



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA



Efecto de las condiciones de extracción sobre el rendimiento y actividad de compuestos  
fenólicos extraídos de la corteza de *Quercus crassifolia*.

TESIS

Que para obtener el título de Licenciado

En Químico Farmacobiología.

PRESENTA:

P. QFB. Alejandra Herrejón Silva.

ASESOR DE TESIS:

Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores.

Morelia, Michoacán.

febrero, 2020

## **AGRADECIEMIENTOS**

Te agradezco Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por permitirme vivir hasta este día y poder darme la dicha de culminar este trabajo de tesis ha sido una gran bendición en todo sentido que me llena de satisfacción, te agradezco Diosito por la fortaleza, por no haberme dejado rendirme en ningún momento, porque todo lo que puedo, lo que hago y lo que recibo es regalo que tú me has dado.

A mis padres por el apoyo Marcial Herrejón Alvarado y M. Guadalupe Silva Quintana, gracias papá y mamá por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, por haberme brindado su apoyo.

Mi profundo agradecimiento a mi asesor de tesis el Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores por haberme brindado la oportunidad, por abrirme las puertas y permitirme ser parte de su equipo de investigación, por su paciencia y por su buena disposición que siempre mostró conmigo.

A la Dra. Eréndira Valencia Avilés, A la M.C. Eunice Tranquilino, gracias por su paciencia, dedicación, por el tiempo, la motivación, criterio y simpatía.

## **DEDICATORIAS**

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional. A mi madre, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones. A mi padre quien me enseñó que el mejor conocimiento que se puede tener es el que se aprende por sí mismo, lo dedico con mucho cariño para mis hermanas que han sido el apoyo fundamental para lograr los objetivos propuestos, ya que, con su ejemplo y amor profundo, me encaminaron a seguir con la propuesta investigativa quienes, siempre me dieron esperanzas y tuvieron fe en mí.

Al Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores, principal colaborador durante todo este proceso, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

A tí, el apoyo que me has brindado ha sido sumamente importante, estuviste a mi lado inclusive en momentos y situaciones más tormentosas, siempre apoyándome, no fue sencillo culminar este proyecto sin embargo siempre estuviste ahí motivándome, me ayudaste hasta donde te era posible, incluso más que eso. Gracias amor.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a todas mis amigas, por apoyarme cuando más las necesito, por extender su mano en momentos difíciles y por el amor brindado cada día, de verdad mil gracias hermanitas, siempre las llevo en mi corazón.

# ÍNDICE GENERAL

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	4
1. GÉNERO <i>Quercus</i> . .....	4
1.1. <i>Quercus crassifolia</i> .....	5
1.2. DISTRIBUCIÓN Y AMBIENTE.....	7
1.3. USOS.....	8
1.4. COMPUESTOS PRESENTES EN LA CORTEZA .....	11
2. COMPUESTOS FENÓLICOS .....	11
2.1. BIOSÍNTESIS DE POLIFENOLES .....	13
2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS POLIFENOLES .....	18
2.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	21
3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES .....	24
II. JUSTIFICACIÓN .....	28
III. HIPÓTESIS .....	29
IV. OBJETIVO GENERAL .....	30
1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
V. METODOLOGÍA.....	31
1. MATERIA PRIMA .....	31
2. EXTRACCIÓN EN AGUA CALIENTE.....	31
3. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	32
4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS POLIFENÓLICOS OBTENIDOS.....	33
4.1. CONTENIDO DE FENOLES TOTALES .....	33
4.2. CONTENIDO DE ÁCIDOS FENÓLICOS TIPO HIDROXICINÁMICOS.....	33

4.3.	CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES .....	34
4.4.	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN DPPH .....	34
4.5.	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN ABTS .....	35
VI.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	35
VII.	DISCUSIÓN Y RESULTADOS .....	36
1.	COMPUESTOS POLIFENÓLICOS .....	36
1.1.	FENOLES TOTALES .....	36
1.2.	FLAVONOIDES TOTALES .....	38
1.3.	COMPUESTOS FENÓLICOS TIPO HIDROXICINÁMICOS .....	40
2.	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	42
2.1.	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN DPPH .....	42
2.2.	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN ABTS .....	44
VIII.	CONCLUSIONES .....	48
IX.	BIBLIOGRAFÍA .....	50
X.	ANEXOS .....	62
	Anexo 1. Tabla de contenido de fenoles totales .....	62
	Anexo 2. Tabla de contenido de flavonoides totales .....	63
	Anexo 3. Tabla de contenido de ácidos hidroxicinámicos. ....	64
	Anexo 4. Tabla de capacidad de captar al radical DPPH .....	65
	Anexo 5. Tabla de capacidad de captar al radical ABTS .....	66

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. <i>Quercus crassifolia</i> .....	6
Ilustración 2. Hojas y tronco de <i>Q. crassifolia</i> .....	6
Ilustración 3. Bellotas de <i>Q. crassifolia</i> .....	7
Ilustración 4. Esquema de la ruta biocinética de los polifenoles en las plantas.....	14
Ilustración 5. Estructura química del fenol.....	15
Ilustración 6. Biosíntesis de flavonoides.....	¡Error! Marcador no definido.
Ilustración 7. Ácidos hidroxicinámicos.....	18

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Concentración de fenoles totales de los extractos de corteza de <i>Q. crassifolia</i> .....	37
Gráfico 2. Concentración de flavonoides totales de los extractos de corteza de <i>Q. crassifolia</i> .....	39
Gráfico 3. Concentración de ácidos hidroxicinámicos de los extractos de corteza de <i>Q. crassifolia</i> .....	41
Gráfico 4. Concentración de capacidad antioxidante en DPPH de los extractos de corteza de <i>Q. crassifolia</i> .....	43
Gráfico 5. Concentración de capacidad antioxidante en ABTS de los extractos de corteza de <i>Q. crassifolia</i> .....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

Ilustración 1. <i>Quercus crassifolia</i> . Tomado de (Arizaga et al., 2009). .....	6
Ilustración 2. Hojas y tronco de <i>Q. crassifolia</i> . Tomado de (Valencia et al., 2016). ....	6
Ilustración 3. Bellotas de <i>Q. crassifolia</i> . Tomado de (Arizaga et al., 2009). .....	7
Ilustración 4. Esquema de la ruta biocinética de los polifenoles en las plantas. CoA=Coenzima A. Tomado de (Quiñones et al 2012). .....	14
Ilustración 5. Estructura química del fenol. (Avalos et al., 2009).....	15
Ilustración 6. Biosíntesis de flavonoides. Tomado de (Avalos et al., 2009).....	17
Ilustración 7. ácidos hidroxicinámicos. Modificada de (Peñarieta, et al., 2014). .....	18

## RESUMEN

Se optimizaron las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de corteza de *Q. crassifolia*. La extracción fue hecha por maceración usando agua como solvente, generando un modelo experimental del proceso de extracción de polifenoles, las variables de proceso fueron temperatura y tiempo (T= 60, 78 y 94°C; t= 20, 40 y 60 min), siendo la concentración de fenoles totales, flavonoides totales, ácidos fenólicos tipo hidroxicinámicos, la capacidad de captar a los radicales DPPH y ABTS las variables de respuesta. Se pudieron observar algunas tendencias estadísticamente significativas en la concentración de los diferentes tipos de compuestos polifenólicos. El contenido de fenoles totales del extracto de *Q. crassifolia* muestra una mayor concentración a T= 94 °C, t= 60 min con 44.42±0.24 mg EAG/ml, en flavonoides la mejor concentración obtenida es en el tratamiento T= 60°C, t=20 min con 9.12±0.04 mg EQ/ml). Para ácidos hidroxicinámicos los resultados son T= 94 °C, t= 40 min 0.36 ± 0.07 mg EAG/ml y en actividad antioxidante el extracto de corteza de encino mostró mayor capacidad de captar al radical ABTS (8.36±0.05 mg EAG/ml) cuando las condiciones de extracción empleadas fueron T= 78 °C, t= 60 min, en cuando a la capacidad de captar DPPH, se obtuvo mejor resultado con el tratamiento T= 60°C, t= 40 min (8.54±0.03). Estos resultados pudieran indicar que la capacidad de captar tanto el DPPH como el ABTS, en el caso de los extractos de corteza de *Q. crassifolia*, está relacionada con los diferentes tipos de compuestos polifenólicos presentes en los diferentes tratamientos, ya que como se ha mostrado, la temperatura y los tiempos de extracción influyen significativamente, tanto en la concentración como en la clase de compuestos polifenólicos que son extraídos. Con datos experimentales se ajustaron por análisis de varianza (ANOVA). El análisis estadístico se realizó utilizando el programa JMP (software estadístico).

**Palabras clave:** Corteza, *Quercus crassifolia*, extracción, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante.

## ABSTRACT

The antioxidant extraction conditions were optimized from *Q. crassifolia*, the extraction was done by maceration using water as a solvent generating an experimental model of the polyphenol extraction process, the process variables were temperature and time,  $T = 60.78$  and  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$   $t = 20.40$  and 60min, being phenols, flavonoids, hydroxycinnamic acids, antioxidant capacity in DPPH and ABTS the response variables, The total phenolic content was determined following the method proposed by Scalbert et al. (1989), flavonoid content was determined at 415 nm with the method of Brighente et al. (2007), hydroxycinnamic acid content was determined by comparison with a calibration curve using chlorogenic acid as standard, and the absorbance of the test was measured at 525 nm, the antioxidant capacity of oak bark extracts was determined by spectrophotometric methods, considering the ability of the extracts to capture oxidizing species of biological relevance. The effect of the process variables was on the statistically significant response variables. The relative content of the extract of *Q. crassifolia* in total phenols shows a higher concentration at  $T = 94\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t = 60\text{min}$  with  $(44.42 \pm 0.24\text{ mg EAG / ml})$ , in flavonoids the best concentration obtained is in the treatment  $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t = 20\text{min}$  with  $(9.12 \pm 0.04)$ , (mg quercetin / ml). For hydroxycinnamic acids, the results are  $T = 94\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t = 40\text{ min}$   $(0.36 \pm 0.07)$  (mg EAG / ml) and in antioxidant capacity applying the ABTS method obtaining the best antioxidant capacity  $T = 78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t = 60\text{ min}$   $(8.36 \pm 0.05)$  (mg EAG / ml). Applying DPPH,  $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t = 40\text{min}$   $(8.54 \pm 0.03)$  These results could indicate that the ability to capture both DPPH and ABTS, in the case of bark

extracts of *Q. crassifolia*, is related to the different types of polyphenolic compounds present in the different treatments, since as shown, the temperature and extraction times significantly influence both the concentration and the class of polyphenolic compounds that are extracted.

With Experimental data were adjusted by analysis of variance (ANOVA) ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis was carried out using the JMP program (statistical software), El análisis estadístico se realizó utilizando el programa JMP (software estadístico).

**Keywords:** Bark, *Quercus crassifolia*, extraction, phenolic compounds, antioxidant capacity.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. GÉNERO *Quercus*.

Los encinos son árboles que pertenecen a uno de los géneros más importantes del mundo. *Quercus* es el más grande de la familia *Fagáceae* (Rodríguez y Romero et al., 2007). Comprende de seis a nueve géneros y alrededor de 600 a 900 especies de encinos y en México se desarrollan tres variantes de este género: *Quercus* (encinos blancos; también conocidos como *Erythrobalanus*), *Lobatae* (encinos rojos o *Leucobalanus*) y *Protobalanus* (encinos intermedios). Todos los encinos comparten una serie de características biológicas comunes: tallos leñosos, hojas con consistencia similar al cuero (coriáceas o duras) y presencia de bellotas. Su forma de crecimiento es comúnmente como árbol (con una altura de 3 a 40 m) y algunos como arbustos (con alturas de 10 a 60 cm), pero nunca como hierba; ramas de 2.3 a 4.5 mm de diámetro, surcadas, densamente tomentosas, de inducción de color amarillento a ámbar, con tricomas estipulados fasciculados, lenticelas no visibles; brotes ovoides a ovoides largos, 4-10 mm de largo, escamas ovadas, ligeramente seríceas, las escamas superiores doradas y pilosas; estípulas deciduas o persistentes en las yemas apicales, lanceoladas, estrigadas, de 8.7-13.5 mm de largo. Hojas maduras con pecíolos 7-30 (35) × 1.9-3.5 mm, tomentosas, ligeramente amarillas, con tricomas sésiles fasciculados; láminas gruesas y coriáceas, obovadas, 10-17.5 × 4.1-11.5 cm, 1.4-1.8 veces más largas que anchas; base cordada, subcordada, truncada, redondeada o ligeramente decurrente; margen grueso, ligeramente revolutivo, con 3-8 dientes aristados a cada lado de la cuchilla ubicados en la parte media distal o la cuarta parte distal de la cuchilla, a veces solo aristadas (sin dientes); ápice obtuso a redondeado; venas secundarias 7-10 a cada lado de la vena media, ascendente, moderadamente curvada, a veces casi recta, ramificado o no cerca del margen, la parte

superior continúa directamente en los dientes y el arista; superficie de la lámina adaxial prominentemente rugosa, algo brillante o sin brillo, verde gris o verde oscuro, glabro o glabrado con algunos tricomas estípidos fasciculados a lo largo de la vena media, secundaria venas y venas impresionadas; superficie de la lámina abaxial con inducción amarillenta, densamente tomentosa a lanosa, con tricomas estípitos fasciculados, los rayos crispados, entrelazados y escondidos los tricomas glandulares ámbar y la epidermis bullata (Valencia et al., 2017) <sup>b</sup>, su desarrollo es lento, causa por la cual son de larga vida. Una peculiaridad de los encinos es el patrón en la duración de las hojas. En los encinos perennifolios, el follaje siempre se mantiene verde y se va sustituyendo de manera paulatina. Por el contrario, los encinos caducifolios pierden la totalidad de sus hojas durante la estación de sequía. En el renuevo de las hojas se muestran colores vívidos que van del naranja al rojo carmesí. Las hojas se caracterizan por tener diferentes tipos de ápice (punta de la hoja), base de la hoja, número de nervaduras, margen, textura, tamaños y colores, propiedades morfológicas que son empleadas en la taxonomía para su clasificación científica (Rodríguez et al., 2007).

### **1.1. *Quercus crassifolia*.**

La especie *Quercus crassifolia* comúnmente llamado encino colorado, encino chicharrón, encino chilillo, encino hojarasca, encino huaje, encino pepitillo, encino prieto, roble y urikoste, su tamaño es de 8 a 20 m de altura y con diámetro del tronco de 25 a 50 cm, su corteza café oscura acanalada, su hoja ovalada u obovada de 4 a 16 cm de largo por 3 a 10 cm de ancho el margen encorvado y aristado y con 6 a 9 dientes, pecíolo tomentoso de 10 a 30 mm; envés amarillo a castaño muy tomentoso, su fruto es anual o bianual, solitario o en pares; bellota ovoide de 10 a 20 mm de largo por 7 a 13 mm de diámetro, las características de esta especie se puede observar en

las Ilustraciones 1, 2 y 3. El mecanismo de propagación es por bellotas producidas de julio a agosto. Estado de conservación: amenazado, hábitat transformado por incendios, tala y cultivos (Arizaga et al., 2009).



Ilustración 1. *Quercus crassifolia*. Tomado de (Arizaga et al., 2009).



Ilustración 2. Hojas y tronco de *Q. crassifolia*. Tomado de (Valencia et al., 2016).



Ilustración 3. Bellotas de *Q. crassifolia*. Tomado de (Arizaga et al., 2009).

## 1.2. DISTRIBUCIÓN Y AMBIENTE

La distribución del género *Quercus* abarca grandes gradientes ecológicos y climáticos en el continente Eurasiático como en el continente americano, en un patrón casi continuo.

Cubren bosques continuos muy grandes desde las regiones tropicales hasta las boreales, principalmente en bosques templados, aunque también pueden hallarse en matorrales, pastizales y de forma intercalada, en algunas selvas secas, desde el nivel del mar hasta 4 000 m en el Himalaya, y se expresan en rasgos de historia de vida muy diferentes. Es uno de las más importantes en las regiones templadas del Hemisferio Norte. En México consta de alrededor de 400–500 especies y es uno de los géneros de árboles más importantes que se distribuyen en el hemisferio norte, en la misma línea, Europa, y África (Esquivel et al., 2007). Desde México hasta Centroamérica; se distribuye en Chihuahua, Chiapas, Distrito Federal, Durango, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala y Veracruz. (Arizaga et al., 2009. *Fagus* y *Quercus* se distribuyen en México, el primero en el noreste, el último alcanza una

gran diversidad en la Sierra Madre Oriental. Tradicionalmente en este género, se han reconocido dos subgéneros: *Cyclobalanopsis* y *Quercus*, el último comprende tres secciones: *Lobatae* (roble rojos), *Protobalanus* (copa dorada o robles intermedios) y *Quercus* (robles blancos) (Manos et al., 1999; Nixon, 1993). Como ya hemos visto los encinos, son un grupo de plantas que se distribuye ampliamente a lo largo del territorio mexicano. Representan un conjunto de arbustos y de árboles con gran valor ecológico, y cultural para México, y para Michoacán en particular, el área de distribución principal de encinos se registra en las grandes sierras, especialmente en aquéllas con los tipos de vegetación conocidos como bosques de pino-encino y de encino, especies de maderas duras por excelencia y extenso uso para combustible en el medio rural, algunas de las cuales son consideradas especies clave.

### **1.3. USOS**

El encino es una de las maderas económicas más rentables utilizadas en la industria de la tonelería, incluso cuando la corteza se utiliza como tapón; sin embargo, hasta el 25% de la corteza no tiene aplicación o se consume como combustible (Valencia et al., 2018). En la mayoría de los países, también se los considera importantes recursos patrimoniales y culturales además de su importancia económica, ecológica y cultural. Los encinos también han sido valorados por su papel ecológico para frenar la desertificación y la erosión del suelo debido a la composición mineral de sus hojas que forman agregados estables de buen tamaño. Así mismo, han contribuido al mantenimiento de la biodiversidad ya que albergan grandes comunidades de roedores, aves, reptiles, insectos arácnidos y epífitas como orquídeas, bromelias, helechos, hongos y briófitas. Los encinos representan un gran beneficio del calentamiento climático continuo debido a su resistencia a la sequía y su preferencia por temperaturas más altas (Esquivel et al., 2009). Los encinos son un

recurso natural renovable que sirve de alimento y para diversas aplicaciones en el sector industrial, como son leña, carbón, fabricación de cercas, arados, ejes de carreta, plataformas y extracción de celulosa para papel, confección de artesanías locales y elaboración de muebles. A nivel mundial, la madera de los encinos es considerada de alta calidad, por lo que resulta importante para la economía de algunos países europeos. En el pasado, los frutos constituyeron una fuente alimenticia importante para el hombre, aunque su uso ha disminuido. En la actualidad, las bellotas son empleadas como alimento para el ganado (principalmente porcino). En ciertos lugares, las bellotas de sabor dulce se consumen crudas, pero su exceso puede provocar una ligera intoxicación; mientras que en otros lugares son tostados y molidos para fabricar una bebida parecida al café. Por otro lado, las hojas son utilizadas como condimento. Además, existen ciertas especies (llamadas “encinos de miel”) que son productoras de sustancias azucaradas (ligamaza) que es colectada por abejas que las almacenan en forma de miel. También la corteza es ampliamente utilizada en trabajos de peletería debido a la alta concentración de taninos que poseen. Desde la visión ecológica, los encinos son proveedores de servicios ambientales, dado que producen oxígeno, capturan bióxido de carbono (contaminante atmosférico producido por el hombre), filtran el ruido, reducen la erosión del suelo, infiltran el agua al subsuelo, regulan la temperatura atmosférica y son hospederos naturales que alojan en sus cortezas, ramas, hojas y flores, a numerosas especies de ardillas, pájaros, avispas, abejas, moscas, escarabajos, orquídeas, líquenes, bromelias, helechos y plantas trepador (Arizaga et al., 2009).

### 1.3.1. USOS MEDICINALES

Se han encontrado diversos usos de *Quercus* en diferentes partes de la República Mexicana: uso medicinal, alimenticio, artesanal, forraje, taninos, colorantes y posee valor cultural. Esto hace a los encinos uno de los grupos taxonómicos de plantas de mayor importancia económica en el hemisferio norte (Valencia, et al., 2004) <sup>b</sup>. El 64% de las especies de encino utilizadas tienen únicamente un uso no leñoso, mientras que para las especies restantes se registraron entre dos y cinco usos. En el segundo caso destacan algunas especies como *Q. crassifolia* que se utiliza como medicina y alimento, para el uso medicinal se emplean casi todos los órganos de la planta: corteza, hojas, flores, raíces y agallas. Se registraron 31 enfermedades relacionadas con los diferentes aparatos y sistemas del cuerpo humano, de las cuales las relacionadas con el aparato digestivo y la piel son las que utilizan el mayor número de especies y cuyas recetas incluyen principalmente el uso de la corteza y hojas. Para el uso con fines alimenticios se emplean las bellotas, las yemas foliares, las flores, las hojas y las agallas, productos que enriquecen la dieta de las comunidades indígenas con proteínas, lípidos y carbohidratos. Se encontraron diez diferentes formas de alimento proveniente de los encinos, las cuales se pueden subdividir en dos grupos. El primero comprende el consumo natural exclusivamente de la bellota; el segundo agrupa a los productos procesados tales como capeado de las flores y tostado de las bellotas para consumirse como “semilla” o para elaborar harina para tortilla, pan, pastel, atole, chocolate, café, pinole y tamales (De Lourdes et al., 2003).

#### **1.4. COMPUESTOS PRESENTES EN LA CORTEZA**

Según Honorato y Hernández et al. (1998) quienes realizaron un análisis para determinar los compuestos químicos de diferentes especies *Quercus* entre ella *Q. crassifolia*, muestra que el encino es una buena fuente de compuestos fenólicos, que pueden extraerse y utilizarse en la formulación de nuevos productos funcionales. La corteza de encino de especies mexicanas representa un área de gran interés para la investigación, ya que es una fuente potencial de antioxidantes naturales.

## **2. COMPUESTOS FENÓLICOS**

Los polifenoles o compuestos fenólicos (CF) son moléculas naturales del metabolismo secundario de las plantas que derivan de las vías de shiquimato y de los fenilpropanoides (Munin et al., 2011). En el reino vegetal se encuentran ampliamente distribuidos, de hecho, las plantas sintetizan miles de CF diferentes (Quiñones et al., 2012). El contenido de CF en las plantas y frutos tiene variaciones que dependen del genotipo, especie, condiciones ambientales, grado de madurez, composición del suelo, ubicación geográfica y condiciones de almacenamiento (Haminiuk et al., 2012). Además de participar en la función fisiológica de los vegetales, también son componentes importantes de la dieta humana, aunque no se consideran como nutrientes. Son objeto frecuente de investigación debido a sus diversas funciones como lo es la asimilación de nutrientes, síntesis proteica, actividad enzimática, fotosíntesis, formación de componentes estructurales y la defensa ante los factores adversos del ambiente como la agresión por patógenos e insectos. Además de estas funciones, los polifenoles son reconocidos por su marcada capacidad antioxidante. Los CF son los antioxidantes más abundantes en las frutas, verduras y bebidas derivadas de algunas

plantas. Su ingesta es en promedio 1 g, lo que es 10 veces mayor que la vitamina C y 100 veces mayor que la vitamina E, más allá de sus propiedades para captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno de importancia en la patogénesis de enfermedades; los CF pueden actuar en numerosas vías de señalización intracelulares como mediadores, lo que los convierte en moléculas muy interesantes para el desarrollo de nuevos productos. Investigadores y grandes industrias han mostrado interés en estas moléculas, lo que ha llevado a realizar diversos estudios con el fin de encontrar CF con propiedades farmacológicas de interés, dentro de las que se encuentran el carácter antioxidante, importante para combatir enfermedades producidas por el estrés oxidativo (Szliszka et al., 2013). Adicionalmente, a la capacidad antioxidante de estos compuestos, se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas, antimicrobianas, antineoplásicas y anticancerígenas, que justifican el número importante de publicaciones científicas que se pueden encontrar (Valencia et al., 2016).

Los CF presentan una estructura similar, caracterizada por tener de uno a más anillos aromáticos con al menos un grupo hidroxilo enlazado (Balasundram, *et al* 2006). Su diversidad estructural implica que exista un amplio grupo de moléculas, los cuales van desde estructuras simples hasta compuestos complejos, siendo clasificados de diversas maneras (Zhang et al., 2015). En general, los CF han sido clasificados en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides. En el grupo de los flavonoides, se encuentran los flavonoles, flavonas, flavan-3-ols, isoflavonas, flavanonas, dihidroflavonoles, antocianidinas y chalconas. Mientras que en el grupo de los no flavonoides, se encuentran los ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, polifenoles volátiles estíbenos y compuestos diversos (lignanos y cumarinas) (Goncalves et al., 2013).

## 2.1. BIOSÍNTESIS DE POLIFENOLES

La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido siquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina) y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y los xantomas. La ruta del ácido siquímico es dependiente de la luz. Se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos, la eritrosa-4-fostato, procedente de la vía de las pentosas fosfato, y el fosfoenolpiruvato, originario de la glucólisis. Tras diversas modificaciones, se obtiene el ácido siquímico, del que derivan directamente algunos fenoles. La vía del ácido siquímico puede continuar con la adhesión de una segunda molécula de fosfoenolpiruvato, dando lugar a la fenilalanina, un aminoácido esencial propio del metabolismo primario de las plantas. La fenilalanina entra a formar parte del metabolismo secundario por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa, que cataliza la eliminación de un grupo amonio, transformando la fenilalanina en el ácido trans-cinámico. Posteriormente, el ácido trans-cinámico se transforma en ácido *p*-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático. La acción de una Coenzima A (CoA), la CoA-ligasa, transforma el ácido *p*-cumárico en *p*-cumaroilCoA, que es el precursor activo de la mayoría de los fenoles de origen vegetal. La ruta de los poliacetatos comienza a partir de una molécula inicial de acetilCoA, y a través de una serie de condensaciones se originan los poliacetatos. Por reducción de los poliacetatos se forman los ácidos grasos, y por ciclación posterior se forman una gran variedad de compuestos aromáticos, como las quinonas y otros metabolitos que se generan a través de rutas mixtas. Las rutas mixtas combinan precursores tanto de la vía del ácido siquímico

como de la ruta de los poliacetatos. Este es el caso de un importante grupo de moléculas biológicamente activas, denominadas genéricamente flavonoides, la biocinética de los polifenoles en planta se muestra en la Ilustración 4 (Quiñones *et al* 2012).

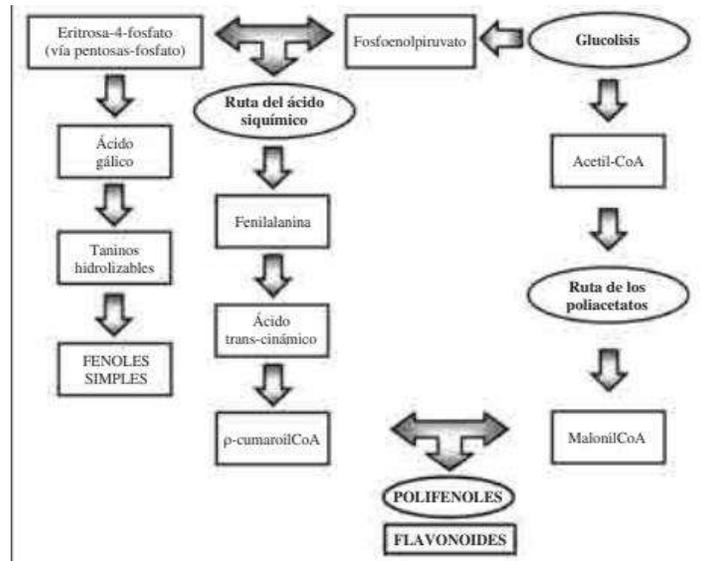


Ilustración 4. Esquema de la ruta biocinética de los polifenoles en las plantas. CoA=Coenzima A. Tomado de (Quiñones *et al* 2012).

### 2.1.1. FENOLES.

Los compuestos polifenólicos poseen en su estructura un anillo bencénico, y tiene un grupo hidroxilo en lugar de uno de los átomos de hidrógeno propio del benceno (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>), tal y como lo muestra la Ilustración 5.

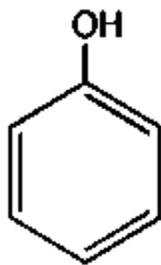


Ilustración 5. Estructura química del fenol. (Avalos et al., 2009)

Desde el punto de vista de la estructura química, los compuestos fenólicos son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina (Avalos et al., 2009).

### 2.1.2. FLAVONOIDES.

Los flavonoides, nombre que deriva del latín “flavus”, cuyo significado es “amarillo”, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal. El término flavonoides denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzo- $\gamma$ -pirano, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares, en forma de glucósidos. Ellos son muy importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas, como agentes protectores contra la luz UV o contra la infección por organismos fitopatógenos; además, estos compuestos presentan propiedades relacionadas con la salud humana, lo cual está basado en su actividad antioxidante.

Existen varios subgrupos de flavonoides. La clasificación de estos compuestos se hace en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la posición del anillo B.

Dentro de cada familia existen una gran variedad de compuestos, que se diferencian entre sí por el número y la posición de los grupos hidroxilos, y por los distintos grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos). Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son: flavonoles, flavonas, flavanonas (dihidroflavonas), isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Aal y Hucl, 1999).

En la ruta de biosíntesis de flavonoides (Ilustración 6), la primera etapa consiste en la condensación de 3 moléculas de malonil-CoA con una molécula de p-cumaril-CoA. Esta reacción está catalizada por calcona sintasa y da lugar a naringerina calcona, precursor de los flavonoles y antocianinas. La misma condensación catalizada por la estilbeno sintasa conduce a la formación estilbenos implicados en mecanismos de defensa de plantas frente a patógenos. (Avalos et al., 2009).

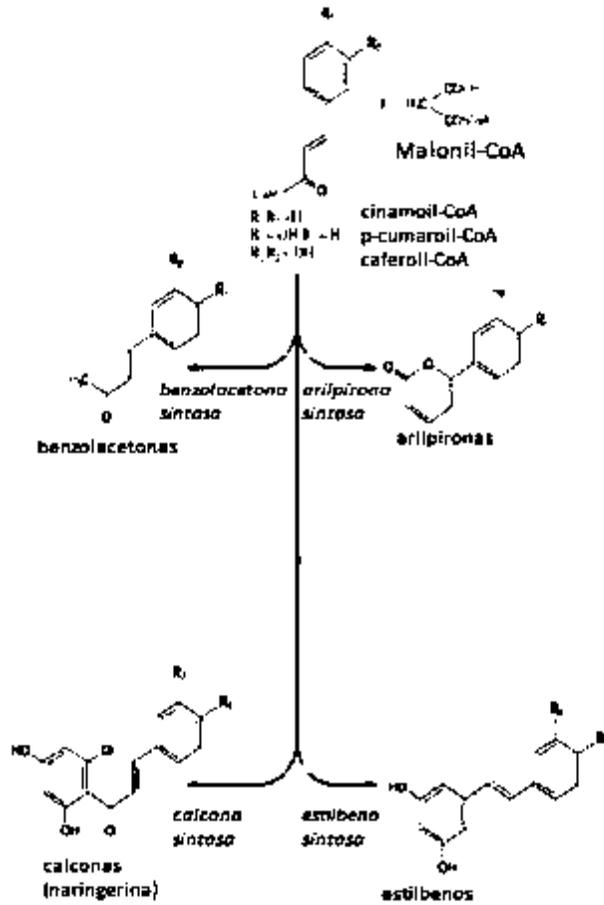


Ilustración 6. Biosíntesis de flavonoides. Tomado de (Avalos et al., 2009).

### 2.1.3. ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS.

Los ácidos hidroxicinámicos son compuestos fenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en alimentos de origen vegetal sus principales funciones en las células vegetales son las de actuar como metabolito para el crecimiento y reproducción de las plantas, y además participan como agentes protectores frente a la acción de patógenos como parte de su mecanismo de defensa (Sancho, et al., 2001).

Además de ser precursores de aromas (ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico entre otros). Su estructura química le permite proteger contra los radicales libres, actuando como antioxidantes, propiedad que se relaciona con su actividad oncoprotectora y anticancerígena. Sin embargo, dependiendo de su concentración y otros factores, también poseen actividad pro-oxidante. Están formados básicamente por un anillo aromático, un grupo alifático y un ácido carboxílico en el extremo. Son denominados hidroxicinámicos por la sustitución del grupo -OH (hidroxilo) en el anillo aromático, tal como se observa en la Ilustración 7.

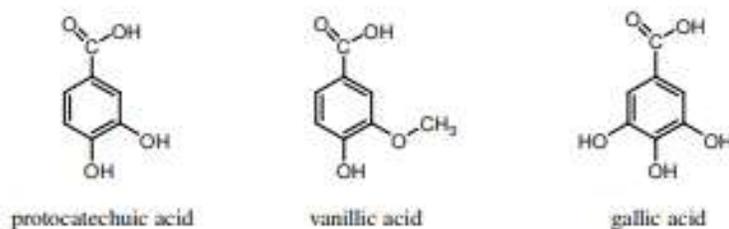


Ilustración 7. ácidos hidroxicinámicos. Modificada de (Peñarieta, et al., 2014).

## 2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS POLIFENOLES

### 2.2.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La principal propiedad de los polifenoles es su actividad antioxidante, con numerosos trabajos que inciden sobre ello, no en vano son los antioxidantes más abundantes en la dieta. Esta propiedad depende del estado de hidroxilación de sus anillos aromáticos (Kok et al., 2008). Entre los efectos antioxidantes de los polifenoles se incluyen los siguientes: (a) eliminación de radicales libres (b) quelación y estabilización de cationes divalentes, y (c) modulación de enzimas antioxidantes endógenas (Manach et al., 2004; Soobrattee et al., 2006).

Debido a que los polifenoles son compuestos sensibles a la óxido-reducción (Ju et al., 2007), dependiendo del tipo de célula, dosis, y/o el tiempo de tratamiento, también pueden actuar como agentes pro-oxidantes, incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno y, por lo tanto, reducir el crecimiento celular (Ramos, *et al* 2008). Hay experimentos clínicos que han demostrado que los polifenoles disminuyen los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS, por Reactive Oxygen Species) (Fenercioglu et al., 2010), concretamente flavonoides tales como quercetina o catequina pueden capturar directamente ROS, tales como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y ácido hipocloroso (HClO) (Binsack et al., 2001). Los polifenoles también pueden potenciar los sistemas de desintoxicación celular, tales como la superóxido dismutasa, catalasa o glutatión peroxidasa (Kolace et al., 2010; Nijveldt et al., 2001); e inhibir las enzimas generadoras de ROS, tales como la xantina oxidasa o la lipoxigenasa (Coulibaly et al., 2011).

La acción antioxidante de los polifenoles se traduce en otras actividades potenciales, como antiinflamatoria, vasodilatadora, antitrombótica, antiapoptótica, o efectos antiaterogénicos (Quiñones et al, 2013). Todas estas actividades se pueden ver traducidas en la reducción del crecimiento de ciertas líneas celulares cancerosas y son cada vez más las investigaciones que atribuyen actividades antitumorales a los polifenoles (Henning et al., 2013; Sak et al., 2014).

### **2.2.2. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.**

La inflamación es una reacción de la microcirculación que se caracteriza por la migración de las proteínas del suero y los leucocitos de la sangre en el tejido extravascular. Esta migración se regula por la liberación secuencial de mediadores vasoactivos y quimiotácticos, tales como histamina, 5-OH-triptamina, moléculas de adhesión y citocinas tales como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-

10, IL-8, y MCP-1. Estos procesos se acompañan de un aumento de la temperatura local, enrojecimiento, hinchazón, dolor, y pérdida de la función del tejido (Guo et al., 2009). La actividad antiinflamatoria de los polifenoles está tomando cada vez más importancia, aunque por supuesto no es algo que debe sorprender dada la relación entre estrés oxidativo e inflamación. El estrés oxidativo produce un aumento de enzimas tales como ciclooxigenasa (COX) y lipoxigenasa (LPO), que están implicadas en la liberación de factores como interleucinas y quimiocinas. Ya en 2000, Lu y colaboradores demostraron que la quercetina inhibía la expresión de COX-2 en estudios in vitro, o que la flavina presente en el té negro suprimía la expresión de la ciclooxigenasa en células de cáncer de colon. La regulación de la inflamación mediante la acción sobre el factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B), que regula el proceso inflamatorio mediante la modulación de la expresión de genes proinflamatorios, es otra diana importante por parte de los polifenoles. Éstos pueden bloquear la fosforilación de la subunidad P65 impidiendo la transcripción de los genes proinflamatorios. En este sentido han mostrado actividad varios polifenoles como el resveratrol, la quercetina o el epigallocatequín galato entre otros (Dryden et al., 2006; Ou et al., 2006; Ran et al., 2008). La asociación entre inflamación y cáncer ha sido establecida por numerosos estudios epidemiológicos y clínicos (Thun et al., 2004), y los principales agentes implicados son NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  y COX-2, desde la iniciación de la inflamación hasta mecanismos ya citados como la proliferación celular, el efecto antiapoptótico, la angiogénesis o la metástasis (Lu et al., 2006).

Funciones de estas sustancias astringentes son sus propiedades hemostáticas al detener el sangrado, constrictoras y antiinflamatorias (Uribe et al., 2016). El extracto metanólico de corteza de *Quercus alba* presenta una actividad antioxidante comparable a la del té verde, la que se ha ligado a la presencia de catequinas y otros flavonoides (McCune et al., 2002). Los estudios realizados por López et al. (1995), Macías et al. (2010) y Osuna et al. (2005) indican la relevancia

que tienen los fenoles como lignanos y taninos al comprobar su actividad terapéutica por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiespasmódicas, antitumorales, hormonales, antimicrobianas y como inhibitoria a la replicación del HIV-1 que es el retrovirus que causa el SIDA.

### **2.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

El oxígeno es un elemento que presenta un perfil con doble efecto fisiológico; es esencial para el desarrollo de la vida aerobia y posee efectos tóxicos inherentes a su estructura. Del oxígeno se derivan moléculas inestables denominadas radicales libres que pueden causar daño a nivel celular, cuando se pierde el equilibrio entre dichas moléculas y el sistema de defensa antioxidante que poseen los seres vivos, generando así lo que se denomina estrés oxidativo. Dicho mecanismo posee una estrecha relación con el desarrollo y evolución de una gran variedad de procesos degenerativos, enfermedades y síndromes. Su estudio se ha centrado principalmente en el conocimiento de los mecanismos de su génesis y las formas de atenuar, disminuir o contrarrestarlas, por medio de los sistemas de defensa antioxidante que posee la célula y la forma de controlar los radicales libres que se generan de forma normal y continua en el organismo resultado de algunos procesos celulares como el relacionado con el metabolismo oxidativo de la mitocondria, proceso necesario para la obtención de ATP (Lucia et al., 2012).

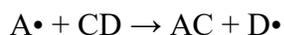
#### **2.3.1. RADICALES LIBRES**

Los radicales libres (RL) son moléculas capaces de existir de forma independiente conteniendo en su última orbita uno o más electrones desapareados, los cuales les otorgan el carácter paramagnético (Pryor et al., 2001) que las torna muy inestables y altamente reactivas con

capacidad para combinarse inespecíficamente con las diferentes moléculas que integran la estructura celular y los derivados de estas, además de su capacidad de atacar cualquier tipo de biomolécula (Halliwell et al, 2002). Por su configuración electrónica estos radicales presentan una vida media corta, sin embargo, en diversos estudios, se ha demostrado que la reactividad de estas moléculas se correlaciona inversamente con su vida media y capacidad de difusión en el medio celular. Los radicales libres se pueden formar a partir de diversos mecanismos, siendo la adición de un electrón a una molécula estable el más común (Cheeseman et al, 1993). Una vez que estos son formados, buscan el modo de conseguir una configuración electrónica estable, razón por la cual interactúan con otras moléculas a través de reacciones de óxido reducción (redox). En dichas circunstancias, hay una transferencia de electrones que necesariamente implican la reducción (ganancia de electrones) y oxidación (pérdida de electrones) de las moléculas participantes. Dicho mecanismo genera que la producción de radicales libres sea una reacción en cadena, ya que al reaccionar un radical libre con una molécula no radical inevitablemente esta última pasa a ser un radical libre. Dicha reacción en cadena solamente se detendrá cuando dos radicales libres se encuentren y reaccionen entre sí (Halliwell et al., 2003). Estas reacciones bioquímicas se encuentran clasificadas en tres grupos: Reacciones de iniciación. Es la formación de un radical libre a partir de no radicales.



Reacciones de propagación. Consisten en la formación de un radical libre cuando reacciona una molécula estable con un radical libre.



Reacciones de terminación. Hace referencia a la reacción química entre dos radicales libres, en donde sus electrones desapareados son cancelados y se genera un producto estable (Lorenzi et al., 2010).



### 2.3.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN DPPH

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas medicinales, pero aquella que ha recibido una preferencial atención es la técnica que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH (Villaño et al., 2007).

Este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante. Los estudios cinéticos muestran que este proceso ocurre a través de una reacción de pseudo primer orden la que puede seguirse midiendo la disminución de la absorbancia en función del tiempo (Brand et al., 2005). Esta medición permite observar una primera fase muy rápida, seguida posteriormente por una reacción lenta, lo que podría ocurrir debido a un proceso de dimerización de los productos de la reacción o a reacciones de los productos de ésta. La reacción antes descrita entre el DPPH y un antioxidante, se puede representar de la siguiente manera (Guija, et al., 2015):



### **2.3.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN ABTS**

El radical ABTS se genera a partir de su precursor 2,2'-azinobis (etilbenzodiazolin)-6-sufónico (ABTS). El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde azulado de absorción UV visible. Es un radical artificial que no mimetiza bien la situación in vivo. Termodinámicamente puede ser reducido por compuestos que tengan un potencial redox menor que el del ABTS (0.68V). Pudiendo reaccionar con el radical muchos compuestos fenólicos con un potencial más bajo. El punto final de la reacción lo marca la sustancia antioxidante empleada. La ventaja de este ensayo es que puede realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado para cada caso (Huang et al., 2005).

El ABTS es oxidado por los radicales peróxido u otros oxidantes en su forma de radical catión ABTS el cual es de color intenso, y la capacidad antioxidante de los compuestos de prueba se mide como inhibición óptica complementaria a la absorbancia (disminución del color) al reaccionar directamente con el radical ABTS (Prior et al., 2005).

Los resultados de los compuestos a analizar expresan la relación con equivalentes de trolox utilizado como reactivo de calibración (Villano et al., 2004).

## **3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES**

La extracción de polifenoles a partir de plantas es un proceso que posee ciertas particularidades a fin de proteger la integridad de las moléculas. Para escoger un método adecuado de extracción de polifenoles, resulta de vital importancia considerar el tipo de compuestos a obtener o analizar (flavonoides, ácidos fenólicos, etc.) y la naturaleza de la matriz biológica a utilizar (planta, hoja, fruto, semilla, etc.), así como el grado de toxicidad y polaridad de los solventes a utilizar. El

rendimiento de extracción depende en gran parte de la manipulación y las condiciones que se utilicen para evitar la oxidación o isomerización de los compuestos. La adición de antioxidantes, la extracción a temperaturas bajas y la utilización de atmósferas inertes son propuestas para evitar la oxidación, degradación térmica o cambios físico-químicos en los polifenoles (Antolovich et al., 2000). Entre los métodos conocidos hoy en día para la extracción de polifenoles, la maceración es una de las técnicas más utilizadas ya que, a pesar de que consume una gran cantidad de tiempo, los solventes utilizados son relativamente baratos, además de que se realiza a temperatura ambiente lo que permite mantener la integridad de las moléculas polifenólicas. Otra técnica muy utilizada es la extracción con Soxhlet, este método permite una extracción continua, además de que es sencillo y también barato, sin embargo, las manipulaciones secundarias, las altas temperaturas y el tiempo de extracción pueden ser inconvenientes, ya que pudieran modificar las características de las moléculas de la matriz vegetal original (García Sánchez et al., 2005).

Otro método utilizado es la extracción asistida por ultrasonido la que involucra dos fenómenos físicos: la difusión y el rompimiento de las paredes celulares de los organismos vegetales. Este método resulta más eficiente que los procedimientos tradicionales permitiendo una maximización del rendimiento de extracción (Azuola et al., 2007). La extracción en fase sólida es otra opción rápida y económica, ya que se reducen los volúmenes de solventes y tiempo de análisis (Peña et al., 2003). La extracción utilizando diferentes pH también se ha descrito como un método eficiente de extraer polifenoles de las matrices vegetales. Este tipo de extracción se utiliza para separar los ácidos fenólicos, catequinas y dihidrochalconas, pero los bajos rendimientos de extracción limitan su uso (Escribano Bailón et al., 2003).

La extracción con fluidos supercríticos ha adquirido un gran impulso en los últimos años. Esta técnica combina las características de los gases y los líquidos para la extracción. La baja viscosidad

de los fluidos supercríticos con alta capacidad de difusión, permiten el acceso del disolvente a los compuestos fenólicos que se encuentran ligados a las paredes celulares. Los procesos de degradación, isomerización y oxidación se reducen mínimamente en un tiempo de extracción mínimo, además de que la extracción se lleva a cabo en ausencia de aire y luz. Sin embargo, el dióxido de carbono supercrítico, que es el solvente más utilizado, no permite la solubilización de los compuestos fenólicos más polares, lo que reduce el porcentaje de extracción. La extracción asistida por microondas es una técnica que combina el uso de un horno de microondas con otras técnicas de extracción tradicionales. Las ventajas de este método son la reducción del tiempo de extracción, el uso de cantidades menores de disolvente y la obtención de rendimientos de extracción más elevados. En todas las técnicas, la elección del disolvente es de suma importancia, para lograr un mayor rendimiento de extracción (Hemwimon et al., 2007). Los solventes más utilizados para la extracción de polifenoles son el agua, metanol, acetona y acetato de etilo; en agua son más solubles los polifenoles asociados con azúcares, por ello la combinación de disolventes con agua se utiliza con frecuencia para extraer glucósidos (Escribano et al., 2003). El acetato de etilo se ha utilizado para obtener extractos ricos en ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas (Ignat et al., 2011). También se utiliza para la purificación de extractos crudos obteniendo fracciones enriquecidas de flavonoides y proantocianidinas oligoméricas (Diouf et al., 2009). La mezcla acetona/agua se ha utilizado para la extracción de fenoles, mostrando mejor rendimiento la acetona al 80% (Turkmen et al., 2006). Las mezclas de metanol/agua al 70-80% resultan con excelentes rendimientos de extracción de flavonas, flavonoles y catequinas (Bocco et al., 1998), mientras que la mezcla metanol/agua 50:50 V: V es más eficiente que la acetona para la extracción de polifenoles, sin embargo, su uso está restringido debido a su toxicidad (Ignat et al., 2011). Cabe mencionar que la exposición de compuestos fenólicos a altas temperaturas por

tiempos largos ocasiona la pérdida de los mismos debido a su alta inestabilidad térmica (Liyana et al., 2005).

## **II. JUSTIFICACIÓN**

Los posibles efectos útiles para la salud de los compuestos polifenólicos radica en su potencial antioxidante, su amplia distribución, así como su capacidad de captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno asociadas con el padecimiento de enfermedades, perfila a los extractos naturales ricos en compuestos fenólicos como ingredientes que pueden ser utilizados para el desarrollo de nuevos productos en la industria farmacéutica, de alimentos y cosméticos. Los compuestos fenólicos presentes en las cortezas de encino son factibles de extracción con solventes, no obstante, debido a que son termolábiles y susceptibles de oxidación, es necesario analizar las condiciones óptimas de extracción de estos compuestos.

### **III. HIPÓTESIS**

Las optimizaciones de proceso de extracción de compuestos fenólicos por el procedimiento de extracción al agua caliente podrán favorecer la concentración y capacidad antioxidante en extractos polifenólicos de corteza de la especie *Quercus crassifolia*.

## **IV. OBJETIVO GENERAL**

Optimizar las condiciones del proceso de extracción en extractos polifenólicos de corteza de *Quercus crassifolia*.

### **1. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Establecer las mejores condiciones de temperatura y tiempo de extracción de compuestos fenólicos de corteza de *Quercus crassifolia* por maceración en agua caliente.
- Determinar el contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos en los diferentes extractos de *Q. crassifolia*.
- Realizar ensayos de capacidad antioxidante en términos de DPPH y ABTS en los diferentes extractos de *Q. crassifolia*.

## **V. METODOLOGÍA**

### **1. MATERIA PRIMA**

Se utilizó corteza de encino *Quercus crassifolia* colectada en una plantación forestal ubicada en Ciudad Hidalgo, Michoacán, México. La corteza de la especie mencionada fue escogida teniendo en cuenta su importancia para la industria forestal del Estado de Michoacán. La corteza colectada fue lavada y durante este proceso se retiraron manualmente todo resto de sílice, líquenes y musgo, que pudieran afectar los resultados obtenidos durante la investigación. Posteriormente, las cortezas se fraccionaron en rectángulos de 5 por 5 cm y se secaron en horno a una temperatura de 40 °C durante 48 h, con el objetivo de preservar la integridad de la mayor parte de los compuestos fenólicos, ya que se tienen reportes de degradación considerable de fenoles totales a temperaturas mayores a 80°C (Sólyom et al., 2014). En seguida, se molieron utilizando un molino de bolas y se tamizó con malla #40, obteniendo un tamaño de partícula <0.40 mm, una vez hecho esto, se almacenó el polvo de corteza a temperatura ambiente.

### **2. EXTRACCIÓN EN AGUA CALIENTE.**

Se tomaron 50 g de corteza seca, molida y tamizada, se realizó la extracción con 500 ml de agua bajo reflujo por diferentes tiempos de acuerdo al diseño. Los sólidos se separaron por filtración con papel filtro Whatman No. 42, y posteriormente fueron lavados con 500 ml de agua caliente (García et al., 2010). El extracto acuoso fue filtrado y secado para almacenarse en frascos ámbar a 4 °C.

### 3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el proceso de extracción por maceración las variables independientes consideradas fueron temperatura y tiempo de extracción:

Temperatura (°C): 60, 78 y 94.

Tiempo (min): 20, 40 y 60.

---

Extracción por maceración	
Temperatura	Tiempo
(° C)	(min)
60	20
60	40
60	60
78	20
78	40
78	60
94	20
94	40
94	60

---

Tabla 1. Diseño experimental para *Q. crassifolia*.

## **4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS POLIFENÓLICOS OBTENIDOS.**

Se realizó la caracterización química de los extractos obtenidos, que consistió en la determinación del contenido de fenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y flavonoides y capacidad entioxidante por la eliminación de radicales DPPH y ABTS por medio de la técnica de espectrometría UV/vis.

### **4.1. CONTENIDO DE FENOLES TOTALES**

Para determinar el contenido de fenoles totales se utilizó el método descrito por (Scalbert et al, 1989), se prepararon soluciones de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 3.75g en 50 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Reactivo de Folin con proporción de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada se prepararon soluciones de los extractos disueltos en una solución 1/40 (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}$ /extracto, serán 1562.5  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 156.25  $\mu\text{l}$  de reactivo de Folin y 152.5  $\mu\text{l}$  de extracto. Posteriormente, se colocaron 10 min en un baño María a 50 °C y se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro VELAB®. El contenido total de fenoles se calculó por comparación con una curva de calibración usando ácido gálico.

### **4.2. CONTENIDO DE ÁCIDOS FENÓLICOS TIPO HIDROXICINÁMICOS**

Para determinar el contenido en ácidos hidroxicinámicos, se utilizó la metodología descrita en la Farmacopea Europea para Fraxini folium (European Pharmacopoeia, 2002). En un tubo de ensayo se añadió 1 ml del extracto (1 mg/ml), 2 ml de HCl (0.5 M), 2 ml de reactivo Arnow, 2 ml de NaOH (2.125 mol/L) y 3 ml de agua (Total= 10 ml) y las absorbancias se tomaron a 525 nm en

un espectrofotómetro VELAB®. El contenido en ácidos hidroxycinámicos se realizó por comparación con una curva de calibración usando ácido clorogénico como estándar.

#### **4.3. CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES**

Para establecer el contenido de flavonoides totales, se añadieron 2 ml del extracto en un tubo de ensayo (1 mg/ml) y una solución al 2% de AlCl<sub>3</sub>, se agitó vigorosamente, se incubó durante 1 hora a 20 °C y se leyó la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro VELAB®. El contenido de flavonoides se determinó por comparación a una curva de calibración usando quercetina como estándar (Brighente et al, 2007).

#### **4.4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN DPPH**

La eliminación de radicales DPPH· se determinó utilizando la metodología descrita por Randhir y Shetty (2007) y con las modificaciones de Gómez et al. (2017). Se mezclaron 50 µL de cada muestra con 2.95 mL de solución DPPH·60 µM (DPPH + metanol), para obtener un volumen total de 3 mL. Las muestras se homogeneizaron durante 10 segundos y se dejaron 30 minutos en la oscuridad. Finalmente, se leyeron a 517 nm de absorbancia en un espectrofotómetro VELAB®. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg EAG/ml) de acuerdo con la curva de calibración preparada con el mismo patrón.

#### **4.5. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN ABTS**

El ensayo de actividad de barrido ABTS<sup>•+</sup> se llevó a cabo de acuerdo con la metodología propuesta por Pellegrini et al. (1999). Una solución madre que contenía volúmenes 2:1 de solución 7 mM ABTS<sup>•+</sup> y 2,45 mM de persulfato potásico se dejó reposar de 12 a 16 horas a temperatura ambiente posteriormente se ajustó con etanol hasta alcanzar una absorbancia de  $0.700 \pm 0.02$  nm. Después de eso, se mezclaron 15  $\mu$ L de cada muestra con 1485  $\mu$ L de la solución de ABTS<sup>•+</sup> resultante anterior. La absorbancia se midió después de 15 minutos a 734 nm en un espectrofotómetro VELAB®. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg EAG/ml) de acuerdo con la curva de calibración preparada con el mismo patrón.

## **VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados experimentales fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar de las tres repeticiones. Los resultados fueron analizados con un análisis de varianza (ANOVA) ( $p < 0.05$ ) y se realizó una prueba de Tukey-Kramer para la comparación de medias ( $p < 0.05$ ). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa JMP (statistical software)

## VII. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

### 1. COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

#### 1.1. FENOLES TOTALES

En el Gráfico 1 se muestra el contenido de fenoles totales para los diferentes tratamientos. Los tratamientos 8 y 9 ( $46.97 \pm 0.24$  y  $44.42 \pm 0.24$  mg EAG/ml respectivamente), en los que se extrajo a  $94^\circ\text{C}$  durante 40 y 60 min, presentan la mayor concentración de fenoles totales, seguidos de los tratamientos 3 ( $36.94 \pm 2.38$  mg EAG/ml), 2 ( $36.74 \pm 0.56$  mg EAG/ml), 1 ( $34.47 \pm 0.71$  mg EAG/ml)  $T = 60^\circ\text{C}$  durante 60, 40 y 20 min respectivamente, 5 ( $34.40 \pm 0.92$  mg EAG/ml) y 4 ( $34.17 \pm 0.68$  mg EAG/ml)  $T = 78^\circ\text{C}$  durante 40 y 20 min respectivamente, en los que no existen diferencias estadísticamente significativas. Por último encontramos a los tratamientos 6 ( $33.51 \pm 0.86$  mg EAG/ml) y 7 ( $31.75 \pm 0.20$  mg EAG/ml) a  $T = 94^\circ\text{C}$  durante 20 min y  $T = 78^\circ\text{C}$  durante 60 min con una menor concentración de compuestos fenólicos. Siendo el tratamiento 8,  $94^\circ\text{C}$  20min considerado como el óptimo para la extracción de compuestos fenólicos.

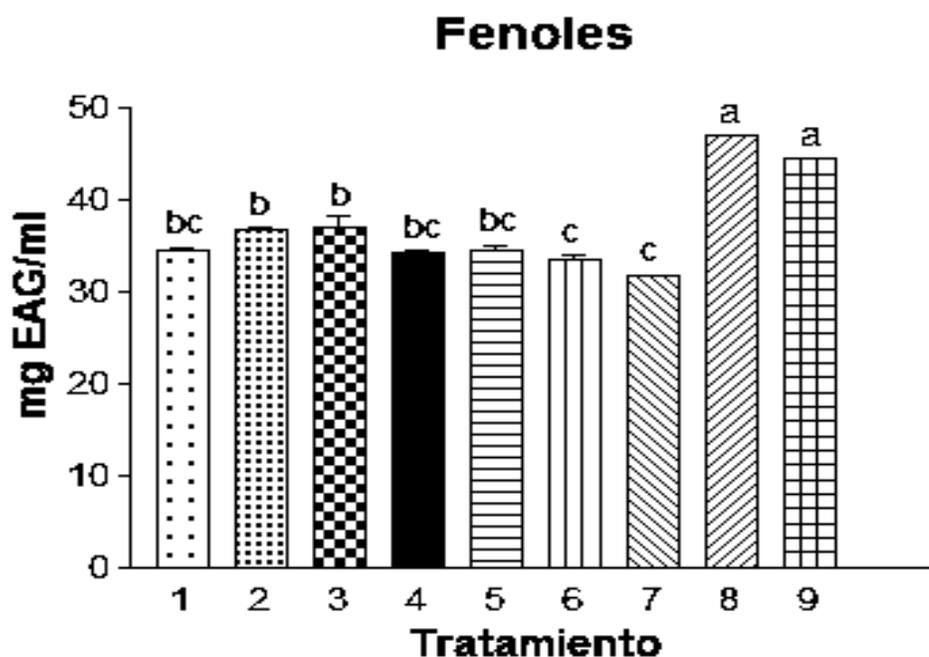


Gráfico 1. Concentración de fenoles totales de los extractos de corteza de *Q. crassifolia*. Barras con letras desiguales son diferentes a  $p < 0.05$  (ANOVA, seguida de una prueba de Tukey-Kramer). EAG, equivalentes de ácido gálico.

Existe una gran diversidad de compuestos presentes en las corteza de los encinos, con diferentes polaridades (Valencia-Avilés et al., 2018). Como se ha observado, los tratamientos a mayor temperatura presentan una mayor concentración de compuestos fenólicos, lo que pudiera ser explicado debido a que a mayor temperatura, existe una mayor transferencia de masa. Los resultados de este trabajo, concuerdan con lo descrito por (Shi et al., 2003 y Naima et al., 2015), en el primero se muestra que existe una concentración más alta de compuestos fenólicos en extractos de semilla de uva a mayor temperatura, este efecto se ha atribuido a que el calentamiento podría ablandar los tejidos de la planta, además de debilitar las interacciones proteína-fenol y polisacáridos-fenol, por lo que existe una mayor migración de

compuestos polifenólicos al solvente. En el segundo estudio citado, se demostró que el aumento de la temperatura mejora el rendimiento de extracción de polifenoles de la corteza de *Acacia mollissima*, usando como solvente agua.

El tratamiento 7, en el cual se llevó a 94 ° C el proceso de extracción, presenta una menor concentración de fenoles totales que los tratamientos 8 y 9, resaltando que tuvo un menor tiempo de extracción, atribuyendo este resultado a que con tiempos prolongados de extracción, otro tipo de compuestos fenólicos, como los lignanos, son extraídos (Naima et al., 2015).

## **1.2. FLAVONOIDES TOTALES**

En el Gráfico 2 se puede ver la cantidad de flavonoides totales determinada para cada uno de los tratamientos, destacando por su mayor concentración los tratamientos 1 ( $9.12 \pm 0.04$  mg EQ/ml), 3 ( $9.02 \pm 0.05$  mg EQ/ml) y 2 ( $8.84 \pm 0.11$  mg EQ/ml) que fueron sometidos a temperatura de 60 °C durante 20, 60 y 40 min respectivamente, no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Seguidos de los tratamientos  $8_{T=94\text{ }^{\circ}\text{C}, t=40\text{ min}}$  ( $8.45 \pm 0.18$  mg EQ/ml), este tratamiento no muestra diferencias estadísticas con los tratamientos 2 y 3, así como con los tratamientos  $7_{T=94\text{ }^{\circ}\text{C}, t=20\text{ min}}$  ( $8.41 \pm 0.22$  mg EQ/ml);  $6_{T=78\text{ }^{\circ}\text{C}, t=60\text{ min}}$  ( $8.19 \pm 0.21$  mg EQ/ml);  $5_{T=78\text{ }^{\circ}\text{C}, t=40\text{ min}}$  ( $8.06 \pm 0.43$  mg EQ/ml) y  $9_{T=94\text{ }^{\circ}\text{C}, t=60\text{ min}}$  ( $5.34 \pm 0.62$  mg EQ/ml).

A diferencia de la concentración de fenoles totales, la concentración de flavonoides totales mostró una menor concentración en los tratamientos en los que se usaron temperaturas más

bajas, ya que se ha reportado que el rendimiento de extracción de algunos compuestos polifenólicos, de la clase de los flavonoides, disminuye cuando la temperatura de extracción excede los 60 °C, debido a la degradación de estos compuestos con el calentamiento (Naima et al., 2015).

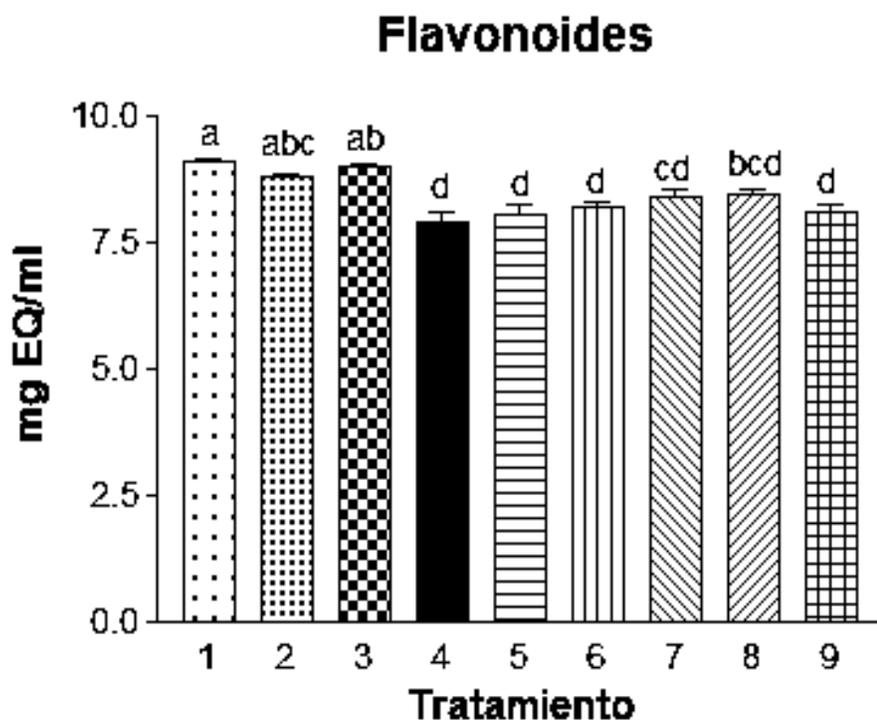


Gráfico 2. Concentración de flavonoides totales de los extractos de corteza de *Q. crassifolia*. Barras con letras desiguales son diferentes a  $p < 0.05$  (ANOVA, seguida de una prueba de Tukey-Kramer). EQ, equivalentes de quercetina.

### 1.3. COMPUESTOS FENÓLICOS TIPO HIDROXICINÁMICOS

Las cortezas de encino, se han caracterizado por poseer una gran variedad de compuestos fenólicos de bajo peso molecular que pueden ser fácilmente extraídos (Fernandez et al., 2011), entre estos podemos encontrar los ácidos hidroxicinámicos.

En el Gráfico 3 se observa la concentración de compuestos fenólicos tipos hidroxicinámicos de los extractos de corteza *Q. crassifolia* sometidos a diferentes temperaturas y tiempos. Se puede notar una mayor concentración en los tratamientos 8  $T=94$  °C,  $t=40$  min ( $0.36 \pm 0.07$  mg ACG/ml); 7  $T=94$  °C,  $t=20$  min ( $0.30 \pm 0.00$  mg ACG/ml); 1  $T=60$  °C,  $t=20$  min ( $0.30 \pm 0.01$  mg ACG/ml) y 2  $T=60$  °C,  $t=40$  min ( $0.30 \pm 0.00$  mg ACG/ml). Después encontramos, con menor concentración, sin encontrar diferencias estadísticas entre ellos, a los tratamientos 3  $T=60$  °C,  $t=60$  min ( $0.28 \pm 0.00$  mg ACG/ml); 9  $T=94$  °C,  $t=60$  min ( $27.00 \pm 0.09$  mg ACG/g), 4  $T=78$  °C,  $t=20$  min ( $0.26 \pm 0.03$  mg ACG/ml); 6  $T=78$  °C,  $t=60$  min ( $0.27 \pm 0.00$  mg ACG/g); encontrándose con la menor cantidad ( $p<0.05$ ) de ácidos hidroxicinámicos en el tratamiento 5  $T=78$  °C,  $t=40$  min ( $0.22 \pm 0.00$  mg ACG/ml).

Podemos notar una tendencia estadísticamente significativa de mayor concentración de estos compuestos en los tratamientos en los que se usaron temperaturas de extracción de 60 °C y 94 °C, durante 20 y 40 min, ya que se ha reportado que cuando un producto rico en polifenoles es expuesto a temperaturas altas y tiempos prolongados de proceso, los compuestos fenólicos se oxidan (Yu et al., 2005), no obstante, cuando la temperatura de extracción empleada fue de 78 °C, no se observaron diferencias estadísticamente

significativas entre los tratamientos a diferentes tiempos, sin embargo se puede notar una tendencia de mayor concentración cuando se extrajo durante 20 min, disminuyendo en 40 min y aumentando nuevamente a los 60 min de extracción, pudiendo explicarse esto debido a la oxidación de los compuestos a tiempos de 40 min, no obstante, extendiendo el tiempo, la extracción pudo ser más eficiente, ya que a consecuencia del tiempo prolongado y la alta temperatura, los componentes de las células se disuelven de manera más efectiva, incluyendo las vacuolas, donde se acumulan, en la mayoría de los casos, los compuestos bioactivos, provocando la liberación de estos al agua (Castro et al., 2017).

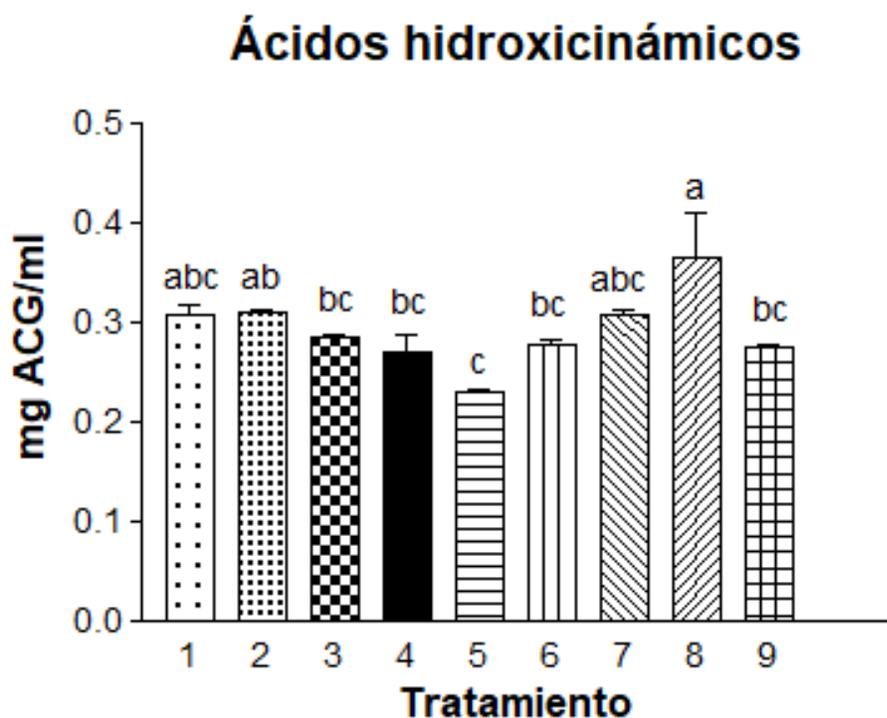


Gráfico 3. Concentración de ácidos hidroxicinámicos de los extractos de corteza de *Q. crassifolia*. Barras con letras desiguales son diferentes a  $p < 0.05$  (ANOVA, seguida de una prueba de Tukey-Kramer). ACG, equivalentes de ácido clorogénico

## **2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

La capacidad antioxidante de los compuestos polifenólicos depende del número y las disposiciones de los grupos hidroxilos, así como de la presencia de donantes de electrones constituyentes (Lapornik et al, 2005), por lo que es importante conocer si los compuestos polifenólicos presentes en los extractos de *Q. crassifolia* obtenidos tienen actividad antioxidante, ya que es una característica que está directamente relacionada con los efectos benéficos a la salud.

En este estudio, se determinó la capacidad de eliminación de radicales libres de los diferentes tratamientos de extracción usando los ensayos DPPH, ABTS. Los ensayos DPPH y ABTS se han utilizado ampliamente para determinar las capacidades antioxidantes de los extractos de plantas, ya que requieren un equipo relativamente estándar y ofrecen resultados rápidos y reproducibles (Buenger et al., 2006).

### **2.1. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN DPPH**

En el Gráfico 4 se muestran los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante en función de la captura del radical DPPH, este indicó que los tratamientos; 2  $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t= 40\text{ min}$  ( $8.54\pm 0.03\text{ EAG/ml}$ ) y 3  $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t= 60\text{ min}$  ( $8.53\pm 0.05\text{ EAG/ml}$ ) presentaron los mejores resultados, e indicó que la temperatura está influyendo significativamente ( $P < 0.05$ ) en la actividad antioxidante de los extractos obtenidos, ya que a menor temperatura de extracción se conserva mejor la actividad antioxidante, cabe mencionar que los tratamientos 1  $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t=$

20 min, 4  $T=78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t=20\text{ min}$  y 5  $T=78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t=40\text{ min}$  no presentaron diferencia estadística significativa con los tratamientos 2 y 3, sin embargo, si lo hicieron con los tratamientos 6  $T=78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t=60\text{ min}$ , 7  $T=94\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t=20\text{ min}$ , 8  $T=94\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t=40\text{ min}$  y 9  $T=94\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t=60\text{ min}$ , lo que indicó que con el incremento de la temperatura de extracción disminuye la actividad antioxidante. Así mismo, se puede observar que con el incremento en el tiempo de extracción hay una tendencia al incremento de la actividad antioxidante de los extractos, sin embargo, este incremento no fue significativo ( $P < 0.05$ ).

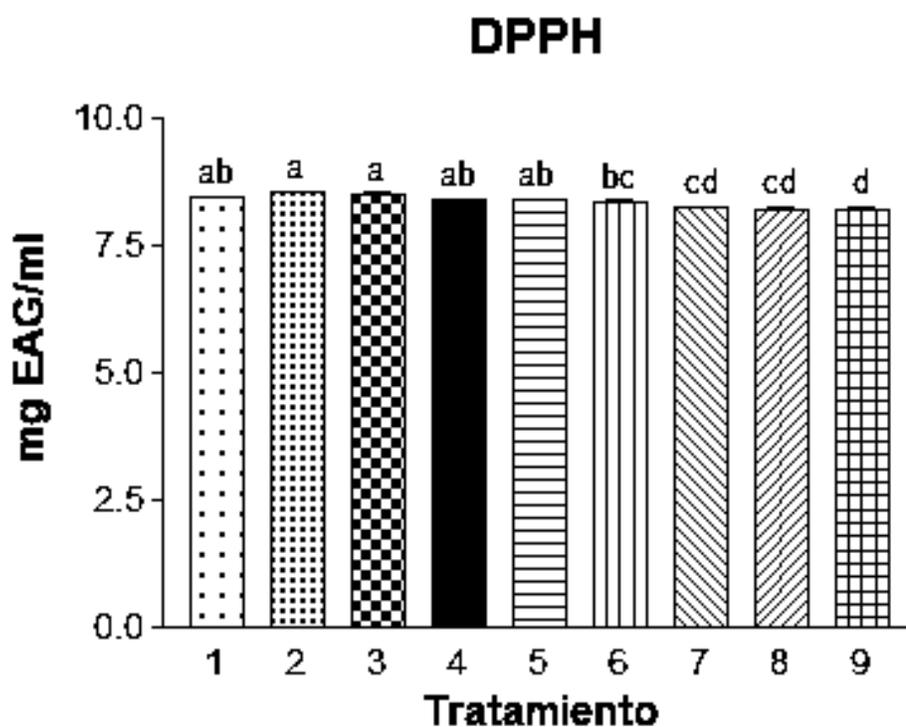


Gráfico 4. Concentración de capacidad antioxidante en DPPH de los extractos de corteza de *Q. crassifolia*. Barras con letras desiguales son diferentes a  $p < 0.05$  (ANOVA, seguida de una prueba de Tukey-Kramer) EAG, equivalentes de ácido gálico.

## **2.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN ABTS**

En cambio en el Gráfico 5 se muestra la capacidad antioxidante de los extractos en función de la captura del radical ABTS, se presentó mayor actividad en los tratamientos 6  $T=78^{\circ}\text{C}$ ,  $t=60$  min y 7  $T=94^{\circ}\text{C}$ ,  $t=20$  min, lo que indicó que a mayor temperatura se incrementó significativamente ( $P < 0.05$ ) la actividad antioxidante por captura de este radical, sin embargo, para este radical también influyó significativamente ( $P < 0.05$ ) el tiempo de extracción, ya que al utilizar una temperatura de extracción de  $78^{\circ}\text{C}$  se necesitaron 60 min para tener una mayor actividad antioxidante, en cambio, si se emplea  $94^{\circ}\text{C}$  se puede disminuir el tiempo de extracción a 20 min.

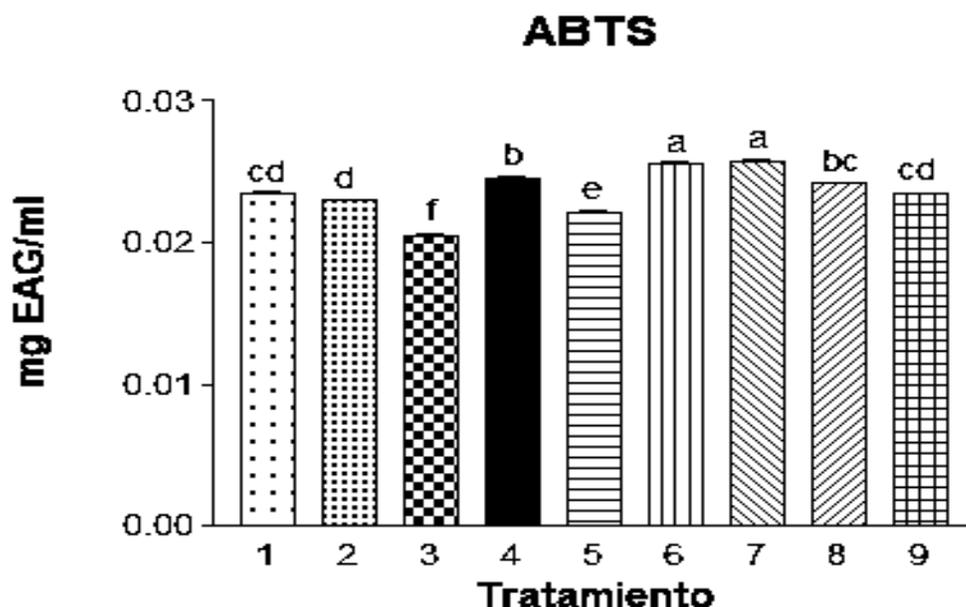


Gráfico 5. Concentración de capacidad antioxidante en ABTS de los extractos de corteza de *Q. crassifolia*. Barras con letras desiguales son diferentes a  $p < 0.05$  (ANOVA, seguida de una prueba de Tukey-Kramer). *EAG*, equivalentes de ácido gálico.

Cabe mencionar que los radicales DPPH y ABTS<sup>•+</sup>, son radicales que no están presentes en el organismo, sin embargo, dan una estimación de la actividad antioxidante de los extractos, siendo el DPPH<sup>•</sup> un radical aniónico y en ABTS<sup>•+</sup> un radical catiónico. Estos ensayos in vitro pertenecen a los ensayos basados en transferencia de electrones (ET), ya que miden la capacidad de un antioxidante para reducir un oxidante, que cambia de color cuando se reduce, y el grado de cambio de color está correlacionado con la concentración de antioxidantes de la muestra.

Se llevaron a cabo las dos determinaciones ya que ningún método individual es suficiente; por lo que es necesario realizar más de un tipo de medición de la capacidad antioxidante para tener en cuenta los diversos modos de acción de los antioxidantes (Huang *et al*, 2005).

En el presente estudio se demostró que la actividad antioxidante por captura del radical DPPH se presentó a la menor temperatura de extracción que fue de 60°C, así mismo, también se observó que los extractos de *Q. crassifolia* obtenidos a 60°C presentaron mayor contenido de ácidos hidroxicinámicos y de flavonoides, por lo que esta temperatura promovió la disolución de estos compuestos de interés y generó un incremento en el rendimiento de extracción, lo cual se relaciona probablemente con un incremento de la solubilidad de los solutos y por ende el coeficiente de difusión del disolvente líquido en la matriz sólida que favoreció la cinética de desorción de los compuestos desde la matriz (Martín, 2011; Heras *et al.*, 2013), el incremento en la extracción de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos se relacionó por tanto, con el incremento en la actividad antioxidante por DPPH, este efecto no se presentó en los tratamientos con temperaturas de extracción de 78 °C y 94°C.

Así mismo, se demostró que al menor tiempo de extracción evaluado en este estudio que fue de 20 min, se logró extraer mayor cantidad de ácidos hidroxicinámicos y flavonoides y se obtuvo mayor capacidad antioxidante en DPPH, lo cual se explica teniendo en cuenta que la difusión es un fenómeno que depende del tiempo, y este tiempo fue suficiente para que se presentara mayor penetración del solvente en el tejido del material vegetal (Wong *et al.*, 2015) y se obtuvieran los mayores rendimientos en estos compuestos bioactivos.

Por lo que este estudio nos demuestra que a 60°C por 20 min podemos extraer la mayor cantidad de compuestos bioactivos (flavonoides y ácidos hidroxicinámicos) de *Q. crassifolia*, mismos que presentarán buena actividad antioxidante en función de la captura del radical DPPH.

Esta investigación muestra que los extractos *Q. crassifolia*, obtenidos en este estudio presentaron importante cantidad de compuestos polifenólicos, además se demostró su actividad antioxidante, por lo que estos pueden ser atractivos para la industria alimentaria como ingredientes funcionales, y con la ayuda de este tipo de estudios se pueden aprovechar mejor estos recursos naturales y obtener mayor cantidad de compuestos bioactivos al encontrar las mejores condiciones de proceso en la extracción y con ello disminuir los costos de proceso.

## VIII. CONCLUSIONES

*Q. crassifolia* es una especie de encino que ha sido de gran interés en los últimos años debido a que se han identificado fitoquímicos que poseen importantes beneficios para la salud. Esta investigación se ha centrado en determinar la concentración de compuestos fenólicos totales, así como flavonoides y ácido hidroxicinámicos, además de la capacidad antioxidante de estos extractos, con la finalidad de conocer las condiciones de temperatura y tiempo óptimos para su proceso de extracción.

Como se ha observado, la concentración de compuestos fenólicos totales está influenciada en este caso, por la temperatura, ya que a temperaturas de 95 °C, se ha presentado mayor concentración de polifenoles. En cuanto a la concentración de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos las mayores concentraciones se muestran en los tratamientos de extracción a temperatura de 60 °C por 20 minutos. Estos tratamientos, muestran también mayor capacidad de captar al radical DPPH.

A diferencia de la capacidad de captar DPPH, en la capacidad de captar el radical ABTS, se pudo observar que los tratamientos que tuvieron mejor capacidad de captar este radical fueron los sometidos a menores temperaturas y largos tiempos de extracción o temperaturas mayores y tiempos cortos de extracción.

Estos resultados, nos pudieran indicar, que la capacidad de captar tanto el DPPH como el ABTS, en el caso de los extractos de corteza de *Q. crassifolia*, está relacionada con los diferentes tipos de compuestos polifenólicos presentes en los diferentes tratamientos, ya que

como se ha mostrado, la temperatura y los tiempos de extracción influyen significativamente, tanto en la concentración como en la clase de compuestos polifenólicos que son extraídos.

Las optimizaciones de la extracción de los compuestos presente en la corteza de encino pueden ser de gran utilidad para ampliar y aprovechar las propiedades del encino, especialmente para la industria alimentaria y farmacéutica, dando la oportunidad de convertirse en un producto quimiopreventivo o quimioterapéutico.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- A. Munin and F. Edwards-Lévy, Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. vol. 3, no. 4. 2011.
- Aldrich, P. R. y J. Cavender Bares. 2011. Quercus. In: Kole, C. (Ed.). Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Forest Trees. Springer-Verlag. Berlin, Germany. pp. 89-129.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K. & Ryan, D., 2000. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. The Analyst Critical Review, García-Sánchez, A., Ramos-Martos, M. & Ballesteros, E., 2005. Estudio, comparativo de distintas técnicas analíticas (espectroscopía de NIR y RMN y extracción mediante Soxhlet) para la determinación del contenido graso y de humedad en aceitunas y orujo de Jaén. Departamento de Química Física y Analítica. Escuela Politécnica Superior de Linares, 57(3), pp. 220-227.
- Arizaga, S., Martínez, C. J., Salcedo, C. M., Bello, M. Á., (2009). Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos. Mur, P. F. 2003. Patrones de distribución geográfica de especies del género *Quercus* y de algunos de sus insectos formadores de agallas en el estado de Michoacán, México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias-UNAM. México, D.F. 59 pp
- Ávalos G. A., Pérez-U C. E., (2009) Metabolismo secundario de plantas Serie Fisiología Vegetal. 2: 119-145
- Azuola, R. & Vargas-Aguilar, P., 2007. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EAU). Tecnología en Marcha, 20(4), pp. 30-40.
- B. Zhang, J. Cai, C.-Q. Duan, M. Reeves, and F. He, “A Review of Polyphenolics in Oak Woods,” Int. J. Mol. Sci., vol. 16, no. 4, pp. 6978–7014, 2015.

- Binsack. R., Boersma, B. J., Patel, R. P., Kirk, M., White, C. R., Darley, U. V., Barnes, S., Zhou, F., Parks, D. A. (2001). Enhanced antioxidant activity after chlorination of quercetin by hypochlorous acid. *Alcohol.Clin.Exp.Res*, 25: 434-443.
- Bocco, A., Cuvelier, M. E., Richard, H. & Berset, C., 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46 (66), pp. 2123-2129.
- Bonnefoy M, Drai J, Kostka T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med* 2002; 31: 1174-8
- Brand- Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol*. 2005; 28(1):25-30.
- Brighente, I.M.C., M. Dias, L.G. Verdi, and M.G. Pizzolatti. 2007. "Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species." *Pharmaceutical Biology* 45(2): 156–61.
- Campbell M. *Bioquímica*. 2000; Porto Alegre: Artmed. 753.
- Cartaya, O. (2001). *Flavonoides: Características químicas y aplicaciones Cultivos Tropicales*, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba, 22 (2): 5-14
- Chai, Tsun-Thai, Meng-Tee Kwek, Hean-Chooi Ong, and Fai-Chu Wong. 2015. "Water Fraction of Edible Medicinal Fern *Stenochlaena Palustris* Is a Potent A-Glucosidase Inhibitor with Concurrent Antioxidant Activity." *Food Chemistry* 186: 26–31.
- Cheeseman K, Slater T. An introduction to free radical biochemistry. In: Cheeseman K, Slater T, editors. *Free radicals in medicine*. London (UK): Churchill Livingstone, 1993; 481 – 493.
- Chen, Fengyang et al. 2014. "Antioxidant Capacity and Proanthocyanidin Composition of the Bark of *Metasequoia Glyptostroboides*." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014: 1–11.

- Coombes, Allen. 735. *Quercus crassifolia*. *Revista botánica de Curtis* 29, no. 2 (2012): 162-69.
- Costa, Elisa et al. 2015. "Influence of Wine Region Provenance on Phenolic Composition, Antioxidant Capacity and Radical Scavenger Activity of Traditional Portuguese Red Grape Varieties." *European Food Research and Technology*: 61–73.
- Coulibaly AY, Kiendrebeogo M, Kehoe PG, Sombie PA, Lamien CE, Millogo JF Nacoulma OG. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Scoparia dulcis* L. *J.Med.Food*. 2011; 14:1576-1582.
- D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. P. E. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, and A. Crozier, "Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases.," *Antioxid. Redox Signal.* vol. 18, no. 14, pp. 1818–1892, 2013.
- D'Andrea, Gabriele. 2010. "Pycnogenol: A Blend of Procyanidins with Multifaceted Therapeutic Applications?" *Fitoterapia* 81(7): 724–36.
- De Kok, T. M., Van Breda, S. G., Manson, M. M. (2008). Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. *Eur.J.Nutr.* 47 (2): 51-59.
- De Lourdes A, Montalvo E. L., Rendón A. B. (2003). Los usos no leñosos de los encinos en México (2003). *Bol. Soc. Bot. Méx.*, 72: 107-117.
- De Lourdes A, Montalvo E. L., Rendon A. B., (2003) los usos no leñosos de los encinos en mexico *Bol. Soc. Bot. Méx.* 72: 107-117 (2003)
- Diouf, P. N., Stevanovic, T. & Cloutier, A., 2009. Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea marianabark* and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chemistry*, 11(4), pp. 897-902.

- Diouf, Papa Niokhor, Tatjana Stevanovic, and Alain Cloutier. 2009. "Study on Chemical Composition, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Hot Water Extract from *Picea Mariana* Bark and Its Proanthocyanidin-Rich Fractions." *Food Chemistry* 113(4): 897–902.
- Doll R. An overview of the epidemiological evidence linking diet and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 49: 119-31.
- Dragsted LO, Strube M, Larsen JC. Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacol Toxicol* 1993; 72: 116-35.
- Dryden GW, Song M McClain C. Polyphenols and gastrointestinal diseases. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 2006; 22:165-170.
- Escribano-Bailón, C. & Santos-Buelga, M. T., 2003. Polyphénols extraction from foods. *Methods in polyphenol analysis*. Cambridge: In T. G. House. Hemwimon, S., Pavasant, P. & Shotipruk, A., 2007. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*. 54(1), pp. 44-50.
- Fan, YinZhou et al. 2015. "Preparative Separation and Purification of Two Flavanols from *Smilax China* L. Using High-Speed Counter-Current Chromatography." *European Food Research and Technology* 240(1): 33–39.
- Fenercioglu, A. K., Saler, T., Genc, E., Sabuncu, H. Altuntas, Y. (2010). The effects of polyphenolcontaining antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in Type 2 diabetes mellitus without complications. *J.Endocrinol.Invest* 33: 118-124.
- Gallardo, C., Jiménez, L., García, C. (2006). Hidroxcinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chem.* 99: 455-463.
- García-Pérez, Martha-Estrella et al. 2010. "Antioxidant, Toxicological and Antiproliferative Properties of Canadian Polyphenolic Extracts on Normal and Psoriatic Keratinocytes." *Journal of ethnopharmacology* VL, 132 45-59

Guo W, Kong E Meydani M. Dietary polyphenols, inflammation, and cancer. *Nutr.Cancer.* 2009; 61:807-810.

Halliwel B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 12003; 57: 715 – 725.

Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata, O. M. S. V., Peralta, R. M. (2012). “Phenolic compounds in fruits - an overview,” *Int. J. Food Sci. Technol*, 47 (10): 2023–2044.

Henning SM, Wang P, Carpenter CL Heber D. Epigenetic effects of green tea polyphenols in cancer. *Epigenomics.* 2013; 5:729-741.

(Halliwel B, Gutteridge J. *Free radicals in Biology and Medicine.* Tercera edición. Oxford, New York, 2002).

Heras, I., Alvis, A., Arrazola, G. (2013). Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (Solana melonera L.). *Información tecnológica.*24 (5): 93-10.

<http://biodiversitylibrary.org/page/2372342>

Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53:1841-56.

J. Gonçalves, C. L. Silva, P. C. Castilho, and J. S. Câmara, “An attractive, sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines,” *Microchem. J.*, vol. 106, pp. 129–138, 2013.

Ju, J., Lu, G., Lambert, J. D., Yang, C. S. (2007). Inhibition of carcinogenesis by tea constituents. *Semin. Cancer Biol*, 17: 395-402.

Kim, D. O., O. K. Chun, Y. J. Kim, H. Y. Moon, and C. Y. Lee. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.* 51 (22): 6509- 6515.

- Kolacek M, Muchova J, Vrankova S, Jendekova L, Pechanova O, Ulicna O, Watala C Durackova Z. Effect of natural polyphenols, pycnogenol(R) on superoxide dismutase and nitric oxide synthase in diabetic rats. *Prague Med.Rep.* 2010; 111: 279-288.
- Kosanić, Marijana, Branislav Ranković, and Tatjana Stanojković. 2014. "Biological Activities of Two Macroalgae from Adriatic Coast of Montenegro." *Saudi Journal of Biological Sciences*: 390–97.
- Liyana-Pathirana, C. y F. Shahidi. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93(1):47-56.
- López-Alarcón, Camilo, and Eduardo Lissi. 2005. "Interaction of Pyrogallol Red with Peroxyl Radicals. A Basis for a Simple Methodology for the Evaluation of Antioxidant Capabilities." *Free radical research* 39(7): 729–36.
- Lorenzi R. Efeito do Glicolaldeído sobre parâmetros de estresse oxidativo no rim, fígado e coração de ratos Wistar. [Tesis de maestría] Porto Alegre (Brasil). Universidad Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pos graduación en Ciencias Biológicas. 2010.
- Lu H, Ouyang W Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol.Cancer.Res.* 2006; 4:221-233.
- (Lucía Constanza CorralesMSc1, Maira María Muñoz Ariza2 Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno 2012 Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas - Issn: 1794-2470 - Vol. 10 No. 18 Julio - diciembre de 2012: 135 – 250).
- Lu J, Ho CT, Ghai G Chen KY. Differential effects of theaflavin monogallates on cell growth, apoptosis, and Cox-2 gene expression in cancerous versus normal cells. *Cancer Res.* 2000; 60:6465-6471
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am.J.Clin.Nutr.*, 79: 727-747.

- Manos, P.S., Doyle, J. J., Nixon, K. C. (1999). Phylogeny, biogeography and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 12: 333–349.
- Martín, D. A. 2011. Apuntes de transmisión del calor. Departamento de Física. Madrid, España. 19p.
- Maurya, D. K., Devasagayam, T. P. (2010). Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food Chem Toxicol.*, 48(12) 3369-73.
- Moon J.K., Shibamoto T. (2009) Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry* 57(5): 1655-1666.
- Morgan Martins M. Reposição de estrogênio Dimui o dano oxidativo, aumenta a actividades das enzimas antioxidantes e melhora a função cardiaca em ratas. PPG em ciencias biológicas. Fisiología. Volume Tese de Doutorados. Porto Alegre (Brasil). UFRGS, 2003.
- Moyo, B., S. Oyedemi, P. J. Masika, and V. Muchenje. 2012. “Polyphenolic Content and Antioxidant Properties of Moringa Oleifera Leaf Extracts and Enzymatic Activity of Liver from Goats Supplemented with Moringa Oleifera Leaves/sunflower Seed Cake.” *Meat Science* 91(4): 441–47.
- Munin, F., Edwards, L. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review, 3(4): 793-829.
- Mura, F., Silva, T., Castro, C., Borges, F., Zuñiga, M. C., Morales, J., Olea, C. (2014). New insights into the antioxidant activity of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic systems: spectroscopic, electrochemistry, and cellular studies. *Free Radic Res.*, 48(12): 1473-84.

- N. Balasundram, K. Sundram, and S. Samman, "Phenolic compounds in plants and agri-industrial byproducts: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses," *Food Chem.*, vol. 99, no. 1, pp. 191–203, 2006.
- Naima, Rhazi et al. 2015. "Comparison of the Impact of Different Extraction Methods on Polyphenols Yields and Tannins Extracted from Moroccan Acacia Mollissima Barks." *Industrial Crops and Products* 70: 245–52.
- Natić, Maja M. et al. 2015. "Analysis and Characterisation of Phytochemicals in Mulberry (*Morus Alba L.*) Fruits Grown in Vojvodina, North Serbia." *Food Chemistry* 171: 128–36.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am.J.Clin.Nutr.* 2001; 74: 418-425.
- Nixon, K.C. 1993. The genus *Quercus* in Mexico. pp. 447–458. In: Ramamoorthy, T.P., R. Bye, A. Lot and J. Fa (Eds.). *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. New York: Oxford University Press.
- Oga Z. *Fundamentos de toxicología*. Segunda edición. Editora Atheneu, São Paulo. 2003: 39- 44
- Oloff, Heathers. 2009. "Scientific and Clinical Monograph for PYCNOGENOL®." *American Botanical Council* 1: 1–24.
- Ou HC, Chou FP, Sheen HM, Lin TM, Yang CH Huey-Herng Sheu W. Resveratrol, a polyphenolic compound in red wine, protects against oxidized LDL-induced cytotoxicity in endothelial cells. *Clin.Chim.Acta.* 2006; 364:196-204.
- Peña, A., Morales, J., Labastida, C. & Capella, s., 2003. Extracción en fase sólida como una alternativa para el procedimiento de limpieza en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases: aplicación a

organismos marinos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 19(1), pp. 13-23

Peñarrieta, J. Mauricio; Tejeda, Leslie; Mollinedo, Patricia; Vila, José L.; Bravo, José A (2014,) *Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos*, , *Revista Boliviana de Química*, vol. 31, núm. 2 pp. 68-81

Pourova J, Kottova M, Voprsalova M, et al. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta physiol.* 2010; 198: 15-35

Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem*, 2005; 53:4290-302

Pryor W. *Free radicals in Biology*. New York, Academy Press, 2001 6; 1: 1- 43.

*Quercus crassifolia* Humb. & Bonpl. *Anual de encinos Michoacanos*. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. 29 agosto 2015. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/603/crassifolia.pdf>.

Quiñones, M., Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular, *Nutr Hosp*, 27(1); 76-89.

Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol.Nutr.Food Res*, 52: 507-526.

Rodríguez, I., Romero, S. (2007). Arquitectura Foliar de Diez Especies de Encino (*Quercus*, FAGACEAE) de México. *Acta Botánica Mexicana*, 81: 9-34.

Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn Rev.* 2014; 8:122-146.

Shaheen SO, Sterne JA, Thomson RL, Songhurst CE, Mergetts BM, Burney PG. Dietary antioxidants and asthma in adults: population-based case-control study. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 164: 1823-18

- Silva D., Kelly J. R., Andrade E. H., Guimaraes E.F., Maia, Guilherme J.S. (2010) Essential oil composition, antioxidant capacity and antifungal activity of *Piper divaricatum*. *Natural Product Communications* 5(3): 477-480.
- Singleton, V. L. (1981). Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv Food Res*, 27: 149-242.
- Sólyom, Katalin, Ruth Solá, María José Cocero, and Rafael B. Mato. 2014. "Thermal Degradation of Grape Marc Polyphenols." *Food Chemistry* 159: 361–66.
- Soobrattee, M. A., Bahorun, T. Aruoma, O. I. (2006). Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer. *Biofactors*, 27: 19-35.
- Sunkireddy, P., Jha, S. N., Kanwar, J. R., Yadav, S. C. (2013). "Natural antioxidant biomolecules promises future nanomedicine based therapy for cataract.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 112: 554–62.
- Surarit, Worawat et al. 2015. "Evaluation of Antioxidant Activities and Phenolic Subtype Contents of Ethanolic Bran Extracts of Thai Pigmented Rice Varieties through Chemical and Cellular Assays." *International Journal of Food Science & Technology* 50(4): 990–98.
- Szliszka, E., Krol, W. (1981). "Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells," *Evidence-based Complement. Altern. Med*, 2013; 1-11.
- Tandley, P.C., Steyermark J.A. 1952. *Flora de Guatemala*. Chicago Natural History Museum. Consultado 29 de agosto 2015.
- Thun MJ, Henley SJ Gansler T. Inflammation and cancer: an epidemiological perspective. *Novartis Found.Symp.* 2004; 256:6-21; discussion 22-8, 49-52, 266-9
- Tomás-Barberán FA, Espín JC. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J Sci Food Agric* 2001; 81: 853-76.

- Tomás-Barberán FA, Ferreres F, Gil MI. Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. En: Attar.Rahman ed. *Studies in Natural products Chemistry*. Amsterdam: Elsevier 2000; 23: 739-95.
- Turkmen, N., Sari, F. & Velioglu, Y. S., 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99(4), pp. 835-841.
- Valencia, A. S., Flores, F. G. Jimenez, R. J., (2017) Distribución and diversity of fagaceae in Hidalgo, Mexico. *Botanical sciences* 95(4), p 660-721.
- Valencia, A. S., Flores, F. G. Jimenez, R. J., (2017). Distribution and diversity of fagaceae in Hidalgo, Mexico. *Botanical sciences*, 95(4): 660-721.
- Valencia, S. (2004). Diversidad del Género *Quercus* (FAGACEAE) en México. (A. Sociedad Botánica de México, Ed.) *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 75: 33-53.
- Villano, D., Fernández, P. M. S., Troncoso, A. M., García, P. M. C. (2004). The Antioxidant Activity of Wines Determinated ABTS•+ Method: Influence of Simple dilution and Time. *Talanta*, 64: 501-509.
- Villaño D, Fernandez-pachon MS, Moya ML, Troncoso AM, Garcia Parrilla MC, Radical Scavenging ability of polyfenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 2007:230-235.
- Wong, J., Muñoz, D. B., Martínez, G. C. G., Belmares, R. E., Aguilar, C. N. (2015). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. *Ultrason Sonochem.*22:81
- Zhao, Chun-Fang et al. 2014. “Characterization of Water-Soluble Proanthocyanidins of *Pyracantha Fortuneana* Fruit and Their Improvement in Cell Bioavailable Antioxidant Activity of Quercetin.” *Food Chemistry* 169: 484–91.

Zhaohui, Z., Moghadasian, M. H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. *Food Chem.* 109 (4): 691-702.

## X. ANEXOS

**Anexo 1. Tabla de contenido de fenoles totales.**

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Fenoles totales (mg EAG/ml)
1	60	20	34.47 ± 0.71 <sup>b, c</sup>
2	60	40	36.74 ± 0.56 <sup>b</sup>
3	60	60	36.94 ± 2.38 <sup>b</sup>
4	78	20	34.17 ± 0.68 <sup>b, c</sup>
5	78	40	34.40 ± 0.92 <sup>b, c</sup>
6	78	60	33.51 ± 0.86 <sup>c</sup>
7	94	20	31.75 ± 0.20 <sup>c</sup>
8	94	40	46.97 ± 0.24 <sup>a</sup>
9	94	60	44.42 ± 0.24 <sup>a</sup>

*Tabla 1A. - Resultado de fenoles totales. <sup>a,b,c</sup> Las medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes a <0,5 (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey).*

## Anexo 2. Tabla de contenido de flavonoides totales

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Flavonoides totales (mg EQ/ml)
1	60	20	9.12 ± 0.04 <sup>a</sup>
2	60	40	8.81 ± 0.19 <sup>a, b, c</sup>
3	60	60	9.02 ± 0.05 <sup>a, b</sup>
4	78	20	7.91 ± 0.32 <sup>d</sup>
5	78	40	8.06 ± 0.30 <sup>d</sup>
6	78	60	8.19 ± 0.21 <sup>d</sup>
7	94	20	8.41 ± 0.22 <sup>c, d</sup>
8	94	40	8.45 ± 0.18 <sup>b, c, d</sup>
9	94	60	8.10 ± 0.24 <sup>d</sup>

*Tabla 2A.- Resultados de flavonoides totales. <sup>a,b,c</sup> Las medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes a <0,5 (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey).*

**Anexo 3. Tabla de contenido de ácidos hidroxicinámicos.**

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Acidos
			hidroxicinamicos totales (mg EACG/ml)
1	60	20	0.30 ± 0.01 <sup>A, B, C</sup>
2	60	40	0.30 ± 0.00 <sup>A, B</sup>
3	60	60	0.28 ± 0.00 <sup>B, C</sup>
4	78	20	0.26 ± 0.03 <sup>B, C</sup>
5	78	40	0.22 ± 0.00 <sup>C</sup>
6	78	60	0.27 ± 0.00 <sup>B, C</sup>
7	94	20	0.30 ± 0.00 <sup>A, B, C</sup>
8	94	40	0.36 ± 0.07 <sup>A</sup>
9	94	60	0.27 ± 0.00 <sup>B, C</sup>

*Tabla 3A.-Resultados de ácidos hidroxicinámicos. <sup>a,b,c</sup> Las medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes a <0,5 (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey)*

#### Anexo 4. Tabla de capacidad de captar al radical DPPH

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	DPPH (mg EAG/ml)
1	60	20	8.45 ± 0.01 <sup>a, b</sup>
2	60	40	8.54 ± 0.03 <sup>a</sup>
3	60	60	8.53 ± 0.05 <sup>a</sup>
4	78	20	8.41 ± 0.03 <sup>a,b</sup>
5	78	40	8.41 ± 0.04 <sup>a, b</sup>
6	78	60	8.36 ± 0.05 <sup>b, c</sup>
7	94	20	8.25 ± 0.01 <sup>c,d</sup>
8	94	40	8.23 ± 0. <sup>c, d</sup>
9	94	60	82.90 ± 70.56 <sup>d</sup>

*Tabla 4A.- Resultados de capacidad antioxidante en DPPH. <sup>a,b,c</sup> Las medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes a <0,5 (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey)*

### Anexo 5. Tabla de capacidad de captar al radical ABTS

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	ABTS (mg EAG/ml)
1	60	20	0.02 ± 0.00 <sup>c, d</sup>
2	60	40	0.02 ± 0.00 <sup>d</sup>
3	60	60	0.02 ± 0.00 <sup>f</sup>
4	78	20	0.02 ± 0.00 <sup>b</sup>
5	78	40	0.02 ± 0.00 <sup>e</sup>
6	78	60	0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>
7	94	20	0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>
8	94	40	0.02 ± 0.00 <sup>b, c</sup>
9	94	60	0.02 ± 0.00 <sup>c, d</sup>

*Tabla 5A.- Resultados de capacidad antioxidante en ABTS. <sup>a, b, c</sup> Las medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes a <0,5 (ANOVA, seguido de la prueba de Tukey)*