

CAPÍTULO 2 ÁREA ALIMENTOS

NANOENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Justicia spicigera* (Muicle) Y *Theobroma cacao* L. (Cacao)

**Miguel Ángel Aguilar-Méndez^{1*}, Eduardo San Martín-Martínez¹,
Jorge Yáñez-Fernández², Elizabeth Navarro-Cerón³**

¹Instituto Politécnico Nacional, CICATA Legaria 694, Col. Irrigación, Ciudad de México, C.P. 11500, México.

²Instituto Politécnico Nacional, Laboratorio de Biotecnología Alimentaria-UIPIBI Av. Acueducto S/N Col. Barrio La Laguna Ticomán, Ciudad de México, CP 07340, México.

³Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal (LANISAF), Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, C.P. 56230, México.

*maguilarme@ipn.mx

<https://doi.org/10.3926/oms.404.2>

Aguilar-Méndez, M.Á., San Martín-Martínez, E., Yáñez-Fernández, J., & Navarro-Cerón, E. (2020). Nanoencapsulación de compuestos bioactivos con actividad antioxidante de *Justicia spicigera* (muicle) y *Theobroma cacao* L. (cacao). En E. San Martín-Martínez (Ed.). *Avances de investigación en Nanociencias, Micro y Nanotecnologías. Volumen II*. Barcelona, España: OmniaScience. 29-46.

Resumen

En este trabajo, se elaboraron nanopartículas cargadas con extractos polifenólicos de *Theobroma cacao* L. (cacao) y *Justicia spicigera* (muicle). El contenido de fenoles totales del grano de cacao y el muicle se determinó usando el reactivo Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante se estimó usando los ensayos DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazilo) y FRAP (reducción férrica / poder antioxidante). El proceso de nanoencapsulación se realizó mediante un nano-secador por aspersión utilizando pectina y aislado de proteína de suero como materiales de pared. Los resultados mostraron que fue posible obtener nanopartículas con morfología esférica homogénea y un tamaño promedio de aproximadamente 500 nm. Los experimentos *in vitro*, en los que se utilizó el método DPPH para evaluar la prevalencia de la capacidad inhibitoria de radicales libres de los extractos nanoencapsulados, indicaron que las eficiencias de carga para las nanopartículas cargadas con ambos extractos fueron aproximadamente del 56.53 % y 41.38 % para muicle y cacao, respectivamente; de la misma manera los resultados de FRAP fueron equivalentes respecto a la capacidad antioxidante.

Palabras clave: Nanopartícula; Cacao; Muicle; Extracto polifenólico; Antioxidante.

1. Introducción

Las investigaciones sobre compuestos bioactivos naturales han aumentado significativamente en los últimos años debido a sus importantes beneficios para la salud, como la prevención de enfermedades crónicas [1,2]. Así, varios grupos de investigación se han centrado en la caracterización de plantas de origen regional con referencias medicinales históricas. En México, la población posee un gran conocimiento de la medicina tradicional. La información etnobotánica y especialmente la antropología médica hacen referencia a una serie de especies ampliamente utilizadas por la población mexicana, tales como *Justicia spicigera* y *Theobroma cacao* L., para tratar enfermedades relacionadas con enfermedades inflamatorias, diabetes y enfermedades cardiovasculares [3,4].

J. spicigera Schltl. es un arbusto de hoja perenne con flores naranjas tubulares nativa de México y América Central. *J. spicigera* se conoce comúnmente como muicle o muite. En la medicina tradicional mexicana, la planta de muicle ha sido una de las plantas más utilizadas debido a sus múltiples propiedades curativas. La investigación científica ha reportado la presencia de varios compuestos fenólicos en extractos de varias partes de la planta, siendo la kaempferitrina un flavonoide de los más abundantes. Este compuesto se ha asociado con propiedades antidiabéticas [5], actividad antitumoral e inmunomoduladora [6,7], actividad ansiolítica [8] y anticonvulsiva [9].

T. cacao L. es un árbol pequeño, pero económicamente importante. Es un árbol de hoja perenne de la familia *Sterculiaceae*, y nativo de la región tropical de las Américas [4]. Cada semilla contiene una cantidad significativa de grasa (40-50 % como manteca de cacao) y polifenoles (principalmente procianidinas y flavonoles), que representan aproximadamente el 10-18 % del peso seco del grano entero [10,11]. Existe una fuerte evidencia de que el alto contenido de flavonoides en los granos de cacao es responsable de los efectos benéficos para la salud. Ensayos clínicos a corto plazo sugieren que los flavonoides del chocolate pueden reducir el riesgo cardiovascular al disminuir la presión arterial. Se ha observado que los flavanoles de los productos del cacao incrementan la formación de óxido nítrico endotelial, lo que promueve la vasodilatación y, por lo tanto, se disminuye la presión arterial [12].

Además de la acción bioactiva, los polifenoles son responsables del desarrollo de la astringencia y el amargor en productos como los granos de cacao, el vino, el té verde y el té negro. Sus altas concentraciones producen un sabor desagradable que condiciona el consumo directo de estos alimentos [13,14]. Aunque los

compuestos fenólicos parecen ser más estables que otros compuestos antioxidantes en los sistemas alimentarios [15], la efectividad de algunos de ellos en la prevención de enfermedades crónicas depende de la preservación de la estabilidad, bioactividad, biodisponibilidad y solubilidad. Los compuestos fenólicos sufren una reducción significativa durante el procesamiento de los alimentos. Por ejemplo, en la producción de chocolate, la cantidad de estos compuestos disminuye después de la fermentación, el secado y el tostado [14]. Por lo tanto, el uso de fenólicos requiere el diseño de sistemas para proteger y preservar su forma activa hasta que se consuman y posteriormente se liberen en el cuerpo.

La nanoencapsulación de fármacos implica la formación de partículas cargadas con compuestos bioactivos con diámetros que varían de 1 a 1000 nm [16,17]. El término nanopartícula es un nombre colectivo tanto para nanoesferas como para nanocápsulas. Las nanocápsulas están compuestas por un núcleo central activo, rodeado por una delgada pared polimérica que proporciona protección al compuesto activo contra el oxígeno, el agua y/o la luz, lo que permite una liberación controlada de la sustancia y/o para evitar el contacto con otros componentes en una mezcla [18]. Por ejemplo, la utilización de polifenoles nanoencapsulados como el resveratrol, ácido gálico, curcumina, ácido elágico y epigallocatequina-3-galato en lugar de compuestos libres, ha demostrado una mejora en su biodisponibilidad y estabilidad además de aumentar su solubilidad y actividad contra el cáncer de seno y colon [19-21]. De acuerdo con Bing et al. [2], las nanopartículas mejoran la absorción y biodisponibilidad de las moléculas bioactivas en humanos, principalmente a través de las siguientes vías: (1) protección de la molécula bioactiva del ambiente hostil del tracto gastrointestinal; (2) prolongación del tiempo de residencia en el intestino por mucoadhesión; (3) endocitosis de las partículas, y/o (4) efecto de penetración del polímero. El objetivo de este estudio fue desarrollar nanopartículas biopoliméricas cargadas con extractos polifenólicos derivados de muicle y cacao mediante nano-secado por aspersión, a fin de preservar sus propiedades antioxidantes.

2. Metodología

2.1. Materiales y reactivos

El material vegetal fue recolectado en un mercado local en la Ciudad de México y los granos de cacao fueron provistos por Agroindustrias Unidas de Cacao S.A. de C.V. (Tabasco, México). Los reactivos 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), reactivo Folin-Ciocalteu, ácido gálico, buffer Tris-HCl, 2,4,6-Tris

(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), cloruro férrico hexahidrato, tripsina acetilada, buffer de fosfatos y Tween 80 se compraron de Sigma-Aldrich (EUA). El ácido acético, ácido ascórbico y acetato de sodio se obtuvieron de JT Baker (México). Se proporcionó aislado de proteína de suero (WPI) de Davisco Foods International (EUA) y se adquirió pectina de cítricos de bajo metoxilo de ICN Biomedicals (EUA).

2.2. Preparación de extractos

El material vegetal se secó a temperatura ambiente (21 °C) y las semillas de cacao se descascararon manualmente. Ambas muestras se molieron por separado en un molino de discos (148-2, The Bauer Bros Co., EUA). En el caso del cotiledón de cacao, se eliminó la grasa del material mediante remojo en hexano durante 24 h a temperatura ambiente. La extracción de compuestos fenólicos se realizó mediante extracción asistida por ultrasonido utilizando un baño ultrasónico (TI-H-5, Elma, Alemania). Usando dos períodos de 30 min de radiación ultrasónica (25 kHz), los polvos se sometieron a una primera extracción empleando una mezcla agua-etanol (relación 1:1) en el caso de los granos de cacao, y solo agua para el muicle. La mezcla se centrifugó (3.000 rpm, 15 min) y se filtró (Whatman 42) y el residuo se recuperó para una segunda extracción con una solución de acetona-agua (relación 70:30) en el caso de los granos de cacao y agua para el muicle. Nuevamente los extractos se centrifugaron y se combinaron los sobrenadantes con los obtenidos previamente. En ambas extracciones se usó una relación muestra/solvente de 1:20 [22]. Finalmente, los extractos se concentraron en un evaporador rotatorio (40-60 rpm, 50 °C) (RE-500, Yamato, Japón) y posteriormente se liofilizaron (FreeZone 4.5 / 77510, Labconco, EUA). Los extractos secos se almacenaron en botellas de color ámbar a temperatura ambiente.

2.3. Determinación del contenido fenólico total.

El contenido fenólico total se calculó a partir de la capacidad de reducción del reactivo Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como estándar. Se añadió un volumen de muestra de 20 µL a 1.4 ml de agua destilada, seguido de la adición de 100 µL del reactivo Folin (2 N). La solución final se dejó reposar durante 3 min a temperatura ambiente. A partir de entonces, 300 µL de una solución de carbonato de sodio se añadió (20 % p/v). Después de 90 min de reposo en la oscuridad, se determinó la absorbancia a 760 nm (Multiskan Go, Thermo Fisher, Finlandia). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de materia seca [23].

2.4. Capacidad secuestradora del radical DPPH

La capacidad antiradical se determinó siguiendo la metodología propuesta por Quiroz-Reyes et al. [22], con algunas modificaciones. Se mezcló una alícuota de extracto de 500 μL con 125 μL de buffer Tris-HCl 0,1 M mediante agitación vortex durante 5 s. A esta solución, se añadieron 500 μL de una solución de DPPH de 400 μM . Después de 30 min, se determinó la absorbancia a 517 nm. El porcentaje de reducción del radical DPPH se calculó utilizando la ecuación 1.

$$\text{Inhibición (\%)} = \left[\frac{\text{Absorbancia}_{\text{control}} - \text{Absorbancia}_{\text{muestra}}}{\text{Absorbancia}_{\text{control}}} \right] * 100 \text{ (ec.1)}$$

El valor de EC_{50} se determinó a partir de los resultados graficados de la relación del efecto de reducción de DPPH contra la concentración de extracto. El EC_{50} se definió como la cantidad del extracto necesaria para reducir la concentración del radical DPPH en un 50 %, utilizando ácido ascórbico como control.

2.5. Ensayo de la actividad de reducción férrica / actividad antioxidante (FRAP)

La actividad antioxidante se determinó mediante la prueba FRAP [24]. El reactivo FRAP se preparó mezclando 25 mL de un buffer de acetato 0.3 M, 2.5 mL de solución de TPTZ (0.01 M) y 2.5 ml de una solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,02 M) a 37 °C. Una muestra de extracto de 150 μL se mezcló con 2850 μL de la solución FRAP y se dejó reposar durante 30 min en la oscuridad. La absorbancia se registró a 593 nm. Los resultados se reportaron en mM equivalentes de Trolox / L de solución.

2.6. Preparación de la solución de nanopartículas

Para la preparación de la solución de nanopartículas, se disolvieron 2.5 g de pectina en 100 mL de agua desionizada ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). La solución se agitó y se mantuvo a una temperatura constante (90 °C) durante 1 h. Posteriormente, se añadieron 0.25 g de WPI y 0.004 g de Tween 80. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente (21 °C) durante 24 h. Posteriormente, se añadieron 0.05 g de extracto en polvo (cacao o muicle) y se agitó durante 2 h. La solución acuosa final se sónico (TI-H-5, Elma, Alemania) durante 5 min y se filtró. La

solución control (sin extracto) se preparó de acuerdo con la metodología descrita anteriormente.

2.7. Nanoencapsulación mediante nano-secado por aspersión

El proceso de nanoencapsulación se realizó siguiendo la metodología de Kyriakoudi y Tsimidou [25], con algunas modificaciones. Se usó un nano-secador por aspersión B-90 (Büchi, Suiza) equipado con una membrana (malla de pulverización) de 4 μm . La suspensión acuosa de cada extracto se alimentó al cabezal de pulverización mediante una bomba peristáltica. Posteriormente, se generaron gotas extremadamente finas y se secaron en partículas sólidas, las cuales se adhirieron a la pared del cilindro colector mediante carga electrostática. Finalmente, el polvo resultante se recogió usando una espátula de goma. Las nanopartículas obtenidas de cada muestra se almacenaron en viales ámbar. Las condiciones de operación para los experimentos se mantuvieron constantes como temperatura entrada / salida: 120 °C / 65 °C, velocidad de alimentación: 3 mL / h, y velocidad de flujo de gas de secado: 100 L / min.

2.8. Caracterización de nanopartículas por microscopía electrónica de barrido (SEM)

El tamaño y la morfología de las nanopartículas se evaluaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (JSM-6390LV, JEOL, Japón). Las muestras examinadas fueron recubiertas con plata. Posteriormente, se obtuvieron imágenes con varios aumentos utilizando un voltaje de aceleración de 20 kV. El tamaño promedio de las partículas se calculó utilizando aproximadamente 600 valores de cada muestra observada en el microscopio.

2.9. Evaluación de la eficiencia de carga determinada mediante la actividad inhibitoria de radicales (DPPH)

De acuerdo con el método descrito por Quiroz et al. [26], 20 mg de nanopartículas secas se dispersaron en 2 mL de agua destilada. La dispersión resultante se añadió a 20 mL de un buffer de fosfato (pH 7), al cual previamente se le incorporaron 2 mL de tripsina acetilada para degradar el material de la pared. La mezcla se agitó constantemente a temperatura ambiente durante 12 h. Al concluir la degradación enzimática, se filtraron 10 mL de la solución a través de papel filtro (Whatman No. 42). La solución filtrada se probó usando el ensayo DPPH

de acuerdo con el método descrito anteriormente. Mediante el uso de una curva de calibración y la ecuación 1, la cantidad conocida de extracto polifenólico al que se aplicó la nanoencapsulación (Q_1) y la cantidad del extracto que retiene la capacidad de inhibición de radicales libres en las nanopartículas examinadas (Q_2) se utilizaron para cuantificar la eficiencia de carga (ecuación 2).

$$\text{Eficiencia de carga (\%)} = \left[\frac{Q_1 \text{ (mg)}}{Q_2 \text{ (mg)}} \right] * 100 \text{ (ec.2)}$$

2.10. Análisis estadístico

Todas las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados fueron analizados por ANOVA (Origin 8.0). Las diferencias entre las medias fueron detectadas por la prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas a un nivel de $P < 0.05$.

3. Resultados y discusión

3.1. Determinación del contenido fenólico total (CFT)

La figura 1 muestra diferencias significativas en el CFT entre los extractos del cotiledón de cacao y los de muicle. El extracto de cotiledón de cacao mostró el CFT más alto con 91.53 ± 3.51 mg de GAE / g de materia seca, mientras que el extracto de muicle mostró un contenido fenólico de 21.34 ± 1.95 mg de GAE / g de materia seca. Estudios previos que cuantificaron el CFT en el cotiledón de cacao (Quiroz-Reyes et al., 2013), mostraron una mayor cantidad de fenólicos (135 mg GAE / g de materia seca) con respecto a la observada en el presente estudio. Esta diferencia podría deberse a los cambios físicos y químicos en los granos de cacao causados por la variedad de granos, la región de origen, el procesamiento que se les aplica y los diferentes métodos utilizados en cada etapa del proceso de extracción [27,28]. El proceso de secado también podría afectar el CFT. Mejía-Meza et al. [29] observaron que los procesos de secado, incluida la liofilización, podrían tener efectos no deseados en los perfiles de ingredientes de muestras de plantas. Por ejemplo, la liofilización redujo la actividad antioxidante en frambuesas en comparación con sus contrapartes frescas, debido a la reducción de los polifenoles glicosilados y agliconas. Por otro lado, el CFT cuantificado en este estudio para el muicle (21.34 ± 1.95 mg GAE / g de materia seca,

equivalente a 76.22 mg GAE / g de extracto seco) fue consistente con los valores reportados por otros autores. Ortiz-Andrade, et al. [5] mostró que la kaempferina es un componente principal en el extracto de muicle, y el cual se encuentra en cantidades de 69,65 mg/g de extracto seco.

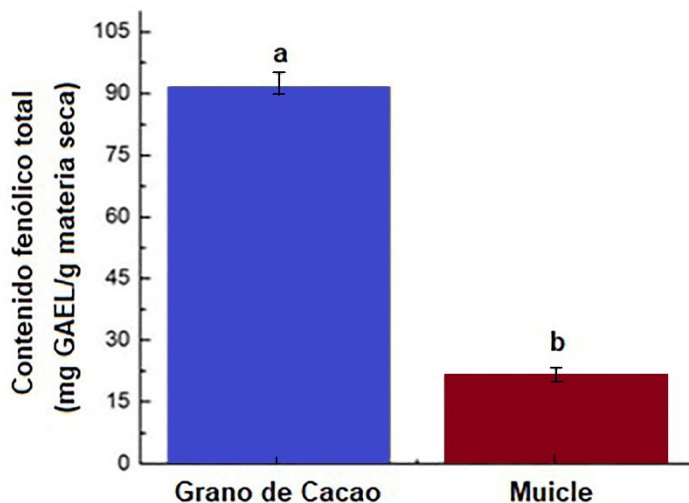


Figura 1. Contenido fenólico total de grano de cacao y muicle. Los valores se expresan como media \pm de (n = 3). Medias con letras diferentes fueron significativamente diferentes (P < 0.05).

3.2. Capacidad antiradical (ensayo DPPH)

En el caso del ensayo DPPH, que es un método muy rápido para evaluar la actividad antioxidante, es posible determinar la capacidad antiradical de un antioxidante midiendo la disminución de la absorbancia de una solución alcohólica de DPPH a 515-520 nm, en la presencia de un antioxidante donador de hidrógeno. Debido al cambio de color de púrpura a amarillo, la absorbancia disminuye cuando un antioxidante elimina el DPPH a través de la donación de hidrógeno para formar una molécula de DPPH estable [30]. La Figura 2 muestra la actividad secuestradora de radicales DPPH de los extractos de cacao y muicle. Se pudo observar que la actividad del extracto de cacao (EC_{50} : 50.21 ± 1.75) fue significativamente mayor que la del extracto de muicle (EC_{50} : 297.91 ± 23.38). Cuanto menor es el valor de EC_{50} , mayor es la actividad de los extractos como captadores de radicales DPPH [31]. Estos resultados pueden atribuirse a las diferentes conformaciones adoptadas por los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en cada extracto, que exhibieron varios efectos biológicos. Particularmente, debido

a su estructura química y propiedades redox debido al número y posición de sus grupos OH que tienen diferentes grados de disociación y grupos ionizados activos [1].

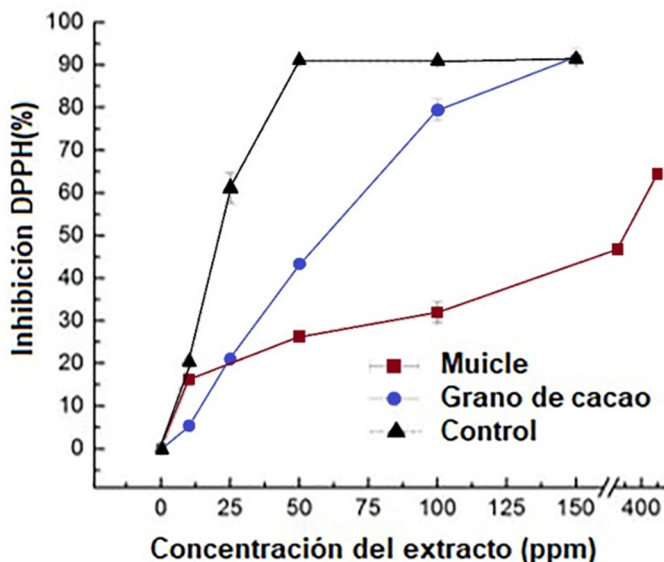


Figura 2. Efecto de inhibición de radicales DPPH de extractos de cacao y muicle. Los valores se expresan como media \pm de ($n = 3$). Se usó ácido ascórbico como control.

3.3. Ensayo de actividad antioxidante (FRAP)

El ensayo FRAP es un método simple, rápido y económico para medir la actividad antioxidante. Este ensayo se basa en la reducción del complejo Fe^{3+} -TPTZ al complejo Fe^{2+} -TPTZ a pH bajo, lo que provoca la formación de un complejo colorido. Los valores de FRAP se obtienen comparando el cambio en la absorbancia a 593 nm en una mezcla de reacción de prueba con iones ferrosos a concentraciones conocidas [24]. Los valores de FRAP (Figura 3) indicaron que el extracto de cacao tuvo la mayor actividad antioxidante, que fue significativamente más alta que la actividad antioxidante presentada por el extracto de muicle, alcanzando un valor de $924.91 \pm 8.76 \mu\text{M Trolox E / L}$, en contraste con el valor de $387.39 \pm 6.43 \mu\text{M Trolox E / L}$ presentado por el extracto de muicle. Estos resultados se pueden correlacionar con el contenido fenólico total, ya que el extracto con mayor contenido fenólico presentó mayor

actividad antioxidante [32, 33]. Las propiedades reductoras generalmente se asocian con la presencia de agentes reductores como los polifenoles, que han demostrado actuar como antioxidantes al romper la cadena de radicales libres al donar un átomo de hidrógeno [22].

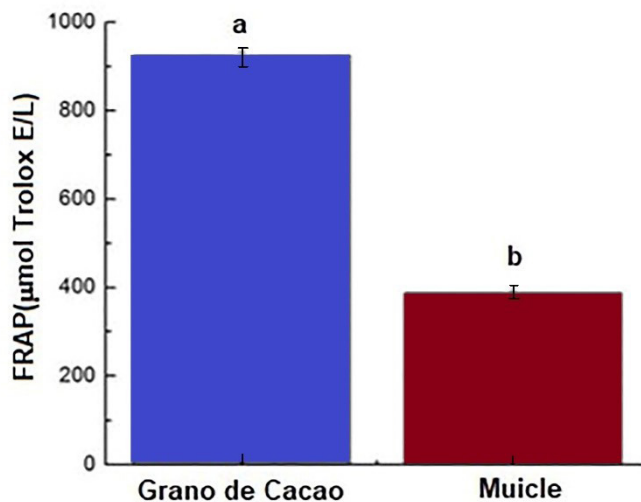


Figura 3. Capacidad antioxidante de los extractos de cacao y muicle medidos por el ensayo FRAP. Los valores se expresan como media \pm de (n = 3). Las medias con letras diferentes fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$).

3.4. Tamaño y morfología de las nanopartículas

Las muestras seleccionadas fueron analizadas por SEM (Figura 4). Las micrografías de SEM indicaron que las nanopartículas exhibieron principalmente una morfología esférica (Figuras 4a, 4b) y una distribución de tamaño uniforme (Figuras 5a, 5b) con tamaños de partícula promedio de 490 y 530 nm para las nanopartículas cargadas con extracto de muicle y cacao, respectivamente. De acuerdo con Li et al. [34], el tamaño y la distribución de las nanopartículas obtenidas por nano-secado por aspersión dependen de la naturaleza de los materiales de pared, y principalmente de la concentración de la muestra. En este caso, no se observó diferencia significativa entre los tamaños de los dos grupos de nanopartículas ($P > 0.05$).

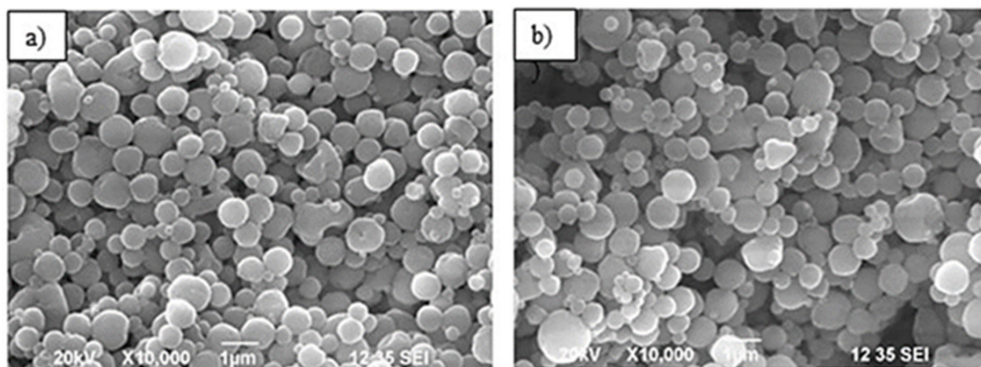


Figura 4. Imágenes SEM de nanopartículas cargadas con extracto fenólico: muicle (a) y grano de cacao (b).

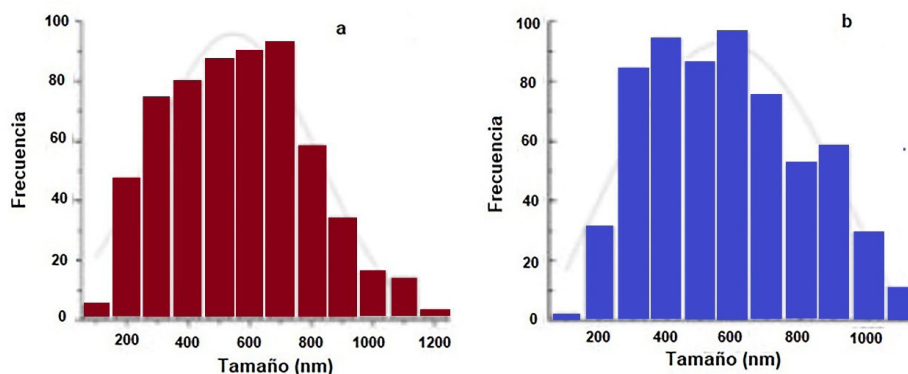


Figura 5. Histogramas de distribución del tamaño de partícula de nanopartículas cargadas con extracto fenólico: muicle (a) y grano de cacao (b).

3.5. Evaluación *in vitro* de la actividad antiradical de nanopartículas cargadas con extracto polifenólico

Los valores de eficiencia de carga para las nanopartículas cargadas con extractos fenólicos se cuantificaron usando la ecuación 2. Las nanopartículas cargadas (Q_1) produjeron la inhibición de radicales libres de 20.31 % (extracto de muicle) y 31.86 % (extracto de cacao), lo que correspondió a concentraciones de 0.45 y 0.33 mg por 10 mg de nanopartículas cargadas con extractos de muicle y de cacao, respectivamente. La cantidad teórica (Q_2) del extracto seco cargado durante este ensayo en cada caso fue de 0.796 mg por 10 mg de nanopartículas secas. Mediante el uso de datos anteriores en la ecuación 2, se calcularon eficiencias de

carga del 56,53 % para las nanopartículas cargadas con extracto de muicle y del 41,38 % para las nanopartículas cargadas con extracto de cacao. Quiroz-Reyes et al. [26] reportaron una eficiencia de carga del 77.56 % para nanopartículas cargadas con extracto de granos de cacao utilizando un método de nanoprecipitación. La disminución en la eficiencia de carga podría explicarse debido a la tendencia de los polifenoles a ser absorbidos o adsorbidos en la matriz polimérica, que depende en gran medida de las interacciones entre los grupos funcionales de los componentes [35,36]. De acuerdo con Shutava et al. [37], la fuerza de la interacción de un complejo proteína-polifenol puede oscilar mucho dependiendo del tipo de proteína y polifenol involucrados, y puede afectar la eficiencia de carga de los compuestos encapsulados.

4. Conclusiones

En este trabajo, fue posible obtener nanopartículas con morfología esférica homogénea y un tamaño promedio de aproximadamente 500 nm utilizando la técnica de nano-secado por aspersión. El extracto de cacao mostró un contenido fenólico total más alto y más capacidad antioxidante que el extracto de muicle. La protección de los extractos con una pared biopolimérica permitió la retención de las propiedades bioactivas. El proceso de nanoencapsulación permitió preservar la capacidad antioxidante de los extractos de cacao y muicle.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo económico de los proyectos SIP del Instituto Politécnico Nacional.

Bibliografía

1. Felhi, S., Hajlaoui, H., Ncir, M., Bakari S., Ktari N., Saoudi M. et al. (2016) Nutritional, phytochemical and antioxidant evaluation and FT-IR analysis of freeze-dried extracts of *Ecballium elaterium* fruit juice from three localities. *Food. Sci. Tech-Brazil*. 36, 646-655. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.12916>.
2. Bing, H., Xixia, L., Chunlan, Z., & Xiaoxiong, Z. (2017). Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. *J. Food Drug Anal.*, 25, 3-15. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.004>.
3. Dillinger, T.L., Barriga, P., Escárcega, S., Jimenez, M., Salazar-Lowe, D., & Grivetti, L.E. (2000). Food of the gods: cure for humanity A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *J. Nutr.*, 130, 2057S–2072S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2057S>.
4. Rusconi, M., & Conti, A. (2010). *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacol. Res.*, 61, 5-13. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.08.008>.
5. Ortiz-Andrade, R., Cabañas-Wuan, A., Arana-Argáez, V., Alonso-Castro, A.J., Zapata-Bustos, R., Salazar-Olivo, L.A. et al. (2012). Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *J. Ethnopharmacol*, 143(2), 455-462. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.043>.
6. Alonso-Castro, A.J., Ortiz-Sánchez, E., Domínguez, F., Arana-Argáez, V., Juárez-Vázquez, M del C., Chávez, M. et al. (2012). Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *J. Ethnopharmacol.*, 141(3), 888-894. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.036>.
7. Fernández-Pomares, C., Juárez-Aguilar, E., Domínguez-Ortiz, M.A., Gallegos-Estudillo, J., Herrera-Covarrubias, D., Sánchez-Medina, A. et al. (2018). Hydroalcoholic extract of the widely used Mexican plant *Justicia spicigera* Schltdl. exerts a cytostatic effect on LNCaP prostate cancer cells. *J. Herb. Med.*, 12, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.09.003>.
8. García-Ríos, R.I., Mora-Pérez, A., González-Torres, D., Carpio-Reyes, R.J., & Soria-Fregozo, C. (2019). Anxiolytic-like effect of the aqueous extract of *Justicia spicigera* leaves on female rats: A comparison to diazepam. *Phytomedicine*, 55, 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.07.007>.

9. González-Trujano, M.E., Domínguez, F., Pérez-Ortega, G., Aguillón, M., Martínez-Vargas, D., Almazán-Alvarado, S. et al. (2017). Justicia spicigera Schltdl. and kaempferitrin as potential anticonvulsant natural products. *Biomed. Pharmacother.*, 92, 240-248. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.075>
10. Niemenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Ndoumou, D.O., & Lieberei, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *J. Food Compos. Anal.*, 19, (6–7), 612-619. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.02.006>.
11. Tomás-Barberán, F., Cienfuegos-Jovellanos, E., & Marin, A. (2007). A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 3926-3935. <https://doi.org/10.1021/jf070121j>.
12. Ried, K., Sullivan, T., Fakler, P., Frank, O.R., & Stocks, N.P. (2010). Does chocolate reduce blood pressure A meta-analysis. *BMC Med.*, 8, 39. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-39>.
13. Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of Polyphenols-a review. *Trends Food Sci. Technol.*, 21, 510–523 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>.
14. Cruz, J.F.M., Leite, P.B. Soares, S.E., & Bispo, E.S. (2015). Bioactive compounds in different cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivars during fermentation. *Food. Sci. Tech-Brazil*, 35, 279-284. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6541>.
15. Seneviratne, K.N., Prasadani, W.C., & Jayawardena, B. (2016). Phenolic extracts of coconut oil cake: a potential alternative for synthetic antioxidants. *Food. Sci. Tech-Brazil*, 36, 591–597. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.07316>.
16. Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomed.-Nanotechnol. Biol. Med.*, 2, 8-21. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>.
17. Li, Z., Jiang, H., Xu C., & Gu, L. (2015). A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals. *Food Hydrocolloids*, 43, 153-164. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.010>.
18. Efrain, P., Alves, A.B., & Jardim, D.C.P. (2011). Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. *Braz. J. Food Technol.*, 14, 181-201. <https://doi.org/10.4260/BJFT2011140300023>.

19. Shirode, A.B., Bharali, D.J., Nallanthighal, S., Coon, J.K., Mousa, S.A., & Reliene, R. (2015). Nanoencapsulation of pomegranate bioactive compounds for breast cancer chemoprevention. *Int. J. Nanomed.*, 10, 475-484. <https://doi.org/10.2147/IJN.S65145>.
20. de Cristo Soares Alves, A., Mainardes, R.M., & Khalil, N.M. (2016). Nanoencapsulation of gallic acid and evaluation of its cytotoxicity and antioxidant activity. *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.*, 60, 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.014>.
21. Jeon, Y.O., Lee, J.-S., & Lee, H.G. (2016). Improving solubility, stability, and cellular uptake of resveratrol by nanoencapsulation with chitosan and γ -poly (glutamic acid)'. *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, 147, 224-233. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.07.062>.
22. Quiroz-Reyes, C.N., Aguilar-Méndez, M.A., Ramírez-Ortiz, M.E., & Ronquillo-de Jesús, E. (2013). Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Rev. Mex. Ing. Quim.*, 12, 12-18.
23. Waterhouse, A.L. (2002). Determination of total phenolics in Wrolstad, R.E. (Ed.): 'Current Protocols in Food Analytical Chemistry' (John Wiley and Sons, New York), units I.1.1.1–I.1.1.8.
24. Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 239, 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
25. Kyriakoudi, A., & Tsimidou, M.Z. (2018). Properties of encapsulated saffron extracts in maltodextrin using the Büchi B-90 nano spray-dryer. *Food Chem.*, 266, 458-465 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.038>.
26. Quiroz-Reyes, C.N., Ronquillo-de Jesús, E., Duran-Caballero, N.E., & Aguilar-Méndez M.A. (2014). Development and characterization of gelatin nanoparticles loaded with a cocoa-derived polyphenolic extract. *Fruits*, 69, 481-489. <https://doi.org/10.1051/fruits/2014034>.
27. Othman, A., Ismail, A., Ghani, N.A., & Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chem.*, 100, 1523-1530. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.021>.

28. Hii, C.L., Law, C.L., Suzannah, S., Misnawi, & Cloke, M. (2009). Polyphenols in cocoa Improving public health: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages (*Theobroma cacao* L.). *As. J. Food Ag-Ind.*, 2(4), 702-722.
29. Mejía-Meza, E., Yáñez, J.A., Remsberg, C.M., Takemoto, J.K., Davies, N.M., Rasco, B. et al. (2010). Effect of dehydration on raspberries: polyphenol and anthocyanin retention, antioxidant capacity, and antiadipogenic activity. *J. Food Sci.*, 75(1), H5–H12. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01383.x>.
30. García-Márquez, E., Román-Guerrero, A., Pérez-Alonso, C., Cruz-Sosa, F., Jiménez-Alvarado, R., & Vernon-Carter, E.J. (2012). Effect of solvent-temperature extraction conditions on the initial antioxidant activity and total phenolic content of muitle extracts and their decay upon storage at different pH. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 1-10.
31. Wootton-Beard, P.C., & Ryan, L. (2011). Improving public health: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Res. Int.*, 2011, 44, 3135-3148. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.015>.
32. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D.H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.*, 19, 669-675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>.
33. Xu, B.J., & Chang, S.K. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J. Food Sci.*, 72(2), 159-166. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x>.
34. Li, X., Anton, N., Arpagaus, C., Belleteix, F., & Vandamme, T. (2010). Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90°. *J. Control. Release*. 147, 304-310. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.07.113>.
35. Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. M.*, 13, 184-196. <https://doi.org/10.1177/154411130201300208>.
36. Yi, K., Cheng, G., & Xing, F. (2006). Gelatin/tannin complex nanospheres via molecular assembly. *J. Appl. Polym. Sci.*, 101, 3125-3130. <https://doi.org/10.1002/app.22416>.
37. Shutava, T., Balkundi, S., Vangala, P. et al. (2009). Layer-by-layer-coated gelatin nanoparticles as a vehicle for delivery of natural polyphenols. *J. Am. Chem. Soc.*, 3, 1877-1885. <https://doi.org/10.1021/nn900451a>