre los 6 a 10 años de edad y continúa produciendo en niveles óptimos y comerciales durante poco más de 50 años (SAGARPA, 2007).

Cuadro 2.1: Clasificación taxonómica del nogal pecanero

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Juglandales</i>
Familia	<i>Juglandaceae</i>
Género	<i>Carya</i>
Especie	<i>Spp.</i>

Fuente: SINAREFI, 2016.

2.4.2 Producción nacional

Durante el 2014 el país obtuvo una cosecha de casi 127 mil toneladas, con lo que desbancó a EU del primer lugar.

Durante 2014 la producción nacional de nuez pecanera fue de 126 mil 799 toneladas (fig. 2.3), lo que representa un 20% más que la obtenida en el 2013, dicho incremento permitió a México colocarse como el principal productor de este producto en el mundo (COMENUEZ, 2014).

El estado mexicano con mayor producción fue Chihuahua (fig. 2.4), al alcanzar 80 mil 413 toneladas, resultado que pone a esta entidad, incluso, por encima del estado de Georgia, que por tradición había sido el mayor productor estadounidense con 33 mil 142 toneladas.

La nuez por ser un producto muy nutritivo se ha vuelto muy demandada, y ello hace que el cultivo sea rentable, por lo que se prevé un aumento del precio, es decir, que pase de 55 mil pesos promedio por tonelada a 65 mil pesos por tonelada.

El mercado de exportación acapara el 63 por ciento de la producción nacional, la mayor parte se destina hacia Estados Unidos, con lo cual, se obtienen alrededor de 370 millones de dólares en ventas anuales (Tierra Fértil, 2014).

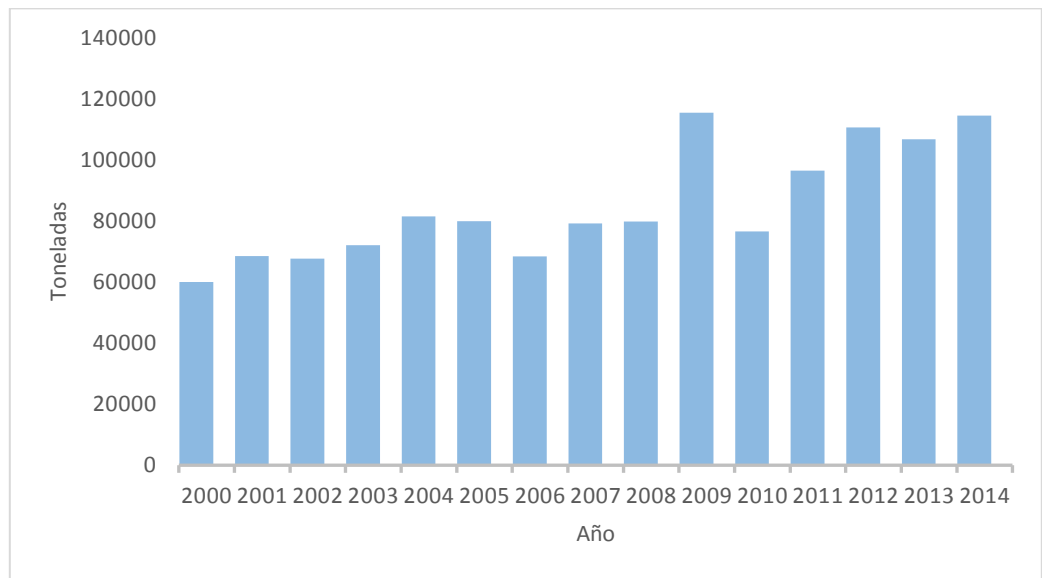


Figura 2.3: Datos estadísticos de la producción (toneladas) de nuez en México durante el periodo 2000-2014 según datos del SIAP-SAGARPA.

Como se puede apreciar en la figura 2.4, la producción nacional de nuez durante el periodo comprendido entre el 2000 a 2014 es inestable, observándose que la mayor producción se obtuvo en el año 2009, la cual se equipara a la producción de 2012 a 2014. La producción más baja se obtuvo en el año 2000, donde a partir de dicho año se incrementa de manera gradual la producción. Notándose además que en el año 2010 una un decremento significativo.

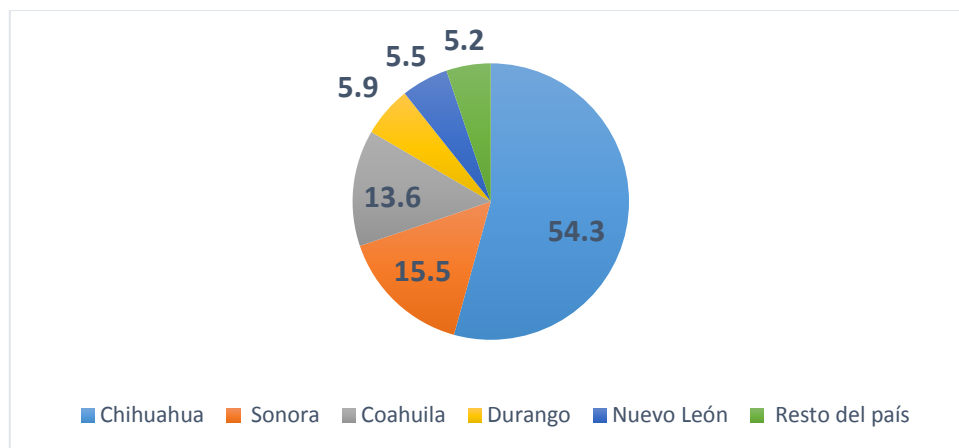


Figura 2.4: Participación (%) de los estados con mayor producción

Como se puede apreciar en la figura 2.5, el estado con mayor producción es Chihuahua, que ocupa un 54.3 %, seguido de Sonora y Coahuila con 15.5 % y 13.6 % respectivamente. Los estados de Durango y Nuevo León destacan con su participación de 5.9 % el primero y 5.5 % el segundo, el resto del país tan solo ocupa un 5.2 % de la producción nacional.

2.4.3 Cáscara de nuez pecanera (*Carya illinoensis*)

La cáscara de nuez pecanera equivale al 50% en peso de la nuez siendo el primer subproducto de la industria comercializadora de nuez (López *et al*, 2004). Tiene usos tales como: material para jardinería, abrasivo, carbón activado y como fuente de pigmentos y taninos, entre otros (Guerra, 2012).

La cáscara de nuez es una fuente excepcional de taninos y pueden ser obtenidos con altos rendimientos (cerca del 40 % en base al peso seco) y son más reactivos que la mimosa, el estándar industrial para los taninos condensados (Guerra, 2012).

2.5 Métodos de cuantificación de metabolitos secundarios

Para la obtención del extracto es importante identificar la parte de la planta que contiene los constituyentes de interés. El mecanismo de extracción involucra dos fenómenos físicos: difusión a través de la pared celular y el lavado de los contenidos celulares, una vez que las paredes se han roto (Vinatoru, 2001).

Las diferentes coloraciones y la cantidad de color producidas por unidad de masa en los métodos colorimétricos (Schofield *et al.*, 2001), la variabilidad en los resultados con la utilización de diferentes patrones y los diferentes mecanismos en las técnicas de precipitación (Krueger *et al.*, 2000), son las mayores limitantes en las marchas analíticas más utilizadas en la actualidad.

El grupo de metabolitos que más se ha cuantificado en el campo de la nutrición animal son los compuestos fenólicos, como producto de su amplia distribución en las plantas de interés agrícola y su repercusión en la fisiología digestiva de los rumiantes y los no rumiantes (Mueller-Harvey, 2001).

La técnica Folin-Ciocalteu (propuestos en los trabajos realizados por estos autores entre los años 1912 y 1927), que se basan en la reducción del ácido fosfomolibdico hasta óxidos azules de molibdeno con estados de oxidación inferiores a 7+, se han convertido en técnicas universales en la determinación de fenoles totales (Mueller-Harvey, 2001); sin embargo, Schofield *et al.* (2001) plantean que el método del Azul de Prusia ($\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), en sentido general, propicia mejores lecturas.

Según García (2004), los métodos para la cuantificación de compuestos fenólicos se pueden clasificar en: 1) colorimétricos, 2) cromatográficos, 3) gravimétricos, 4) de inhibición enzimática, 5) por precipitación, 6) toxicológicos.

El ensayo del butanol-HCl es específico para taninos condensados, pero requiere de patrones internos fidedignos a la naturaleza de la muestra analizada, ya que el color varía con la estructura tánica. Aunque es un método clásico, no es totalmente confiable para la determinación si no se conoce el tipo de tanino presente (García, 2004).

La utilización de la Vainillina-HCl es específica para meta difenoles y se pueden cuantificar los monómeros de taninos condensados obtenidos después de la hidrólisis del material; no obstante, si están presentes unidades de flavonoides se pueden obtener sobreestimaciones de los contenidos de estos tipos de taninos (Sun *et al.*, 1998).

Los procedimientos que emplean HPLC son factibles para las determinaciones de estructuras complejas (Hedqvist *et al.*, 2000), pero algunos solo son aplicables para taninos condensados de 7 a 8 unidades, y en ocasiones se observan uniones irreversibles con la matriz utilizada (García, 2004).

Otros métodos significativamente importantes son el empleo de la rodanina para la cuantificación de taninos hidrolizables del tipo galotaninos (Mueller-Harvey, 2001), el empleo de KIO_3 en las determinaciones de galo y elagitaninos (Willis y Allen, 1998).

2.6 Métodos alternativos para el control de NGI en ovinos y caprinos

2.6.1 Agujas de óxido de cobre (AOC)

Son administradas vía oral en cápsulas de gelatina y llegan hasta el abomaso, donde los filamentos de cobre son liberados y quedan atrapados en los pliegues de este órgano digestivo. Las AOCs se oxidan liberando iones de cobre que provocan la muerte y expulsión de los parásitos del abomaso. Las AOCs presentan una elevada eficacia contra *H. contortus* y una persistencia

superior al 46%, 35 días después de su dosificación. A pesar de su utilidad en ovinos y caprinos, muestran el riesgo derivado del cobre acumulado en el hígado de los animales tratados. Por tal motivo, se sugiere tratar la Hemoncosis en el primer año de vida de las corderas o cabritas (con dos dosis espaciadas cada 60 días) (Aguilar-Caballero *et. al.*, 2011).

Posterior a esta edad, no se recomienda usar AOC para que el cobre se reduzca gradualmente del hígado al siguiente año. Las AOC reducen las cargas de *H. contortus* entre 75 y 90% y reducen la cantidad de parásitos, pero no necesariamente mejoran la ganancia de peso de los animales. La dosis de una capsula de dos gramos es recomendable cuando inicia el periodo infectivo de la pradera; se puede repetir 60 días después. Es importante explotar la capacidad inmunitaria del animal para el control de los NGI (Galindo-Barboza *et al.*, 2011).

2.6.2 Hongos nematófagos

Estos hongos son considerados como los enemigos naturales principales de los nemátodos. En sí, son organismos del suelo que poseen la capacidad de transformar sus micelios en trampas especializadas para capturar y destruir nemátodos, ya sea en el suelo o en las heces de los animales. Las clamidosporas de los hongos nematófagos son ofrecidas oralmente a los animales, como parte de su dieta, para llegar al tracto gastrointestinal sin ser dañadas. Una vez que las heces se depositan en el exterior se estimula la germinación y desarrollo del hongo por contacto con las fases larvianas de nemátodos. En condiciones de campo se ha probado que la inoculación de *D. flagrans* reduce significativamente la infección de las praderas con NGI, donde se observa adicionalmente una mayor ganancia de peso en ovinos en pastoreo. Las dosis van de 1 a 100 millones de clamidosporas (Torres-Acosta y Hoste, 2008).

2.6.3 Taninos condensados (TC)

Los TC han probado ser eficaces como sustancias antihelmínticas. Un extracto de 5-6% redujo la prolificidad de las hembras parasitas y redujo el establecimiento de larvas y la población de parásitos adultos. Parece tener mayor eficacia contra *T. colubriformis* comparado con otros NGI abomasales. En Yucatán, se han identificado plantas (*Lisiloma latisiliquum*, *Havardia albican*) ricas en taninos que afectan las fases adultas y larvianas de *H. contortus*, ya que reducen la longitud y la prolificidad del parásito. Las evidencias, hasta este momento, indican que 500 g de esas plantas reducen la carga parasitaria de los caprinos (Torres-Acosta *et al.*, 2012).

2.6.4 Manejo del pastoreo: pastoreo alterno y rotación de praderas

El manejo del pastoreo puede ser usado para controlar la infección por NGI al reducir la cantidad de larvas disponibles para ser consumidas por los animales. Las técnicas de pastoreo se agrupan en técnicas preventivas, de evasión y de dilución. El pastoreo rotacional es una técnica de evasión donde los animales se mueven antes de que se enfrenten a altas cargas de larvas L3 en la pastura. En regiones de clima templado, el desarrollo y la sobrevivencia de las larvas L3 puede ser considerablemente mayor. En estas condiciones, es mejor utilizar el pastoreo alternado donde primero se introducen en la pradera animales de mayor resistencia, capaces de consumir mayor cantidad de larvas infectantes y que no tengan signos de enfermedad y puedan eliminar bajas cantidades de huevos de nemátodos en sus heces. Posteriormente, cuando la infección de la pradera es menor, se introducen animales más susceptibles a la parasitosis gastrointestinal (Torres-Acosta y Hoste, 2008).

2.6.5 Selección Genética

La selección de los animales resistentes a las infecciones con NGI es medida a través de la cuenta de huevos por gramo de heces (HPG). Los animales resistentes no son completamente refractarios a la enfermedad, solo albergan menos parásitos que los animales susceptibles, y por lo tanto, eliminan menos huevos en las heces. Se ha demostrado que algunas razas caprinas son más resistentes que otras a los NGI. Existe una variabilidad genética individual lo que ha obligado a la selección de aquellos animales con una reducida eliminación de huevos en las heces. Dicha variabilidad probablemente está basada en la capacidad individual de un animal para responder inmunológicamente contra los parásitos y es una característica altamente heredable. Existen dos formas de evaluar la resistencia genética a los NGI, la primera y más común es medir la reducción en la eliminación de huevos en las heces, ya que existe una alta correlación entre esta medición con la carga parasitaria en el animal. La segunda y más confiable para conocer el efecto racial sobre la resistencia a los NGI en los ovinos, es conocer la cantidad de parásitos (larvas y adultos) presentes en el tracto gastrointestinal de los animales. La selección se ha basado en la retención de caprinos con las menores cuentas de HPG, la mejor resiliencia o resistencia. Sin embargo, en ovejas se ha probado que cuando se estresan se vuelven susceptibles de nuevo a las infecciones con *H. contortus* (Hoste *et al.*, 2008; Hoste *et al.*, 2010).

2.6.6 Uso de suplemento para el control de nemátodos gastrointestinales (NGI)

La suplementación con proteína dietética mejora la resistencia contra infecciones de NGI tanto en ovinos como en caprinos. Se reporta que los animales suplementados reducen sus cargas de HPG e incrementan su cuenta de eosinófilos periféricos. Animales suplementados con maíz tienen menor cantidad de *H. contortus* que los no suplementados, y la suplementación con maíz-soya ocasiona una mayor cantidad de larvas hipobióticas de *T.*

columbriformis y *O. columbuianum*. Ambas estrategias disminuyen la cantidad de hembras por cada macho de *H. contortus* y reducen la cantidad de huevos in útero de las hembras de los NGI. Las fuentes de energía, como el maíz y la melaza, han demostrado su eficacia para el control de los NGI. Recientemente, se demostró que la suplementación con maíz al 1% del peso vivo de los animales en pastoreo presentó la mejor respuesta para el control de los NGI a través de la inmunidad celular (eosinófilos y mastocitos celulares), manteniendo valores de crecimiento de acuerdo a los nutrientes ofrecidos. La propuesta actual es ofrecer a los animales maíz (base fresca) al 1% de su peso vivo (Torres-Acosta *et al.*, 2012).

2.6.7 Inmunización

En el caso de *H. contortus*, el uso de larvas irradiadas parecía ser una buena alternativa y en 1987 se produjo una vacuna llamada “Contortin” Sin embargo, por el costo, su eficiencia y el material necesario para su elaboración, se cuestionó su aplicación. Hoy en día, el uso de antígenos excretorios/secretorios y somáticos de este parásito parece ser una buena alternativa. Sin embargo, su eficacia solamente ha sido probada sobre la excreción de HPG y la respuesta inmune humoral y celular, ha tenido resultados variados. El uso de larvas L3 y parásitos adultos es todavía un método utilizado. Los resultados muestran una reducción de 50 a 70% en la excreción de HPG y una reducción en la carga parasitaria adulta; para mejorar la inmunidad se necesita una segunda dosis de infección). Se ha probado que las infecciones naturales que son detenidas con tratamientos antihelmínticos permiten a los corderos desarrollar inmunidad contra los NGI. En este sentido se observan reducciones en la cuenta de HPG (50%) (Aguilar-Caballero *et al.*, 2008; Hoste *et al.*, 2008)

2.6.8 Antihelmínticos naturales

En el cuadro 4.2 se presentan especies de plantas que han sido identificadas con potencial para ser empleados como antihelmínticos.

Cuadro 2.2. Plantas con propiedades antihelmínticas

Planta	Descripción
<i>Acacia auriculiformis</i>	Los tallos de los frutos contienen saponinas, que actúan como vermífugos.
<i>Allium sativum</i>	Contiene allicina, alinina, alina. Tiene eficacia contra especies del género <i>Ascaris</i> y contra nemátodos pulmonares.
<i>Artemisia absinthium</i>	Contiene tuyona (=tujona. Presenta actividad contra nemátodos gastrointestinales en ovinos.
<i>Artemisia vulgaris</i>	Puede usarse toda la planta. Contiene tuyona (=tujona), bastante tóxica.
<i>Azadirachta indica</i>	Se puede utilizar las hojas que contiene azadiractina.
<i>Bursera copallifera.</i>	Puede hacerse uso de los tallos. Presenta actividad «in vitro» contra <i>Haemonchus contortus</i> .
<i>Butea monosperma</i>	Contiene palasonina, la cual ha demostrado tener actividad contra <i>Ascaris lumbricoides</i> y <i>Fasciola hepática</i> .
<i>Carica papaya</i>	Los frutos contienen benzil-isotiocianato.
<i>Chenopodium anthelminticum</i>	Contiene ascaridol. Ha mostrado actividad contra nemátodos gastrointestinales.
<i>Juglans regia</i>	Las hojas tienen juglona y ácido gálico, que han demostrado ser buenos antihelmínticos.

La fitomedicina es una actividad humana milenaria, desde hace mucho tiempo algunos productores marginados, muchas veces indígenas, han identificado plantas que mejoran la condición y el estado de salud de sus animales (Cuéllar, 2016).

24 especies de plantas con potencial antihelmíntico fueron identificadas: *Acacia farnesiana*, *Acacia melanoxylon*, *Acacia salicina*, *Acacia holosericea*, *Acacia flavescens*, *Acacia leptostachya*, *Acacia nilotica*, *Eucalyptus tessellaris*, *Eucalyptus tereticornis*, *Eucalyptus platyphylla*, *Eucalyptus corymbia*, *Eucalyptus drepanophylla*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus moluccana*, *Eucalyptus crebra*, *Casuarina cunninghamiana*, *Callitris endlicheri*, *Melaleuca leucodendra*, *Alphitonia excelsa*, *Erythrina variegata*, *Neolitsea dealbata*, *Allocasuarina torulosa*, *Euphorbia hirta* y *Panicum minutiflora* (Moreno et al., 2010).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

La determinación de compuestos polifenólicos y el análisis químico de la cáscara de nuez pecanera (*Carya illinoensis*) se realizó en el laboratorio del Departamento de Nutrición Animal, en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Saltillo, Coahuila, México.

La determinación de compuestos bioactivos presentes en la cáscara de nuez se efectuó en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

3.1 Colección del material vegetal

El material vegetal se obtuvo de una fábrica de dulces de nuez, ubicada en Saltillo, Coahuila, México. Se empleó únicamente un kilogramo de cáscara de nuez pecanera (*Carya illinoensis*) para la realización de este trabajo de investigación. Una vez retirada el fruto, se dejó secar en el horno a 60° C por 24 horas.

3.2 Preparación del extracto acuoso de la cáscara de nuez pecanera

Para la preparación del extracto acuoso de la cáscara de nuez, las cáscaras secas se molieron finamente (1 kg), de la cual se tomó una muestra de 15 g, a la que se le agregó 50 mL de agua a una temperatura de 60° C (1.5/5; planta: disolvente). La mezcla se colocó en el horno a la misma temperatura durante 30 min, en la cual en intervalos de 5 minutos se le proporcionó homogeneidad con agitación.

3.3 Determinación del contenido de polifenoles

A los extractos acuosos de la cáscara de nuez se les cuantificó el contenido de polifenoles. Las técnicas utilizadas fueron las siguientes: Folin-Ciocalteu (Guerra, 2012), para cuantificar los taninos hidrolizables (TH) de los extractos acuosos de *Carya illinoensis* y HCl-butanol (Guerra, 2012) para taninos condensados.

3.4 Determinación de taninos hidrolizables

Se colocaron 10 μL de la muestra en un tubo de ensaye, al mismo tubo se le adicionaron 390 μl del reactivo comercial Folin-Ciocalteu, se agitó en el vortex y se dejó reposar por 5 minutos. Después se adicionaron 400 μL de carbonato de sodio 0.01 M, se agitó y se dejó reposar por 5 minutos. Posteriormente se diluyó con 390 μl de agua destilada y se realizó la lectura en un espectro UV/Visible a 725 nm, para determinar los taninos hidrolizables. La curva de calibración (fig. 3.1) se elaboró con ácido gálico y agua destilada (Makkar, 2000).

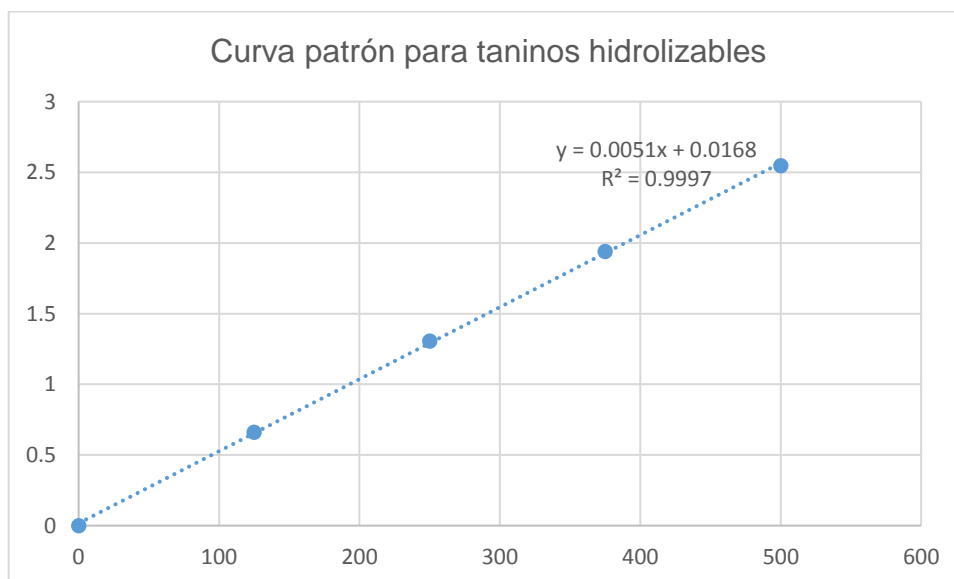


Figura 3.1: Curva patrón para la determinación de taninos hidrolizables.

3.5 Determinación de Taninos Condensados

En un tubo de ensaye se colocaron 10 μ L de muestra, sobre este se agregaron 3 ml de HCl/butanol y 10 μ l de reactivo férrico. Los tubos se taparon, para evitar la evaporación del butanol. Todos los tubos se calentaron por una hora a baño María a 100 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se dejaron enfriar y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro UV/Visible a 460 nm. . La curva de calibración (fig. 3.2) se elabora con catequina y agua destilada (Porter *et al.*, 1986; Makkar *et al.*, 1993; Makkar, 2000).

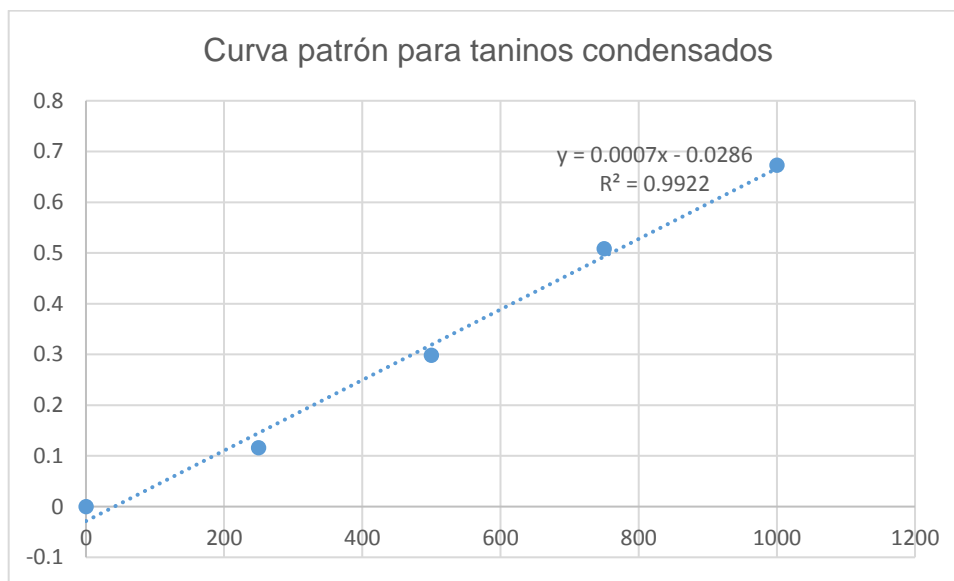


Figura 3.2: Curva patrón para la determinación de taninos condensados

3.6 Cromatografía en columna utilizando amberlita XAD-16.

Se realizó utilizando una columna con capacidad de 500 mL, se utilizaron 61.2 g de amberlita XAD-16 (sigma) para 100 mL de extracto. Se usó agua destilada como eluyente para descartar compuestos indeseables y, posteriormente, el etanol se empleó como eluyente para obtener una porción de metabolitos totales. El líquido obtenido se fraccionó en cajas Petri y se guardó en la estufa para desecar marca Robert Shaw a 65°C para evaporar el disolvente,

finalmente, los metabolitos totales se recuperaron como polvo fino (Ascacio Valdés *et al.*, 2013; Seeram *et al.*, 2005).

3.7 Análisis proximal

Se realizó el análisis bromatológico de la cáscara de nuez por el método de Weende, se obtuvieron: materia seca parcial y total, proteína cruda, fibra cruda, cenizas y extracto etéreo (AOAC, 1990).

3.7.1 Determinación de materia seca parcial

En una bandeja de aluminio vacía previamente pesada, se agregó el material de muestra hasta que llenó y se registró el peso más la muestra húmeda. Se colocó la bandeja con la muestra húmeda en el horno de convección de aire forzado con temperatura de 60° C por un periodo no menor de 18 horas. Luego del periodo indicado con anterioridad, se retiró la bandeja con la muestra parcialmente seca del horno y se colocó sobre la mesa para que se equilibrara con la humedad del aire del laboratorio por lo menos durante 30 minutos. Se pesó la bandeja con la muestra parcialmente seca y se registró el valor. El resultado se sacó por la diferencia de peso entre el material fresco y material parcialmente seco.

3.7.2 Determinación de materia seca total

Se colocaron crisoles de porcelana en un horno de convección de aire forzado a 100 °C por 16 horas por lo menos. Se removió el crisol de porcelana del horno, utilizando pinzas de metal, y se colocó en un desecador, se dejó enfriar por 20 minutos. Se procedió a remover el crisol del desecador con unas pinzas de metal y procedió a registrar su peso. El peso se registró en una balanza analítica. Sin remover el crisol de la balanza, se agregó con cuidado 2 g de muestra y se registró el peso. Se retiró el crisol de la balanza y se colocó en un

horno de convección de aire forzado a 100 °C durante 24 horas. Al final del periodo de secado, se removió el crisol del horno y se colocó en un desecador, dejando que se enfriara. Se registró el peso del crisol más la muestra seca con exactitud.

3.7.3 Determinación de cenizas

El crisol y la muestra seca utilizada para la determinación de humedad a 100°C se colocaron en un incinerador frío, donde se ha preestablecido como temperatura máxima los 600 °C. Cuando la temperatura alcanzó los 600° C se dejó las muestras por espacio de dos horas. Se apagó el incinerador y se esperó a que la temperatura descendiera por debajo de los 200° C. Se procedió a retirar los crisoles hacia un desecador, utilizando pinzas, para que se enfriaran. Al enfriarse se pesaron los crisoles más las cenizas con exactitud (AOAC, 1990).

3.7.4 Determinación de proteína cruda

En un papel filtro libre de nitrógeno se pesó 1.0 g de muestra, posteriormente se colocó la muestra con el papel dentro del balón tipo Kjeldhal, evitando perder algo de muestra. Después se añadieron tres perlas de vidrio en cada uno de los matraces, luego se agregó 5 g de mezcla reactiva de selenio y se añadió 30 ml de H₂SO₄ rotando levemente el matraz para que se humedeciera completamente el papel con la muestra. Se encendió el calentador y se colocaron los matraces sobre él. Se esperó el cambio de color, la cual pasa de un color oscuro hasta quedar completamente clara o ligeramente verdosa. Terminado el periodo, se apagó el calentador y se dejó enfriar los balones. Aún tibios, se agregó lentamente al balón 300 ml de agua destilada tratando de lavar las paredes, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió al balón lentamente, sin agitar, aproximadamente 100 ml de NaOH al 45%, asimismo se le agregó zinc. Se colocó el balón sobre el calentador del sistema de destilación y en el extremo opuesto del sistema de condensación coloque un Erlenmeyer con

aproximadamente 50 ml de la solución de ácido bórico e indicadores correspondientes, de manera que el extremo del tubo colector quedara inmerso en la solución. Se giró el balón de manera que la solución de NaOH se mezclara completamente con el contenido del balón. Se encendió el calentador y se procedió a destilar hasta recolectar cerca de 150 ml de destilado. Se retiró el Erlenmeyer de manera que la punta del tubo recolector quedara fuera de la solución pero no fuera del Erlenmeyer. Se retiró el Erlenmeyer y se tituló el destilado con la solución estandarizada de HCl 0.10526315 N y se calculó el porcentaje de Nitrógeno en la muestra. Se registra el volumen utilizado de ácido.

3.7.5 Determinación de extracto etéreo

Se sacó del horno los matraces de extracción sin tocarlos con los dedos, se dejaron enfriar en un desecador y se obtuvieron los pesos con aproximación de mg. Se pesó en un dedal de extracción manejado con pinzas, 4 g de la muestra seca con aproximación de miligramos y se colocó colóquelo en la unidad de extracción. Se conectó al extractor el matraz con 200 ml de hexano. Se llevó a ebullición. Al término de 8 horas se recuperó el hexano para un uso posterior. Se colocó el matraz en el horno durante hora y media para eliminar el éter. Se dejaron enfriar los matraces en un desecador y se obtuvieron los pesos con aproximación de miligramos.

3.7.6 Determinación de fibra cruda

Se pesó con aproximación de miligramos 2 g de la muestra desengrasada y seca. Se colocó en un vaso y se le adicionó 200 ml de la solución de ácido sulfúrico en ebullición. Se dejó hervir exactamente por 30 min, manteniendo constante el volumen con agua destilada y moviendo periódicamente el matraz para remover las partículas adheridas a las paredes. Se instaló el embudo Buchner con el papel filtro y se precalentó con agua hirviendo. Simultáneamente

y al término del tiempo de ebullición, se retiró el matraz, se dejó reposar por un minuto y se filtró cuidadosamente usando succión. Se lavó el papel filtro con agua hirviendo. Se transfirió el residuo al matraz con ayuda de una pipeta conteniendo 200 ml de solución de NaOH en ebullición y se dejó hervir por 30 min. Se retiró nuevamente y se filtró en el embudo Buchner, se lavó el residuo con agua hirviendo. El residuo se colocó en un crisol que posteriormente se llevó al horno a 100°C por 12 hr. Se retiró del horno y se dejó enfriar en un desecador. Se pesaron los crisoles con el residuo y se colocaron en la mufla a 600°C por 2 horas, se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron nuevamente.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis proximal

Para la caracterización de la cáscara de nuez pecanera se realizó el análisis proximal, los resultados se muestran en la Tabla 4.1.

La fibra cruda representa la fracción principal de la cáscara de nuez pecanera (61.09 %), seguido por la humedad (8.73 %), arrojó un bajo contenido de proteína (2.41 %), de extracto etéreo (1.1 %) y de cenizas (1.96 %).

Cuadro 4.1.: Análisis proximal de la cáscara de nuez pecanera (*Carya illinoensis*)

Composición nutricional de la cáscara de nuez	
Componente (g/100 g)¹	Promedio \pm D.E (n=6)
Materia seca total	91.27 \pm 0
Humedad	8.73 \pm 0
Proteína Cruda ²	2.41 \pm 0.16
Extracto Etéreo	1.22 \pm 0.2
Fibra Cruda	61.09 \pm 2.19
Cenizas	1.96 \pm 0.07

¹Promedio \pm Desviación Estándar (n=6);²N x 6.25.

Los valores obtenidos de proteína cruda y extracto etéreo son similares a los reportados por Pinheiro do Prado *et al.* (2009), quienes reportaron valores de 2.2% y 1.1%, respectivamente. Los mismos autores reportan valores de 16.8% de humedad y 48.6% de fibra cruda, diferentes a los valores encontrados en el presente trabajo de investigación, la composición fisicoquímica puede variar según el grado de desarrollo de la planta o de la estación o temporada en la que es colectada (Moreno, 2012).

4.2 Determinación de la concentración de polifenoles (mg/g)

Para la determinación de la concentración en mg/g de polifenoles presentes en la cáscara de nuez pecanera (*Carya illinoensis*) se tomaron 6 muestras del extracto acuoso, en los cuales se obtuvieron el contenido de taninos condensados (TC), el contenido de taninos hidrolizables (TH) y con la sumatoria de los dos se obtuvo el contenido de polifenoles totales. Los resultados se muestran en el cuadro 4.2.

Según los resultados, el extracto acuoso de la cáscara de nuez pecanera contiene mayor contenido de taninos condensados que de taninos hidrolizables, con valores promedio de 37.79 mg/g y 20.38 mg/g, respectivamente.

Cuadro 4.2.: Fenoles totales, taninos condensados y taninos hidrolizables.

	TC (mg/g)*	TH (mg/g)*	PT (mg/g)*
Muestra 1	38.86	21.59	60.45
Muestra 2	39.57	21.10	60.67
Muestra 3	37.43	20.71	58.14
Muestra 4	38.86	20.61	59.47
Muestra 5	36.71	19.73	56.44
Muestra 6	35.29	18.55	53.84
Promedio±D.E. ^a	37.79±1.613	20.38±1.088	58.17± 2.64

*TC=Taninos condensados, TH= taninos hidrolizables, PT= polifenoles totales; ^aPromedio ±desviación estándar (n=6).

Villarreal-Lozoya *et al.* (2007) reportó un contenido de fenoles totales de 448 mg EAC/g (equivalente de ácido clorogénico) o 80 mg EAG/g (equivalentes de ácido gálico) en extracto de cascara de nuez pecanera en una mezcla de acetona-agua (70:30), asumiendo un factor de conversión de 0.6 de EAC a EAG (Kyoung Chun y Kim, 2004). Estos valores son similares a los reportados en este trabajo de investigación.

Pinheiro *et al.* (2009), utilizando cáscara de nuez pecanera (*Carya illinoensis*), reportaron 43 ±7 mg EC/g de TC, similar a los resultados encontrados

en este estudio donde hubo una concentración de 37.79 ± 1.61 mg/g. Villarreal-Lozoya *et al.* (2007) reportaron un promedio de 42 ± 1.5 mg EC/g (equivalente de catequina).

De la Rosa *et al.* (2011), utilizando el ensayo de vainillina encontraron valores de 316.1 a 464 mgCE/g de TC, además de sugerir que la cáscara de nuez pecanera puede estar formado hasta un 46% de TC, los resultados obtenidos en es este estudio son significativamente diferentes a los encontrados por estos autores, sin embargo, cabe mencionar que la técnica utilizada es diferente, a lo cual Moreno (2012), sugiere que la concentración de taninos se ve afectado por el tipo de solvente utilizado y por la interacción de la planta por solvente.

Al respecto, Robbins *et al.* (2015), comentan que el tipo de cultivo y el lugar deben de ser tomados en cuenta como punto importante, pues es bien sabido que estos dos aspectos pueden tener un efecto potencial en el nivel de fenoles en la plantas.

De la Rosa *et al.* (2011), comentan que los constituyentes polifenólicos de la cáscara de nuez pecanera son afectados por si origen geográfico. Sugieren además que las condiciones de almacenamiento post-cosecha influyen en la concentración de compuestos polifenólicos.

4.3 Identificación de compuestos bioactivos

Los resultados de la identificación de los compuestos bioactivos de la cáscara de nuez pecanera mediante cromatografía líquida de alta resolución, acoplado a espectrómetro de masas HPLC/MS, se muestran en el cuadro 4.3.

Se puede apreciar que en compuesto bioactivo que se encuentra en mayor concentración es el pelargodenin 3-O-glucosil-rutinocido, perteneciente a la familia de las antocianinas, que reporta un peso molecular de 740; seguido de apigenin 6,8 diglucosido, perteneciente a la familia de los flavonoides, que arroja un peso molecular de 593; seguidos por el epigallocatequin 7-O-glucuronido, perteneciente a la familia de los flavonoles, que posee un peso molecular de 497.2; que a su vez es seguido por el dimetil epigallocatequin 3-O- galato, perteneciente a la familia de los flavonoles con un peso molecular de 487 y por último el compuesto que se encontró en menor proporción fue el sesaminol, perteneciente a la familia de los lignanos, con un peso molecular de 371.1.

Cuadro 4.3: Compuestos bioactivos presentes en un extracto acuoso de la cáscara de nuez pecanera

Tiempo de retención (min)	m/z*	Compuesto	Familia
31.6	740	Pelargodenin 3-O- glucosil- rutinocido	Antocianina
34.4	593	Apigenin 6,8 diglucosido	Flavonoide
33.4	497.2	Epigallocatequin 7-O- glucuronido	Flavonoles
34.2	487	Dimetil epigallocatequin 3-O- galato	Flavonoles
32.4	371.1	Sesaminol	Lignano

*m/z= Relación masa/carga

Kornsteiner *et al* (2006), comentan que los compuestos bioactivos son usados para el control y la prevención de enfermedades como el cáncer, arterosclerosis y enfermedades inflamatorias. Proporcionan mecanismos de protección.

4.3.1 Pelargodenin 3-O-glucosil-rutinocido

El pelargodenin 3-O-glucosil-rutinocido (fig. 4.1) pertenece a la familia de las antocianinas, las cuales ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo (Garzón, 2008).

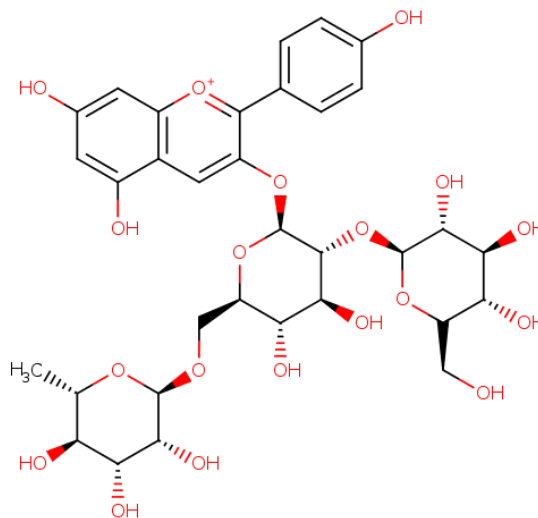


Fig. 4.1: Estructura química de pelargodenin 3-O-glucosil-rutinocido

Garzón (2008), afirma que estudios con fracciones de antocianinas provenientes del vino han demostrado que estas son efectivas en atrapar especies reactivas del oxígeno, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas. A las antocianinas también se les atribuye actividad antitumoral y anticancerígena. Según Tristán *et al* (2008), las antocianinas muestran propiedades hipoglucémicas.

Borges *et al* (2007), las antocianinas, familia a la que pertenece el compuesto bioactivo en cuestión, tienen propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias, sugieren también que posee efectos en la mejora de la visión y memoria, además de reducir la incidencia de la enfermedad coronaria.

4.3.2 Apigenin 6,8 diglucosido

La apigenina (fig. 4.2) parece estar orientada a reducir la ansiedad y causar sedación. La apigenina también es un compuesto anticanceroso muy potente (NCBI, 2016).

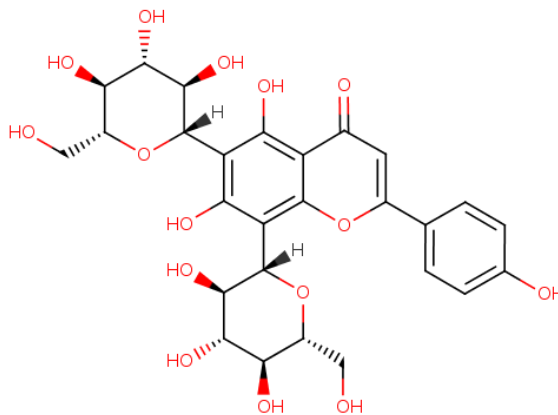


Fig. 4.2: Estructura química de Apigenin 6,8 diglucosido

Kris-Etherton *et al.* (1999), mencionan que los flavonoides, familia a la que pertenece el compuesto en cuestión, tienen efectos cardioprotectores. Estudios epidemiológicos han demostrado que la ingesta de flavonoides reduce significativamente la mortalidad por enfermedad coronaria.

De la Rosa *et al* (2011),₁ reporta que en las cáscaras de nuez pecanera las concentraciones de flavonoides oscilaron entre 26,3 y 36,1 mgEC / g (aproximadamente un tercio del total de compuestos fenólicos extraíbles).

4.3.3 Epigallocatequin 7-O- glucuronido

El epigallocatequin 7-O-glucuronido (fig. 4.3) pertenece a la familia de los flavonoles, diversos estudios indican que la ingesta de flavonol se ha asociado con un menor riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular e hipertensión (Bell, 2016).

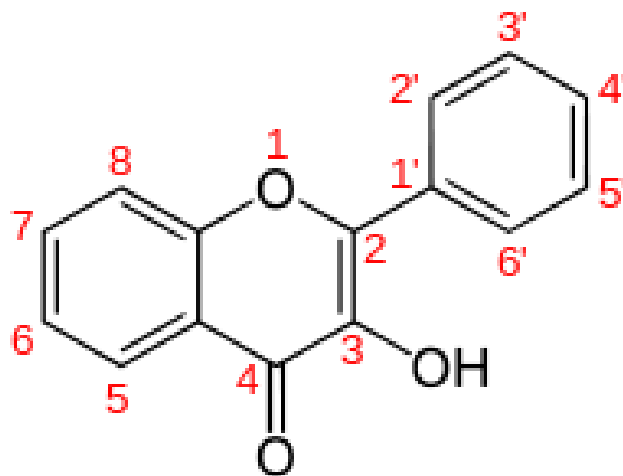


Fig. 4.3: Estructura química de Epigallocatequin 7-O- glucuronido

4.3.4 Dimetil epigallocatequin 3-O- galato

El dimetil epigallocatequin 3-O-galato (fig. 4.4) inhibe la oxidación celular y previene el daño de los radicales libres a las células. Está en estudio como un potencial agente quimiopreventivo del cáncer. (NCI). También actúa como agentes neuroprotectores, se usa en medicamentos destinados a prevenir daños al cerebro o a la médula espinal por isquemia, accidente cerebrovascular, convulsiones o traumatismos (NCBI, 2016).

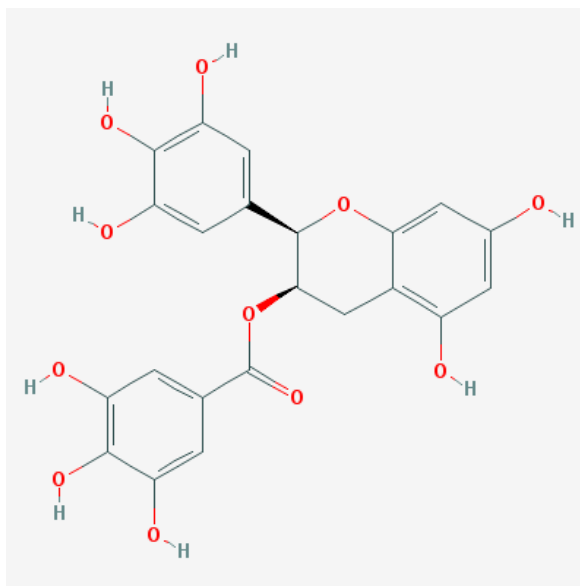


Fig. 4.4: Estructura química de Dimetil epigallocatequin 3-O- galato

Este compuesto pertenece al grupo de los flavonoles, los cuales a su vez pertenecen al grupo de los flavonoides. Martínez-Flores *et al.* (2002), menciona que los flavonoides poseen efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatorias.

4.3.5 Sesaminol

Estudios recientes han demostrado que el sesaminol (fig. 4.5) tiene efectos positivos contra el Alzheimer (Katayama, 2016).

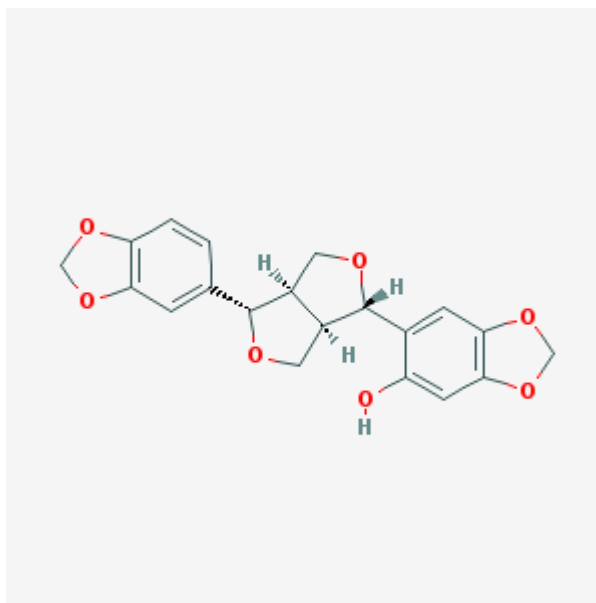


Fig. 4.5: Estructura química de sesaminol.

El sesaminol está comprendido dentro del grupo de los lignanos, y éste a la vez está dentro del grupo de los fitoestrógenos. Drago *et al.* (2006), mencionan que el consumo de los fitoestrógenos se ha correlacionado con efectos benéficos contra el cáncer de próstata, obesidad y diabetes, así como inflamación, artritis, infarto miocárdico, neurodegeneración y cáncer de mama.

5 CONCLUSIONES

El extracto acuoso de la cáscara de nuez pecanera (*Carya illinoensis*) presenta mayor concentración de polifenoles condensados que de polifenoles hidrolizables.

Se observó mayor contenido de FC, por lo que posiblemente no sería viable para ser empleado como alimento para rumiantes, al ser altamente indigestible, aunado a esto la cáscara de nuez presenta niveles bajos de proteína cruda y extracto etéreo.

Los compuestos bioactivos encontrados a través de una cromatografía líquida de alta resolución acoplado a espectrómetro de masas, al parecer pudieran tener actividad antimicrobiana, antiviral, antioxidante, anticancerígeno y antiglicémico. Por ejemplo, los compuestos bioactivos encontrados en el extracto de la cáscara de nuez pecanera pertenecen a los grupos de las antocianinas, flavonoles, flavonoides y lignanos, a los cuales se les han atribuido acciones favorables en patologías como cáncer, enfermedades coronarias, Alzheimer, diabetes mellitus, entre otras, por lo tanto es necesario realizar otros estudios *in vitro*, para corroborar el supuesto.

6 LITERATURA CITADA

- Aguilar-Caballero, A.J., Torres-Acosta, J.F.J., Cámara-Sarmiento, R., Hoste, H. y Sandoval-Castro, C., 2008. Inmunidad contra los nemátodos gastrointestinales: la historia caprina. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 9, 73-82.
- Aguilar-Caballero, A.J., Cámara, S. R., Torres-Acosta, J.F. y Sandoval-Castro, C.A. 2011. El control de los nemátodos gastrointestinales en caprinos: ¿dónde estamos? Depto. de Salud Animal, Campus Ciencias Biológicas y Agropecuarias-UADY. Yucatán, México.
- AOAC: Official Methods of Analysis (Volume 1). 1990. 15th Edition. AOAC international. Washington, D.C. Archivo en línea, disponible en: <https://archive.org/details/gov.law.aoac.methods.1.1990>
- Ascacio-Valdés, J.A., Aguilera-Carbó, A., Rodríguez-Herrera, R. y Aguilar-González, C. 2013. Análisis de ácido elágico de algunas plantas del semidesierto Mexicano. *Revista Mex. Cienc. Farm.* 44, 36-40.
- Ávalos, A. y Pérez, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense, Madrid.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. Interamericana Mc Graw-Hill. 555 p.
- Borges, G., Roowi, S., Rouanet, J-M., Duthie, G.G., Lean, M.E.J., y Crozier, A. 2007. The bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins in rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 714 – 725. DOI 10.1002/mnfr.200700024.
- Comité Mexicano del Sistema Producto Nuez, A.C., 2014, COMENUEZ en línea, Disponible en: (<http://www.comenuetz.org/xoo/modules/tinycontent/index.php?id=77>).
- Comité Mexicano del Sistema Producto Nuez A.C. (COMENUEZ). 2015. Estudio de Mercado Estratégico de la Nuez Pecanera. Estudio. Chihuahua, Chih.
- Cuéllar, O.J.A. 2016. El Sistema FAMACHA, una opción eficaz para el control de nemátodos gastroentéricos en los ovinos. Depto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Cuatitlán, UNAM. Proyecto de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM: IN218909-2

- De la Rosa, L.A., Álvarez-Parrilla, E. y Shahidi, F. 2011. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Kernels and Shells of Mexican Pecan (*Carya illinoensis*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. Art. DOI: 10.1021/jf1034306.
- Drago, S.M, López, L.M. y Sainz, E.T. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Artículo. ISSN: 1870-0195.
- Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero (FND). 2014. Panorama de la Nuez. Artículo.
- Galindo-Barboza, A.J., Aguilar-Caballero, A.J., Cámara-Sarmiento, R., Sandoval Castro, C.A., Ojeda-Roberto, N.F., Reyes- Ramírez, R., España-España, E., Torres Acosta, J.F.J. 2011. Persistence of the efficacy of copper oxide wire particles against *Haemonchus contortus* in sheep. Vet. Parasitol. 176, 261-267.
- García, D.E. 2004. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba.
- Garzón, G.A. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia.
- Guerra, R. E. 2012. Evaluación de los extractos polifenólicos de residuos de Nogal Pecanero (*Carya illinoensis*) obtenidos mediante técnicas de extracción alternativas para su efecto contra bacterias patógenas a humanos. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.
- Guzmán, C. I. 2014. Diagnóstico de la red de valor de la nuez en el Estado de Coahuila. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.
- Hedqvist, Helena. Mueller-Harvey, Irene. Reed, J.D., Krueger, C.G. y Murphy, M. 2000. Characterization of tannins and in vitro protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. Anim. Feed Sci. Technol. 87, 41-48.
- Hoste, H, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero A.J. 2008. Nutrition-parasite interactions in goats: is immunoregulation involved in the control of gastrointestinal nematodes? Parasite Immunology. 30, 79-88.
- Hoste, H., Sotiraki, S., Landau, S.Y., Jackson, F., Beveridge, I. 2010. Goat-nematode interactions: think differently. Trends Parasitol. 26: 376-381.

- Bell, J.A. 2016. The Effect of Flavonols on Health and Exercise. EAS Academy. En línea, disponible en: <http://easacademy.org/trainer-resources/article/the-effect-of-flavonols-on-health-and-exercise-eas-academy>.
- Katayama, S., Sugiyama, H., Kushimoto, S., Uchiyama, Y., Hirano, M. y Nakamura, S. 2016. Effects of sesaminol feeding on brain A β accumulation in a senescence-accelerated mouse-prone 8, SAMP8. *J Agric Food Chem.* 64(24):4908-13. doi: 10.1021/acs.jafc.6b01237.
- Khanbabaee, K y Ree, T. 2001. Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* 18, 641-649.
- Kornsteiner, M., Wagner, K-H. y Elmadfa, I. 2006. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry* 98 (2006) 381–387.
- Kris-Etherton, P.M., Yu-Puth, S., Sabaté, J., Ratcliffe, H.E., Zhao, G y Etherton, T.D. 1999. Nuts and their bioactive constituents: effects on serum lipids and other factors that affect disease risk. *Am J Clin Nutr* 1999;70(suppl):504S–11S.
- Krueger, C.G.; Carter-Dopke, N.; Treichel, P.M.; Folts, J. y Reed, J.D. 2000. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of polygalloyl polyflavan-3-ols in grape seed extract. *J. Agric. Food Chem.* 48, 663-676.
- Kyoung Chun OK, Kim D. 2004. Consideration on equivalent chemicals in total phenolic assay of chlorogenic acid-rich plums. *Food Res. Internat.* 37, 337-342.
- López-Díaz, J.C. y Herrera, A.E. 2004. Comercialización de la Nuez y Expectativas. Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Ciencias Agrotecnológicas.
- Makkar H. P. 2000. Quantification of tannins in tree foliage. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Animal Production and Health Sub-programme. Vienna, Austria
- Makkar H. P., Blümel M., Borowy N., Becker K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J. Scie. Food Agric.* 61, 161-165.
- Markham, K.R. 1982. Techniques of flavonoid identification. Academic Press. University of Michigan.
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M. y Tuñón, M.J. 2002. Los flavonoides: propiedades y actividades antioxidantes. *Nutr. Hosp.* ISSN 0212-1611

- Moreno-Sifuentes, B. 2012. Obtención y caracterización de los compuestos bioactivos del nogal pecanero (*Carya illinoensis*) por tecnologías emergentes. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. Facultad de Ciencias Químicas.
- Moreno, F.C., Gordon, I. J., Wright, A.D., Benvenuttia, M.A. y Saumell, C.A. 2010. Efecto antihelmíntico in vitro de extractos de plantas sobre larvas infectantes de nemátodos gastrointestinales de ruminantes. *Arch. Med. Vet.* 42, 155-163.
- Mueller-Harvey, Irene. 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci. Techn.* 91, 3-9.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=65064, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65064> (accessed Nov. 18, 2016).
- Pinheiro do Prado, A.C., Aragão, A.M, Roseane Fett. R y Block, J.M. 2009. Antioxidant properties of Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] Shell infusion. Federal University of Santa Catarina, Center of Agrarian Sciences, Department of Food Science and Technology, UFSC – Florianópolis – SC, Brazil. DOI: 10.3989/gya.107708
- Porter L. J., Hrstich L N., Chan B G. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochem.* 25, 223-230.
- Ramos, G.; Frutos, P.; Giráldez, F.J. y Mantecón, A.R. 1998. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Arch. Zootec.* 47, 597-604.
- Robbins, K.S., Gong, Y., Wells, M.L., Greenspan, P. y Pegg, R.B. 2015. Reprint of "Investigation of the antioxidant capacity and phenolic constituents of U.S. pecans". *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 4332-4341. [dx.doi.org/10.1021/jf500909h](https://doi.org/10.1021/jf500909h).
- SAGARPA, 2007. Pliego de condiciones para el uso de la marca oficial México calidad suprema en nuez pecanera. (Rev. 070307). Págs. 1-39.
- Schofield, P.; Mbugua, D.M. y Pell, A.N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Sci. Techn.* 91, 21-27.
- Seeram, N., Lee R., Hardy, M., Heber, D. 2005. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the comercial juice industry. *Separation and Purificati. Techn.* 41, 49-55.

- Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. Noviembre, 2016. SINAREFI en línea, disponible en: http://www.sinarefi.org.mx/redes/red_nogal.html
- Sun, B.; Ricardo da Silva, J.M. y Spranger, I. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4267-4269.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 1991. *Plant physiology*. Benjamin/Cummings Pub. Co. Universidad de Carolina.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. *Fisiología Vegetal*. Universitat Jaume I. Publicacions, ed. III. Títol. IV. Série 581.1.
- Tierra Fértil en línea, disponible en <http://www.tierrafertil.com.mx/> [Consulta: 14 de noviembre 2016].
- Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Aguilar-Caballero, A.J., Cámara-Sarmiento, R. y Alonso-Díaz, M.A. 2012. Nutritional manipulation of sheep and goats for the control of gastrointestinal nematodes under hot humid and subhumid tropical conditions. *Small Rumin. Res.* 103, 28-40.
- Torres-Acosta, J.F.J y Hoste, H. 2008. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 77, 159-173.
- Tristan F, Kraft B, Schmidt B.M, Yousef G.G, Knigh C.T.G., Cuendet M, *et al.* Chemopreventive Potential of Wild Lowbush Blueberry Fruits in Multiple Stages of Carcinogenesis. *J Food Sci.* 2005; 70(3):S159-S166.
- Valdés, R. y Balbín, María Irene. 2000. *Curso de fisiología y bioquímica vegetal*. UNAH. La Habana, Cuba. 89 p.
- Villarreal-Lozoya JE, Lombardini L, Cisneros-Zevallos. 2007. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. *Food Chem.* 102, 1241-1249.
- Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* 8, 303-313.
- Willis, R.B. y Allen, P.R. 1998. Improved method for measuring hydrolysable tannins using potassium iodate. *Analyst.* 123, 435-440.