



Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo

Facultad de Químico Farmacobiología

**Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas
Área Temática: Biotecnología Alimentaria**

“Efecto de las variables temperatura y tiempo en los procesos de extracción por maceración y ultrasonido sobre el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de corteza de *Quercus crassifolia* utilizando la metodología de superficie de respuesta”

TESIS

Que para obtener el grado de Maestra en Ciencias

Presenta:

QFB Guillermina Escobar Salazar

Director de Tesis

Dc. Héctor Eduardo Martínez Flores

Morelia Michoacán., mayo del 2021

Tabla de contenido

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Generalidades de <i>Quercus</i> spp.	6
2.2 Compuestos bioactivos.....	7
2.3 Compuestos fenólicos	9
2.4 Flavonoides	9
2.5 No flavonoides	10
2.6 Taninos	11
2.7 Estilbenos.....	12
2.8 Métodos de extracción de compuestos fenólicos.....	12
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVO GENERAL	17
5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1 EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN	18
6.2 EXTRACCIÓN CON PROCESAMIENTO ULTRASÓNICO	18
6.3 COMPOSICIÓN FENÓLICA DEL EXTRACTO CRUDO	19
6.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO CRUDO	20
6.5 EXPERIMENTACIÓN PRELIMINAR.....	21
6.6 CONDICIONES PARA OPTIMIZACIÓN.....	22
6.7 RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN	23
6.8 ANÁLISIS DE DATOS.....	23
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
7.1 RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN	24
7.1.1 MACERACIÓN	24

7.1.2 ULTRASONIDO	28
7.2 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	29
7.2.1 MACERACIÓN	29
7.2.2 ULTRASONIDO	33
7.3 DETERMINACIÓN DE INHIBICIÓN DE RADICALES ABTS	34
7.3.1 MACERACIÓN	35
7.3.2 ULTRASONIDO	36
7.4 DETECCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES	38
7.4.1 MACERACIÓN	38
7.4.2 ULTRASONIDO	42
7.5 DETECCIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES	43
7.5.1 MACERACIÓN	43
7.5.2 ULTRASONIDO	47
8. CONCLUSIONES	50
• 9. LITERATURA CITADA.....	51

RESUMEN

Los encinos, género *Quercus*, son una fuente de antioxidantes como son los compuestos fenólicos (CF). *Q. crassifolia* se caracteriza por su alto contenido de CF. Por ello en el presente trabajo se realizó la extracción de CF de la corteza de *Q. crassifolia* por medio de dos métodos: de extracción clásico por maceración y uno innovador por asistencia de ultrasonido. El objetivo general fue comparar los dos métodos, condiciones de extracción y la preservación de la capacidad antioxidante de los CF. Las muestras fueron analizadas utilizando un Diseño de Superficie de Respuesta (DSR), para encontrar el punto óptimo de: a) porcentaje de rendimiento (%R), b) porcentaje de actividad antioxidante (%AA) e inhibición de radicales ABTS (%inh), c) compuestos fenólicos totales, y d) flavonoides totales. Bajo las condiciones sugeridas por el DSR, los resultados obtenidos fueron: a) lo prospectado por el DSR fue de 3.8% y se logró recuperar 4.23 ± 0.19 %R a un tiempo de 20h y 39 °C para maceración; en cuanto a la extracción asistida por ultrasonido se obtuvo un 5.1 de %R a 40 °C por 5 min de tratamiento, lo cual sugiere una optimización en el % de rendimiento obtenido. b) Lo prospectado por el DSR fue de 82.39% y se logró un 90.91 %AA por inhibición de DPPH a 39 °C por 20h de maceración, para la extracción por ultrasonido se tuvo un 92.99 de %AA. El resultado de ABTS para maceración fue de 63.62 %inh y para el tratamiento de ultrasonido de 79.32 % inh, por lo que también se logró una optimización en el % de inhibición del radical ABTS. c) Lo prospectado por el DSR para la recuperación de CF fue de 2200.9 mgEAG/g y los resultados para el tratamiento de maceración fue de 3331.88 mgEAG/g a 46 °C y un tiempo de 20h, en cuanto al tratamiento de extracción por ultrasonido se obtuvo 1948.2 mg EAG/g a 20 °C y un tiempo de 5 min, no se logró superar el prospecto de recuperación de CF ni el resultado obtenido por maceración, sin embargo, el tiempo de extracción ofreció una optimización. d) El prospecto indicado por el DSR para la obtención de

flavonoides totales fue de 162.5mgEQ/g, para maceración se obtuvo un total de 124.10 mgEQ/g, a 46 °C y un tiempo de 20h, no se superó lo prospectado por DSR, en cuanto a la extracción asistida por ultrasonido se obtuvo 124.04 ± 2.2 mgEAG/g a una temperatura de 40 °C y un tiempo de 10min, se obtuvo la misma cantidad que por maceración. Se observó que 20h es el tiempo constante en la mejor obtención de las variables respuestas para maceración en combinación de 39 °C (%R, %AA y % inh) y 46 °C (fenoles totales y flavonoides totales). En cuanto a la extracción por ultrasonido se observó que la mejor combinación de variables fue de 20 °C en combinación con 5min (%AA y fenoles totales) y 10min (%inh de ABTS), y 40 °C en combinación con 5min (%R) y 10min (flavonoides totales). Se concluye que los resultados obtenidos por la extracción de ultrasonido superan a los obtenidos por maceración, en cuanto a rendimiento y tiempo de extracción.

Palabras clave: Compuestos fenólicos, *Quercus*, ultrasonido, encino

ABSTRACT

Oaks (*Quercus*) are a source of antioxidants such as phenolic compounds (PC). *Q. crassifolia* is characterized by its high content of PC. Due to that, in the present work, the extraction of PC from the bark of *Q. crassifolia* was carried out using two methods: the classical maceration extraction and an innovative method by ultrasound assistance. The general objective was to compare methods, extraction conditions and preservation of antioxidant capacity of the PC by both techniques. The samples were analyzed using a Response Surface Design (RSD), to find the optimal point of: a) percentage of yield (% R), b) percentage of antioxidant activity (% AA) and inhibition of radicals ABTS (% inh), c) total phenolic compounds, and d) total flavonoids. Under the conditions suggested by the RSD, the results obtained were: a) the prospected by the RSD was 3.8% and it was possible to recover $4.23 \pm 0.19\%$ R at a time of 20h and 39 °C for maceration; Regarding the extraction assisted by ultrasound, a 5.1% R was obtained at 40 °C for 5 min of treatment, which suggests an optimization in the % yield obtained. b) The prospected by the RSD was 82.39% and a 90.91 % AA was achieved by inhibition of DPPH at 39 °C for 20h of maceration, for the extraction by ultrasound there was a 92.99% AA. The ABTS result for maceration was 63.62% inh and for the ultrasound treatment it was 79.32% inh, so it can also be indicated that an optimization was achieved in the % inhibition of the radical ABTS. c) The prospected by the RSD for the recovery of CF was 2200.9 mgEAG/g and the results for the maceration technique was 3331.88 mgEAG/g at 46 °C and a time of 20h, regarding the ultrasound extraction method was obtained 1948.2 mg EAG/g at 20 °C and a time of 5 min, it was not possible to exceed the PC recovery prospect or the result obtained by maceration, however the extraction time offered an optimization. d) The leaflet indicated by the RSD for obtaining total flavonoids was 162.5mgEQ/g, for maceration a total of 124.10 mgEQ/g was obtained, at 46 °C and a time of 20h, the prospects

for RSD were not exceeded. Regarding the extraction assisted by ultrasound, 124.04 ± 2.2 mg EAG/g was obtained at a temperature of 40 °C and a time of 10 min, the same amount was obtained as by maceration. It was observed that 20h is the constant time in the best obtaining of the response variables for maceration in a combination of 39 °C (% R,% AA and% inh) and 46 °C (total phenols and total flavonoids). Regarding the extraction by ultrasound, it was observed that the best combination of variables was 20 °C in combination with 5min (% AA and total phenols) and 10min (% inh of ABTS), and 40 °C in combination with 5min (% R) and 10 min (total flavonoids). The obtained results evidence that the ultrasound method overcome the maceration in terms of efficiency and time of extraction.

Keywords: phenolic compounds, *Quercus*, ultrasound .

1. INTRODUCCIÓN

Los encinos son árboles pertenecientes al género *Quercus* L., se encuentran ampliamente distribuidos por el territorio mexicano. Uno de los estados con abundantes plantaciones de encinos es Michoacán; de las 30 especies registradas en el estado se eligió estudiará una especie en particular, *Quercus crassifolia* Humb. & Bonpl. Esta especie del género *Quercus* se ha catalogado como una fuente rica en compuestos fenólicos (CF).

Los principales grupos de CF son: ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, taninos y flavonoides. Los CF son importantes antioxidantes naturales por su capacidad para secuestrar radicales libres y quelar indirectamente iones metálicos considerados prooxidantes; permiten que el consumo de estos compuestos a dosis indicadas retarde el envejecimiento y prevenga enfermedades relacionadas al estrés oxidativo.

Existen diferentes formas de extraer los CF, que varían de acuerdo con el método, condiciones de extracción y materia prima utilizada, donde básicamente se busca que se tenga un alto rendimiento y conservando las propiedades como antioxidantes. Los métodos mas comunmente utilizados también llamados clásicos o convencionales son la maceración, extracción por Soxhlet o la hidrodestilación, pero además se han presentado nuevas alternativas de extracción, los llamados métodos no convencionales para evitar el uso excesivo de solventes, disminuir el tiempo de proceso, aumentar la presión en la extracción y tener un mayor control en la temperatura; ejemplos de estos son la extracción asistida por ultrasonido, por microondas, por campos pulsados o la extracción por medio de enzimas. Dada la gran variedad de las técnicas que pueden ser aplicadas para la extracción de los bioactivos de las plantas, que para los fines de esta investigación son los CF, realizaremos la comparación de un método clásico o convencional como es la maceración y un método moderno o no

convencional como es el ultrasonido, buscando que este último iguale o supere las características de los CF obtenidos por la maceración primordialmente la capacidad antioxidante, la cual es característica de estos bioactivos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de *Quercus* spp.

A nivel mundial, los encinos del género *Quercus* pertenecientes a la familia *Fagaceae* se desarrollan ampliamente en los bosques templados, regiones tropicales y subtropicales del hemisferio norte e incluso algunas especies habitan en climas más secos, en el norte de Asia y nororiente de África (Valencia, 2004). Se han reconocido dos centros principales de diversidad para el género *Quercus*, el principal localizado en el sureste de Asia y el segundo en importancia en México. En México se reportan alrededor de 161 especies (Valencia, 2004). Se distribuyen normalmente en lugares templados y fríos, con excepción de los estados de Yucatán, Quintana Roo y Campeche (Arámbula-Salazar y col. 2010). En Michoacán, el área principal de encinos se registra en las grandes sierras, especialmente en aquellas conocidas como bosques de pino-encino y de encino, en donde se han identificado 30 especies (Arizaga y col., 2009).

En México se desarrollan tres variantes de este género, *Erythrobalanus*, *Lobatae* y *Protobalanus* (Arizaga y col., 2009). Se han identificado cinco categorías de uso (Luna-José y col., 2003): (1) medicinal, que se relaciona principalmente, aunque no limitativo, con problemas del aparato digestivo; (2) alimenticio, que comprende la elaboración y consumo de alimento fresco o procesado; (3) artesanal, para la elaboración de artículos como rosarios o juguetes; (4) forraje, principalmente para la alimentación de ganado porcino y caprino; (5) taninos y colorantes, para curtir piel, como mordiente y para teñir hilo.

2.2 Compuestos bioactivos

Desde la antigüedad la humanidad ha utilizado las plantas para fines alimenticios y posteriormente descubrió el uso medicinal de las mismas (Azmir y col., 2013). Existen registros en papiros egipcios con recetas medicinales, así como escritos de los griegos tales como Hipócrates, Teofrasto, Celso o los romanos como Heródoto quien describió el uso de *Leonurus cardiaca* (Pulsen y col., 2010). Sin embargo, las personas de aquellas épocas no sabían que el poder de las plantas radicaba en las moléculas bioactivas. Más adelante, se hizo referencia a la fitoquímica, quien se encarga de estudiar los componentes químicos de las plantas (Flores-Morales y col., 2014). Por lo que, ahora se conoce que los compuestos bioactivos son compuestos secundarios producidos por plantas que tienen efectos farmacológicos o toxicológicos en el hombre y los animales dependiendo de la naturaleza y la dosis administrada, los nutrientes de las plantas generalmente no se incluyen entre los metabolitos secundarios (Bernhoft y col., 2010).

Los metabolitos secundarios de las plantas tienen peso molecular bajo, y generalmente protegen a los vegetales contra plagas, bacterias, estrés ambiental, radiación UV u otros factores (Andrade-Andrade y col., 2018). De acuerdo con lo descrito por Bernhoft (2010) los metabolitos primarios y secundarios se producen dentro de las plantas siguiendo diversas rutas biosintéticas y metabólicas de compuestos asociados con el crecimiento de las plantas. En la Figura 1 se esquematiza de forma resumida las rutas metabólicas para la síntesis de los principales metabolitos secundarios en plantas.

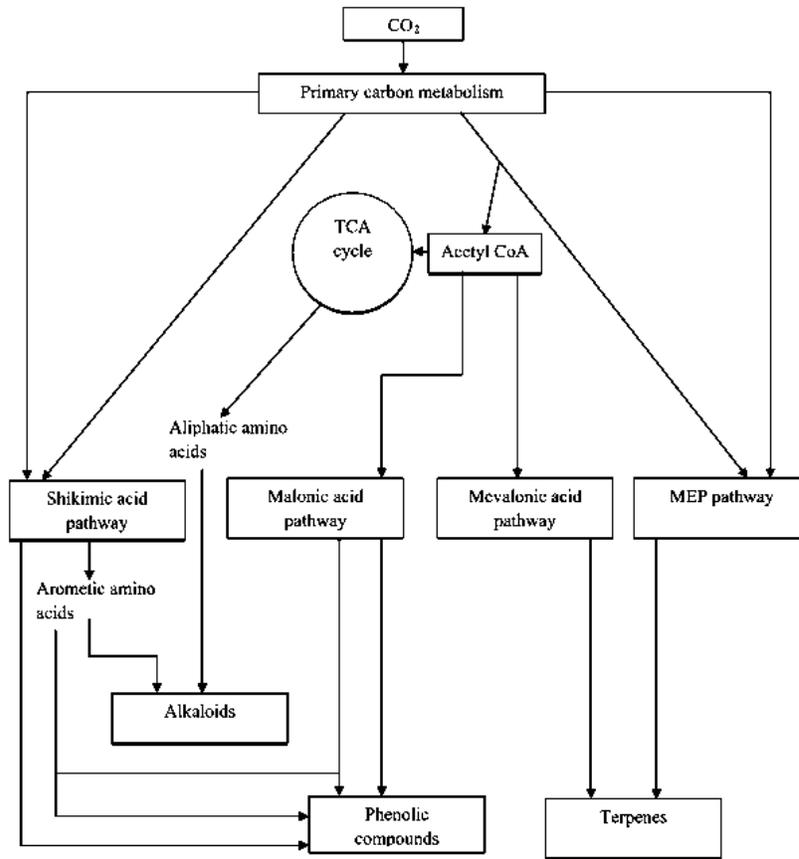


Figura 1. Diagrama simplificado de las rutas biosintéticas de los tres principales compuestos bioactivos de plantas. Tomado de Tiaz y Zeiger (2006).

2.3 Compuestos fenólicos

Entre los componentes fitoquímicos de importancia están los compuestos fenólicos (CF), que poseen acción antioxidante y pueden tener aplicaciones benéficas para la salud humana, como la de utilizarse en el tratamiento y prevención de cáncer, así como de enfermedades cardiovasculares y otras de carácter inflamatorio (Porrás-Loaiza y López-Malo, 2009).

Los CF son uno de los fitoquímicos más abundantes en el reino vegetal, provienen de dos rutas biosintéticas, la del ácido shikímico y la del ácido malónico. Se conocen alrededor de 8,000 diferentes CF, pueden ser clasificados de acuerdo con su estructura química o su naturaleza (Santhakumar y col., 2018). Una clasificación bastante general es separarlos como flavonoides y no flavonoides. Además, tienen dos formatos estructurales principales que les confieren solubilidad si se encuentran unidos a azúcares, estos son conocidos como glucósidos, o solo un compuesto y son conocido como agliconas (Bravo y col 1998).

2.4 Flavonoides

Los flavonoides se caracterizan por tener en su estructura un difenil propano formado por dos anillos de benceno unidos por un puente conformado por tres carbonos (C6-C3-C6). Los carbonos de propano que conectan a los anillos del fenilo forman un anillo de pirano con uno de los anillos de benceno que dan como resultado una estructura de 3 anillos formado por 15 carbonos (Santhakumar y col., 2018). En la Figura 2 se muestra la estructura básica de los flavonoides conformada por 3 anillos (A, B, C). Se presentan las estructuras de los principales flavonoides, en la cual se observan los diferentes sustituyentes para R como pueden ser los grupos -OH, -H- o -OCH₃ a los diversos flavonoides. Generalmente se combinan con azúcares para formar los glucósidos, la glucosa es el azúcar la predominant, aunque también puede unirse con otros azúcares

como galactosa, ramnosa y xilosa, y pueden así mismo reclasificarse de acuerdo con su grado de oxidación del anillo C, dando las principales clases de flavonoides que son: flavanoles, flavonas, isoflavonas, flavan-3-oles, flavanonas y antocianidinas, según lo descrito por Santhakumar y col. (2018).

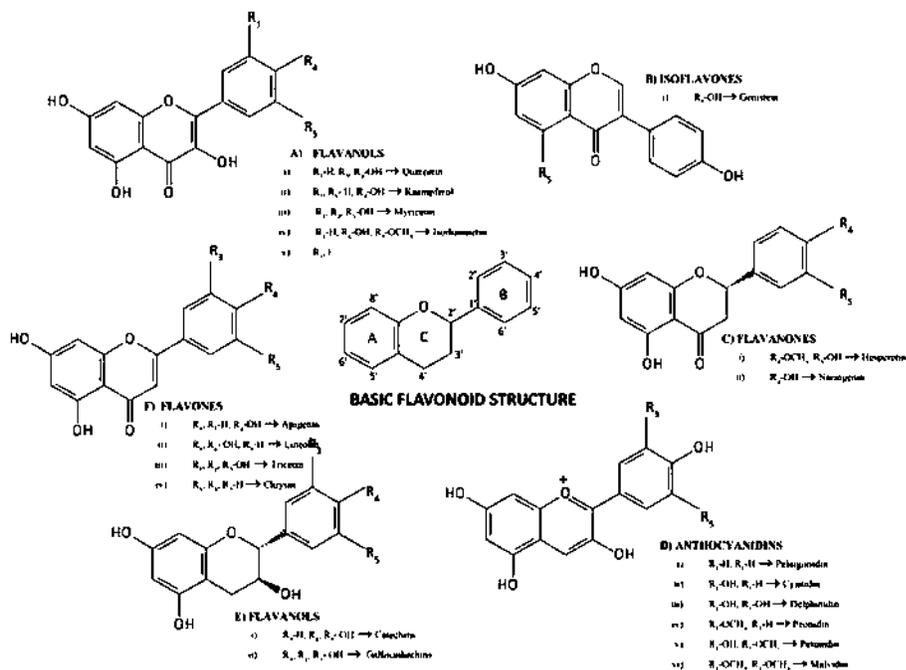


Figura 2. principales estructuras de flavonoides.

2.5 No flavonoides

Los ácidos fenólicos son los más representativos dentro de los no flavonoides, son un grupo de compuestos que derivan de los ácidos hidroxicinámicos y del ácido benzoico, pueden tener uno o más sustituyentes -OH en su anillo aromático. Los fenoles simples están constituidos por un anillo de C6 (timol, cresol y fenol), como se observa en la Figura 3A. Mientras otros no flavonoides están formados por C6-C1 (ac. gálico, ac. vanílico y ac. siríngeo), aldehídos (vainillina), estructura C6-C2 (ac. fenilacético y acetofenonas) Figura 3 B y Figura C. Además pueden estar formados por

una estructura C6-C3, derivados fenilpropanoides (ac. hidroxicinámicos), tal como lo menciona Santhakumar y col. (2018) así como Bravo (1998).

2.6 Taninos

Los taninos son no flavonoides y se dividen en hidrolizables y no hidrolizables. Hay dos subclases de taninos hidrolizables, los galotaninos y elagitaninos, la molécula del tanino está formado por un carbohidrato, generalmente, D-Glucosa, en donde sus grupos hidroxilo están, total o parcialmente esterificados con un ácido fenólico (ac. gálico o ac. elágico). En los galotaninos el ac. gálico es el predominante. En los elagitaninos pueden existir diversas combinaciones de ac. gálico y ac. hidroxicinámico con una glucosa (ac. elágico, ac. glucósidos) (Bernhoft, 2010).

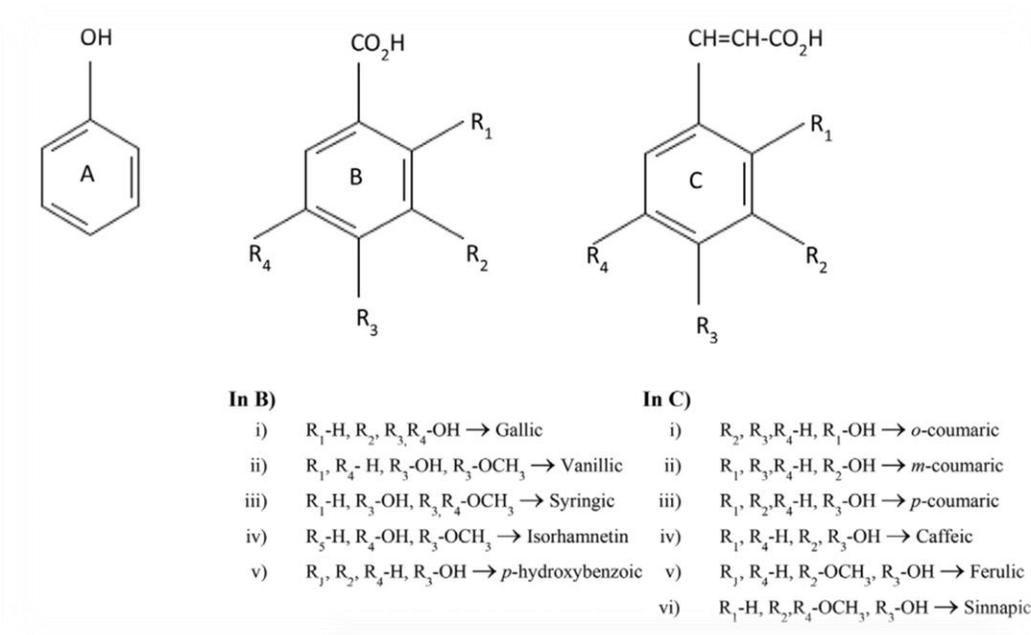


Figura 3. Estructura de fenol A y principales ac. fenólicos B y C.

2.7 Estilbenos

Son un grupo de fotoalexinas formado por una estructura de C6-C2-C6. El estilbeno más representativo es el resveratrol (5-[(E)-2-(4-hidroxifenil)etenil] benceno-1, 3-diol), sus isómeros son cis y trans (Santhakumar y col., 2018; Bernhoft, 2010).

Según Valencia-Avilés y col. (2018), los encinos contienen grandes cantidades de CF. La composición química de la albura o xilema y corteza de especies de encinos mexicanas como *Q. laurina*. y *Q. crassifolia* fue descrita, y ha permitido concluir que la concentración de CF extraídos de la corteza de estas especies fue mayor a cualquier concentración del extracto de otra parte del tronco. Cabe mencionar que la forma más común para obtener los principios activos de las plantas es la extracción y su finalidad es separar la materia soluble (fitoquímicos) de los tejidos vegetales (materia no soluble) (Flores-Morales y col., 2014).

2.8 Métodos de extracción de compuestos fenólicos

La extracción es el primer paso realizado para el estudio de los compuestos de las plantas, según lo refiere Azmir y col. (2013). El éxito en la recuperación de los compuestos bioactivos en los extractos depende sin duda en el método de extracción, las condiciones y propiedades de la matriz (parte de la planta), así como la concentración del solvente, la presión, temperatura y tiempo. Los métodos de extracción a veces se denominan "técnicas de preparación de muestras". La mayoría de las veces, esta parte del estudio es descuidada y realizada por personal de investigación no capacitado (Azmir y col., 2013), (Sasidharan y col., 2011).

Los compuestos bioactivos pueden ser extraídos de las plantas mediante diversas técnicas de extracción ya sean clásicas o modernas; las técnicas clásicas se basan en el poder de extracción de diferentes solventes y la aplicación de calor y agitación. Estas son: (1) Extracción Soxhlet, (2)

Maceración e (3) Hidrodestilación (Azmir y col., 2013). Algunos de los métodos modernos o no convencionales más prometedores son el (1) campo eléctrico pulsado, (2) extracción asistida por microondas, (3) extracción asistida por ultrasonido y (4) extracción asistida por enzimas. Dichas técnicas no convencionales, buscan reducir el tiempo de extracción, la cantidad de solventes utilizados, así como poder utilizar temperaturas y presiones mas altas o mas bajas (Smith y col., 2003). Ya que algunos de las limitantes de los métodos convencionales son el mayor tiempo de extracción, el requerimiento de solvente tóxico, costoso y de alta pureza, la evaporación de la gran cantidad de solvente, la baja selectividad de extracción y la descomposición térmica de compuestos termolábiles (Azmir y col., 2013; Cowan, 1999). En el cuadro 1 se muestran ejemplos de algunos solventes utilizados para la extracción de compuestos bioactivos.

Cuadro1. Ejemplo de algunos solventes para la extracción de bioactivos de plantas.

Agua	Etanol	Metanol	Cloroformo	Diclorometanol	Éter	Acetona
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenoides	Terpenoides	Alcaloides	Flavonoides
Taninos	Polifenoles	Terpenoides	Flavonoides		Terpenoides	
Saponinas	Flavonoides	Saponinas			Cumarinas	
Terpenoides	Terpenoides	Taninos			Ac. grasos	
	Alcaloides	Flavonas				
	Esteroles	Polifenoles				

El método de extracción más comúnmente utilizado para la obtención de CF a partir de materia vegetal es por medio de la maceración con disolventes como agua, metanol y acetona (Izquierdo-Hernández, 2011). Según Soto-García y col. (2016), la polaridad del disolvente afecta directamente la cantidad y calidad del extracto, y menciona que no existe un método ni solvente definido que garantice una extracción total de compuestos, ya que la estructura química y el tamaño molecular interactúan con otros factores como la concentración del solvente, tamaño de partícula, temperatura, tiempo de contacto, y la relación masa-volumen que vuelven dependiente la recuperación y bioactividad de estos compuestos.

En un estudio realizado por Soto-García y col. (2016), la concentración de flavonoides de los extractos de *Quercus sideroxylla* fue de 318.97 mg EC/g y en *Q. sideroxylla* al 50% de solución hidroetanólica y una relación masa/volumen de solvente (QsE50-1/30) de 385.95 mg EC/g en QsE80-1/10. En esta especie se observa una tendencia de aumentar la concentración de flavonoides al aumentar la concentración de etanol. Para la extracción de proantocianidinas (flavanoles o catequinas) en esta misma especie de encino la concentración máxima fue de 319.83 mg EC/g en QsE20-1/30, y la mínima de 267.61 mg EC/g en QsE80-1/20, concluyéndose que la concentración de etanol y la relación masa/volumen utilizado tuvieron efecto significativo en la cantidad de flavonoides y proantocianidinas recuperados en los extractos. En la Figura 4 se muestran los resultados del contenido de CF totales evaluado por Soto-García y col. (2016).

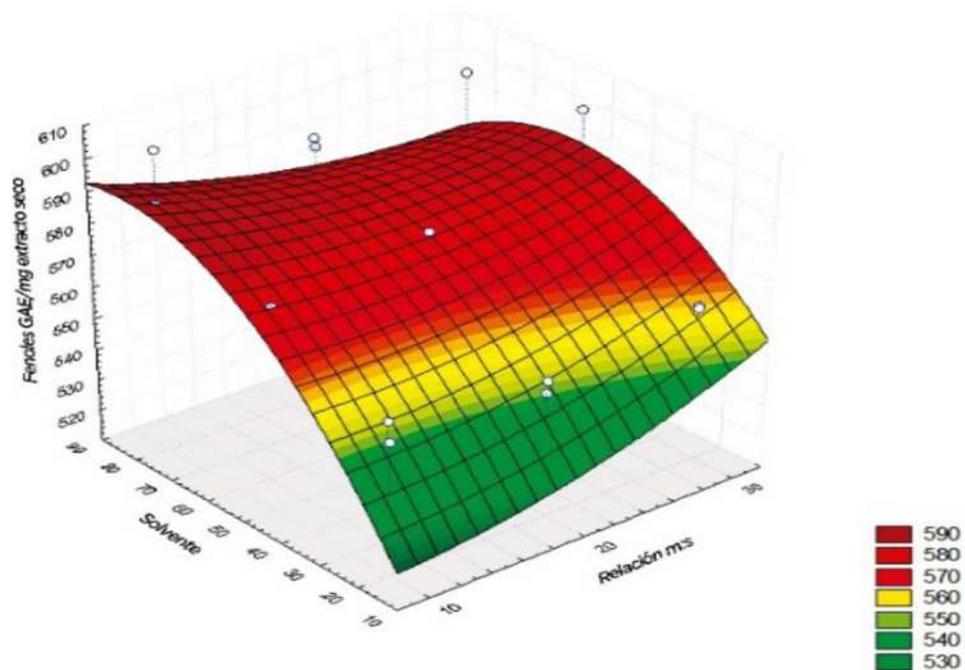


Figura 4. Efecto de la concentración de etanol y la relación corteza: solvente sobre el contenido de fenoles totales en la corteza de *Q. sideroxylla* (Soto-García y col., 2016).

El gráfico anterior analiza los datos de la concentración de solvente en relación con la corteza de *Q. sideroxylla* por medio de la metodología de Diseño de Superficie de Respuesta (DSR). Según Figueroa-Preciado (2003) se define a la DSR como un conjunto de técnicas que permiten investigar un efecto producido al variar factores cuantitativos en los valores que toma una variable dependiente o respuesta y estos se pueden mostrar como una superficie. Se trata de encontrar los valores óptimos para las variables independientes que maximizan, minimizan o cumplen ciertas restricciones en la variable respuesta.

La extracción con solventes orgánicos puede tener la ventaja de ser sencilla y eficiente, sin embargo, también puede tener efectos perjudiciales debido a las trazas de solvente orgánico que pueden quedar en el extracto y ser consumidas por el ser humano (Soto-García y col., 2016). La extracción con etanol se considera de baja toxicidad para consumo humano (Xavier y col., 2015).

Como se mencionó previamente, existen otros métodos no convencionales para la extracción de CF, como lo es la extracción asistida por ultrasonido, la cual por medio de vibraciones mecánicas y el efecto térmico producido ha mostrado ser una técnica eficaz para la recuperación de compuestos en general (De la Cruz-Tabón, 2015).

El ultrasonido es un tipo de vibración de onda de sonido con frecuencia más allá de la audición humana (20 kHz), es decir, a más de 20 kHz y puede ser dividido en ultrasonido de señal y ultrasonido de potencia (De la Cruz-Tabón, 2015). El de señal tiene un rango de frecuencia de onda de 100 Hz hasta 1 MHz (baja frecuencia); esta señal es afectada por los elementos que entran en contacto con ella, permite recabar información de un producto, como puede ser en un estudio reológico para evaluar las propiedades físicas del producto como su consistencia (Azuola y Vargas, 2007). En el ultrasonido de potencia, el rango de frecuencia de onda se encuentra de 18 KHz hasta 100 KHz (alta potencia); en este caso existe una frecuencia más baja pero una potencia más alta lo

cual produce cambios fisicoquímicos en el medio por el fenómeno de cavitación en donde las ondas de sonido generan burbujas que se expanden y se comprimen al pasar por un medio o solvente líquido y golpear contra una superficie sólida debido a una gran cantidad de energía que al pasar por un transductor convierte la energía cinética en energía acústica (Azuola y Vargas, 2007). Al aplicar ultrasonido como método de extracción de compuestos dentro de las células en plantas se tendría una mayor y más rápida difusión de los compuestos en el medio en comparación con otros métodos debido a los movimientos generados por la cavitación (Sharmila y col., 2016). Este novedoso método se aplica en la industria alimentaria no solo en procesos de extracción de compuestos sino también para la cocción, desecación, cristalización, marinado, filtración, desgasificación, cortado, desmoldado y emulsificación entre otras (Chemat y col., 2011).

3. JUSTIFICACIÓN

Por su importante actividad antioxidante los compuestos fenólicos extraídos de la corteza de *Quercus crassifolia* y sus potenciales usos para el cuidado de la salud, prevención y tratamiento de enfermedades como el cáncer, hipertensión, cardiovasculares, dislipidemias y desórdenes metabólicos, es preciso estandarizar las técnicas de extracción de dichos compuestos que conserven su capacidad antioxidante. Se han realizado estudios para la extracción de compuestos fenólicos de diversas especies de encinos como son *Quercus laurina*, *Quercus crassifolia* y *Quercus scytophylla*, utilizando hojas, ramas y corteza de éstos. En un trabajo previo por nuestro grupo de trabajo fue posible recuperar compuestos fenólicos en corteza de *Q. crassifolia*. Se realizaron experimentos por diferentes tiempos, temperaturas y variación en sistemas de extracción en solvente caliente y a temperatura ambiente. Sin embargo, aún falta optimizar la técnica y tiempo de extracción, así como la temperatura óptima para la recuperación de la mayor cantidad de fenoles

con actividad biológica. Por lo anterior, en esta propuesta de investigación se plantea utilizar la metodología de superficie de respuesta como herramienta para elegir las mejores condiciones de extracción ya sea por maceración o ultrasonido y evaluar si la extracción por ultrasonido presenta extractos con mayor contenido de compuestos fenólicos preservando su capacidad antioxidante.

4. HIPÓTESIS

Al utilizar ultrasonido como método de extracción de la corteza de *Quercus crassifolia* es posible obtener una concentración elevada de compuestos fenólicos con actividad antioxidante similar o mayor a la obtenida con el método de maceración.

5. OBJETIVO GENERAL

Obtener un extracto de corteza de *Q. crassifolia* que contenga alta concentración de compuestos fenólicos, con alta actividad antioxidante mediante el método de extracción por ultrasonido y que sea comparativamente similar o mejor que la obtenida con un método de maceración.

5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Realizar la optimización de procesos de extracciones de compuestos fenólicos de corteza de *Quercus crassifolia* por los métodos de maceración clásica y por ultrasonido.
2. Caracterizar los compuestos fenólicos, flavonoides totales y la actividad antioxidante en los extractos de corteza de *Q. carssifolia* obtenidos por los procesos de maceración y de ultrasonido.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó corteza de encino de la especie *Quercus crassifolia* colectada de una plantación forestal localizada en Zacán, municipio de los Reyes, Michoacán a una altitud de 2191.5 m, longitud de -102.30 y latitud de 19.55. La corteza fue identificada y tipificada botánicamente en el laboratorio de botánica de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. La corteza se cortó en rectángulos de 5 x 5 cm, y se secó a 40 °C por 48 h en horno de secado Ecoshel (9053A) y triturada utilizando un molino Thomas Digital ED-5 Wiley®. El polvo obtenido se pasó por una criba #40 (400 µm) y se almacenó hasta su uso.

6.1 EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN

Se utilizó el método por maceración aplicando tres diferentes temperaturas y tres diferentes tiempos para la extracción de compuestos fenólicos de *Q. crassifolia*, con base en un diseño experimental que se ajustó a la Metodología de Superficie de Respuesta. Las temperaturas aplicadas fueron de 20 °C, 40 °C y 60 °C a tiempos de 12, 18 y 24 h. Se utilizó como solvente etanol al 90%; para ello, se adicionaron 100mL de etanol al 90% a 5g de corteza y se agitó con una combinación determinada por una temperatura y tiempo considerados en el diseño experimental. El extracto fue filtrado con papel Whatman No. 42, y los restos sólidos fueron lavados con 20mL de etanol al 90%. El extracto crudo fue almacenado a 4 °C en frascos ámbar.

6.2 EXTRACCIÓN CON PROCESAMIENTO ULTRASÓNICO

La extracción de los compuestos fenólicos se realizó por medio de un procesador ultrasónico Sonics, modelo: VC505, aplicando diferentes condiciones de proceso, basado en el modelo utilizado en el Diseño de Superficie de Respuesta (DSR). En la Figura 5 se muestra la imagen del

equipo de procesamiento por ultrasonido utilizado para la extracción. Para ello 5g de muestra se colocaron en 100 mL de etanol al 90% y se realizó la extracción de acuerdo con dos variables de proceso. Una variable independiente fue el tiempo, con lapsos de 2.5, 5 y 10 min y la temperatura aplicada tuvo los niveles de 20 °C, 40 °C y 60 °C. El extracto líquido fue filtrado con papel Whatman no. 42, y el extracto crudo fue almacenado en botellas ámbar a 4 °C.



Figura 5. Extracción asistida por ultrasonido Sonics, modelo: VC505.

6.3 COMPOSICIÓN FENÓLICA DEL EXTRACTO CRUDO

La cantidad total de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales contenidos en los extractos fueron determinados por medio de técnicas espectrofotométricas en la región visible.

En los extractos se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales siguiendo el método de Scalbert y col. (1989), como lo menciona Valencia-Avilés y col. (2018). Se usó ácido gálico

para la calibración de la curva y la absorbancia fue medida a 750 nm. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de extracto seco.

El contenido total de flavonoides se determinó a 415 nm con el método de Brighente y col. (2007), usando una curva de calibración, siendo la quercetina el estándar. Los resultados fueron expresados en mg de equivalentes de quercetina (QE)/g de extracto seco.

6.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO CRUDO

Un método para medir la actividad antioxidante del extracto crudo de corteza de *Q. crassifolia* es por medio de una reacción de un antioxidante y un radical de nitrógeno orgánico como es el DPPH (2,2,-Diphenyl-1-picrylhydrazyl). La reacción conlleva una variación de color, de un radical libre (color morado) a la desaparición de este radical por la actividad antioxidante (color amarillo); este cambio se mide con un espectrofotómetro UV/Vis. En esta técnica se prepara una solución stock con ácido gálico como estándar, de donde se obtienen diferentes concentraciones para la curva de calibración. La absorbancia fue medida a 515 nm. El resultado se reportó como (mgEAG)/g (Prior y col., 2005).

Además, se determinó la inhibición de radicales $ABTS^{\bullet+}$, este método mide la interacción entre antioxidantes y el catión $ABTS^{\bullet+}$, este catión (de color azul) vuelve a su forma neutra (incolora) al generarse una reacción entre el grupo oxidante con la sal del $ABTS^{\bullet+}$ (Figura 7). Los compuestos fenólicos tienen bajos potenciales redox por lo que son capaces de reducir el $ABTS^{\bullet+}$ (0.68V). Se utilizó un espectrofotómetro UV/Vis (Marca VELAB modelo VE-5600UV), a un máximo de 815 nm y los resultados fueron expresados como capacidad antioxidante equivalente en (EAG)/g (Prior y col., 2005).

.



Figura 6. Viración de color morado característico del DPPH de acuerdo a la concentración de ác. gálico.



Figura 7. Cambio de color azul, característico del radical ABTS de acuerdo a la concentración de ac. gálico.

6.5 EXPERIMENTACIÓN PRELIMINAR

Se realizaron experimentos preliminares para obtener información necesaria para establecer el diseño adecuado para analizar por la Metodología de Superficie de Respuesta. Las variables de respuesta evaluadas fueron: a) rendimiento de extracción de sólidos, de compuestos fenólicos

totales y flavonoides totales de la corteza de encino de la especie *Q. crassifolia*; b) capacidad antioxidante por la determinación del radical ABTS y DPPH.

Para los experimentos se pesaron 5 g de corteza de encino y se adicionaron 50 mL de etanol al 90%; se maceraron a 3 diferentes tiempos (20 °C, 40 °C y 60 °C) y tres diferentes temperaturas (12, 18, 24 h) de maceración como se indicó en la metodología. Para el caso de ultrasonido se pesaron 5g de muestra y se colocaron en 100mL de etanol al 90%, se fijaron las condiciones de extracción en un pulso de 55 seg de trabajo por 5 seg de reposo, una amplitud de 40% para los 3 tiempos (2.5, 5 y 10 min) y tres temperaturas (20 °C, 40 °C y 60 °C). En ambos casos los sólidos remanentes fueron lavados con 20mL de etanol al 90% y reunidos con el extracto obtenido de la maceración.

6.6 CONDICIONES PARA OPTIMIZACIÓN

En base a los resultados obtenidos del estudio preliminar utilizando el análisis de la DSR, fue posible establecer tres nuevos tiempos (16, 20 y 24 h) y tres nuevas temperaturas (32 °C, 39 °C y 46 °C) con el fin de obtener mejores rendimientos en las variables de respuesta analizadas, las cuales fueron: a) rendimiento de extracción de compuestos totales de la corteza de encino de la especie *Q. crassifolia*, compuestos fenólicos totales y flavonoides totales; b) capacidad antioxidante por la determinación del radical ABTS y DPPH.

Para esta nueva etapa, de cada tratamiento se siguió la misma metodología de extracción descrita en el apartado 6.5 tanto para la maceración como por el procedimiento por ultrasonido.

6.7 RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Se tomaron 10ml de los extractos en solución (extracto crudo), se introdujeron en un recipiente de vidrio (a peso constante), se deshidrataron a una temperatura de 100 °C, por 5h, se pusieron nuevamente a peso constante y se obtuvo el peso de los sólidos obtenidos por diferencia de pesos. Se realizó por triplicado para cada uno de los extractos con la combinación de tiempo y temperatura de (20 °C, 40 °C y 60 °C) y (12, 18 y 24 h), (16, 20 y 24 h) y (32 °C, 39 °C y 46 °C) y para ultrasonido (2.5, 5 y 10 min) y (20 °C, 40 °C y 60 °C). Se aplicó la siguiente ecuación para la obtención del % de Rendimiento:

$$\%R = \frac{\text{Peso g extracto deshidratado}}{\text{mL del extracto crudo}} \cdot 100$$

6.8 ANÁLISIS DE DATOS

Se seleccionó un Diseño Experimental por Superficie de Respuesta en modalidad de diseño compuesto con un punto central, para analizar los 27 datos provenientes de un experimento factorial preliminar corrido con 3 repeticiones y los resultados usarlos para la construcción de una matriz aleatorizada codificada para tres niveles, mínimo (codificación -1), intermedio (codificación 0) y máximo (codificación 1) para cada uno de los factores a evaluar, en este caso tiempo 12h como mínimo, 18h como intermedio y 24h como máximo y 20 °C como mínimo, 40 °C como intermedio y 60 °C como máximo para temperatura. Con esta codificación se corrió el análisis y se generó una respuesta para cada una de las combinaciones de tiempo y temperatura arrojadas por el programa. Esta información se utilizó para el diseño de un nuevo experimento buscando la optimización de las respuestas del estudio preliminar. El nuevo diseño de superficie

de respuesta se realizó con los 27 datos obtenidos del análisis por triplicado de cada variable respuesta con las tres temperaturas y los tres tiempos propuestos 32 °C, 39 °C y 46 °C, para tiempo, 16h, 20h, 24h. Los datos generados para cada variable respuesta fueron analizados por medio de un factorial completo y una prueba de comparación de medias de Tukey con $p \leq 0.05$.

Los resultados reportados fueron los valores de máximo rendimiento prospectados por el análisis del Diseño de Superficie de Respuesta (DSR).

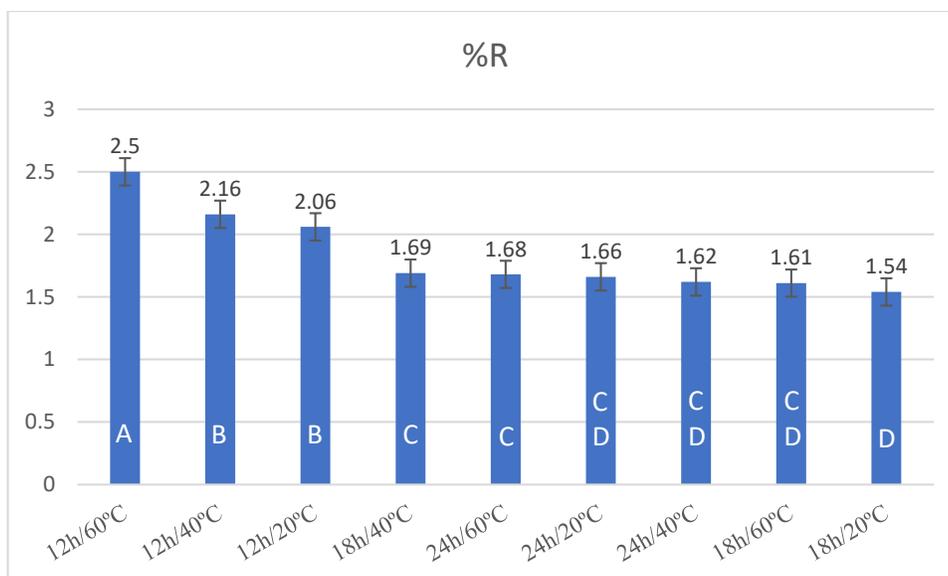
Los datos de las pruebas fueron analizadas utilizando el software estadístico JMP11 (SAS Institute, 2014).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

7.1.1 MACERACIÓN

Los resultados obtenidos en el experimento preliminar indicaron que los mejores rendimientos de extracción se obtuvieron a una temperatura de 20 °C y 24h de maceración en etanol al 90%, con una media de 2.5% ± 0.02 de rendimiento (Figura 8), lo que comparado con lo reportado por Valencia (2019), quien obtuvo un rendimiento de 4.55% por maceración de la corteza de *Q. crassifolia* en etanol al 90%, a temperatura ambiente (alrededor de 25 °C) y un tiempo de contacto de corteza-solvente de 24h, se tuvo un menor porcentaje de recuperación, el cual puede ser atribuido a la combinación particular del tiempo y la temperatura, así como a la cantidad de muestra y solvente utilizado que es en una menor en proporción a lo utilizado por Valencia (2019), quien usó 20g de muestra seca en un volumen de 200 mL; mientras que en este trabajo se utilizaron 5 g en un volumen de 100 mL.



Los tratamientos con letras diferentes indican diferencia estadística significativa, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)
Figura 8. Porcentaje de rendimiento obtenido por maceración en el experimento preliminar (± 0.02 E.E)

Usando el DSR como se indicó en la metodología, el punto máximo de %R se ubicó en un tiempo de 17.08 h y una temperatura de 32.19 °C y 3.8 de rendimiento en porcentaje (Figura 9), claramente superior al 2.5% obtenido en el experimento preliminar (Cuadro 2) donde se muestran las condiciones y resultados de la DSR.

Cuadro 2. Condiciones y resultado de DSR para %R por el tratamiento de maceración

Condiciones de experimentación	Tiempo codificado h	12 (-1), 18(0), 24(-1)
	Temperatura codificada °C	32 (-1), 39(0) y 46(1)
Resultado de DSR	Punto de máximo rendimiento	Tiempo 17.085 h (-0.152439) Temperatura 32.195 °C (-0.390244)
Prospecto	%R	3.80%

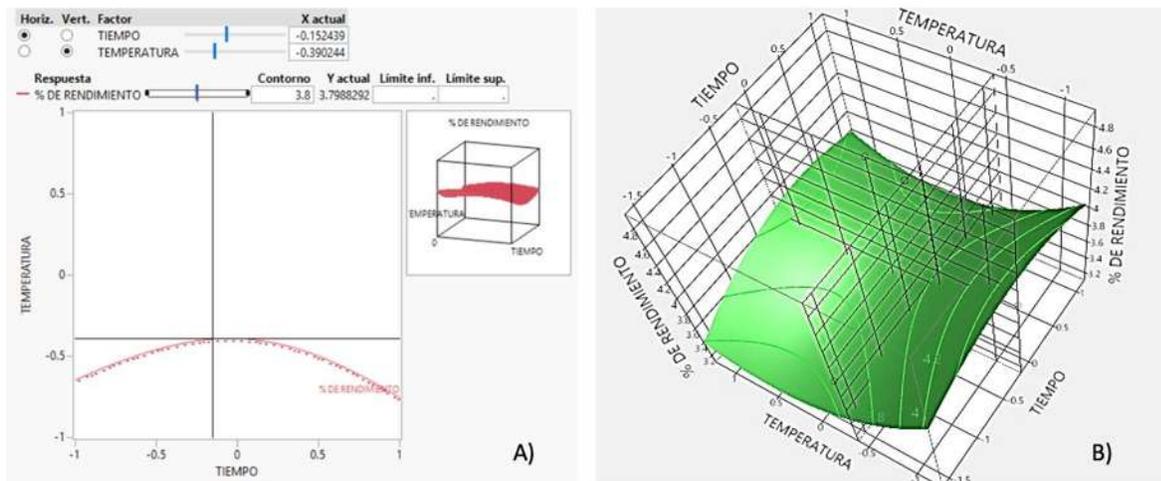


Figura 9. A) Perfilador de contorno y B) gráfico tridimensional de la superficie de respuesta en donde se puede observar la intersección de las cuadrículas representantes del tiempo y la temperatura respectivamente. el punto de máximo rendimiento es de 3.8% a una temperatura de 32.19 oC (-0.390244) y un tiempo de 17.08h (-0.152439).

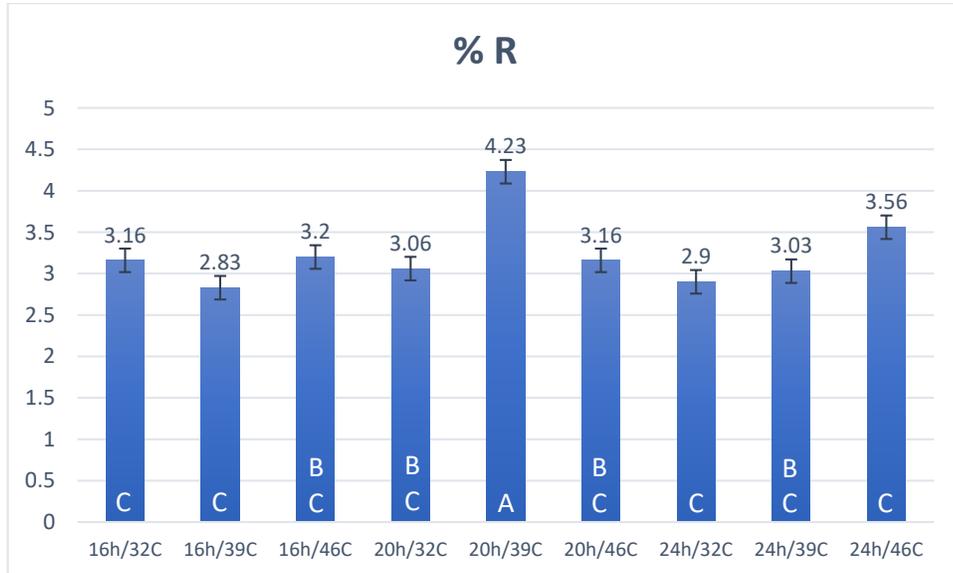
Se realizó un nuevo experimento considerando los resultados del DSR utilizando tres tiempos (16, 20 y 24 h) y tres temperaturas (32, 39 y 46 °C). Estas variables fueron seleccionadas a partir del análisis de los datos del experimento preliminar para el tratamiento de extracción por maceración (Cuadro 3).

Al realizar el análisis factorial completo para revisar las interacciones entre los diferentes niveles de las variables tiempo y temperatura en el sistema, con una probabilidad de 0.0027 se encontró que por lo menos hay una combinación que genera una diferencia significativa entre las medias analizadas. Evaluando tiempo y temperatura de manera individual, es posible observar que la temperatura ($p=0.124$), no tuvo un aporte significativo mientras que el tiempo tiene efecto significativo ($p=0.0405$), lo cual indicaría que la diferencia proviene de las variaciones e interacciones de este factor; sin embargo, la probabilidad no permite una alta significancia estadística, por lo que hay que tomar este resultado con precaución (Figura 10).; Puede observarse

que en la interacción entre el tiempo y la temperatura con la combinación 20h/39 °C se obtuvo un 4.23±0.19% de rendimiento, superando así el 3.8%, prospectado por la MSR, aunque aún es menor en comparación con lo reportado por Valencia (2019), probablemente debido a la proporción de materia/solvente que este autor utilizó para la maceración.

Cuadro 3. Condiciones y resultado de DSR y factorial para el tratamiento de maceración.

Condiciones de experimentación resultado de DSR	Factor tiempo h (3 niveles)	16, 20, 24
	Factor temperatura °C (3 niveles)	32, 39 y 46
Factorial completo	Mejor interacción	Tiempo 20h Temperatura 39°C
Respuestas de Nueva Experimentación por factorial completo	Rendimiento Máximo	4.23±0.19%



*Los tratamientos con letras diferentes indican diferencia estadística significativa, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Figura 10. Valores %R de la comparación de medias para la interacción de tiempo y temperatura de maceración ±(0.19 E.E)

7.1.2 ULTRASONIDO

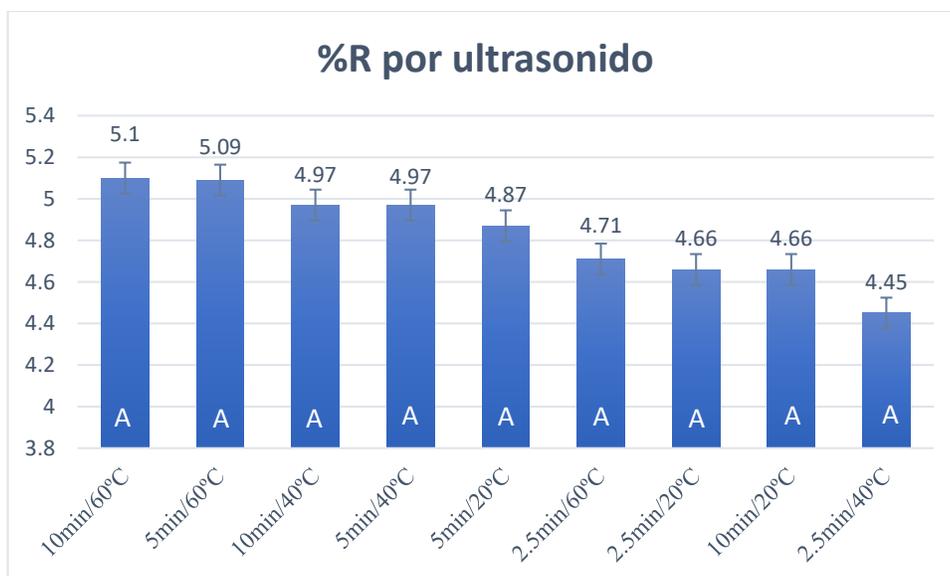
Se realizó la extracción por ultrasonido, utilizando tres niveles de tiempo y tres de temperatura (Cuadro 4). Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis factorial completo el cual mostró que la interacción entre temperatura de 60 °C por 10min de tratamiento de extracción tuvo un $5.11 \pm 0.16\%R$; sin embargo, de acuerdo con la probabilidad obtenida (> 0.146), no hay diferencias significativas entre las medias de rendimiento obtenidas.

Analizando en lo particular los factores se puede observar que el tiempo ($p = 0.031$) provoca resultados estadísticamente distintos, en congruencia con la información obtenida con los datos provenientes del tratamiento por maceración; mientras que la temperatura no tuvo significancia en el %R obtenido para la extracción por ultrasonido.

Con base en el análisis de estos datos se puede indicar que la interacción temperatura y tiempo de mayor rendimiento fue 10 minutos a 60 °C con $5.1 \pm 0.16\%$ ($p=0.62$) (Figura 11), aunque según la comparación de medias con Tukey no existieron diferencias significativas entre las diferentes interacciones.

Tabla 4. Condiciones y resultados de la extracción por ultrasonido.

Condiciones de experimentación	Factor tiempo h (3 niveles)	2.5, 5 y 10min
	Factor temperatura °C (3 niveles)	20, 40 y 60 °C
Factorial completo	Mejor interacción	Tiempo 5min Temperatura 40 °C
Respuestas de Nueva Experimentación por factorial completo	Rendimiento Máximo	$5.1\% \pm 0.16$



*Los tratamientos con letras diferentes indican diferencia estadística significativa, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Figura 11. Valores de %R para las diferentes combinaciones de tiempo y temperatura para la extracción por ultrasonido (± 0.16 E.E)

7.2 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

7.2.1 MACERACIÓN

Se realizaron pruebas preliminares para determinar la actividad antioxidante de la corteza de encino de la especie *Q. crassifolia*, para ello las muestras se maceraron de acuerdo con la metodología descrita a 3 diferentes tiempos y tres diferentes temperaturas (12, 18 y 24h) y (20, 40 y 60 °C) (Cuadro 5).

Los datos obtenidos fueron analizados por DSR con el fin de obtener el punto de máxima Actividad Antioxidante de acuerdo con las predicciones del modelo con las interacciones de los factores del sistema.

7.2.1.1 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (DPPH)

La reducción del DPPH produce un cambio de color en las muestras, de tener un color morado viran a un color amarillo, los resultados de las mediciones de actividad antioxidante en los extractos obtenidos por maceración de la corteza de *Q. Crassifolia* fueron expresados en mg Equivalentes de ácido gálico/g (mgEAG/g) y porcentaje de Actividad antioxidante (%AA).

Se analizaron los datos del estudio preliminar por medio de DSR. En la figura 12 se muestra la gráfica de perfilador de contornos A) y B) grafica tridimensional por DSR, en la que se indica la combinación de factores en donde se encuentra el punto de máxima respuesta 16.48h (-0.2525) y 37.22°C. (-0.1387) con la de mayor %AA siendo este de 82.39.

Cuadro 5. Condiciones y resultados del DSR en extracción por maceración.

Condiciones de experimentación preliminares	Tiempo codificado h	13 (-1), 18(0), 24(-1)
	Temperatura codificada °C	32 (-1), 39(0) y 46(1)
Resultado de DSR	Punto de máximo rendimiento	Tiempo 16.48h (-0.2525) Temperatura 37.22 °C. (-0.1387)
Prospecto	%AA	82.39%

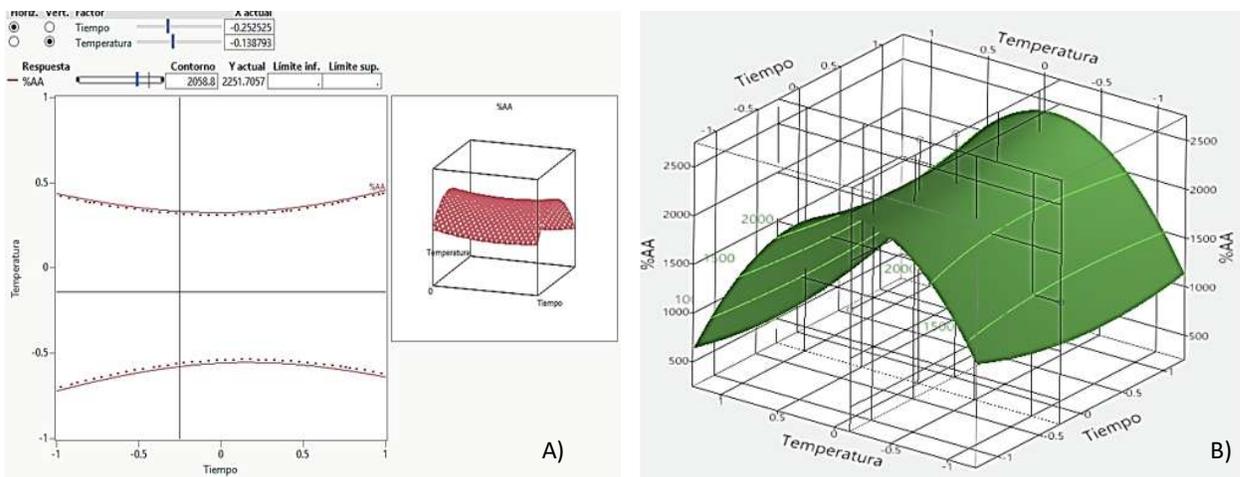


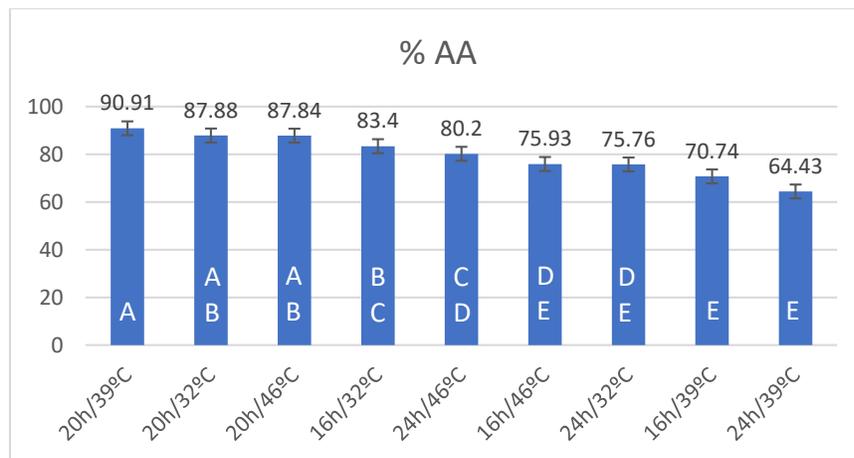
Figura 12. Perfilador de contorno y gráfico tridimensional de la superficie de respuesta en donde se puede observar la intersección de las cuadrículas representantes del tiempo y la temperatura respectivamente. el punto de máximo rendimiento es de 2251.70 mgEAG/gr con un 82.39% AA, (-0.2525) para tiempo y (-0.1387).

Se realizó un nuevo experimento para la determinación de actividad antioxidante por medio de la reducción del DPPH con los tiempos y temperaturas sugeridos por el análisis de los datos preliminares por medio del DSR para la extracción por maceración (16, 20 y 24h) y (32, 39 y 46 °C). En el Cuadro 6 se muestran las condiciones y resultados de esta parte del experimento.

Se obtuvieron 3250mgEAG/g con un 90.91 de %AA a una temperatura de 39 °C y 20h de maceración. Con los datos obtenidos se realizó un análisis factorial completo con una probabilidad ($p < 0.0001$). Se observa que al comparar las medias de las interacciones entre los factores de los que depende la respuesta de %AA, por lo menos una de ellas tiene diferencias significativas. En la Figura 13- Se presentan los valores comparados por Tukey, donde la combinación de 20h/39 °C fue la de mayor de rendimiento 90.91 ± 1.8 en porcentaje.

Cuadro 6. Condiciones y resultados del análisis factorial completo del segundo tratamiento por maceración.

Condiciones de experimentación	Factor tiempo h (3 niveles)	16, 20, 24h
	Factor temperatura °C (3 niveles)	32, 39 y 46
Factorial completo	Mejor interacción	Tiempo 20h Temperatura 39°C
Respuestas de Nueva Experimentación por factorial completo	Rendimiento Máximo	90.91±1.8%



***Los tratamientos con letras diferentes indican diferencia estadística significativa, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)**
Figura 13. Valores de %AA con las diferentes combinaciones de tiempo y temperatura para la extracción por maceración. (± 1.8 E.E)

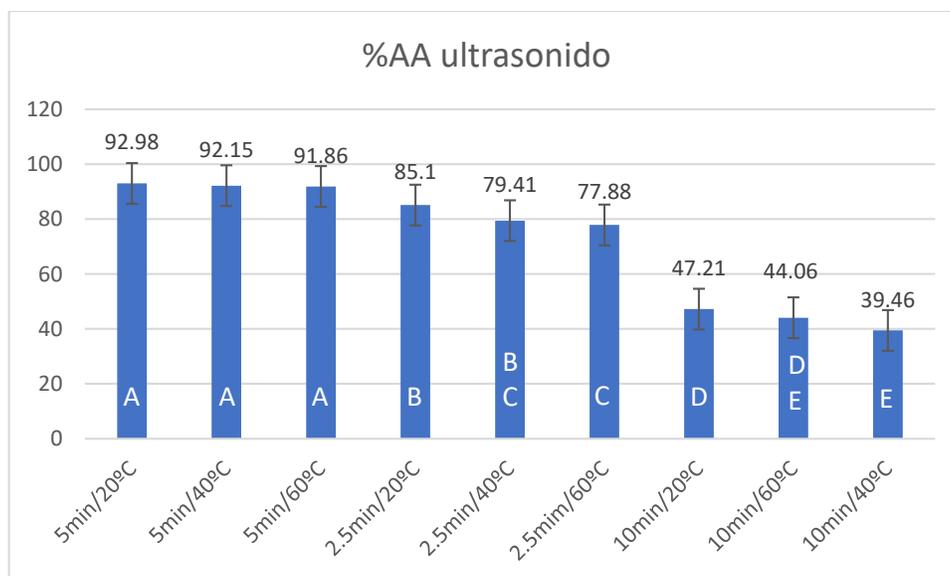
7.2.2 ULTRASONIDO

Se realizó el análisis de los datos obtenidos por ultrasonido para la determinación del %AA por DPPH, en donde se observó que el mayor %AA fue de 92.99 ± 1.3 el cual se encontró a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un tiempo de 5min. Se presentan en la Cuadro 7 las condiciones y resultados de la extracción por ultrasonido.

Se analizaron los datos con un diseño factorial completo, mostrándose que tanto la temperatura como el tiempo tuvieron influencia en la respuesta del %AA ($p < 0.0001$). En la Figura 14 se muestra la comparación de medias realizada con la prueba de Tukey, incluyendo las interacciones entre tiempo y temperatura. Es posible observar que existieron diferencias significativas dando como resultado una combinación con resultado máximo de 99% de AA por inhibición del radical DPPH a los $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5min.

Cuadro 7. Condiciones y resultados del análisis factorial completo del tratamiento por ultrasonido para %AA

Condiciones de experimentación preliminares	Factor tiempo h (3 niveles)	2.5, 5 y 10min
	Factor temperatura $^{\circ}\text{C}$ (3 niveles)	20, 40 y $60\text{ }^{\circ}\text{C}$
Factorial completo	Mejor interacción	Tiempo 5min Temperatura $20\text{ }^{\circ}\text{C}$
Respuestas de Nueva Experimentación por factorial completo	Rendimiento Máximo	$92.99 \pm 1.3\%$



***Los tratamientos con letras diferentes indican diferencia estadística significativa, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)**
Figura 14. Valores de %AA con las diferentes combinaciones de tiempo y temperatura para la extracción por ultrasonido (± 1.3 E.E)

7.3 DETERMINACIÓN DE INHIBICIÓN DE RADICALES ABTS

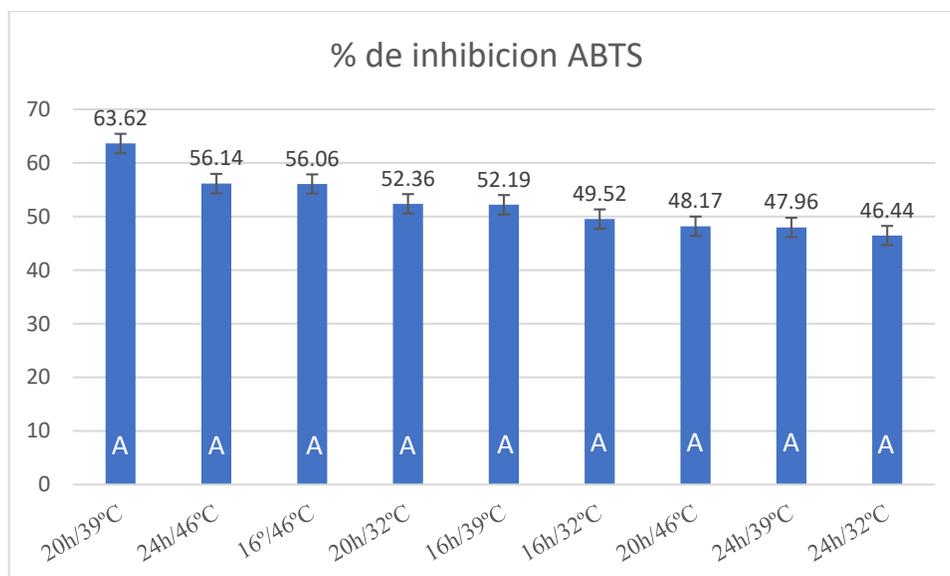
La determinación de la inhibición del radical ABTS permite la medición de la actividad antioxidante, distingue entre efectos aditivos y sinérgicos y se basa en la interacción entre los antioxidantes contenidos en el extracto de *Q. crassifolia* y el catión ABTS, el cual cambia de color morado característico a un color amarillo pálido. Las lecturas de absorbancia corresponden a la actividad antioxidante en los extractos obtenidos por maceración y ultrasonido de la corteza de *Q. crassifolia* y fueron expresados en mg Eequivalentes de ácido gálico/g (mgEAG/g) y porcentaje de actividad antioxidante (% de inhibición). No se realizó estudio preliminar de % de inhibición de ABTS.

7.3.1 MACERACIÓN

Se analizaron los datos del experimento de maceración a tres tiempos y tres temperaturas diferentes (16, 20 y 24h) y (32, 39 y 45 °C) por medio de un factorial completo. En el Cuadro 8 se presentan las condiciones y resultados del análisis por DSR para evaluar el % de inhibición del radical ABTS. Se observó que la probabilidad fue de ($p=0.115$), por lo que no hubo diferencias significativas en el análisis de varianza, y por lo tanto, no se observó un efecto en la interacción de los factores, tiempo y temperatura en los resultados del % de inhibición del radical ABTS. El mayor % de inhibición fue de 63.62 y se obtuvo en la combinación de 20h /39 °C lo que en referencia a los resultados obtenidos a %AA por inhibición de DPPH proyectan la misma combinación de factores. En la Figura 15, se muestran los valores de las medias comparadas de las interacción entre los factores, se puede observar que no hubo diferencia significativa entre ellas, es decir, no hay una combinación específica de optimización.

Cuadro 8. Condiciones y resultados del análisis de datos del % de inhibición del radical ABTS.

Condiciones de experimentación	Factor tiempo h (3 niveles)	16, 20, 24h	
	Factor temperatura °C (3 niveles)	32, 39 y 46	
Factorial completo	Mejor interacción	Tiempo 20h Temperatura 39 °C	
Respuestas de Nueva Experimentación por factorial completo	Rendimiento Máximo	63.62 ±3.8%	



***Los tratamientos con letras diferentes indican diferencia estadística significativa, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)**

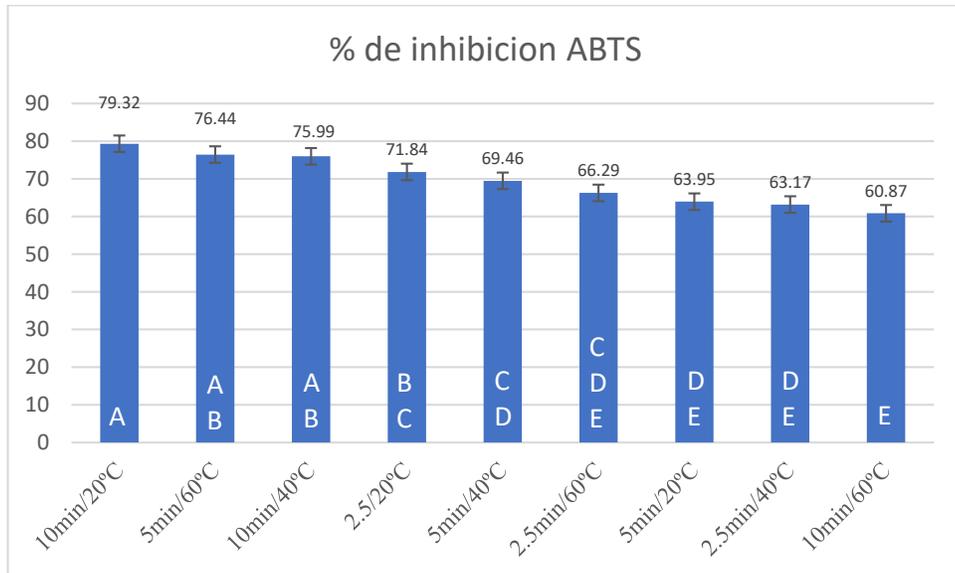
Figura 15. Valores de % de inhibición del radical ABTS con las diferentes combinaciones de tiempo y temperatura para la extracción por maceración (± 3.8 E.E)

7.3.2 ULTRASONIDO

Se realizó la extracción por ultrasonido en tres tiempos y tres temperaturas (Cuadro 9). El extracto obtenido fue analizado para determinar el % de inhibición del catión ABTS para el este método de extracción. Se pudo observar que existieron diferencias significativas en por lo menos una de las medias analizadas con una probabilidad de ($p < 0.0001$); el de mayor % de inhibición fue de 79.32 ± 1.3 con la combinación $20\text{ }^\circ\text{C}/10\text{ min}$. En la Figura 16 se observa que hubo diferencias significativas entre los extremos, sin embargo, entre los valores de mayor % de inhibición de ABTS no se observó diferencia significativa. Las combinaciones de tiempo y temperatura se pueden comportar de la misma manera, siendo el % de inhibición más alto de $79.32 \pm 1.3\%$ a una temperatura de $20\text{ }^\circ\text{C}$ y un tiempo de 10 min.

Cuadro 9. Condiciones y resultados del análisis de datos del % de inhibición del radical ABTS.

Condiciones de experimentación	Factor tiempo h (3 niveles)	2.5, 5 y 10min
	Factor temperatura °C (3 niveles)	20, 40 y 60 °C
Factorial completo	Mejor interacción	Tiempo 10 Temperatura 20 °C
Respuestas de Nueva Experimentación por factorial completo	Rendimiento Máximo	79.32±1.3%



*Los tratamientos con letras diferentes indican diferencia estadística significativa, de acuerdo con la prueba de Tukey.

Figura 16. Valores de % de inhibición del radical ABTS con las diferentes combinaciones de tiempo y temperatura para la extracción por ultrasonido (±1.3 E.E)

7.4 DETECCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

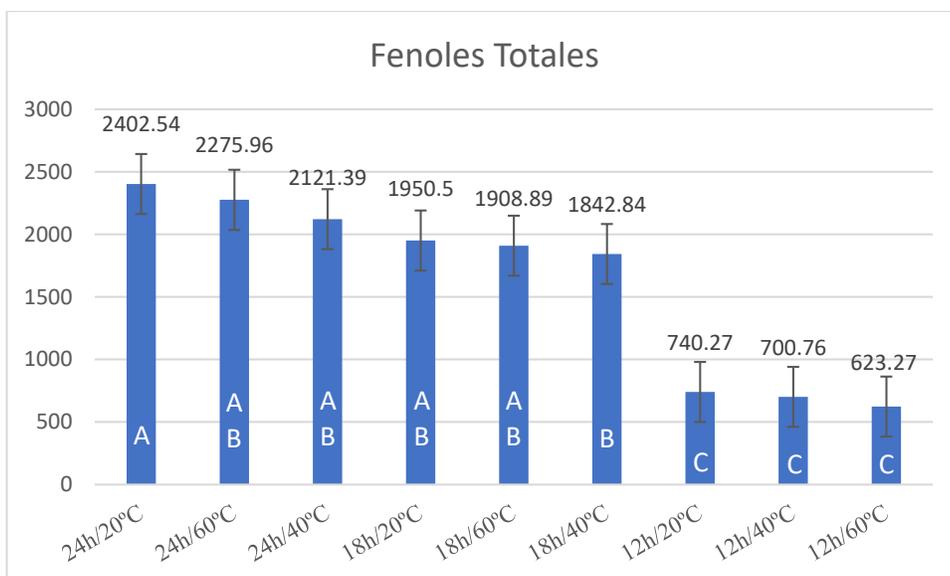
7.4.1 MACERACIÓN

Para la determinación de compuestos fenólicos totales se usaron muestras de la corteza de *Q. crassifolia* sometida a maceración a tres diferentes tiempos y tres diferentes temperaturas respectivamente (12, 18, 24 h) y (20, 40 y 60 °C), de acuerdo con la metodología descrita previamente. En el Cuadro 9 se muestran las condiciones y resultados del DSR para la obtención de compuestos fenólicos totales por maceración.

Los datos obtenidos indicaron que la mayor concentración de fenoles se encontró en la combinación de 60 °C/18h de maceración en etanol al 90% con 2402.54 mgEAG/g. En la Figura 17 se muestra la comparación de medias del análisis preliminar.

Cuadro 9. Condiciones y resultados para la recuperación de fenoles totales por maceración.

Condiciones de experimentación preliminares	Tiempo codificado h	14 (-1), 18(0), 24(-1)
	Temperatura codificada °C	32 (-1), 39(0) y 46(1)
Resultado de DSR	Punto de máximo rendimiento	Tiempo 23.85 h (0.976) Temperatura 43.17 °C (0.1585)
Prospecto	Fenoles totales	2200.9 mgEAG/g



***Los tratamientos con letras diferentes indican diferencia estadística significativa, de acuerdo con la prueba de Tukey.**

Grafico 17. Datos obtenidos en el estudio preliminar, de maceración para la recuperación de fenoles totales (± 110.19 E.E)

Los datos del análisis preliminar para la determinación de fenoles totales fueron usados para el análisis del DSR en el cual se indicó una combinación de los factores tiempo y temperatura en el que se puede encontrar un máximo de 1973.99 mgEAG/g de contenido de fenoles totales. El análisis obtenido del software, infiere que se debe llegar a una temperatura de 43 °C (0.1585) y tiempo de 24h (0.976). En la Figura 18 se aprecian las gráficas de contornos y el modelo en tercera dimensión del DSR, en donde se muestra en la región de operabilidad el punto óptimo para la obtención de fenoles totales equivalentes a 2200.9 mgEAG/g.

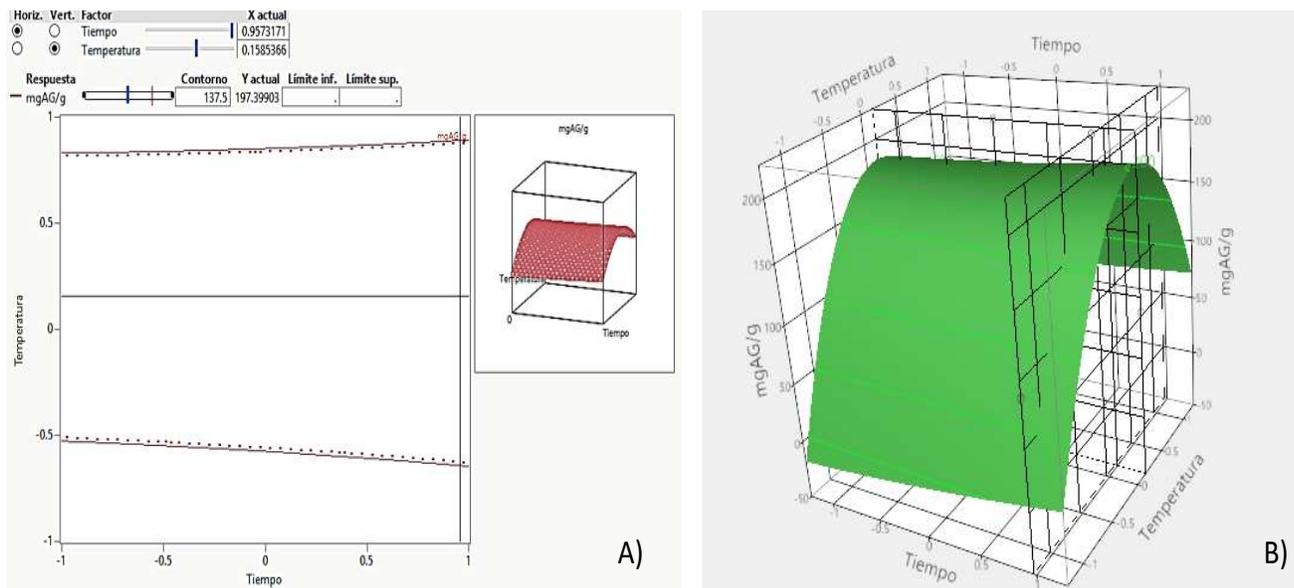


Figura 18. A) Perfilador de contorno y B) gráfico tridimensional de la superficie de respuesta en donde se puede observar la intersección de las cuadrículas representantes del tiempo y la temperatura respectivamente. el punto de máximo obtención de fenoles totales 1973.99 mgEAG/g extracto seco (0.9756) , (0.1585).

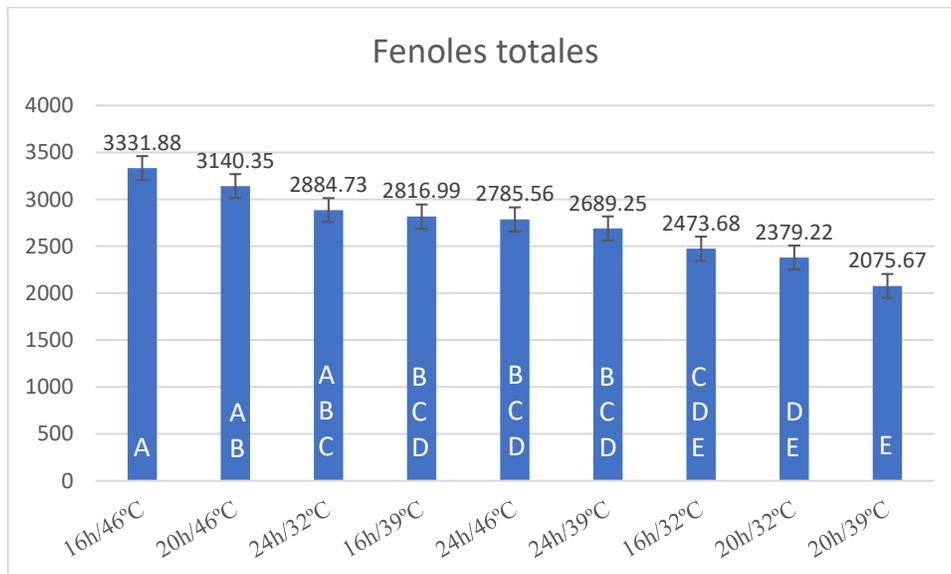
Se realizó un nuevo experimento para el tratamiento de maceración, en que se probaron tres tiempos y tres temperaturas de acuerdo a los datos recabados del análisis de DSR (16, 20 y 24h) y (32, 39 y 45 °C), respectivamente (Cuadro 10). Por medio del análisis factorial completo se observó que por lo menos alguna de las medias presentó diferencias significativas ($p < 0.0001$). En la Figura 19 se observan los valores de las medias comparadas de fenoles totales y el resultado de la prueba de Tukey.

La combinación de mayor recuperación se obtuvo con la combinación 16h/46 °C y fue de 3331.88 ± 97 mgEAG/gr de extracto seco, por lo que se supera el prospectado por el DSR de 1973.99 mgEAG/g. En comparación con lo reportado por Soto-Garcia (2016), quien evaluó el extracto de corteza *Q. sideroxylla* en maceración por 24h a una temperatura aproximada de 25 °C

(ambiente), con una proporción de 1/10 (masa/volumen) en una solución hidroetanólica al 80% y obtuvo un total de 592.97 mgEAG/g de extracto seco, lo recuperado en el presente trabajo con esa temperatura fue de 2738.91mgEAG/g de extracto seco, valor mayor que lo reportado por este autor, lo que puede explicarse porque se utilizaron diferentes especies de encino.

Cuadro 10. Condiciones y resultados para la recuperación de fenoles totales por maceración

Condiciones de experimentación	Factor tiempo h (3 niveles)	16, 20, 24h
	Factor temperatura °C (3 niveles)	32, 39 y 46 °C
Factorial completo	Mejor interacción	Tiempo 20h Temperatura 46 °C
Respuestas de Nueva Experimentación por factorial completo	Rendimiento Máximo	3331.88 ± 97 mgEAG/g



* Los tratamientos con letras diferentes indican diferencia estadística significativa, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Figura 19. Valores de fenoles totales de la interacción entre los factores para la extracción por maceración (± 97 E.E)

7.4.2 ULTRASONIDO

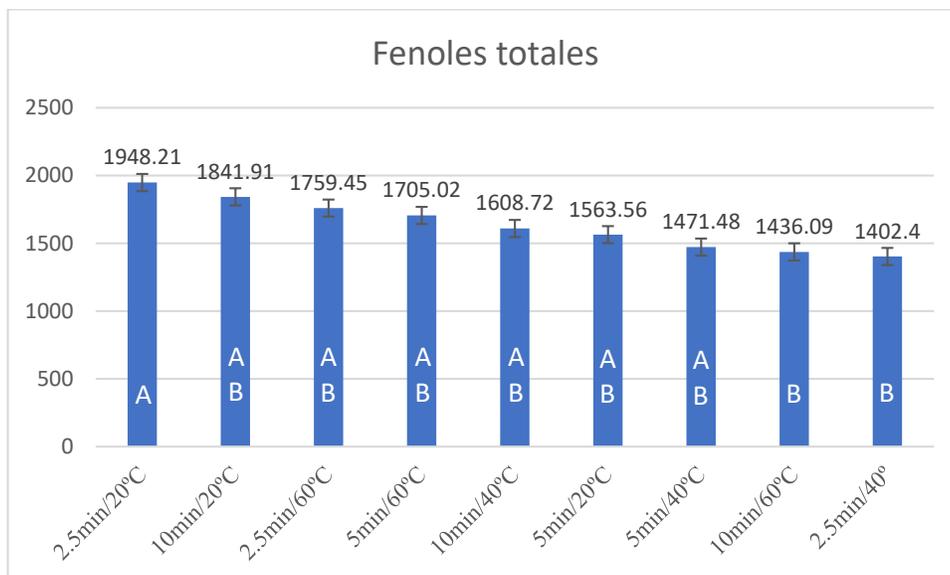
Se analizaron las mediciones obtenidas para la determinación de fenoles totales en el extracto por ultrasonido a tres tiempos (2.5, 5 y 10min) y tres temperaturas (20, 40 y 60 °C) (Cuadro 11) por medio de un diseño factorial completo en el que se obtuvo una probabilidad ($p < 0.0094$), lo que indica que por lo menos una de las medias presentó diferencia significativa.

Se observó que el factor tiempo tuvo una probabilidad ($p = 0.321$), indicativo que la variación en el sistema tuvo poco efecto del factor tiempo. Para la temperatura se ~~tiene~~ tuvo una probabilidad de ($p = 0.007$) por lo que se puede inferir que el factor temperatura sí es relevante para la recuperación de fenoles totales en el sistema.

Para corroborar lo anteriormente dicho se realizó una comparación de medias de las combinaciones de los factores por medio de una prueba de Tukey. En la Figura 20 se observan los valores de fenoles totales y la comparación de las medias de las interacción entre tiempo y temperatura. La combinación de mayor recuperación de fenoles totales fue 20 °C/2.5min con 1948.2 ± 97 mg EAG/g de extracto seco. Lo prospectado por el DSR para maceración fue de 2200.9 mgEAG/g, que puede ser comparable con lo obtenido por ultrasonido.

Cuadro 11. Condiciones experimentales y resultados para ultrasonido.

Condiciones de experimentación	Factor tiempo h (3 niveles)	2.5, 5 y 10min
	Factor temperatura °C (3 niveles)	20, 40 y 60 °C
Factorial completo	Mejor interacción	Tiempo 5min Temperatura 20 °C
Respuestas de Nueva Experimentación por factorial completo	Rendimiento Máximo	Se obtuvo 1948.2±97 mgEAG/g



* Los tratamientos con letras diferentes indican diferencia estadística significativa, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

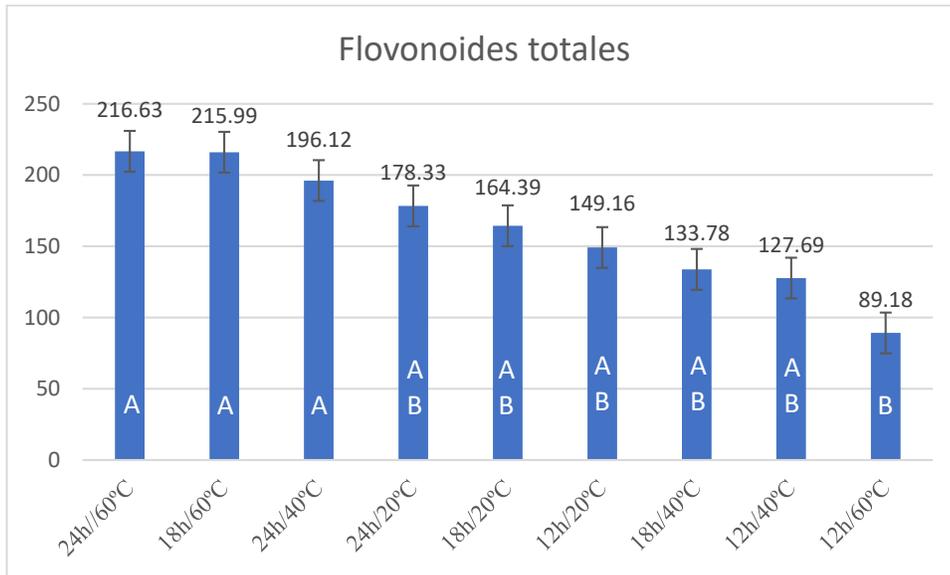
Figura 20. Valores de fenoles totales de la interacción entre los factores para la extracción por ultrasonido (± 97 E.E)

7.5 DETECCIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

7.5.1 MACERACIÓN

Los resultados de esta prueba preliminar fueron mayores a lo reportado por Valencia (2019), para un extracto por maceración de *Q. crassifolia*. Valencia (2019) reporta un valor de 43.59mgEQ/g de flavonoides totales en extracto crudo, mientras que los resultados obtenidos en

el presente trabajo arrojaron concentraciones de 216.63 ± 20.24 mgEQ/g de extracto seco, utilizándose en este estudio 12h y 60 °C en la extracción (Figura 21).



* Los tratamientos con letras diferentes indican diferencia estadística significativa, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Figura 21. Comparación de medias de la combinación de factores tiempo y temperatura de la extracción por ultrasonido para la determinación de fenoles totales (20.24 E.E).

Los resultados de los experimentos preliminares para la determinación de flavonoides fueron utilizados para realizar el análisis por DSR. En el cuadro 12 se muestran las condiciones y los resultados obtenidos de la DSR. El análisis indicó que la combinación de los factores de tiempo y temperatura en la que se puede lograr el punto máximo de obtención de flavonoides, el cual es en términos codificados (-0.1554), (0.2661), equivalente a 17.06h /45.22 °C. En la Figura 22 se presentan A) perfilador de contornos B) gráfico de superficie en tercera dimensión del DSR.

Tabla 12. Condiciones y resultados del análisis de los datos preliminares de la obtención de flavonoides totales para el tratamiento de maceración.

Condiciones de experimentación preliminares	Tiempo codificado h	15 (-1), 18(0), 24(-1)
	Temperatura codificada °C	32 (-1), 39(0) y 46(1)
Resultado de DSR	Punto de máximo rendimiento	Tiempo 17.58 h (-0.75) Temperatura 45.6 °C (0.268)
Prospecto	Flavonoides totales	162.5mgEQ/g

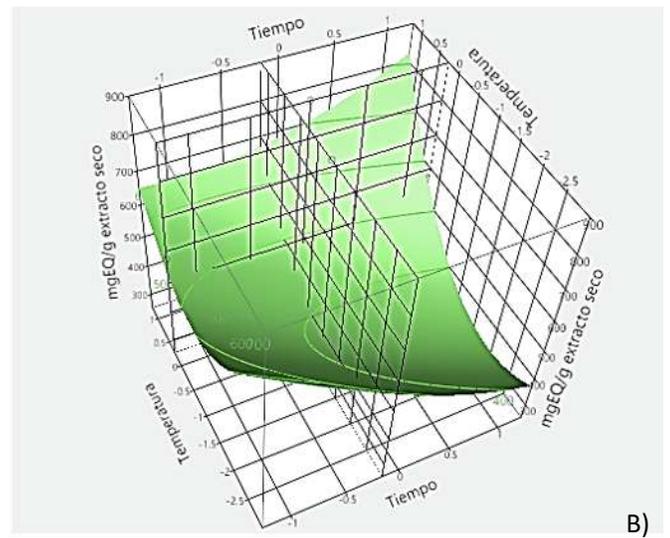
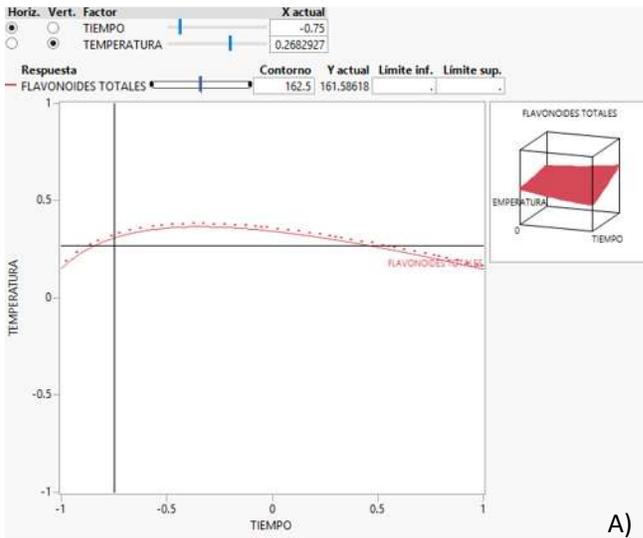


Figura 21. A) Perfilador de contornos B) gráfico tridimensional de la superficie de respuesta en donde se puede observar la intersección de las cuadrículas representantes del tiempo y la temperatura respectivamente punto de máximo obtención de flavonoides (-0.75), (0.268) respectivamente.

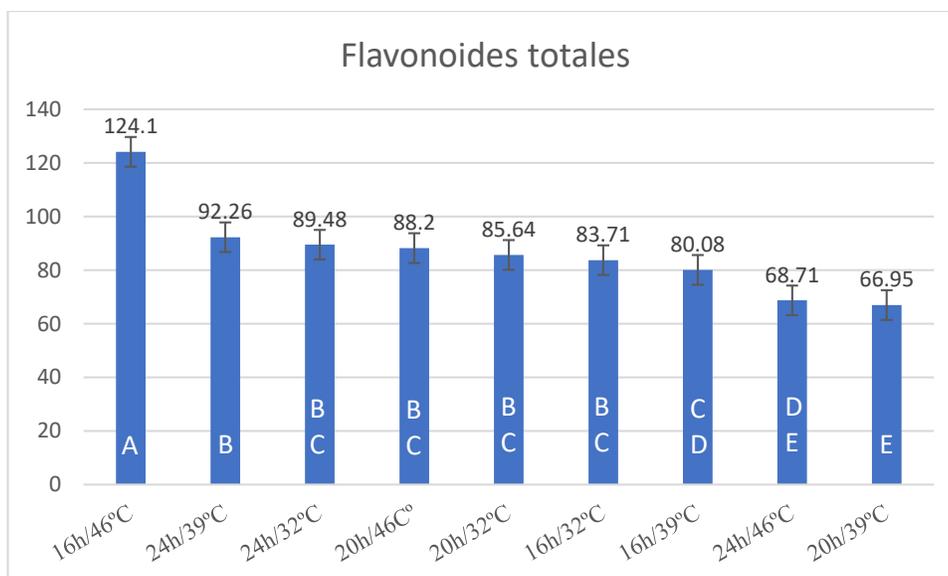
Se realizó un nuevo experimento, fijando nuevos valores para los factores tiempo (16, 20 y 24h) y temperatura (32, 39 y 46 °C), (Cuadro 13) de acuerdo con lo sugerido por el DSR para el tratamiento de maceración. Los resultados obtenidos de las lecturas de absorbancia para la determinación de flavonoides totales fueron analizadas como un diseño factorial completo para encontrar la mejor combinación de tiempo y temperatura para la mayor recuperación de flavonoides expresados en mgEQ/g de extracto seco \pm el error estándar.

Las comparación de medias con la prueba de Tukey para las interacciones, se puede observar que la combinación de 16h/46 °C es en donde se recupera una mayor cantidad de flavonoides $124.10 \pm 2.3\text{mgEQ/g}$ de extracto seco (Ffigura 23).

De acuerdo a lo reportado por Valencia-Avilés y col. (2018), quienes señalan un total de $14 \pm 3\text{mg EQ/g}$ de muestra seca, se observó que es una cantidad mucho menor a lo reportado en el presente trabajo. El tiempo que utilizaron Valencia-Avilés y col. (2018), fue de 24h con $\approx 25^\circ\text{C}$ (ambiente). La combinación de factores sugerida en nuestro estudio por el DSR es de un tiempo menor y una temperatura mayor, para encontrar el punto óptimo de recuperación de flavonoides totales.

Cuadro 13. Condiciones y resultados experimentales para maceración.

Condiciones de experimentación	Factor tiempo h (3 niveles)	16, 20, 24h
	Factor temperatura °C (3 niveles)	32, 39 y 46 °C
Factorial completo	Mejor interacción	Tiempo 20h Temperatura 46°C
Respuestas de Nueva Experimentación por factorial completo	Rendimiento Máximo	$124.10 \pm 2.3\text{mgEQ/g}$



* Los tratamientos con letras diferentes indican diferencia estadística significativa, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Figura 23. Valores de flavonoides totales de la interacción entre los factores para la extracción por maceración ($\pm 2.3E.E$)

7.5.2 ULTRASONIDO

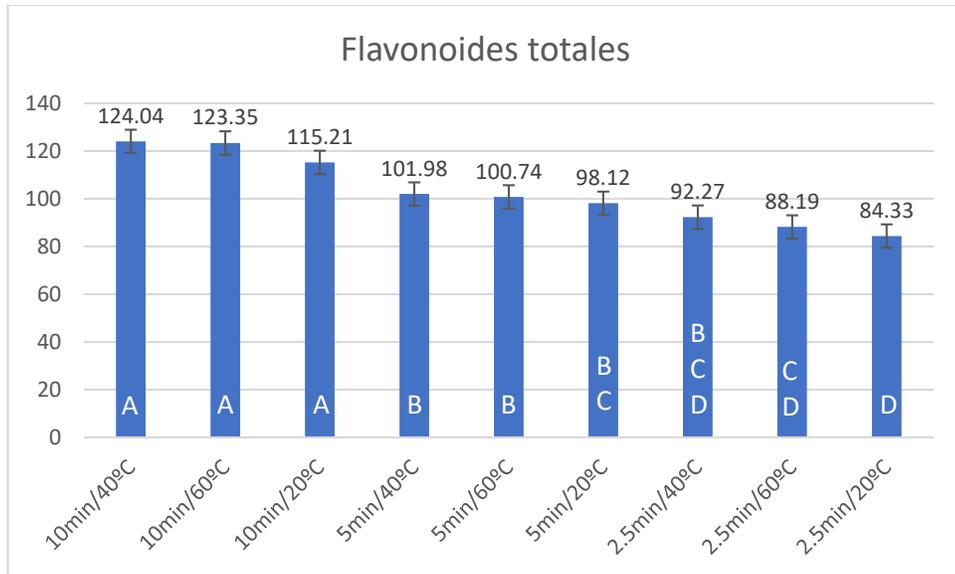
Se realizó la extracción por ultrasonido a tres tiempos y tres temperaturas (2.5, 5 y 10min) y (20, 40 y 60 °C) (Cuadro 14). Los datos obtenidos en estos experimentos se analizaron por medio de un modelo factorial completo para encontrar el punto de mayor obtención de flavonoides. Se encontraron diferencias significativas en el análisis de la varianza ($p < 0.0001$), con el tiempo y la temperatura influyendo en la variable respuesta. Con la prueba de Tukey para el factor tiempo, se obtiene que la mayor recuperación de flavonoides se alcanzó en 10min de tratamiento con 120mgEQ/g de extracto seco.

Se analizó de igual manera la temperatura, en donde se encontró que las temperaturas intermedia y alta no presentaron diferencias significativas, siendo la de 40 °C la de mayor recuperación de flavonoides totales con 120.87 mgEQ/g de extracto seco. Se realizó una comparación de medias para la interacción de los factores, con el fin de encontrar la combinación

que permitiera la mayor obtención de flavonoides totales expresados en mgEQ/g de extracto seco. En la Ffigura 24 se muestran los valores de las medias de las combinaciones de los factores, en donde se observa que las interacciones del tiempo de 10min con la temperatura intermedia de 40 °C y alta de 60 °C, fueron en las que se puede encontrar un mejor rendimiento de obtención de flavonoides. La combinación de 10min/40 °C arrojó un máximo de 124.04±2.5 mgEQ/g de extracto seco. La cantidad de flavonoides obtenidos por ultrasonido es consistente con los recuperados por maceración, sin embargo, no superan la cantidad prospectada por el DSR de 162.5mgEQ/g en extracto seco.

Cuadro 14. Condiciones experimentales y resultados para extracción por ultrasonido.

Condiciones de experimentación	Factor tiempo h (3 niveles)	2.5, 5 y 10min
	Factor temperatura °C (3 niveles)	20, 40 y 60 °C
Factorial completo	Mejor interacción	Tiempo 10min Temperatura 40°C
Respuestas de Nueva Experimentación por factorial completo	Rendimiento Máximo	124.04±2.5 mgEAG/g



* Los tratamientos con letras diferentes indican diferencia estadística significativa, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

Figura 24. Valores de flavonoides totales de la interacción entre los factores para la extracción por ultrasonido ($\pm 2.5E.E$)

8. CONCLUSIONES

- En cuanto al %R por maceración se pasó de un 3.8 prospectado por la MSR a un 4.23%.
- Por su parte el %R de el tratamiento por ultrasonido fue de 5.1% a una temperatura de 40 °C y un tiempo de 5 minutos, siendo esta una optimización del proceso y del rendimiento.
- Para la actividad antioxidante, el análisis por MSR aportó información para lograr la optimización de algunas de las variables respuestas como el porcentaje de actividad antioxidante que pasó de un máximo de 82.39% a un 90.91% (un 8.52% más de actividad antioxidante) en la extracción por maceración; mientras que para ultrasonido se pudo obtener un 92.99% de actividad antioxidante (un 10.6% más de actividad antioxidante con respecto a los datos preliminares de maceración y un 2.08% al dato de optimización) en sólo 5 minutos.
- En la cuantificación de fenoles totales para maceración se logró obtener 3331.88 mgEAG/g a una temperatura propuesta de 46 °C por 20h de maceración, lo que aumentó 1130.98mgEAG/g de extracto seco, lo que sugiere que se logró una optimización de los resultados en la extracción de fenoles totales.
- En cuanto a la extracción de fenoles totales por ultrasonido, se extrajeron 1948.2mgEAG/g de extracto seco a una temperatura de 20 °C con 5min de extracción, que con respecto a lo prospectado fue menor en 252.7mgEAG/g de extracto seco; aunque por el hecho de ahorrar considerable cantidad de tiempo puede ser una buena opción de extracción, pero no la óptima.
- En los experimentos realizados para la determinación del total de flavonoides extraídos por maceración de la corteza de *Q. crassifolia* se logró cuantificar un promedio de 124.1 mgEQ/g de extracto seco a una temperatura de 20h a 46 °C, que no fue distinto a lo obtenido

por ultrasonido, por lo que, en función del mucho menor tiempo requerido, se recomendaría el uso del ultrasonido.

- Los resultados del presente trabajo permiten establecer que al utilizar ultrasonido como método de extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante de la corteza de *Quercus crassifolia*, fue posible obtener una concentración similar o mayor a la obtenida con el método de maceración.

9. LITERATURA CITADA

Andrade-Andrade, G., Delgado-Alvarado, A., Herrera-Cabrera, B.E., Arévalo-Galarza, M.L., Caso Barrera, L. 2018. Variación de compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos en "*Vanilla planifolia*". *Agrociencia*, 52(1):55-66.

Arámbula-Salazar, J.A., Ibarra-Salinas, B.I., González-Laredo, R.F., Galindo-Muñoz, O.D., Hernández-Vela, H. 2010. Variación estacional de compuestos fenólicos foliares en *Quercus sideroxylla* en diferentes tipos de suelo. *Madera y Bosques*, 16(3):49-59.

Arizaga S., Martínez-Cruz, J., Cebrales-Salcedo, M., González-Bello, M.A. 2009. Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Pp. 10-41.

Azmir J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A. , Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafour, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. *J.-Food Engin*, 117; 426–436.

Azuola, R., Vargas, P. 2007. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en Marcha*, 20(4):30-40.

Bernhoft, A., 2010. A brief review on bioactive compounds in plants. In: Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, Norway.

Bravo, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56:317–333.

Brighente, I.M.C., Días, M., Verdi, L.G., Pizzolatti, M.G. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharm. Biol.* 45:156–161.

Chemat, F., Huma-E, Z., Karan- Khan. M. 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochem.*, 18:813–835
doi:10.1016/j.ultsonch.2010.11.023

Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. p. 564–582

De la Cruz-Tabón, A.N. 2015. Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo. Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para obtener al título de Magister en Innovación Alimentaria y Nutrición. 67-139.

Figuroa-Preciado, G. 2003. Optimización de una superficie de respuesta utilizando JMP. *Mosaicos Matemáticos*, 11:17-23

Flores-Morales, V., Castañeda-Hernández, O., Montiel Santillán, T., Hernández-Delgadillo, G. 2014. Análisis fotoquímico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Hemiphylacus novogalicianus*, una especie endémica de México. *Investigación y Desarrollo*, 63:18-23.

García-Pérez, M., Royer, M., Duque-Fernandez, A., Niokhor Diouf, P., Stevanovic, T., Pouliot, R. 2010. Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes. *J. Ethnopharm.*, 132:251–258. doi:10.1016/j.jep.2010.08.030

Izquierdo-Hernández, A. 2011. Estudio comparativo de cuatro métodos de extracción de compuestos fenólicos de bayas de *Vitis vinifera*. Tesis Disponible en <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/111142>

Luna-José, A.L., Montalvo-Espinosa, L., Rendón-Aguilar, B. 2003. Los usos no leñosos de los encinos en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 72:107-117. DOI: 10.17129/botsci.1671

Porras-Loaiza, A.P., Lopez- Malo, A. 2009. TSIA, Temas selectos de ingeniería de alimentos. 3-1: 121-134 Disponible en <https://tsia.udlap.mx/importancia-de-los-grupos-fenolicos-en-los-alimentos/>

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric Food Chemistry*, 53(10):4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>

Paulsen, B.S., 2010. Highlights through the history of plant medicine. In: Proceedings from a Symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, Norway.

Santhakumar, A.B., Battini, M., Álvares, J.M. 2018. Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. Pages 49-65. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.022>

Sasidharan S., Chen Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., Latha, Y.L., 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African J. Tradit. Complem. Alternat. Medic.* 8(1):1–10.

Scalbert, A., Monties, B., Janin, G. 1989. Tannins in wood: Comparison of different estimation methods. *J. Agric. Food Chem.*, 37:1324–1329.

Sharmila, G., Nikitha, V.S., Ilaiyarasi, S., Dhivyaa, K., Rajasekar, V., Manoj-Kumar, N., Muthukumar, K., Muthukumar, C. 2016. Ultrasound assisted extraction of total phenolics from *Cassia auriculata* leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 84:13–21 <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.010>

Smith, R.M., 2003. Before the injection modern methods of sample preparation for separation techniques. Department of Chemistry, Loughborough University, Loughborough, Leics, LE11 3TU, UK. Science direct, journal of chromatography A. 3-27. doi:10.1016/S0021-9673(03)00511-9

Sotero, V., Maco, M., Vela, J., Merino, C., Dávila, E., García, D. 2011. Evaluación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales amazónicos de la familia *Sterculiaceae*. *Revista de la sociedad química del Perú*. ISSN 1810-634X. Rev. Soc. Quím. Perú v.77 n.1 Lima ene./mar. 2011.

Soto-García, M., Rosales-Castro, M. 2016. Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus Sideroxylla*. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 8(4):701–714.

Tiaz, L., Zeiger, E., 2006. Secondary metabolites and plant defense. In: *Plant Physiology*, 4th ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, pp. 283–308 (Chapter 13).

Valencia-Avilés, E., García-Pérez, M.E., Garnica-Romo, M.G., Figueroa-Cárdenas, J.D., Méndez-Herrera, E., Salgado-Garciglia, R., Martínez-Flores, H.E. 2018. Antioxidant properties of polyphenolic extracts from *Quercus laurina*, *Quercus crassifolia*, and *Quercus scytophylla* bark. *Antioxidants* 2018, 7, 81. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox7070081>

Valencia, A.E. 2019. Efecto de la adición de aceite vegetal y nanocápsulas de un extracto polifenólico de corteza de *Quercus crassifolia* a un yogurt medidos en hámsteres dislipidémicos. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Pp 69-79

Valencia, A.S. 2004. Diversidad del género *Quercus* (*Fagaceae*) en México. *Bol. Soc. Bot. Méx.*, 75:33-53. DOI: 10.17129/botsci.1692

Xavier, L., Freire, M.S., Vidal-Tato, I., Gonzáles-Alvarez, J. 2015. Application of aqueous two phase systems based on polyethylene glycol and sodium citrate for the recovery of phenolic compounds from *Eucalyptus* wood. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 17(2):345-354.