



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL NANCHE (*Byrsonima crassifolia*), VARIEDAD ÁCIDA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

CRISANTO ROLDAN SABINO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ALMA XOCHIL AVILA ALEJANDRE

CO-DIRECTOR DE TESIS

DR. OMAR VIÑAS BRAVO

San Juan Bautista Tuxtepec, 2019



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2018/MB/141
ASUNTO	Jurado de examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 14 de diciembre de 2018

C. CRISANTO ROLDAN SABINO
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestria en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores:

Dra. Delia Esther Páramo Calderón	UNPA	Presidente
Dr. Julian Mario Peña Castro	UNPA	Vocal
Dra. Alma Xochil Avila Alejandre	UNPA	Secretario
Dr. Enrique Villalobos Amador	UNPA	1er Suplete
Dra. Agustina Rosa Andrés Hernández	BUAP	2do Suplente

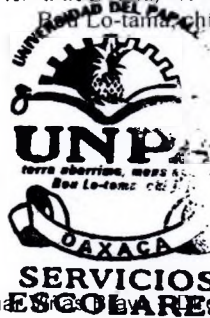
Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji ju



Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

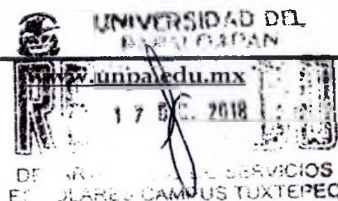


SERVICIOS ESCOLARES

M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo. **VICE-RECTORIA ACADEMICA**

C.c.p. Dra. Alma Xochil Avila Alejandre, Dr. Omar Rodríguez – Jefa y co-director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240



CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/121
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 14 de diciembre de 2018

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología del **C. Crisanto Roldan Sabino**, matrícula **16140013**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Estudio de la actividad antioxidante del Nanche (*Byrsonima crassifolia*), variedad ácida**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji ju



Dr. Adolfo López Torres

Jefe de la División de Estudios de Posgrado

Crisanto Roldan Sabino
14 dic 18

C.c.p. C. Crisanto Roldan Sabino
C.c.p. Archivo



CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759740

www.unpa.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria,
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

A Maru y Yan, Gene y Nao. A bebé Franco y Leo.

Esperando llegar a ustedes, siempre.

RECONOCIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**), por la beca otorgada con el número de apoyo: **458281**.

A la universidad del Papaloapan, por las facilidades brindadas durante el desarrollo del presente proyecto.

Al M en BE Alejandro Hernández López, por su asesoría técnica en los experimentos y en la escritura de la tesis.

AGRADECIMIENTOS

A los integrantes del jurado, la Dra. Delia E. Páramo, el Dr. Julián Peña, el Dr. Enrique Villalobos y la Dra. Agustina Andrés, por revisar el trabajo escrito, exponer sus observaciones y recomendaciones para mejorarlo. Al Dr. Oscar Abelardo, quien formó parte del comité tutorial, siempre exponiendo sus recomendaciones.

Al M en BE Alejandro Hernández López, por su valiosa asesoría, atinada dirección, sus consejos y recomendaciones a lo largo de la realización del presente proyecto.

Al Dr. Omar Viñas, por sus consejos y disposición en la revisión del escrito.

De forma especial, a la Directora de este trabajo, la Dra. Alma Xochil Avila Alejandre. Por la confianza depositada en mí, como estudiante, para realizar este proyecto de investigación, por su disposición en tiempo, esfuerzo, paciencia y recursos para finalizar la presente tesis.

A Karen, Michell, Felipe, Erick, Key, Guadalupe, Daniel, Misael. Por su amistad, compañerismo y apoyo.

Brenda, gracias, por tanto.

A Victoria y mis Padres por su apoyo incondicional.

Con sinceridad,

Crisanto

Productos académicos

Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en: el X Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, XXI congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica y XVI Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular del COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS A.C.

Se publicó como artículo de investigación original en la revista científica internacional: JOURNAL OF BIOENGINEERING AND BIOMEDICINE RESEARCH (JBBR), con ISSN: 2594-052X, editada por el COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS A.C. (ANEXO, pg. 1)

ABSTRACT

Plants have been used by humans to satisfy basic needs such as food, clothing, health and housing. They also represent a source of important metabolites to traditional medicine. *Byrsonima crassifolia*, is a plant species, that has been used to treat and cure many diseases, as ailments, nutritional source or combustible material. However, there are not enough scientific reports about its biological activities, the existing ones focus on agroforestry management, in contrast, other countries have conducted ethnopharmacological research. Therefore, it is important to attend the study of its biotechnological potential.

In the present work it was proposed to analyze the antioxidant potential of leaves and bark of a variety of *Byrsonima crassifolia*, whose peculiarity is to produce acid fruits. The method of extraction with solvents assisted with ultrasound, was modified, adding a pressing process to increase extraction yields. As a result, a method for obtaining antioxidant compounds was established, with up to 22.55 % yield, compared to the 24-h maceration method, that yields only 8 % solids. Additionally, it was determined that the optimum time to obtain extracts was 5 and 20 min for leaves and bark, respectively.

In addition, it was determined that the antioxidant activity is not affected by varying the sonication times (5, 20, 40 and 50 min). The analysis of the antioxidant activity showed that this activity was concentrated in the ethanolic extract, finding IC_{50} values between 8 and 9 $\mu\text{g/mL}$ over DPPH radical. Such activity is distributed between polar and non-polar compounds. In addition, total phenol contents of 0.5 mg GAE/mg of ES in leaves and greater than 0.65 in bark were determined. Quercetin 3- β -O-D-glucopyranoside, isorhamnetin-rutinosyl-glucoside, rutin, isorhamnetin, and a compound with R_f values similar to isoquercetin or caffeic acid were tentatively identified and can be considered as compounds responsible for antioxidant activity.

In this work it was demonstrated that *Byrsonima crassifolia*, acid variety, presents an important biotechnological potential, for which it can be used in: research, food production processes, chemistry and pharmacology because it is recognized as a potential source of metabolites.

RESUMEN

Las plantas han sido utilizadas por el ser humano para cubrir necesidades básicas como la alimentación, vestido, salud y vivienda. También representan una fuente de metabolitos importantes en la medicina tradicional. *Byrsonima crassifolia*, es una especie vegetal, que en México se ha utilizado para tratar y curar numerosos padecimientos, como fuente nutricional o material combustible. Sin embargo, no hay suficientes reportes científicos sobre actividades biológicas de la planta, los reportes existentes, se centran en el manejo agroforestal. En otros países se ha realizado investigación etnofarmacológica.

En el presente trabajo se planteó estudiar el potencial antioxidante de las hojas y la corteza de una variedad de *Byrsonima crassifolia*, cuya particularidad es producir frutos ácidos. Para lo cual, se modificó el método de extracción con disolventes asistido con ultrasonido, añadiendo el proceso de prensado para incrementar los rendimientos de extracción. A sí mismo, se emplearon 3 disolventes diferentes para una extracción por agotamiento en polaridad descendente. Como resultado se obtuvo un rendimiento de 22.55 %, de una extracción con etanol, en comparación con el método de maceración por 24 h, con el cual sólo se logró extraer un 8 % de sólidos. Adicionalmente, se determinó que el tiempo óptimo de sonicación para la obtención de estos extractos fue de 5 y 20 min para las hojas y la corteza, respectivamente. En cuanto a los rendimientos con diclorometano y hexano, fueron menores al 1.5 %.

El análisis de la actividad antioxidante de los extractos mostró que la mayor actividad se concentraba en el extracto etanólico. Por lo cual los estudios posteriores se realizaron únicamente en este extracto. La actividad antioxidante no es afectada por variar los tiempos de sonicación (5, 20, 40 y 50 min), encontrándose valores de IC₅₀ de entre 8 y 9 µg/mL sobre el radical DPPH. Tal actividad se distribuyó entre compuestos polares y no polares. Además, se determinó que el contenido de fenoles totales fue de 0.5 mg GAE/mg de ES de las hojas, mientras que, en la corteza, se observaron valores mayores a 0.65 mg GAE/mg de ES. Se identificó de manera tentativa la quercetina 3-β -O-D-glucopiranosido, la isorhamnetina-rutinosil-glucósido, la rutina, la isorhamnetina, y un compuesto con valores de R_f similares a la

isoquercetina o al ácido cafeico. Los cuales pueden considerarse como compuestos responsables de actividad antioxidante.

En este trabajo, se demostró que *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, presenta potencial biotecnológico, ya que produce compuestos con capacidad antioxidante, por lo cual, puede ser empleado en la industria de los alimentos, la química, farmacéutica, entre otros.

CONTENIDO

ABSTRACT	IX
RESUMEN	X
CONTENIDO.....	XII
LISTA DE FIGURAS	XV
LISTA DE TABLAS.....	XVII
ABREVIATURAS	XVIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 METABOLITOS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO	4
2.1.1 Fenoles.....	5
2.1.2 Terpenos	7
2.1.3 Glicósidos.....	8
2.1.4 Alcaloides.....	8
2.2 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO.....	9
2.2.1 Cromatografía en capa fina	11
2.3 TÉCNICAS NO CROMATOGRÁFICAS.....	13
2.3.1 Reconocimiento de alcaloides.....	13
2.3.2 Reconocimiento de flavonoides	13
2.4 RADICALES LIBRES	14
2.4.1 Clasificación y mecanismos de generación de radicales libres	14
2.5 ESTRÉS OXIDATIVO	17
2.6 ANTIOXIDANTES	18
2.6.1 Clasificación y mecanismos de acción de los compuestos antioxidantes	18
2.7 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	21
2.7.1 Método del DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	22
2.7.2 Método del ABTS• ⁺ (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico))	23
2.8 OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS	24
2.8.1 Extracción por disolventes	25
2.8.2 Extracción asistida por ultrasonido	26

2.9 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS	27
2.10 <i>Byrsonima crassifolia</i>	29
2.10.1 Taxonomía de <i>Byrsonima crassifolia</i>	29
2.10.2 Distribución geográfica de <i>Byrsonima crassifolia</i> e importancia económica en México ...	33
2.10.3 Usos de <i>Byrsonima crassifolia</i>	35
2.10.4 Propiedades biológicas de <i>Byrsonima crassifolia</i>	36
2.10.4.1 Actividad antimicrobiana	37
3. ANTECEDENTES DE <i>Byrsonima crassifolia</i>	38
3.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	38
3.2 OTRAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS	38
3.3 FITOQUÍMICA DE <i>Byrsonima crassifolia</i>	39
4. JUSTIFICACIÓN	42
5. OBJETIVOS	43
5.1 OBJETIVO GENERAL	43
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	43
6. MATERIALES Y MÉTODOS	44
6.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	44
6.2 REACTIVOS	45
6.3 PROCESOS DE EXTRACCIÓN	45
6.3.1 Maceración	45
6.3.2 Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido y prensado (UPAE)	46
6.3.3 Extracción líquido-líquido y separación por TLC	47
6.4 ANÁLISIS DIGITAL DE PLACAS CROMATOGRÁFICAS	48
6.5 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	48
6.5.1 Cromatografía en capa fina (TLC)	48
6.5.2 Ensayo del DPPH•	48
6.6 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	49
6.6.1 Ensayo del DPPH•	49
6.6.2 Ensayo del ABTS• ⁺	49
6.7 FITOQUÍMICA PRELIMINAR	50
6.7.1 Determinación de flavonoides por TLC	50

6.7.2 Determinación de alcaloides mediante reactivo de Dragendorff.....	50
6.8 FITOQUÍMICA CUANTITATIVA	50
6.8.1 Cuantificación de fenoles totales (Folin-Ciocalteu)	50
6.8.2 Cuantificación de alcaloides totales.....	51
6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	51
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
7.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE ÓRGANOS DE <i>Byrsonima crassifolia</i> , VARIEDAD ÁCIDA.....	52
7.2 HARINA DE HOJAS Y CORTEZA DE <i>Byrsonima crassifolia</i> , VARIEDAD ÁCIDA.....	53
7.3 COMPARACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO Y PRENSADO CON LA EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN.....	54
7.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50.....	58
7.4.1 Actividad antioxidante preliminar por TLC.....	58
7.4.2 Determinación de la IC ₅₀	60
7.4.3 Análisis de compuestos antioxidantes por su polaridad.....	66
7.4.4 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ABTS• ⁺	67
7.5 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES (FOLIN-CIOCALTEU)	69
7.6 FITOQUÍMICA PRELIMINAR DE FLAVONOIDES EN PLACAS DE TLC	71
7.7 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES TOTALES	73
8. CONCLUSIONES.....	77
9. PERSPECTIVAS	78
10. REFERENCIAS	79
11. ANEXO.....	92

Lista de Figuras

Figura 1. Compuestos fenólicos.....	6
Figura 2. Estructura básica de los flavonoides.....	7
Figura 3. Compuestos terpénicos	7
Figura 4. Compuesto glucosidado	8
Figura 5. Ejemplo de compuestos de la familia de los alcaloides	9
Figura 6. Proceso de formación de especies reactivas de oxígeno	15
Figura 7. Representación esquemática de la formación de radicales libres de oxígeno	16
Figura 8. Mecanismos de acción de los compuestos antioxidantes por transferencia de electrón e hidrógeno	20
Figura 9. Reacción de reducción del radical DPPH (DPPH•) por antioxidantes.....	23
Figura 10. Reacción de reducción del radical catiónico ABTS (ABTS• ⁺) por antioxidantes.	23
Figura 11. Distribución geográfica de <i>Byrsonima crassifolia</i> en América	29
Figura 12. Estructuras vegetales de <i>Byrsonima crassifolia</i>	30
Figura 13. Parámetros considerados para la caracterización morfológica de las hoja de <i>Byrsonima crassifolia</i>	32
Figura 14. Estados productores de nanche (<i>Byrsonima crassifolia</i>) en la República Mexicana ...	34
Figura 15. Porcentaje de rentabilidad de la producción total agrícola de <i>Byrsonima crassifolia</i> en el estado de Oaxaca.....	35
Figura 16. Diagrama experimental	44
Figura 17. Proceso de extracción del material vegetal de <i>Byrsonima crassifolia</i> , variedad ácida.	47
Figura 18. Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> , variedad ácida	52
Figura 19. Fruto e inflorescencia de <i>Byrsonima crassifolia</i> , variedad ácida.....	53
Figura 20. Harina de hojas y de corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> , variedad ácida	53
Figura 21. Eficiencia de la extracción, asistiendo con diferentes tiempos de ultrasonicación y prensado (método UPAE) o maceración usando etanol	57
Figura 22. Determinación semicuantitativa de la actividad antioxidante preliminar	59
Figura 23. Efecto de la concentración del Tween 80 sobre la absorbancia a 517 nm.....	61
Figura 24. Determinación espectrofotométrica de la actividad antioxidante a extractos etanólicos de la UPAE de hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> ,variedad ácida	62
Figura 25. Determinación espectrofotométrica de la actividad antioxidante a extractos etanólicos de la UPAE de hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> ,variedad ácida	62

Figura 26. Efecto de la concentración de extractos de las hojas y la corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> , variedad ácida, sobre el porcentaje de inhibición del radical DPPH	64
Figura 27. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox de extractos etanólicos, con tiempos de sonicación de 5 y 20 min en hoja y corteza respectivamente.....	68
Figura 28. Contenido de fenoles totales en hoja y corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> , variedad ácida, de extractos etanólicos obtenidos mediante la UPAE	69
Figura 29. Contenido de fenoles totales en hoja y corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> , variedad ácida	71
Figura 30. Detección de flavonoides mediante TLC a 254 y 365 nm.....	72
Figura 31. Identificación de flavonoides mediante TLC a 254 nm	73
Figura 32. Determinación cualitativa de alcaloides en extractos etanólicos de <i>Byrsonima crassifolia</i> , variedad ácida, mediante el método de Dragendorff.....	75
Figura 33. Determinación de alcaloides totales en extractos etanólicos de hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> , variedad ácida.....	76

Lista de Tablas

Tabla 1. Metabolitos secundarios en plantas superiores	5
Tabla 2. Clasificación de los radicales libres	16
Tabla 3. Clasificación de los métodos para determinar la actividad antioxidante	22
Tabla 4. Ventajas y desventajas de los métodos de extracción.	28
Tabla 5. Rendimientos de las extracciones etanólicas de las hojas y la corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> , variedad ácida, mediante la UPAE y maceración por 24 h	55
Tabla 6. Rendimientos de las extracciones con diclorometano y hexano, de las hojas y la corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> , variedad ácida, mediante la UPAE	55
Tabla 7. Porcentaje de inhibición y concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀) sobre el radical DPPH, de los extractos etanólicos de las hojas y corteza a diferentes tiempos de ultrasonicación.	63
Tabla 8. Porcentaje de inhibición y concentración inhibitoria 50 sobre el radical DPPH, de los extractos con diclorometano de las hojas y corteza a diferentes tiempos de ultrasonicación.	65
Tabla 9. Porcentaje de inhibición y concentración inhibitoria 50 sobre el radical DPPH, de los extractos hexánicos de las hojas y corteza a diferentes tiempos de ultrasonicación.....	65
Tabla 10. Evaluación de la distribución de los compuestos con actividad antioxidante en placas de TLC, empleando ImageJ	67
Tabla 11. Posibles compuestos de la familia de los flavonoides, localizados mediante un análisis de imagen, a partir de valores de R _f	72

ABREVIATURAS

A Asc	Ácido ascórbico
AAPH	2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ABTS•	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BHA	Butyl hidroxy anisole
BHT	Butyl hidroxy toluene
CAT	Catalasa
CERAC	Ce (IV)-based reducing capacity
CHROMAC	Chromium reducing antioxidant capacity
CUPRA	Cupric reducing antioxidant power
CYP450	Citocromo P450
DCM	Diclorometano
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DPPH•	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical
EPR	Electron paramagnetic resonance
ES	Extracto seco
ExDCM	Extracto de diclorometano
ExETOH	Extracto etanólico
ExHEX	Extracto hexánico
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
G6PDH	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
GAE	Gallic acid equivalents
GC	Gas chromatography
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación peroxidasa
HAT	Hydrogen atom transfer
OMS	Organización mundial de la salud
ONOO	Peroxinitrato
ONOO-	Peroxinitrito
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PBS	Phosphate buffered saline
PG	Propyl gallate
QE	Quercetin equivalents

R_f	Ratio to the front
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNS	Radical nitrogen species
ROS	Radical oxygen species
SET	Single electron transfer
SO	Monóxido de azufre
SOD	Superóxido dismutasa
TEAC	Trolox antioxidant equivalent capacity
TLC	Thin layer chromatography
UAE	Ultrasound assisted extraction
UPAE	Ultrasound and pressing assisted extraction
UV	Radiación ultravioleta
UVB	Radiación ultravioleta de onda media (315-280 nm)
VCEAC	Vitamin C equivalent antioxidant capacity

1. INTRODUCCIÓN

El ser humano a lo largo de su historia ha empleado productos naturales para prevenir y tratar diversas dolencias y enfermedades. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80 % de la población mundial utiliza remedios tradicionales basados en plantas para la atención primaria de su salud (Rates, 2001). Así mismo, los microorganismos, hongos macroscópicos y animales, o fracciones de éstos, han sido utilizados para contrarrestar infecciones, reacciones de inflamación, para cicatrizar, desinfectar y/o como antisépticos, entre otros usos (Chin *et al.*, 2006; Dias y Roessner, 2012; Brusotti *et al.*, 2014). Estos ‘depósitos’ de compuestos naturales o principios bioactivos son la materia prima de una amplia fuente de conocimiento etnofarmacológico, el cual forma parte de la llamada medicina tradicional. De acuerdo con su definición, la medicina tradicional no solo trata del conocimiento sobre las plantas medicinales, sino que, además: “comprende la suma total de las prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias, obtenidas por ensayo y error, propias de diferentes culturas, utilizadas en la prevención, diagnóstico, mejoramiento o tratamiento de enfermedades físicas y mentales con el objetivo de mantener la salud” (OMS, 2017).

Los registros etnobotánicos señalan la importancia de los efectos terapéuticos de las plantas medicinales o partes de éstas, ya sean hojas, corteza, frutos, flores, raíces, semillas, entre otros, las cuales han sido empleadas de diferentes formas como: frescas o preparadas en infusiones, en polvo o en decocciones, mediante extracciones con alcohol y como aceites o bálsamos; para el uso o la obtención de los agentes bioactivos. Para la industria farmacéutica, el desarrollo de nuevos fármacos es necesario, sin embargo, tal proceso es complejo, lento, costoso y con un alto índice de incertidumbre en cuanto a su eficacia. Las alternativas químicas no han sido completamente exitosas, por lo que se han promovido investigaciones en las prácticas medicinales que han formado base de la mayoría de los primeros medicamentos, seguido de estudios clínicos, farmacológicos y químicos. Tal enfoque resulta ser eficaz en el descubrimiento de nuevas entidades químicas con potencial farmacológico, este tipo de investigación se denomina investigación fitoquímica basada en etnofarmacología (Škrovánková *et al.*, 2012).

Además de representar una fuente de componentes químicos (precursores de principios activos) y sustancias activas con algún efecto farmacológico, las plantas, son una fuente importante de nutrientes como vitaminas y aceites esenciales. También se consideran importante para la industria de los alimentos o de cosméticos, debido a su composición de moléculas antioxidantes y antimicrobianas, colorantes, saborizantes o aromas. En los últimos años, la demanda de productos naturales ha incrementado sobre los productos sintéticos, en este sentido, las plantas, se han popularizado como un recurso natural para la obtención de satisfactores en el área médica o de alimentos (Rozin *et al.*, 2004). Se ha descrito que existen numerosos beneficios del uso de plantas medicinales sobre la salud, como la prevención de enfermedades crónico degenerativas, cardiovasculares o el cáncer. Estos beneficios se han relacionado con la presencia de compuestos antioxidantes presentes en las plantas, que como señalan diversos estudios, retrasan la oxidación de moléculas que provocarían daño celular.

Rates (2001) menciona que el 80 % de los fármacos derivados de las plantas están relacionados con su objetivo etnofarmacológico original (medicamento tradicional). Los estudios de productos bioactivos implican como primer paso, la obtención de las plantas, seguida de procesos de extracciones específicos para un grupo de compuestos que se pretende estudiar, los cuales pueden ser volátiles o no volátiles. Actualmente, destacan mecanismos que asisten las metodologías tradicionales de extracción como el uso de disolventes, por ejemplo: la ultrasonificación, micro-extracción en fase sólida, extracción con fluido supercrítico, entre otros. Estos métodos alternativos de extracción buscan disminuir la contaminación y eficientar el proceso de extracción (Azuola y Vargas, 2007; Huie, 2002).

Para desarrollar el presente trabajo, se realizó una modificación del método de extracción convencional asistido con ultrasonido agregando un proceso de prensado, con la finalidad de incrementar la eficiencia de extracción. La fuente vegetal empleada fue *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, una especie perenne cuyos reportes etnofarmacológicos señalan su amplio uso en la medicina tradicional. En México, se han establecido líneas de investigaciones agroforestales, siendo pocos trabajos logrados en el estudio de actividad biológica. En países de Sudamérica como Brasil, la tendencia es hacia estudios fitoquímicos y farmacológicos. En este contexto, se reconoce la importancia de estudiar el potencial biotecnológico que puede presentar *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, como una fuente de productos naturales. Por

lo cual, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad antioxidante de extractos obtenidos mediante un método de extracción asistido por ultrasonido.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Metabolitos de interés biotecnológico

Son llamados metabolitos secundarios aquellos productos intermediarios del metabolismo de las plantas, cuya función principal no se relaciona directamente con su crecimiento o desarrollo, es decir, no participan en procesos como la fotosíntesis, respiración, síntesis de carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos u otros. Este grupo de moléculas tienen un papel muy importante en la adaptación de las plantas a su medio; entre una gran diversidad de funciones se incluyen: señalización, cofactores enzimáticos, atrayentes o defensa contra insectos, entre otros (Bourgaud *et al.*, 2001; Sepulveda *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2014; Tiwari y Rana, 2015). El ser humano ha aprovechado a estos intermediarios secundarios para obtener diferentes satisfactores. Hoy en día, además de representar fuentes únicas de fármacos (antibióticos, antifúngicos y antivirales), los metabolitos secundarios también tienen funciones como aditivos alimentarios y de materiales industriales, como las resinas, gomas, entre otros (Ávalos y Pérez, 2009; Vaishnav y Demain 2011; Lopez-Romero *et al.*, 2016).

Los metabolitos secundarios son característicos de un género, familia e incluso una especie, es decir, no todas las plantas producen todos los metabolitos estudiados hasta ahora, también son órgano-tejido específicos. Tales compuestos pueden clasificarse en función de su estructura química, su composición, su solubilidad en diversos disolventes o la vía por la que se sintetizan. Con base en su estructura química, se clasifican en metabolitos nitrogenados y no nitrogenados (**Tabla 1**) (Bourgaud *et al.*, 2001; Ávalos y Pérez, 2009; Wink, 2010 y Ndam *et al.*, 2014).

Tabla 1. Metabolitos secundarios en plantas superiores (Modificado de Wink *et al.*, 2010).

TIPO DE METABOLITOS	NÚMERO ^A
NITROGENADOS	
ALCALOIDES	21000
AMINOÁCIDOS NO PROTEÍCOS (NAAS)	700
AMINAS	100
GLUCÓSIDOS CIANOGENÍCOS	60
GLUCOSINOLATOS	100
ALCAMIDAS	150
LECTINAS, PÉPTIDOS, POLIPÉPTIDOS	2000
NO NITROGENADOS	
MONOTERPENOS (C10)	25000
SESQUITERPENOS (C15)	5000
DITERPENOS (C20)	2500
TRITERPENOS, ESTEROIDES, SAPONINAS (C30, C27)	5000
TETRATERPENOS (C40)	500
FLAVONOIDES, TANINOS	5000
FENILPROPANOIDES, LIGNINAS, CUMARINAS, LIGNANOS	2000
POLIACETILENOS, ÁCIDOS GRASOS, CERAS	1500
POLICÉTIDOS	750
CARBOHIDRATOS, ÁCIDOS ORGÁNICOS	200

A: denota número aproximado de estructuras.

2.1.1 Fenoles

Los compuestos fenólicos, fenoles o polifenoles (**Figura 1**) son sustancias que en su composición estructural contienen un grupo fenol, un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo; también se les conoce como fenoles o fenilpropanoides y son derivados de las vías de pentosas fosfatos, ácido Shiquimico y fenilpropanoides, en plantas. Comprenden un grupo amplio de moléculas que van desde las más sencillas como los ácidos fenólicos a la de un polímero complejo de alto peso molecular como pueden ser los taninos y ligninas (Balasundram *et al.*, 2006). Son de interés debido a sus propiedades antioxidantes, las cuales dependen de la estructura, en particular del número y de las posiciones de los grupos hidroxilo y de la naturaleza de las sustituciones en los anillos aromáticos (Foti, 2007; Lü *et al.*, 2009). Las frutas y verduras son las principales fuentes de compuestos fenólicos en la dieta humana; algunos han sido asociados con actividad antimicrobiana, mientras que otros, como el ácido

cafeico han sido reportados como reguladores del crecimiento vegetal o compuestos que otorgan resistencia contra patógenos (Ovodov, 2010).

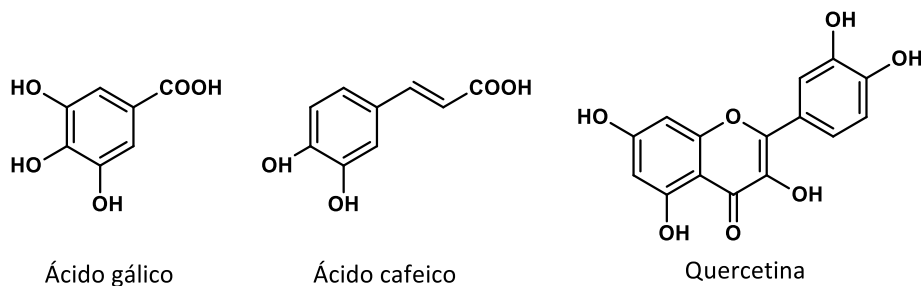


Figura 1. Ejemplos de compuestos fenólicos. Se observa que tienen en común un grupo fenol con uno o más grupos hidroxilos.

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos puede atribuirse a los dos factores siguientes:

1. Su facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre.
2. La posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático.

Por poseer una estructura química ideal para captar iones metálicos (principalmente divalentes, como el hierro (II) y cobre (II) y, por lo tanto, para inhibir la formación de radicales libres a través de reacciones tipo Fenton, actuando como un agente quelante (Rice-Evans, 2001; Shahidi, 2015).

Los flavonoides son un grupo de moléculas perteneciente a la familia de los fenoles, constan de 15 átomos de carbono dispuestos en la configuración C6-C3-C6 compartiendo un esqueleto común, compuesto por dos radicales fenilos (anillo A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (**Figura 2**). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Aherne *et al.*, 2002). En las últimas décadas, los flavonoides han resultado de particular interés por las diversas actividades biológicas que presentan, por ejemplo: actividad antimicrobiana, antifúngica y bactericida. También se ha demostrado que presentan inhibición de la oxidación de lipoproteínas y que pueden modular el proceso de carcinogénesis, a través de un efecto antiproliferativo (Martínez *et al.*, 2002).

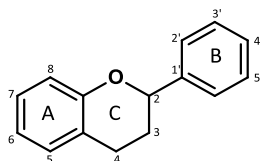


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides. Se muestran los dos radicales fenilos (anillo A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) y sistema de numeración (Aherne *et al.*, 2002).

La existencia de oxidantes endógenos y exógenos, por un lado, y los sistemas de neutralización conocidos como antioxidantes naturales, han traído un amplio interés en todas las disciplinas de investigación, desde la química y la biología celular hasta las ciencias de la salud. En este contexto, es relevante el estudio de nuevas fuentes vegetales con potencial antioxidante.

2.1.2 Terpenos

Los terpenoides son un grupo de hidrocarburos de origen vegetal con fórmula general $(C_5H_8)_n$, así como sus derivados oxigenados, hidrogenados y deshidrogenados (**Figura 3**). Son compuestos de cadena abierta o cíclicos insaturados que tienen uno o más dobles enlaces.

Todos son solubles en disolvente orgánico y usualmente insolubles en agua, la mayoría de ellos son ópticamente activos, se oxidan fácilmente casi por todos los agentes oxidantes, generalmente se producen en las plantas superiores y son sustancias volátiles que se les asocia a la fragancia de las flores. Se presentan ampliamente en las hojas y frutos. Muchos compuestos terpénicos son de interés comercial debido a su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética. Por otra parte, se ha reportado que los compuestos terpenoides tienen actividad anticarcinogénica, antiulcerosa, contra la malaria, antimicrobianas, entre otras (Yadav *et al.*, 2014).

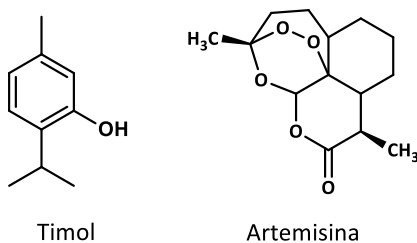


Figura 3. Ejemplos de compuestos terpénicos (Wink, 2010).

2.1.3 Glicósidos

Los glicósidos son metabolitos secundarios que contienen un compuesto de carbohidrato unido por un enlace éter a un núcleo no carbohidrato (aglicona) (**Figura 4**) y generalmente se le asocia al sabor amargo. Cuando el tejido de la planta está dañado, como por marchitamiento, congelación, masticación o pisoteo la aglicona se libera por acción enzimática. Los glicósidos se clasifican de acuerdo con la estructura del constituyente aglicona (núcleo), los de mayor importancia en la nutrición humana y animal incluyen saponinas, glucosinolatos, glucósidos cianogénicos, glucósidos cardíacos y glicoalcaloides. A estos compuestos se les han reportado propiedades de regulación de la actividad cardíaca, antibiótica, colerética y colagoga, balsámica, rubefaciente y antirreumática (Cheeke, 2001).

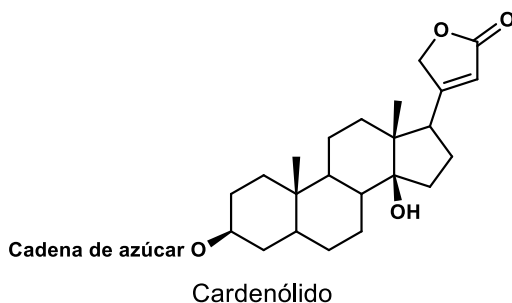


Figura 4. Ejemplo de un compuesto glucosidado (Wink, 2010).

2.1.4 Alcaloides

Los alcaloides son compuestos químicos naturales que contienen al menos un átomo de nitrógeno básico en un anillo heterocíclico (**Figura 5**). Los alcaloides son producidos por una gran variedad de organismos, incluyendo bacterias, hongos, plantas y animales. El nombre deriva de la palabra alcalino y se debe a la base que contiene nitrógeno. La mayoría son incoloros, sólidos cristalinos, ópticamente activos, levorrotatorios con excepción de la cinchonina y la laudanosina (Shamsa *et al.*, 2008), se pueden encontrar en hojas, flores, frutos, semillas, cortezas y raíces, pero existen principalmente en plantas con flores (Arango, 2008). Algunos alcaloides conocidos como la nicotina, la quinina, la cocaína y la morfina, son reconocidos por sus cualidades tóxicas o medicinales, se les asocia con funciones de defensa, hormonal y alelopáticas (Sepulveda *et al.*, 2004; Loyola *et al.*, 2004; Amirkia 2014).

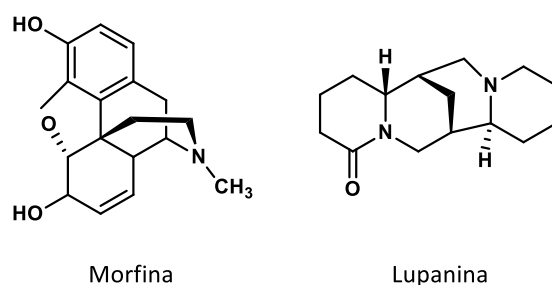


Figura 5. Ejemplo de compuestos de la familia de los alcaloides (Wink, 2010).

2.2 Identificación y caracterización de metabolitos de interés biotecnológico

Los metabolitos secundarios obtenidos de los extractos de las plantas, se distribuyen como complejas matrices y en bajas concentraciones. Para recuperarlos, purificarlos e identificarlos, se requiere de métodos cromatográficos o no cromatográficos.

La cromatografía es un método analítico que permite identificar compuestos mediante su separación entre una fase móvil y una fase estacionaria. A través de un proceso de adsorción-desorción, las sustancias a separar son atraídas a la fase estacionaria y retenidos mediante fuerzas intermoleculares lo que provoca un desplazamiento más lento de las moléculas que son adsorbidas de aquellas que no lo son, a través de la fase móvil y a lo largo de la fase estacionaria. Por lo tanto, se puede considerar que una cromatografía permite una distribución de compuestos entre la fase móvil y la fase estacionaria mediante un equilibrio dinámico entre las muestras disueltas en la fase móvil y las adsorbidas en la fase estacionaria (Pagni, 2003; Tistaert *et al.*, 2011; Coskun, 2016). Se consideran tres métodos cromatográficos importantes en la separación y purificación de las moléculas químicas.

- *La cromatografía líquida (LC)*, también llamada cromatografía en columna, se usa para separar compuestos de baja volatilidad; se puede realizar con un amplio rango de cantidades de muestra, desde unos pocos microgramos y hasta 10 g o más. La mayoría de la cromatografía de líquidos se lleva a cabo bajo condiciones de partición, es decir, que un soluto se divide entre dos disolventes inmiscibles utilizados para la separación. En la cromatografía líquida, la fase estacionaria es un adsorbente sólido con un recubrimiento líquido, empaquetado en una columna. Un disolvente de elución sirve como fase móvil que se desplaza por efecto de la gravedad y consiste en un compuesto líquido puro o una solución de líquidos. La naturaleza de

la fase estacionaria no polar o polar, permite la separación de compuestos polares o relativamente no polares respectivamente. Este último mecanismo de separación se considera como cromatografía de fase reversa. La gravedad permite el desplazamiento del disolvente de elución en dirección descendente en la columna. La separación se produce por interacciones selectivas entre la fase estacionaria y la fase móvil. Las polaridades relativas de estas dos fases determinan el orden en que los compuestos en la muestra se eluyen de la columna (Pagni, 2003; Buszewski y Noga, 2016).

- *La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)* permite que los análisis se completen rápidamente con una separación y sensibilidad superiores en comparación con otros métodos de cromatografía líquida. Es una de las técnicas de separación analítica más utilizadas. Se emplean cantidades pequeñas de muestras en el orden de microgramos y se usa a menudo para el análisis de mezclas, puede usarse para compuestos volátiles y no volátiles. Sin embargo, debido a su alto costo y exigentes requisitos instrumentales, lo hacen más accesible para los laboratorios de química orgánica (Pagni, 2003; Thammana, 2016).

- *Cromatografía de gases (GC)*, también conocida como cromatografía de gases y líquidos (GLC). Es una cromatografía de partición que permite el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas orgánicas volátiles, con una gran capacidad de separar las mezclas complejas, para lo cual son adsorbidas en la fase estacionaria. Sin embargo, se limita solo a los grupos de compuestos con un valor alto de presión de vapor que les permite transportarse a lo largo de la columna GC, también requiere de estándares para identificación de muestras. La fase estacionaria es un líquido no volátil con alto punto de ebullición, el cual reviste el interior de la columna capilar en forma de película dejando un canal a través del cual se desplaza la fase móvil y moléculas de la muestra. La fase móvil es un gas inerte, el cual no compite contra la fase estacionaria por los compuestos que se analizan, simplemente transporta (arrastra) a la muestra en estado de vapor. En el puerto de inyección la muestra es inyectada, a partir de ahí se vaporiza y es transportada por la fase móvil (gas acarreador) y al adherirse en la fase líquida de acuerdo a la solubilidad de los componentes de la muestra empieza la separación de las mismas. La separación dependerá de la atracción relativa hacia la fase estacionaria y de su presión de vapor. A mayor presión de vapor de un compuesto, mayor volatilidad y menor

punto de ebullición, mayor tendencia a pasar de la fase líquida a la fase gaseosa móvil (Pagni, 2003).

2.2.1 Cromatografía en capa fina

La *Cromatografía en capa fina* (TLC), es una técnica de análisis cualitativo ampliamente utilizado, simple, económico, rápido y eficiente, y solo requiere miligramos de material para su realización. Permite el análisis de la mayoría de los compuestos orgánicos sólidos no volátiles. Es útil para determinar el número de compuestos en una mezcla y ayuda a establecer si dos compuestos son idénticos (Pagni, 2003; Tistaert *et al.*, 2011; Coskun, 2016).

La capa fina, refiere a una capa delgada de adsorbente, que sirve como fase estacionaria. Se encuentra adherida a una superficie plana, la cual puede ser una placa de vidrio, metal o plástico. La fase móvil es un disolvente puro o una mezcla de disolventes, cuya composición apropiada depende de las polaridades de los compuestos en la mezcla que se está separando. El análisis de TLC, empieza cuando una pequeña cantidad de la mezcla que se separará, se disuelve en un disolvente adecuado y se aplica o mancha sobre el adsorbente cerca de un extremo de una placa de TLC. Posteriormente, la placa se coloca en una cámara cerrada, con el borde más cercano al punto aplicado sumergido en una capa poco profunda de la fase móvil. El disolvente se eleva a través de la fase estacionaria por acción capilar, parte del proceso conocido como desarrollo del cromatograma. A medida que el disolvente asciende por la placa, la muestra se distribuye entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuanto más estrechamente se une un compuesto al adsorbente, más lentamente se mueve en la placa de TLC (Pagni, 2003).

Placas para cromatografía en capa fina

El gel de sílice es el adsorbente más utilizado en una cromatografía en capa fina para los compuestos orgánicos. Cuando se realiza la TLC en fase reversa, la sílice es modificada, se reemplazan los grupos hidroxilos normalmente unidos a los átomos de silicio con grupos alcoxi y con grupos alquilo de cadena larga. La fase estacionaria líquida es no polar y los disolventes utilizados en TLC de fase inversa son bastante polares, como metanol o acetonitrilo, a menudo mezclados con agua. Existen placas de gel de sílice con respaldo de plástico, un polímero de

poliéster resistente a los disolventes. También están disponible placas con un respaldo de vidrio o aluminio, útiles cuando se requiere calentar la TLC para revelar ciertos compuestos (Pagni, 2003).

El óxido de aluminio (alúmina), también se puede usar como un adsorbente polar. La celulosa es menos polar que el gel de sílice y la alúmina, se utiliza para separar compuestos altamente polares; solubles en agua, como azúcares, aminoácidos y derivados de ácidos nucleicos. La cromatografía en papel es un ejemplo del uso de celulosa como fase estacionaria (Pagni, 2003).

Técnicas de visualización

Los compuestos que emiten color son visibles inmediatamente en las placas de cromatografía al ser separadas, en cuanto a los compuestos incoloros requieren métodos indirectos de visualización. Generalmente, se emplea fluorescencia como primer recurso, lo cual implica el uso de adsorbentes que contienen un indicador fluorescente. El indicador inorgánico insoluble hace que la visualización sea sencilla. Cuando la salida de una lámpara ultravioleta de longitud de onda corta (254 nm) se utiliza para iluminar el lado adsorbente de la placa en una habitación oscura o en una caja oscura, la placa emite luz fluorescente y los compuestos separados aparecen como manchas oscuras en el campo de visualización (Pagni, 2003; Sherma, 2018).

Por otro lado, las placas de TLC de vidrio o aluminio se pueden sumergen brevemente en soluciones de visualización que contienen los reactivos que reaccionan para formar compuestos coloreados al calentarse o rociar con la solución de visualización. Tres soluciones comunes de visualización son *p*-anisaldehído, vainillina y ácido fosfomolibdico. Otra forma de visualizar compuestos orgánicos utiliza su absorción de vapor de yodo (I_2). La solución del DPPH•, también se ha empleado como agente revelador en placas de sílica gel de compuestos con actividad antioxidante (Pagni, 2003; Sharif y Al-kayali, 2016).

Cuantificación en placas de TLC

La cuantificación en placas de TLC se realiza predominantemente por densitometría, sin embargo, el análisis de imagen en lugar de densitometría de barrido por hendidura continúa siendo ampliamente reportado cada año. Las imágenes se pueden generar con un teléfono

móvil o un escáner UV, estación de lámpara UV, cámara digital y densitómetro. En cuanto al análisis de la imagen, se puede realizar con Microsoft Paint, Sorbfil TLC Videodensitometer, UN-SCAN-IT, JustTLC, Image J, TLSee y el software Gimp (Tistaert *et al.*, 2011, Sherma, 2018).

2.3 Técnicas no cromatográficas

Las técnicas no cromatográficas son ensayos de cribado o tamizaje fitoquímico, permiten la posibilidad del aislamiento e identificación de diferentes tipos de compuestos, las cuales son realizados a partir de un extracto total o extracto crudo.

2.3.1 Reconocimiento de alcaloides

Los alcaloides son compuestos básicos, contienen nitrógeno en un anillo heterocíclico. En su reconocimiento fitoquímico preliminar las técnicas empleadas son basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados, para formar precipitados con reactivos como el mercurio tetrayoduro de potasio (de Mayer) y yoduro de bismuto (Dragendorff), estas reacciones se basan en los siguientes comportamientos:

El yoduro al reaccionar con cloruro mercúrico, forma un precipitado rojo de yoduro mercúrico: $[HgCl_2 + 2I^- \rightarrow 2Cl^- + HgI_2]$, soluble en exceso de iones de yoduro con formación de un anión complejo incoloro: $[HgI_2 + I^- \rightarrow HgI_4^{2-}]$. En esta reacción se forma el compuesto de color pardo oxiyoduro mercuri amoniaco, que es soluble en exceso de complejo $[HgI_4^{2-}]$, generando intenso color amarillo (Barrera *et al.*, 2014).

2.3.2 Reconocimiento de flavonoides

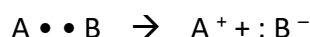
El ensayo de Shinoda permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos, cuando se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado. La prueba Shinoda es una prueba para detectar la presencia de flavonas. Si están presentes en la muestra de prueba, se reducen a antocianidinas.

El ensayo de antocianidinas permite identificar en los extractos la existencia en estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. La aparición de un color rojo a marrón en la fase amílca es indicativa de un ensayo positivo. La presencia de estructuras de tipo polisacárido, que forman un coloide hidrófilo de alto índice de masa, que aumenta la densidad del agua de donde se extrae (Vásquez, 2015).

2.4 Radicales libres

Un radical libre se define como una especie química que posee números impares de electrones desapareados (González-Torres, 2000; Venereo, 2002; Schieber y Chandel, 2014). Los enlaces químicos pueden deshacerse de dos formas:

- Heterólisis: cuando ambos electrones de enlace quedan unidos a uno de los fragmentos del compuesto, formando iones como consecuencia de la ruptura del enlace.



- Homólisis: los electrones que constituyen la unión entre compuestos quedan divididos simétricamente entre los fragmentos del compuesto, generando las especies conocidas como radicales.



Por lo tanto, la presencia de electrones desapareados, generalmente le confiere mayor reactividad a una molécula o a un átomo, por lo cual tienden a captar hidrógenos de otras moléculas, provocando así, reacciones en cadena.

2.4.1 Clasificación y mecanismos de generación de radicales libres

El origen de los radicales libres es diverso, va desde procesos fisiológicos intrínsecos del organismo como el metabolismo de alimentos o la respiración y también debido a factores ambientales, los cuales pueden ser la luz o xenobióticos (fármacos, aditivos alimenticios, etc.) (Lushchak, 2014). Por lo tanto, se pueden considerar fuentes endógenas y exógenas para la formación de los radicales libres.

Durante el metabolismo celular se genera la adenosina trifosfato (ATP) mediante un proceso oxidativo, en el cual, además de producir agua (H_2O), durante los pasos intermedios se originan especies químicas reducidas derivadas de oxígeno, llamadas también especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Rao *et al.*, 2011). Dependiendo del número de electrones transferidos durante la reacción enzimática o no enzimática, se pueden formar hasta tres intermediarios (**Figura 6**) (Rao *et al.*, 2011).

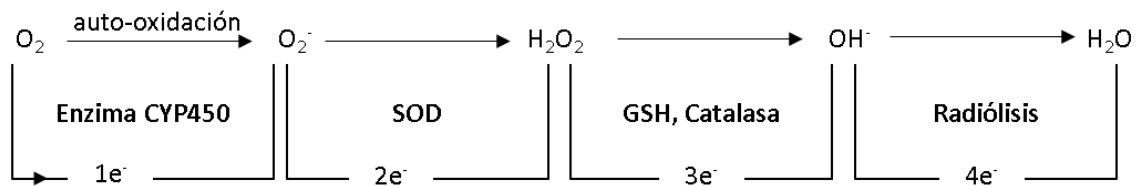


Figura 6. Proceso de formación de especies reactivas de oxígeno mediante la reducción de cuatro pasos de electrones del oxígeno molecular (Modificado de: Rao *et al.*, 2011).

- Ion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Es generado directamente de la autooxidación del O_2 durante la respiración. Otra alternativa es la producción enzimática por xantina oxidasa o el citocromo P450 en la mitocondria o el citosol. El $\text{O}_2^{\bullet-}$ es catabolizado por la superóxido dismutasa para formar H_2O_2 , el cual es considerado la ROS menos reactiva y el que se produce comúnmente en los seres humanos. Sin embargo, es el intermediario a partir del cual se generarán los siguientes radicales libres hasta su reducción vía enzimática a agua, por la catalasa en los peroxisomas y glutatión peroxidasa (tanto en el citosol como en las mitocondrias) (Quintanar y Calderón, 2009).
- Radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$): es la especie más reactiva de radicales libres de oxígeno. Causa daños a las membranas celulares y lipoproteínas a través de oxidaciones lipídicas (lipoperoxidación). Este radical se genera a partir de la radiólisis del agua y mediante la reacción del H_2O_2 con el ion Fe^{++} .

Otros radicales libres de oxígeno, pueden ser:

- Óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), es una molécula química producida por diferentes células del cuerpo (macrófagos, células endoteliales, neuronas, etc.). Esta molécula al combinarse con el superóxido forma peroxinitrato (ONOO^-), un potente radical libre.

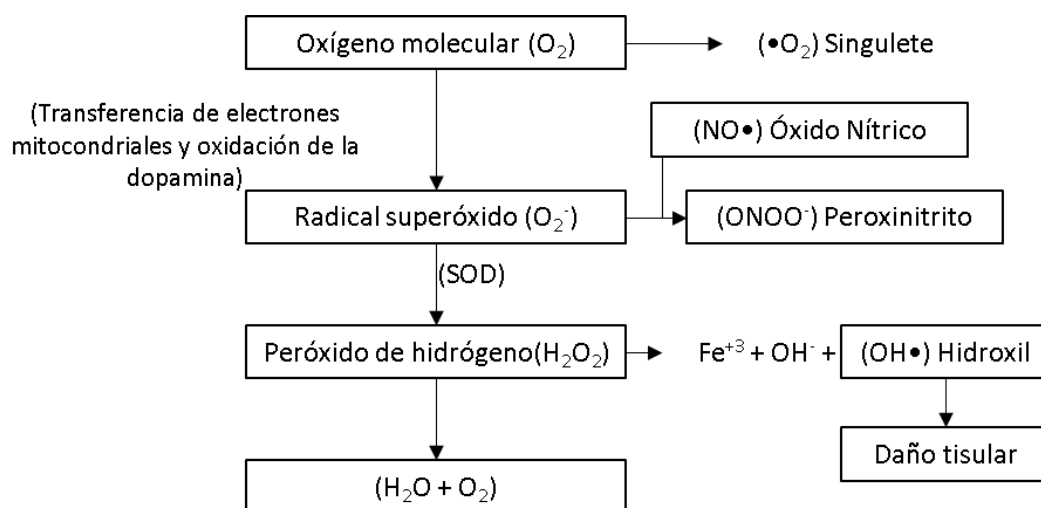


Figura 7. Representación esquemática de la formación de radicales libres de oxígeno (Modificado de: Rao *et al.*, 2011).

- Haluros (clorinas y cloruros), los leucocitos al reaccionar con los superóxidos forman ácido hipocloroso (HOCl), un radical libre citotóxico.

Los radicales se agrupan como derivados de oxígeno, metales de transición y otros radicales entre los que se pueden considerar las especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de los radicales libres (Fuente: elaboración propia).

GRUPO	NOMBRE	RADICAL
DERIVADOS DE OXÍGENO	Ion superóxido	$O_2^{\bullet -}$
	Radical hidroxilo	$\bullet OH$
	Peroxilo	$ROO^{\bullet}$
	Alcoxilo	$RO^{\bullet}$
METALES EN TRANSICIÓN	Fierro	$Fe^{\bullet}$
	Manganeso	$Mn^{\bullet}$
	Cobalto	$Co^{\bullet}$
	Níquel	$Ni^{\bullet}$
	Cobre	$Cu^{\bullet}$
OTROS RADICALES	Otros elementos solos y asociados con Oxígeno	S, N, Cl, C, SO, NO, CO

2.5 Estrés oxidativo

De manera habitual, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O_2). Presenta beneficios positivos y efectos secundarios potencialmente dañinos para los sistemas biológicos (Venereo, 2002; Ung *et al.*, 2017). Su reactividad le permite participar en transferencias de electrones de alta energía y, por tanto, la generación de grandes cantidades de ATP a través de la fosforilación oxidativa, pero también, debido a reacciones químicas, por acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos). Al incrementarse la concentración de tales moléculas reactivas, con respecto a los compuestos estabilizantes, se produce el ambiente oxidativo (Quintanar y Calderon, 2009).

El estrés oxidativo o daño oxidativo se describe como la exposición de las células a diversas especies químicas que rompen el equilibrio entre los factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes, estos últimos encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de las defensas o por el incremento exagerado de la producción de ROS o de RNS (Birben, 2012; Blanco y Blanco, 2017). Las consecuencias de tales alteraciones en el equilibrio son el origen de múltiples reacciones con otras moléculas presentes en el organismo, sean una proteína, lípido, ADN o carbohidratos, produciéndose así daño celular, con la consiguiente alteración de su función (Burton *et al.*, 2011; Birben, 2012).

Otra de las implicaciones de los radicales libres es en la oxidación de los alimentos, lo cual representa uno de los problemas más importantes que afectan la calidad e inocuidad alimentaria. Por ejemplo, la rancidez, un problema de oxidación que es un fenómeno atribuido a la formación de radicales que dan un sabor y aroma característico en productos alimentarios, provocando consecuentemente el rechazo de los consumidores. Una forma de evitar o de reducir la oxidación es la utilización de antioxidantes o de procesos que la limiten, por lo que en la actualidad se propone el desarrollo de películas de envasado con propiedades antioxidantes y/o aditivos que retrasen el proceso de oxidación (Franco y Moure 2011; Shahidi, 2015).

2.6 Antioxidantes

Para contrarrestar el efecto de los compuestos oxidantes, el organismo tiene mecanismos de protección eficaces. Tales compuestos son llamados antioxidantes y pueden ser endógenos o exógenos, estos últimos, naturales, recuperados de los alimentos o sintéticos. Los sistemas endógenos, pueden ser enzimáticos, tales antioxidantes con gran afinidad y velocidad de reacción para la reducción parcial de una especie reactiva son: superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GPx), coenzima Q, ácido dihidrolipoíco o metalotioneínas (Blanco y Blanco, 2017).

Los nutrientes con propiedades antioxidantes como las vitaminas E y C son las más importantes fuentes exógenas de compuestos reductores. La principal diferencia entre estas se debe a sus propiedades de solubilidad. La vitamina C, o ácido ascórbico, es soluble y se encuentra en los medios acuosos intracelular y extracelular. La vitamina E es altamente lipofílica y se localiza en las membranas y como parte de las lipoproteínas. Los carotenoides son otro grupo de micronutrientes que actúan como protectores contra ROS. Estos pigmentos orgánicos son efectivos en la eliminación de oxígeno singulete y radicales peroxi. El licopeno es un carotenoide con actividad antioxidante abundante en los tomates (Blanco y Blanco, 2017).

2.6.1 Clasificación y mecanismos de acción de los compuestos antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que previenen el daño celular causado por la oxidación por radicales libres, las cuales, una vez formados generan una cadena de reacciones oxidativas. El compuesto antioxidante reacciona con tales radicales para finalizar la reacción, eliminar intermediarios de los radicales libres o inhibir reacciones de oxidación al oxidarse (Rao *et al.*, 2011).

Los compuestos antioxidantes pueden clasificarse en dos grandes grupos a partir de su origen, se pueden considerar antioxidantes sintéticos y naturales (Thorat *et al.*, 2013).

- Los antioxidantes sintéticos, son comúnmente utilizados en la industria de los alimentos para retardar la oxidación progresiva de los lípidos. Sin embargo, de todos los antioxidantes

sintéticos disponibles en el mercado, solo algunos de ellos se han podido emplear en alguna aplicación, dada la necesidad de comprobar la ausencia de toxicidad de sus formas oxidadas y de sus productos de reacción con los constituyentes de la matriz de aplicación. Algunos de los antioxidantes sintéticos más populares son butil-hidroxianisol (BHA, por sus siglas en inglés), butil-hidroxi tolueno (BHT, por sus siglas en inglés) y ésteres de ácido gálico como, galato de propilo (PG, por sus siglas en inglés), entre otros. El BHT es efectivo en retardar la oxidación en grasas animales, alimentos bajos en grasa, productos de pescados, en la conservación de la parafina, etc. No obstante, es menos efectivo en aceites de origen vegetal.

- Los antioxidantes naturales, en su mayoría son sintetizados por el organismo y otra gran parte es suplementado a partir de otros recursos naturales. La actividad de tales compuestos depende en gran medida de sus propiedades fisicoquímicas y sus mecanismos de acción.

A su vez, los antioxidantes naturales se subclasifican en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

- Los antioxidantes enzimáticos son los únicos producidos en el cuerpo humano, estos a pueden ser divididos en antioxidantes primarios y secundarios.

- Los antioxidantes primarios incluyen principalmente a la superóxido dismutasa (SOD). La SOD cataliza la reducción del anión superóxido a peróxido de hidrógeno el radical superóxido y repara los daños celulares. Además, compite contra el óxido nítrico (NO) por el ion superóxido, impidiendo la formación de peroxinitrito. La Catalasa (CAT), la descompone el H_2O_2 a oxígeno y agua. La GPx, es un grupo de enzimas dependientes del selenio, se encuentran en el citosol y las mitocondrias. Cataliza la reducción de peróxido de hidrogeno utilizando glutatión como donador de hidrógeno y como resultado se produce glutatión oxidado, el cual es nuevamente reciclado a su forma reducida por glutatión reductasa y la nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH).
- Los antioxidantes secundarios, incluyen el glutatión reductasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). La G6PDH genera NADPH. La glutatión reductasa es requerido para reciclar el glutatión oxidado utilizando NADPH.

Los antioxidantes reducen la velocidad de oxidación, como resultado de la combinación de los mecanismos que a continuación se describen:

- Captación o secuestro de radicales libres (*Scavenger*), la efectividad de los antioxidantes que actúan bajo este principio, para eliminar los radicales libres, depende de la energía de disociación del enlace entre el oxígeno y el hidrógeno fenólico y el potencial de reducción y deslocalización de los radicales antioxidantes (**Figura 8**). Se consideran las siguientes formas de captación directa de especies reactivas:

- Transferencia simple de electrones (*Single electron transfer*, SET), el cual consiste en la transferencia o cesión de un electrón a especies reactivas, lo cual provoca que el radical libre pierda su condición de molécula desapareada, con una consecuente formación de radical libre del compuesto antioxidante como consecuencia de su oxidación. Sin embargo, la forma oxidada del antioxidante tendrá una baja o nula reactividad hacia su entorno (Thorat *et al.*, 2013).
- Transferencia de átomos de hidrógeno (*Hydrogen atom transfer*, HAT), el cual implica la captación de un radical peroxilo por donación de átomos de hidrógeno, generando un hidroperóxido y un radical antioxidante más estable químicamente.

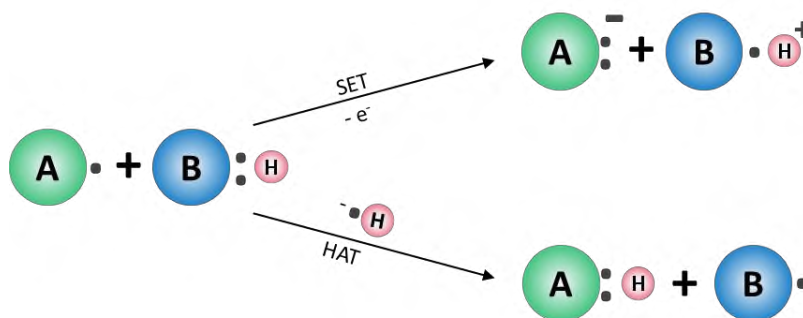


Figura 8. Mecanismos de acción de los compuestos antioxidantes por transferencia de electrón (SET) e hidrógeno (HAT) (Fuente: elaboración propia).

- Inducción de la actividad de enzimas antioxidantes.
- Prevención de la formación de especies reactivas dependiente de metales, este mecanismo consiste en la inhibición de la formación de especies reactivas a partir de evitar que ciertos

metales (como el Fe^{3+} y el Cu^{2+}) con capacidad de reducción del oxígeno y radicales hidroxilos usando como sustrato el peróxido de hidrógeno (reacción de Fenton). Tal inhibición está dada por moléculas con la capacidad de quelación para unir metales, y así formar quelatos.

- Prevención de la formación enzimática de especies reactivas.

2.7 Métodos de análisis de la actividad antioxidante

Existe una amplia disponibilidad de métodos para medir la actividad antioxidante, las cuales se basan en la captación de átomos de hidrógeno o la transferencia de electrones desde los antioxidantes hacia los radicales libres. Aunque la actividad antioxidante reportada con tales métodos está asociada con su capacidad de eliminación contra formas específicas de radicales, estas pueden ser artificiales y biológicamente no equivalentes, por lo cual se han criticado al no reflejar una situación *in vivo*. No obstante, los datos de la capacidad de donación de electrones o del átomo de hidrógeno obtenidos mediante estos métodos, proporcionan información importante sobre su potencial antioxidante intrínseco. Estos ensayos generalmente emplean un sistema químico que contiene un oxidante (radicales libres), una sonda oxidable (no necesaria para algunos ensayos) y antioxidantes bajo investigación. Dependiendo de las reacciones químicas involucradas, estos ensayos se pueden dividir en reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) o ensayos basados en reacciones de transferencia de electrones simples (SET).

La actividad antioxidante medida se expresa como inhibición contra la oxidación de la sonda mediada por radicales libres o equivalentes de un antioxidante de referencia como trolox, ácido ascórbico u otro compuesto. La detección de la oxidación se puede realizar por diferentes tecnologías, entre las que destacan la espectrofotometría, fluorometría, quimioluminiscencia, EPR (resonancia paramagnética de electrones), FTIR (infrarrojo por transformada de Fourier), RMN (resonancia magnética nuclear), entre otros. Los ensayos químicos se resumen en la **Tabla 3**.

Para efectos del presente trabajo se emplearon dos metodologías de análisis de actividad antioxidante, ampliamente utilizados en estudios de extractos vegetales, dada su sensibilidad y reproducibilidad (Zhong y Shahidi, 2015). A continuación, se detallan las características fundamentales.

Tabla 3. Clasificación de los métodos para determinar la actividad antioxidante basados en su capacidad para captar radicales libres (scavenging) y su potencial redox.

NOMBRE DEL ENSAYO	MECANISMO DE ACCIÓN	AGENTE OXIDANTE	SONDA	MÉTODO DE DETECCIÓN
ENSAYOS BASADOS EN LA CAPTACIÓN DE RADICALES				
ORAC	HAT	Radical peroxil generado por AAPH	Fluoresceína	Fluorometría
QUIMIOLUMINISCENCIA	HAT	Peróxido de hidrógeno	Luminol	Fluorometría
CAPTACIÓN DEL DPPH•	SET	Radical DPPH	Radical DPPH	Espectrofotometría o EPR
CAPTACIÓN DEL ABTS•⁺	SET	Radical ABTS ⁺	Radical ABTS ⁺	Espectrofotometría
ENSAYOS BASADOS EN EL POTENCIAL REDUCTOR				
FRAP	SET	Fe ³⁺	Ferriciadina	Espectrofotometría
CUPRAC	SET	Cu ²⁺	Neocuproina	Espectrofotometría
REDUCCIÓN DE Ag⁺	SET	Ag ⁺	Nanopartícula de plata	Plasmón de resonancia superficial
REDUCCIÓN DE Au³⁺	SET	Au ³⁺	Nanopartícula de oro	Voltamperometría cíclica
CERAC	SET	Ce ⁴⁺	Colorante índigo carmín	Espectrofotometría
CHROMAC	SET	Cr ⁶⁺	Complejo Cr ³⁺	Espectrofotometría

Modificado de Zhong y Shahidi, 2015

2.7.1 Método del DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Es un método basado en que los antioxidantes, o al menos un grupo de ellos, es donador de hidrógeno. Se considera un ensayo rutinario en el estudio de antioxidantes naturales, debido a su alta simplicidad y sensibilidad. Se emplea el radical DPPH (DPPH•), un radical libre de nitrógeno comercial, que acepta el hidrógeno del antioxidante para formar DPPH, de forma tal que el efecto antioxidante es directamente proporcional al DPPH• reducido. El electrón transmite el color violeta intenso de la solución preparada con el radical, la cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando el DPPH• reacciona en solución, con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta cambia al color amarillo o transparente. La medición de la transición de color o pérdida de absorción es monitoreada espectrofotométricamente y es utilizada para cuantificar la actividad antioxidante de la

muestra de estudio. Los resultados se pueden expresar como coeficiente de inhibición (IC_{50}), % de secuestro del radical y mg /Equivalentes de Trolox o vitamina C (estándares).

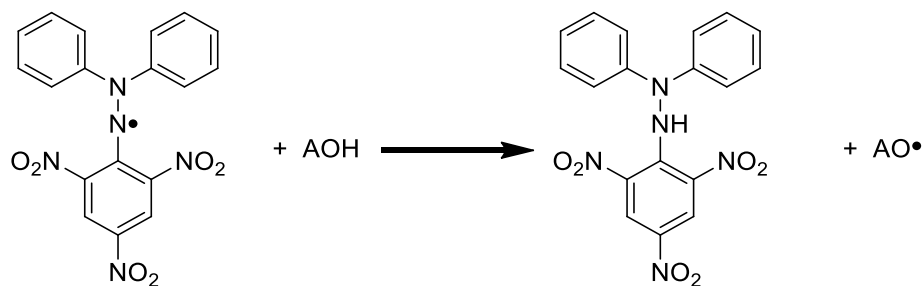


Figura 9. Reacción de reducción del radical DPPH (DPPH•) por antioxidantes. AOH: denota antioxidante, AO•: denota antioxidante oxidado.

2.7.2 Método del ABTS•⁺ (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico))

Al igual que el método anterior, el ensayo ABTS supone la reducción de su radical correspondiente (ABTS•⁺) para medir la capacidad antioxidante de los compuestos en cuestión. El ABTS•⁺ es producido horas previas al ensayo de actividad antioxidante, ya sea mediante una oxidación que puede ser química, enzimática (dióxido de manganeso, persulfato potásico, radicales peroxilo) o electroquímica. El radical catiónico es un compuesto verde azulado en buffer de fosfato a pH de 7.4 con una absorción máxima a 734 nm.

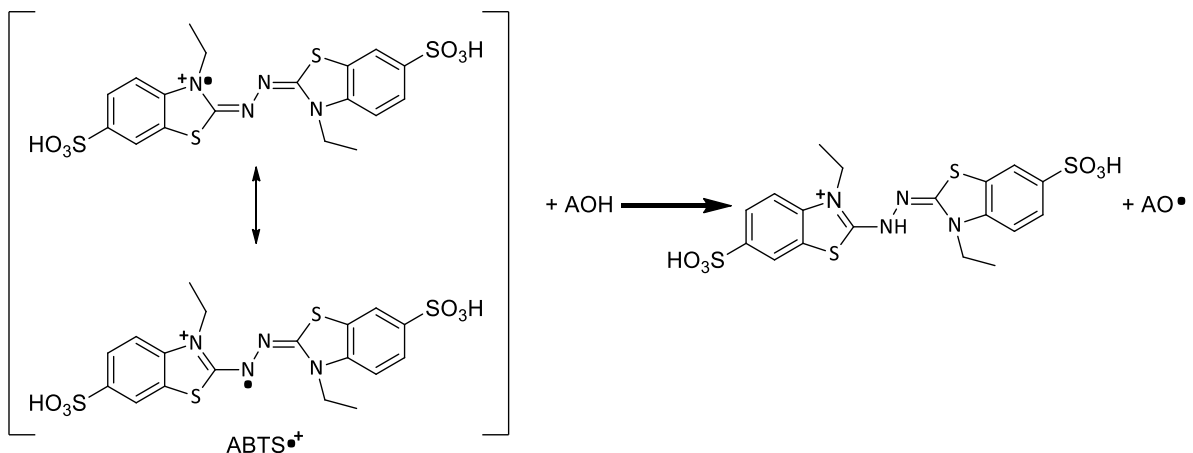


Figura 10. Reacción de reducción del radical catiónico ABTS (ABTS•⁺) por antioxidantes. AOH: denota antioxidante, AO•: denota antioxidante oxidado.

La monitorización de la reducción del radical al preparar una mezcla con compuestos antioxidantes, consiste en medir la pérdida de la absorbancia a 734 nm. Tales mediciones son comparadas con las obtenidas mediante la oxidación del Trolox (un análogo sintético y soluble

de la vitamina E) y se expresa en valores de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC). Este ensayo permite, la medición para muestras liposolubles e hidrosolubles. La longitud de onda a la cual se lleva a cabo este ensayo es apta para el estudio de extractos vegetales, pues tiene la ventaja de que no hay interferencia de color.

2.8 Obtención de los compuestos bioactivos

La obtención de los compuestos con actividad biológica requiere de un proceso que incluye, la recolección de la planta, preparación de la muestra, seguida de la extracción, el tamizaje farmacológico, el aislamiento y la caracterización del compuesto bioactivo, la evaluación toxicológica y la evaluación clínica.

La preparación de la muestra consiste en diferentes pasos como prelavado, secado de materiales vegetales o liofilización y molienda para homogenizar la muestra, casi siempre mejora la cinética de extracción del analito y aumenta el contacto de la superficie de la muestra con el sistema disolvente. Los extractos, ya sea como compuestos puros o como extractos estandarizados, representan una oportunidad para el descubrimiento de nuevos fármacos debido a la gran diversidad de compuestos químicos que contienen (Sasidharan *et al.*, 2011). La recuperación de los extractos representa un paso muy importante dentro del proceso del descubrimiento de compuestos bioactivos, el cual dependerá de la naturaleza de los compuestos que se desea obtener, que podrían ser la fracción volátil y la fracción no volátil.

Los compuestos volátiles comprenden los aceites esenciales contenidos en una planta, por lo que se obtienen mediante técnicas de destilación, en la que se volatilizan estos principios por calor, se condensan en frío y se recuperan. Otros métodos empleados pueden ser la hidrodifusión, el calor y/o la hidrólisis. Los extractos no volátiles son inestables con la temperatura, por lo que no se pueden obtener mediante destilación, sino que se obtienen mediante diversas técnicas de extracción, las cuales pueden agruparse en técnicas convencionales y técnicas no convencionales o nuevas tecnologías de extracción (Azuola y Vargas, 2007). Las técnicas convencionales incluyen los métodos de arrastre por vapor, extracción por solución, extracción por centrifugación y extracción en fase sólida.

2.8.1 Extracción por disolventes

La extracción por disolventes, es uno de los procesos más efectivo y económico para purificar, concentrar y separar los compuestos de interés, se realiza con disolventes capaces de arrastrarlos y de separarlos de la muestra. Esta técnica aprovecha la solubilidad de un compuesto, la cual está en función de su polaridad. Las sustancias iónicas o polares se disuelven en disolventes polares, y las no-iónicas, no-polares o lipídicas lo hacen en disolventes apolares o lipófilos. La extracción puede ser sólido-líquido o líquido-líquido en función del estado de la muestra. Se habla de extracción sólido-líquido o maceración, cuando se parte de una muestra sólida, que se pulveriza y a continuación, se extraen los analitos mediante un disolvente en el que sean muy solubles. Suelen ser asistidos con agitación, temperatura o ultrasonido para una mayor eficiencia. Por otra parte, en la extracción líquido-líquido se hace uso de disolventes inmiscibles para extraer los analitos de una muestra líquida, por ejemplo: una fase acuosa con un disolvente orgánico no miscible, además, el pH permite conseguir un mejor rendimiento (Jiménez y Kuhn, 2009).

En ocasiones, basta mezclar la muestra con el disolvente y agitar para lograr la extracción; sin embargo, el rendimiento suele ser bajo, pero se puede incrementar con aplicación de calor, ya sea mediante el uso de un refrigerante de reflujo que condense y devuelva los vapores del disolvente y evite pérdidas y explosiones, o bien mediante un aparato de Soxhlet que permita una percolación repetida durante horas de la muestra con el disolvente en ebullición. La selección de la combinación de disolventes depende de la naturaleza específica del compuesto bioactivo al que se está dirigiendo. Con disolventes apolares, como el hexano, heptano, benceno, es posible separar sustancias como hidrocarburos de bajo y gran peso molecular, productos órgano-halogenados y órgano-fosforados, sustancias canábicas, etc. En cuanto a los disolventes polares más empleados son el agua y el etanol, y entre los apolares, el hexano, éter etílico y diclorometano. Estos deben ser de extrema pureza, ya que cuando se decide concentrar el extracto, las impurezas que pudiesen contener también se concentran e interfieren las señales de la moderna instrumentación analítica (Sasidharan *et al.*, 2011).

Otras técnicas de extracción, modernas, incluyen micro-extracción en fase sólida, extracción con fluido supercrítico, extracción de líquido a presión, extracción asistida por

microondas, extracción en fase sólida o técnicas mediadas por surfactantes y la extracción por ultrasonificación (Jones y Kinghorn, 2006; Bertoli *et al.*, 2011). Tales técnicas tienen numerosas ventajas, como pueden ser: la reducción del consumo de disolventes orgánicos, la degradación de la(s) muestra(s), eliminar el requerimiento de limpieza adicional de la muestra y las etapas de concentración antes del análisis cromatográfico, mejora la eficiencia de extracción, la selectividad y la cinética de extracción (Huie, 2002).

2.8.2 Extracción asistida por ultrasonido

Los métodos tradicionales de extracción requieren prolongados tiempos de residencia, grandes cantidades de disolvente, y suelen presentar baja selectividad, aunado a esto, los disolventes representan un riesgo para el ambiente, como residuo, por su toxicidad, su poder inflamable, entre otros. Actualmente se buscan técnicas que incluyan la disminución de los tiempos de extracción, que reduzcan el consumo de disolventes y energía, prevengan o disminuyan la contaminación ambiental y no resulte perjudicial en la obtención de los compuestos termolábiles (Azuola y Vargas, 2007; McDonnell y Tiwari, 2017; Ezoddin *et al.*, 2019). Dentro de las técnicas alternativas propuestas en la literatura se incluye la extracción asistida con ultrasonido (UAE, por sus siglas en inglés).

La UAE ha cobrado interés en los últimos años, principalmente por su eficiencia, bajo costo, y por la posibilidad de realizar extracciones a bajas temperaturas, utilizando menores cantidades de disolvente que los procesos tradicionales (Vinatoru, 2001; Martínez *et al.*, 2011; McDonnell y Tiwari, 2017; Ezoddin *et al.*, 2019). En esta técnica se utiliza alta potencia y baja frecuencia para poder separar el soluto de interés de la matriz vegetal. Las ondas sonoras que se propagan en el medio o disolvente resultan en la alternancia de ciclos de alta y baja presión que producen burbujas de cavitación. La energía generada a partir del colapso de las burbujas de cavitación proporciona una mayor penetración del disolvente en el material celular y mejora la transferencia de masa hacia y desde las interfases (Huie, 2002; Knorr, 2003; McDonnell y Tiwari, 2017).

2.9 Ventajas y desventajas de métodos de extracción de metabolitos

Los procesos de extracción de metabolitos, están íntimamente relacionados con la solubilidad que presentan ante una mezcla de disolventes. Existen numerosas técnicas para la extracción de metabolitos presentes en las plantas, y en general, son necesarios para la diferenciación de los compuestos bioactivos. Durante el proceso de separación, el disolvente solubiliza compuestos con polaridad similar (Jones y Kinghorn, 2006). Aunque el material de estudio y los disolventes, sean los mismos, se ha observado que hay variación en los rendimientos de extracción cuando el método cambia. Desde este contexto, es relevante la elección del método de extracción, en cuanto al disolvente, deberá ser seleccionado de acuerdo a la aplicación, pues según lo mencionado con anterioridad, se recuperarán compuestos polares usando disolventes polares y compuestos no polares usando disolventes de la misma naturaleza (Jones y Kinghorn, 2006; Visht y Chaturvedi, 2012).

Los disolventes comúnmente utilizados son, el agua, etanol, cloroformo, acetato de etilo, metanol, hexano, entre otros, cuya combinación es posible si se requiere mejorar la eficiencia de la extracción.

El aumento de interés en los metabolitos de las plantas, ha alentado a los investigadores a considerar cada vez más a los métodos novedosos de extracción, que permitan tiempos cortos de recuperación de metabolitos, incrementar la eficiencia, la automatización del método y reducción del consumo de disolventes orgánicos (Rafiee *et al.*, 2011). Estos nuevos métodos (**Tabla 4**), o métodos emergentes de extracción, son un grupo de procedimientos que comparten objetivos similares (Brusotti *et al.*, 2014), como:

- Extracción de fitoconstituyentes bioactivos específicos del vegetal.
- Aumentar la selectividad de los métodos analíticos.
- Aumento de la sensibilidad del bioensayo al aumentar la concentración de compuestos específicos.
- Extraer los compuestos bioactivos en una forma adecuada para su detección y separación.
- Proporcionar un método fuerte y reproducible que sea independiente de las variaciones en la matriz de la muestra.

Tabla 4. Ventajas y desventajas de los métodos de extracción.

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS
CONVENCIONALES		
DECOCCIÓN	Fácil de realizar, no requiere equipos sofisticados.	No permite la recuperación de compuestos termolábiles.
INFUSIÓN	Requiere periodos cortos de tiempo.	No es eficiente en tejidos sólidos, difícil penetración del disolvente.
SOHXLET	Hay un continuo recambio del disolvente que entra en contacto con la muestra. El Soxhlet es independiente de la muestra vegetal.	Requiere largos tiempos, alta cantidad de disolvente, elevadas temperaturas y consumo de energía.
MACERACIÓN	Método simple, no requiere equipos complejos.	Requiere de tiempos prolongados de extracción, se obtienen bajos rendimientos y uso excesivo de disolventes.
HIDRODESTILACIÓN	No se emplean disolventes orgánicos.	Requiere temperaturas elevadas. Afecta compuestos termolábiles.
EMERGENTES		
ASISTIDO CON ULTRASONIDO (UAE)	Se requiere bajas cantidades de disolventes, tiempo, temperatura de extracción y energía. Se obtienen altos rendimientos.	Se obtienen bajos rendimientos en comparación con otros métodos emergentes.
ASISTIDO CON MICROONDAS (MAE)	Requiere bajos tiempos y poco disolvente en la extracción. Mantiene temperaturas constantes.	Afecta antioxidantes termolábiles. Se obtienen bajos rendimientos de compuestos no polares. Requiere de pasos intermedios de centrifugación o filtración.
MEDIANTE FLUIDO SUPERCRÍTICO	Requiere cortos tiempos de extracción, baja cantidades de disolventes. Se obtienen altos rendimientos. Permite la separación de compuestos termolábiles.	Es un método muy caro en comparación con los métodos convencionales y requiere grandes cantidades de energía.

2.10 *Byrsonima crassifolia*

2.10.1 Taxonomía de *Byrsonima crassifolia*

Byrsonima crassifolia (L.) Kunth es el nombre científico del árbol comúnmente conocido como nanche. Debe su nombre al naturalista y botánico Alemán Carl Sigismund Kunth, quien en 1822 determinó su clasificación taxonómica. En lo que respecta a *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K., que pudiera ser considerada como una planta diferente a (L.) kunth, no es así, las siglas H.B.K únicamente hacen referencia a Humboldt, Bonpland y Kunth, quienes estuvieron involucrados en la colecta e identificación de la planta, por lo que es importante resaltar que se tratan de la misma especie. Otros nombres, sinónimos científicos, con los que se le reconoce son: *Byrsonima cumingana* Juss.; *Byrsonima fendleri* Turcz.; *Byrsonima panamensis* Beurl.; *Byrsonima pulchra* Sessé and Moc. ex DC.; *Malpighia crassifolia* L.; *Malpighia pulchra* Sessé and Moc (Kunth, 1822).

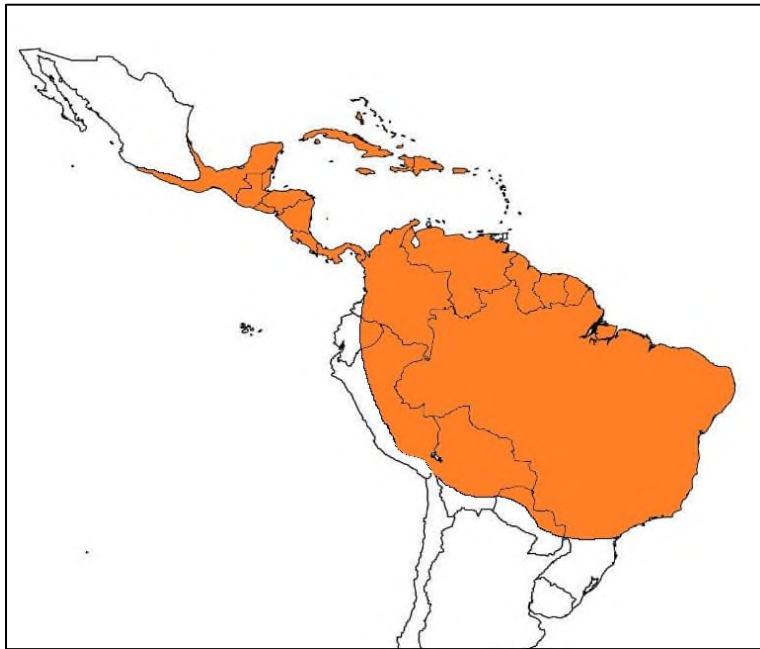


Figura 11. Distribución geográfica de *Byrsonima crassifolia* en América. La zona sombreada en color naranja, indica la distribución geográfica del nanche en América latina. Modificado de: <https://webapps.lsa.umich.edu/herbarium/malpigh/index.html>).

La especie *Byrsonima crassifolia*, pertenece al reino Plantae, phylum o división Tracheophyta, clase Magnoliopsida, al orden Malpighiales, y, pertenece a la familia de las

Malpighiaceae. De acuerdo con Anderson *et al.*, (2006), la familia Malpighiaceae comprende aproximadamente 75 géneros y 1300 especies del trópico y subtrópico (Martínez *et al.*, 1999; Pozos *et al.*, 2013; Rodrigues, 2016). Alrededor del 80 % de los géneros y el 90 % de las especies se encuentran en América, el resto hacia el sur de África, la región Indomalaya y Madagascar (**Figura 11**).

El género *Byrsonima*, es el segundo más grande de la familia, comprende 135 especies descritas hasta la actualidad (Croft y Schaal, 2012). Las poblaciones silvestres habitan desde el sur de México, Paraguay, Brasil, entre otros países, algunas de estas plantas crecen en bosques húmedos, pero el género es más diverso en sabanas y otros tipos de vegetación relativamente abiertos (Correa, 2002).

La planta *Byrsonima crassifolia*, es un arbusto perennifolio (caducifolio en bosques secos) o árbol pequeño, de crecimiento vertical o torcido que mide de 2 a 3 m, pero en algunos lugares logran superar incluso los 20 m de altura (Kunth, 1822; Cáceres *et al.*, 1993; Moraes *et al.*, 1994; Bejar *et al.*, 1995; Amarquaye *et al.*, 1994; Rivero-Cruz *et al.*, 2009). El tallo del árbol tiene una corteza agrietada y verrugosa, de color gris a oscuro (Cáceres *et al.*, 1993). La parte interior tiene surcos de color rosa o rojo y un sabor amargo. La copa del árbol es amplia e irregular, sus hojas son verdes, brillantes en la parte superior, oscuras y tomentosas en el envés, son alargadas de 5 a 15 cm de largo por 2 a 7.5 cm de ancho, elípticas y puntiagudas en el ápice (Kunth, 1822; Cáceres *et al.*, 1993; Correa 2002; Duarte, 2011).



Figura 12. Órganos vegetales de *Byrsonima crassifolia*. a) Inflorescencia, b) fruto, nanche en estado fisiológico verde y c) nanche en estado fisiológico maduro, se observa la semilla.
(https://es.wikipedia.org/wiki/Byrsonima_crassifolia#/media/File:Nanche.jpg)

Byrsonima crassifolia produce flores a partir de los cuales se generan los frutos (Correa, 2002). Las numerosas inflorescencias se presentan en racimos, de cinco pétalos

redondeados, inicialmente son de color amarillo, luego naranja, con márgenes crespos y estambres de color amarillo atenuado (Cáceres *et al.*, 1993; Correa, 2002) (**Figura 12 a**). El fruto es una drupa cuyo tamaño es variado, puede ser de color amarillo, rojo, naranja o verde, puede ser dulce, ácido o a veces amargo (Correa, 2002; Duarte, 2011). Una pulpa amarilla circunda una semilla que germinará una nueva planta, se considera un endocarpio dicotiledóneo, leñoso y redondo de testa grisácea, aceitosa y de diferentes tamaños (Martínez *et al.*, 2006; Raya *et al.*, 2010) (**Figura 12 b, c**).

La planta *Byrsonima crassifolia*, produce frutos conocidos con una amplia variedad de nombres. En México, se nombra tanto al árbol y el fruto de forma popular como nanche; del náhuatl *Nantzincoyotl* que significa fruto ácido de las madres o ancianas, denominados así cuando se producen por plantas domesticadas mientras que en condiciones silvestres son conocidas como changunga (Rivero-Cruz *et al.*, 2009; Raya *et al.*, 2010; Roque *et al.*, 2012). Otros sinónimos comunes del nanche son: nance, *nananché*, *chi'* (tzeltal/tzotzil, Chiapas), nanchi, nanatsin (Guerrero); changungo, enanchi (Michoacán); *chí* (maya, Quintana Roo) (Rivero-Cruz *et al.*, 2009). En países como Cuba a *Byrsonima crassifolia* se le llama peralejo, en Perú se llama indano, en la región del Caribe adopta varios otros nombres como: changugu, craboo, maricao, peralejo, perdejo, peralejo de sabana, en Brasil se nombra como muricí y en Estados Unidos se denomina como *golden spoon* o *golden cherry* (Almeida *et al.*, 2011; Duarte, 2011).

Diversos autores han señalado que algunas variaciones como el color del fruto y el tamaño del mismo, pueden permitir la distinción de *Byrsonima crassifolia*, como variedades; en este contexto, científicos brasileños han distinguido 5 variedades en función de su color (blanco, rojo, naranja, amarillo y verde) y por su tamaño. No obstante, los mismos autores reportaron que hasta ese momento no se habían descrito la existencia de híbridos ni razas (Correa, 2002; Raya *et al.*, 2010; Roque *et al.*, 2012).

Por otro lado, los estudios en México se han concentrado en analizar los frutos y las hojas. Martínez *et al.* (2006) realizaron una caracterización morfométrica de frutos y semillas de *Byrsonima crassifolia*, donde definieron que el porcentaje de pulpa y los °Brix (sólidos solubles totales) en el fruto podrían ser caracteres importantes en la diferenciación

dada la gran diversidad de plantas de nanche que existen, esta afirmación concuerda con lo reportado por Maldonado-Peralta *et al.* (2016), quienes señalan que el color del pericarpio, los °Brix, y vitamina C se consideraron como parámetros definitivos para una diferenciación en la calidad de los frutos de nanche, específicamente el nanche rojo. Tales observaciones coincidieron a su vez, con las realizadas por Medina-Torre *et al.* (2015), que al evaluar la calidad de los frutos de 41 genotipos diferentes de nanche concluyeron que los factores determinantes para diferenciarlas hasta en un 80.61 % corresponden a: peso, diámetro, longitud, tamaño de fruto, porcentaje de ácido cítrico de la pulpa, el pH del jugo del fruto, los °Brix, y la relación °Brix/pH de la pulpa.

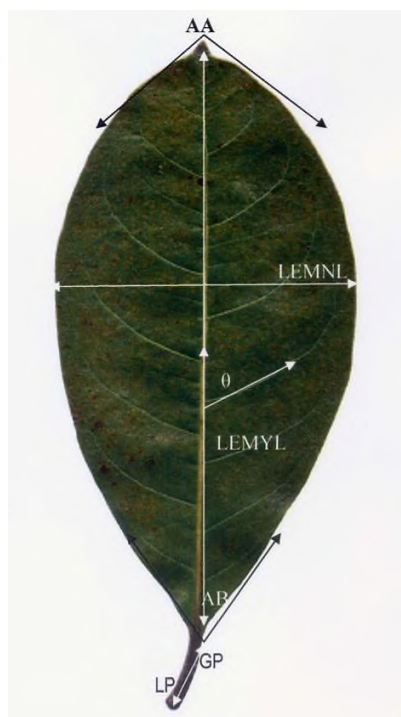


Figura 13. Parámetros considerados para la caracterización morfológica de las hojas de *Byrsonima crassifolia*. LEMYL = longitud del eje mayor del limbo; LEMNL = longitud del eje menor del limbo; A5V = ángulo de la quinta vena; AA = ángulo apical; AB = ángulo basal; LP = longitud del pecíolo; AP = ancho del pecíolo (Tomado de Martínez-Moreno *et al.*, 2010).

Otro recurso importante para la diferenciación genotípica de *Byrsonima crassifolia* han sido las hojas. Martínez *et al.*, (2010) determinaron que características como: longitud del eje menor, índice de redondez, ángulo basal, ángulo de la quinta vena, relación longitud del eje mayor del limbo/longitud del eje menor, relación longitud del eje menor/longitud del pecíolo y relación ángulo basal/ángulo de la quinta vena, explicaron el 77.8 % de la

variabilidad total que existía entre las diferentes plantas que fueron colectadas (Figura 13). En estudios similares Bayuelo-Jiménez *et al.*, (2006) analizaron características del fruto, del árbol y de las hojas para caracterizar los genotipos de la planta, a partir de los cuales, concluyeron que los sólidos solubles, la acidez titulable y el contenido de proteínas fueron los factores más importantes para diferenciar los grupos de estudios, en los cuales lograron diferenciar 60 genotipos a partir de las tres características anteriormente mencionadas.

2.10.2 Distribución geográfica de *Byrsonima crassifolia* e importancia económica en México

El nanche, es un frutal nativo conocido a nivel local y regional, que como ya se ha descrito previamente, es potencialmente productivo y genera ingresos económicos importantes a la población de las zonas donde prospera. Diversos reportes señalan que Oaxaca alberga las especies *Byrsonima crassifolia* y *Malpighia mexicana* (SIAP, 2015; Maldonado-Peralta *et al.*, 2016).

En el 2008, en México, inició actividades una asociación conocida como Red del Nanche, cuya misión ha sido promover, coordinar, apoyar y realizar actividades dirigidas al conocimiento del fruto nanche, su conservación y uso sustentable para beneficio de la sociedad (snics, 2017-2018). Atendiendo líneas de acción de acuerdo al Segundo Plan de Acción Mundial para los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura de la FAO. Destaca dentro de estas líneas, la promoción y desarrollo de la comercialización de todas las variedades, principalmente las variedades de los agricultores/variedades nativas y especies subutilizadas.

En México, existen plantaciones de nanche en huertos semi-comerciales, los cuales comprenden sistemas de producción riego-semitemporal. En 2015, se reportó una superficie sembrada de 1 317.2 hectáreas, con una producción de 6 223.68 toneladas lo que significó un valor económico de 27 814.42 millones de pesos. El Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera reporta que los estados de Campeche, Chiapas,

Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, Veracruz y Yucatán son los principales productores de este fruto (**Figura 14**, SIAP 2015).



Figura 14. Estados (en verde) productores de nanche (*Byrsonima crassifolia*) en la República Mexicana. De producción cíclicas y perennes en la república mexicana, a través de sistema de riego o temporal (SIAP, http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp, 2014).

En el resto de las entidades federativas como Tamaulipas, San Luis Potosí, Quintana Roo, Chiapas, Puebla y México existen cultivos etnobotánicos y áreas de recolección (Nova Genera et Species Plantarum 1822, Martínez *et al.*, 2013; Pozos *et al.*, 2013 y Albiter *et al.*, 2014). En cuanto a Oaxaca, SIAP reportó en el 2014 un valor de producción de 14 139 321.5 millones de pesos, por parte de los distritos de Cañada, Costa, Huajuapán de León, Istmo, Sierra Juárez, Tuxtepec y Valles Centrales. En el caso de Tuxtepec el valor de producción corresponde a 5 165 342.23 millones de pesos (Figura 15).

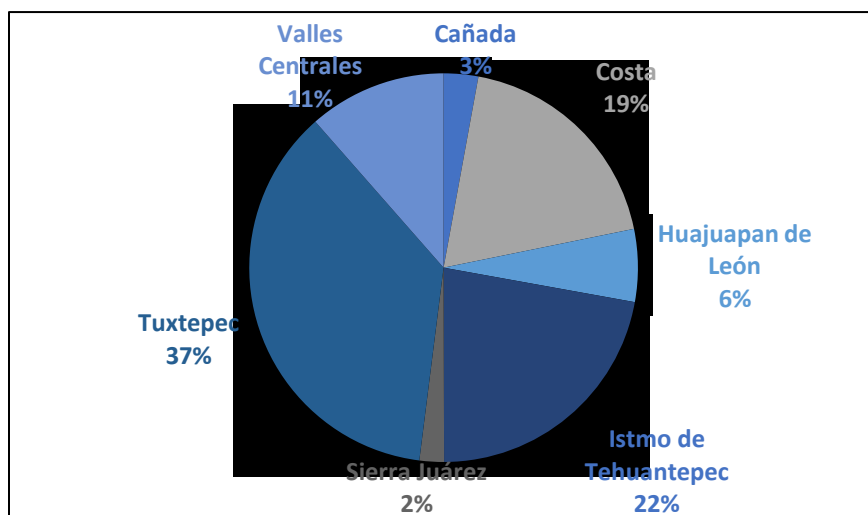


Figura 15. Porcentaje de rentabilidad de la producción total agrícola (\$ 14 139 321.50) del nanche (*Byrsonima crassifolia*) por municipio (millones de pesos) en el estado de Oaxaca. En el municipio de Tuxtepec, y zonas aledañas se reconoce la variedad dulce de nanche como el fruto con mayor distribución para su consumo. (http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp; comunicación personal, 2018).

2.10.3 Usos de *Byrsonima crassifolia*

La especie *Byrsonima crassifolia* es un recurso biológico importante, la planta se ha empleado, como: fuente de combustible, curtiente, fuente de colorantes, elemento reforestador u ornamental, un componente en sistemas agrosilvopastoril, como fuente de alimentos y recursos medicinales (Albíter *et al.*, 2014 y Roque *et al.*, 2012).

El fruto que produce se consume en estado maduro y fresco o se procesan para generar diferentes derivados alimenticios como son: jaleas, mermeladas, almíbares, jugos, néctares, cremas, paletas, nieves, refrescos, atoles, dulces, gelatinas, pasteles y bebidas alcohólicas (Pozos *et al.*, 2013). De entre las variedades de nanche, la changunga (frutos silvestres) es la preferida para elaborar nieves, paletas, atole o licores. Los frutos contienen vitaminas A y C, y se ha reportado que ciertas variedades, superan en cantidad de ácido ascórbico a otros frutos como la fresa, la mandarina y la guayaba (Raya *et al.*, 2010).

2.10.4 Propiedades biológicas de *Byrsonima crassifolia*

Actualmente, *Byrsonima crassifolia* resulta ser de gran interés científico, esto se debe a la gran diversidad de actividades biológicas que se le atribuyen. Se le ha relacionado con el alivio de diversas enfermedades, dolencias o padecimientos, como demostraron los estudios etnofarmacológicos dirigidos por diferentes investigadores. Katiyar (1979), describió que, en Panamá, los nativos empleaban a *Byrsonima crassifolia* para aliviar la colitis, evitar la piorrea y como remedio diurético.

Caceres (1990), Bejar y Malon (1993), Amarquaye *et al.*, (1994) y Geiss *et al.*, (1995) realizaron una descripción puntual acerca de los usos de la corteza, en el cual, ha sido reportado como el material vegetal más frecuentemente usado. En países como México y Guatemala, se ha usado para el alivio de la diarrea, también se le asocia como remedio para otros desórdenes del tracto gastrointestinal como el empacho, la estomatitis, la disentería e indigestión (Caceres *et al.*, 1993; BIBLIOTECA DIGITAL de la Medicina Tradicional Mexicana [BDMTM], 2009-2018). Así mismo, la infusión, que resulta de la decocción de la corteza ha sido importante en el alivio de infecciones de las vías urinarias, uterinas y vaginales, se empleaba para la inducción del ciclo menstrual y el parto (Bejar y Malone 1993; Amarquaye *et al.*, 1994). En algunas regiones de Belice se empleaba para tratar mordeduras de serpientes, las decocciones de las ramas se usaron para apretar los dientes flojos y la maceración de las mismas para la pesca (Geiss *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 1996; Maldini *et al.*, 2009).

Otros reportes en la etnomedicina describen el uso de la corteza y hojas para el tratamiento de infecciones de la piel; enfermedades bacterianas y micóticas, para el tratamiento de lesiones cutáneas, úlceras, granos y otras heridas, en Guyana se aplicaba la corteza machacada sobre la lesión para inducir la cicatrización (Caceres *et al.*, 1991; Amarquaye *et al.*, 1994; Geiss *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 1999). Por otra parte; las decocciones de hojas o maceraciones han sido empleadas para aliviar la tos, resfriados y fiebre (Martínez *et al.*, 1999; Rezende y Fragas, 2003). La semilla de los frutos para aliviar la disentería, según lo reportado por Bejar y Malone (1993).

De acuerdo con la revisión realizada, se determinó que hasta el 2003, se reportaron estudios científicos que asociaron a *Byrsonima crassifolia* con actividades bactericida, antimicóticas, espasmogénicas, como antiprotozoarios, antiinflamatorias, antivirales entre otros.

2.10.4.1 Actividad antimicrobiana

Caceres *et al.*, (1991) reportaron la inhibición del crecimiento de enterobacterias del género *Salmonella* y *Shigella* usando extractos crudos macerados en hojas y corteza de *Byrsonima crassifolia*, y en estudios posteriores determinaron que el mejor disolvente para obtener metabolitos con actividad antimicrobiana era el etanol, en comparación con el hexano, donde se determinó la actividad antifúngica contra *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* y *Trichophyton rybrum*. Por otra parte, los ensayos con extractos de corteza etanólico y de acetona, revelaron actividad contra las siguientes especies de *Cándida*: *albicans*, *krusei*, *paropsilosis* y *stellatoidea*, cuyo crecimiento fue inhibido completamente. Las actividades antifúngica y antibacteriana, se han asociado con compuestos como proantocianidina y proantocianidina galato, ambos flavonoles (Martínez *et al.*, 1999). Por otro lado, diversos autores afirmaron que extractos de corteza, son capaces de contener el crecimiento microbiano *in vitro*, entre ellos: dermatofitos y enteropatógenos (Amarquaye *et al.*, 1994; Caceres *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 1999). También se ha reportado actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* a partir de extracciones de raíces con acetato de etilo (Martinez *et al.*, 1999). A partir de estudios similares, Rivero-Cruz *et al.*, (2009) reportaron en extractos de corteza con diclorometano (DCM) una concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de 63 mg/mL sobre *S. aureus*, tales resultados fueron obtenidos a través de ensayos de microdilución. También, se han reportado actividades antimicrobianas al realizar estudios del aceite esencial de hojas de *Byrsonima crassifolia*. Por otra parte, a través de una evaluación por el método de difusión en agar contra *B. cereus* y *S. aureus*, se determinó actividad bacteriostática, con una MIC de 20 mg/mL (Vazquez *et al.*, 2013).

3. ANTECEDENTES DE *Byrsonima crassifolia*

3.1 Actividad antioxidante

El número de trabajos publicados en relación a la actividad antioxidante de *Byrsonima crassifolia* es relativamente pequeño (Almeida *et al.*, 2011; Gutiérrez y Flores, 2014; Mariutti *et al.*, 2014; de Souza *et al.*, 2017). Por ejemplo, Almeida *et al.*, (2011), reportaron un contenido de ácido ascórbico de 11.8 mg/100 g en peso fresco de extracto en frutas, 1.02 mg/100g de antocianinas totales y 159.9±5.6 mg GAE/100 g. En cuanto a la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) y vitamina C (VCEAC) determinados mediante los métodos del DPPH• y del ABTS•⁺ se obtuvieron: 6.46 µM/g, 295.12 mg/100 g y 15.73 µM/g, 235.94 mg/100 g, respectivamente. Además, determinaron que el contenido de fenoles hallado en su estudio mostró una correlación positiva con la capacidad antioxidante. Por otra parte, Pompeu *et al.*, (2012) evaluaron la capacidad antioxidante (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno-ORAC y Folin-Ciocalteu-fenólicos totales) para extractos etanólicos (65:35; v/v; etanol:agua) de hojas de *Byrsonima crassifolia*, en estos ensayos se determinaron altos valores de ORAC: 1.422 mmol de Trolox equivalente por g de hoja seca y 35.93 mg de ácido gálico equivalente a 1 g hoja seca, los valores ORAC no presentaron una correlación con los fenoles totales, lo que sugiere la presencia de otros compuestos dado el valor de la actividad antioxidante. En este mismo contexto, Olivera de Souza *et al.* (2017) reportaron valores de IC₅₀ de 1.82 y 1.51 mg QE/g en extractos purificados y en extractos fraccionados, respectivamente, además determinaron que, a concentraciones, tales como 1.2 µg/mL, pueden prevenir aproximadamente el 40% de la peroxidación lipídica en células irradiadas con UVB (20 mJ/cm²).

3.2 Otras actividades biológicas

Como se ha descrito previamente, *Byrsonima crassifolia* ya había sido asociado con actividad cicatrizante, y fueron Gutiérrez y Ramírez (2013) quienes reportaron formalmente tal actividad biológica, en extractos hexánicos obtenidos por maceración de frutos secos con semillas. Por su parte, a la corteza, mediante una extracción secuencial con éter de

petróleo, cloroformo y metanol se le determinó actividad farmacológica antiinflamatoria tópica, la cual se le relacionó con compuestos del tipo de polifenoles, triterpenos, esteroides y glicolípidos (Maldini *et al.*, 2009).

Por otro lado, Gutiérrez y Flores (2014) reportaron que ratas diabéticas inducidas por streptozotocina (ratas-STZ), tratadas con extractos de *Byrsonima crassifolia* como suplemento alimenticio mostraron mejora significativa con respecto al control diabético. Observaron que la administración del extracto de hexano (200 y 400 mg/kg) mostró una reducción significativa en la glucosa sérica (de 349.7 mg/dL a 99.8 mg/dL), disminuyeron el nivel de glucosa y se restablecieron al nivel de control (90.6 mg/dL). En cuanto a las determinaciones de los niveles de colesterol total y triglicéridos de las ratas diabéticas, estos presentaron un incremento significativo, volviendo a los niveles de las ratas sanas control y el colesterol HDL, una lipoproteína amigable, disminuyó en los grupos diabéticos con respecto al control. Tales parámetros se reestablecieron a valores similares a los de las ratas control después de 28 días de suplementos del extracto de hexano de semillas de *Byrsonima crassifolia*. Y finalmente describieron que los extractos disminuyeron la cantidad de células beta con actividad liberadora de insulina en comparación con las ratas intactas. Sin embargo, el tratamiento del extracto de semilla (200 y 400 mg/kg) aumentó las células beta activas en comparación con el control diabético.

Con tales hallazgos se demostró que la semilla de *Byrsonima crassifolia* tiene un efecto beneficioso para la diabetes a través de la disminución de la glucosa en sangre y los niveles de lípidos aumentando el índice de sensibilidad y el contenido de insulina, regulando la actividad de las enzimas antioxidantes y disminuyendo la peroxidación de los lípidos.

3.3 Fitoquímica de *Byrsonima crassifolia*

La composición química heterogénea de *Byrsonima crassifolia* ha sido señalada por varios informes. Se han aislado triterpenos (β -amirina, β -amirenona, la friedelina, el ácido acetil-oleanólico, 3-o-acetil-lupeol, la gloquidona y esteroides (β -sitosterol), otra serie de compuestos asociados a espasmogénesis como ursenaldehído, betulina, ácido betulínico, quercetina e hiperina; a partir de corteza, ésteres aromáticos, triterpenos (como α -amirina,

ácido oleanólico y ácido ursólico), aminoácidos, flavonoides, quercetina, isoquercetina, quercetina-3-arabinosil, ácido gálico, saponinas (Bejar *et al.*, 1993; Bejar *et al.*, 1995), taninos y una nueva serie de glicolípidos a partir de los extractos metanólicos de las hojas (Amarquaye *et al.*, 1994). También se ha logrado el aislamiento de proantocianidinas de la corteza (Geiss *et al.*, 1995). Por otro lado, un estudio fitoquímico preliminar mostró en el extracto de acetato de etilo de las raíces la presencia de flavonoides, saponinas y glucósidos (Martínez *et al.*, 1999).

Más tarde, Rezende y Fraga (2003), revelaron en un estudio de extractos de fruta mediante cromatografía de gases de alta resolución acoplado a olfatometría, la presencia de butanoato de etilo, hexanoato de etilo, octenol, ácido butírico, ácido hexanoico y alcohol feniletílico. La composición principal de la pulpa resultó ser de ésteres, de etilo, metilo y feniletilo; ácidos carboxílicos, terpenoides, δ -lactonas y otros compuestos azufrados. El análisis de semillas reveló aromas relacionados a compuestos como ácidos linoleicos, oleico, esteárico y palmítico.

Las plantas de *Byrsonima crassifolia*, se distribuyen ampliamente en la región del Papaloapan, el SIAP, señala que cada producción anual del fruto genera un impacto económico importante. Sin embargo, tal beneficio social únicamente es de temporada, y la principal forma de consumo del fruto es en fresco. Desde luego, se generan otros productos derivados del procesamiento de los mismos, como pueden ser helados, conservas, bebidas alcohólicas, entre otros. Un hecho importante que se ha verificado durante el desarrollo del presente trabajo es, que el fruto de mayor demanda es el nanche dulce, preferido por el consumidor.

Sin embargo, en la región del Papaloapan, es bien conocido la existencia del frutal de nanche con un característico sabor ácido, el cual, de acuerdo con información recabada por comunicación personal puede considerarse una especie o variedad infrautilizada. No obstante, es importante resaltar que la subutilización no compete únicamente al aprovechamiento del fruto, sino que también a las hojas, pues la única utilidad dada a esta planta es como combustible. En cuanto a las hojas, la subutilización no solo es exclusivo para la variedad con sabor ácido, sucede también con el nanche dulce, pues según la

información bibliográfica revisada, la tendencia actual en el estudio de *Byrsonima crassifolia* es en el fruto y el país con mayor número de estudios científicos encontrados es Brasil.

De acuerdo con el contexto anterior, y aunque México alberga una importante comunidad de variedades de especies de *Byrsonima crassifolia*, no se realizan un mayor número de estudios de actividad biológica en las diferentes plantas. Por lo cual, en el presente estudio, se realizó un análisis de actividad antioxidante sobre las hojas y la corteza de una planta de nanche cuyo sabor en el fruto es ácido, con la finalidad de encontrar un valor agregado a una especie de planta infravalorada.

4. JUSTIFICACIÓN

El nanche (*Byrsonima crassifolia*) es un árbol perenne, característico de la zona sureste de México. Los frutos de sabor dulce son muy apreciados por la población para su consumo como fruta, además, las hojas y la corteza se les atribuye, además, propiedades medicinales. Sin embargo, los árboles que producen frutos con sabor ácido son utilizados, principalmente, como sombra y como leña.

Estudios preliminares del grupo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología Agrícola y Transferencia de Tecnología, de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, mostraron que la planta presentaba actividad antioxidante. Dado que estos árboles se consideran una especie subutilizada resulta interesante estudiar su potencial biotecnológico, como fuente de metabolitos con actividad antioxidante. Actualmente, se considera que los estudios de Biotecnología agroindustrial deben demostrar factibilidad económica y viabilidad científico-técnica en la producción de nuevos productos alimenticios, industriales o de uso agrícola. Por lo que en este trabajo se planteó como objetivo, el estudio de la actividad antioxidante de las hojas y la corteza de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la actividad antioxidante de extractos de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida.

5.2 Objetivos particulares

Optimizar el proceso de extracción con disolvente, asistido por ultrasonido de compuestos con actividad antioxidante a partir de las hojas y la corteza de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida.

Determinar la actividad antioxidante de extractos de las hojas y la corteza de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, empleando los ensayos del DPPH• y ABTS•⁺.

Determinar cualitativamente las familias de compuestos con actividad antioxidante y alcaloides de los extractos de las hojas y la corteza obtenidos de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

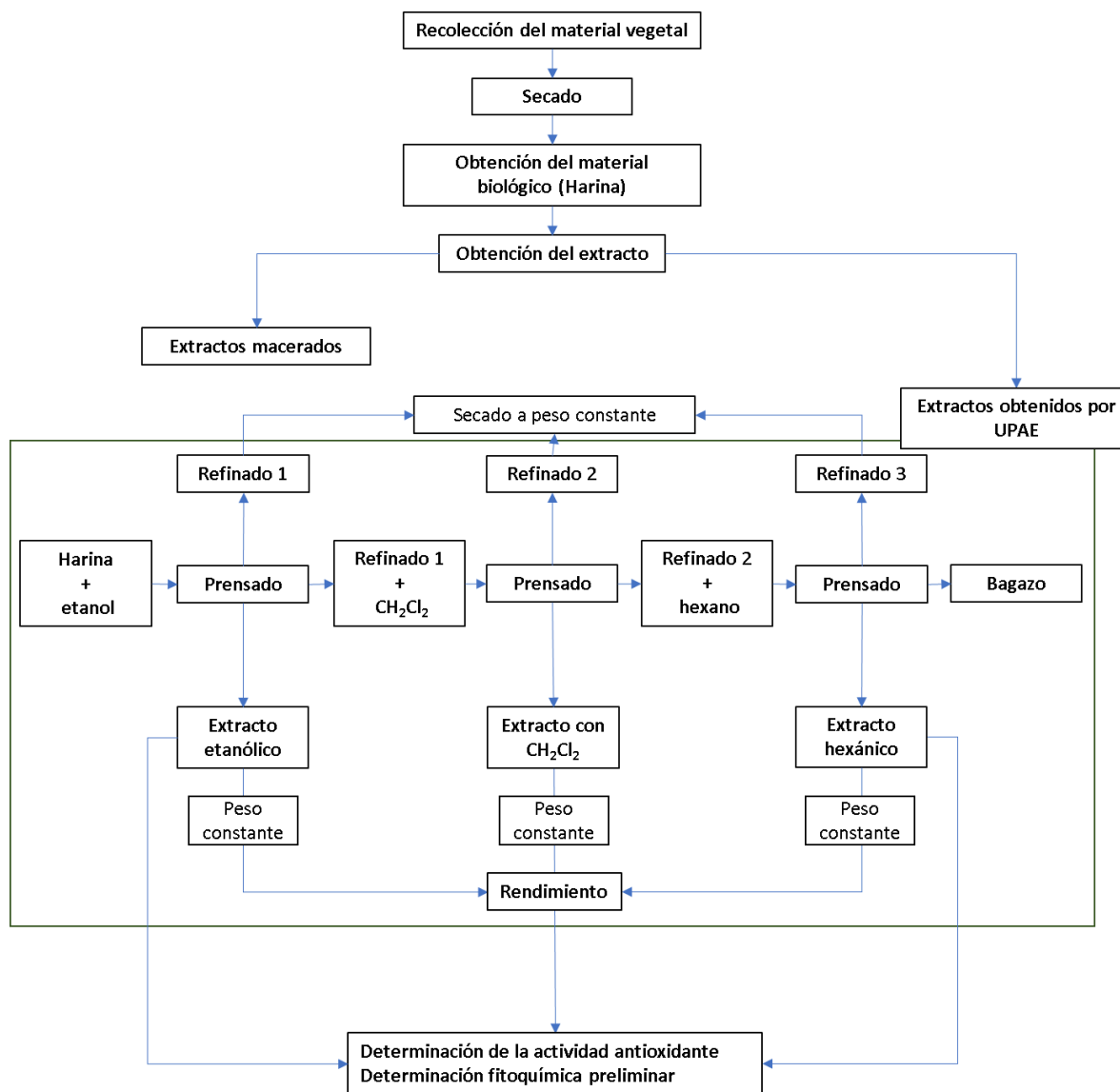


Figura 16. Diagrama general de la estrategia experimental para el desarrollo de la presente investigación.

6.1 Obtención del material vegetal

El presente estudio se realizó empleando hojas y corteza de la especie *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida (la planta produce frutos agrios de color amarillo). Estas partes de la planta fueron recolectadas directamente del árbol, en el mes de agosto del año 2017 en una población natural de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, ubicada en la Colonia

Universidad, Tuxtepec Oax. (18.014247, -96.166400), se recuperó el material vegetal sano y libre de patógenos.

Las hojas y corteza se secaron mediante aire forzado con un flujo de aire de 0.0103 m³/s por aproximadamente 48 h a 33±2 °C, posteriormente se sometieron a moliendas en una licuadora Black and Decker hasta obtener harina. Para homogenizar el tamaño de partícula, la harina se tamizó usando una criba de 8 poros/cm. El material fue almacenado en bolsas de polipapel a temperatura ambiente hasta su uso posterior.

6.2 Reactivos

Los disolventes, grado técnico, empleados en el presente trabajo experimental, fueron: acetato de etilo (MEYER, reactivos, México), acetona (MEYER, reactivos, México), ácido acético glacial (MEYER, reactivos, México), ácido fórmico (J. T. Baker, México), cloroformo (MEYER, reactivos, México), diclorometano (MEYER, reactivos, México), etanol (GOLDEN BELL, reactivos, México), hexano (MEYER, reactivos, México) y metanol (GOLDEN BELL, reactivos, México). En cuanto a los reactivos, estos se adquirieron en diferentes casas comerciales: radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) (SIGMA-ALDRICH, MO, USA), ácido ascórbico (SIGMA ALDRICH, MO, USA), ácido gálico (BIO BASIC, Ontario, CANADA), Atropina (BAYER, México), cafeína, Na₂CO₃, sal de diamonio ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid)) (SIGMA-ALDRICH, MO, USA), solución de Folin-Ciocalteu (MEYER, reactivos, México), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (SIGMA-ALDRICH, MO, USA), Tween 80 (SIGMA-ALDRICH, MO, USA) y verde de Bromocresol (MEYER, reactivos, México).

6.3 Procesos de extracción

6.3.1 Maceración

Se realizó una extracción por maceración durante 24 h a temperatura ambiente, para lo cual se puso en contacto la harina obtenida a partir de las hojas o de la corteza con etanol

al 95 % en una proporción 1:4. Se filtró con papel filtro de tamaño de poro fino y se determinó el porcentaje de extracción, considerando la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{peso del extracto obtenido}}{\text{peso del bagazo}} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Se estableció la extracción por maceración con etanol, para cotejar la viabilidad de una extracción asistida con ultrasonido y prensado para mejorar los rendimientos de recuperación de sólidos.

6.3.2 Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido y prensado (UPAE)

El proceso de extracción se realizó con tres diferentes disolventes. Los disolventes empleados fueron etanol al 95 %, diclorometano y hexano en una proporción 1:4 p/v (harina-disolvente).

La mezcla de extracción se colocó en un baño ultrasónico (marca BAKU, mod. BK-3550, Ultrasonic Cleaner) a una potencia de 50 W a diferentes tiempos (5, 20, 40 y 50 min), por triplicado. Después de la primera extracción, se recuperó la fracción líquida extraída mediante un prensado empleando una jeringa de vidrio de 50 mL y un filtro de tamaño de porosidad fina. El material retenido, bagazo, se llevó hasta sequedad a peso constante y a continuación se le agregó el siguiente disolvente para repetir el proceso de obtención de la nueva fracción líquida. Se usó como control de extracción la maceración de 24 h previamente descrita. Para concentrar el extracto se realizó una destilación simple, se secaron y se determinó el rendimiento de sólidos extraídos (Ec. 1). Las gomas obtenidas se almacenaron protegiéndolas de la luz a 4 °C (**Figura 17**).

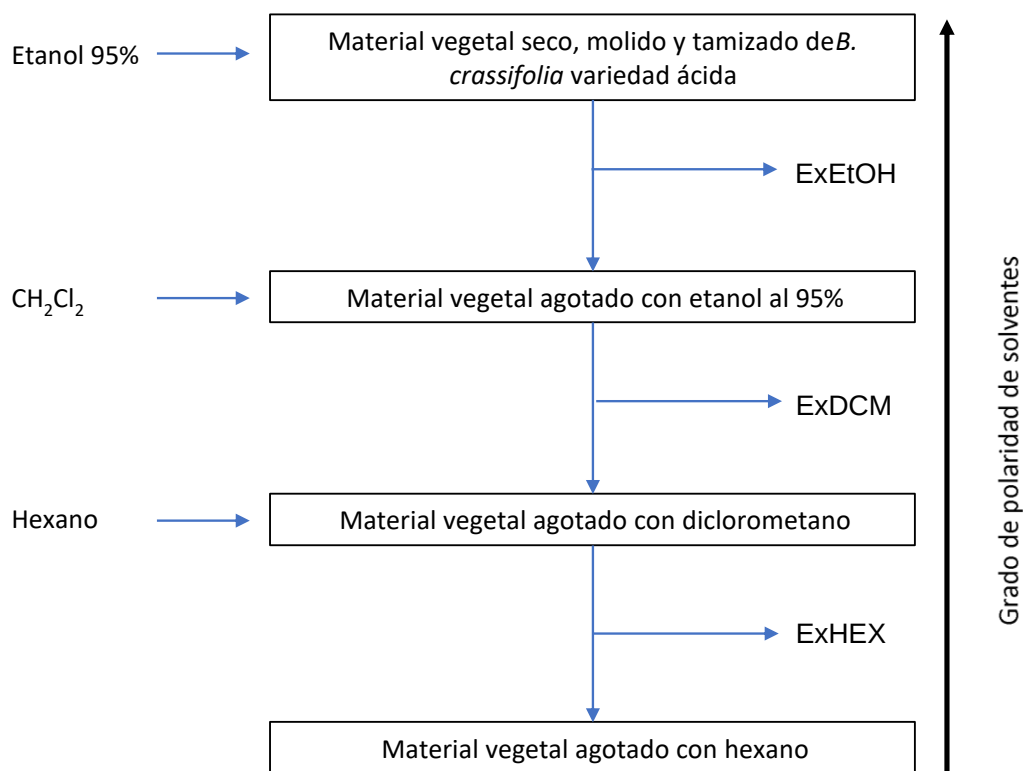


Figura 17. Proceso de extracción del material vegetal de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida. ExtEtOH: extracto etanólico; ExtDCM: extracto de diclorometano; ExtHEX: extracto hexánico.

6.3.3 Extracción líquido-líquido y separación por TLC

Se disolvió el extracto etanólico en metanol a una concentración de 10 mg/mL y esta solución se mezcló en una relación 1:1 con hexano para llevar a cabo la extracción y separación líquido-líquido de compuestos polares y no polares. Se recuperaron las fracciones de metanol y hexano. Las cromatografías se realizaron en placas de cromatografía (Sílica gel 60 F254, MERCKMILLIPORE) de 2.5 x 4 cm en un ambiente semihermético empleando un sistema acetona-metanol-etanol-agua (1:2:1:2) como fase móvil. Después de correr las placas se observaron en luz visible y en UV a 365 nm (UVLS-24 EL series UV Lamp), posteriormente se asperjaron con una solución del DPPH• (autobiografías) y nuevamente se observaron en las condiciones de iluminación anteriores. Se fotografiaron las placas en cada una de las condiciones para su posterior análisis de imagen.

6.4 Análisis digital de placas cromatográficas

Se establecieron regiones de análisis en las fotografías de las placas cromatográficas y con el software ImageJ 1.51k (Sherma, 2018) se generó un área de análisis que se utilizó para medir las intensidades de todas las regiones en todas las placas.

6.5 Determinación cualitativa de actividad antioxidante

6.5.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

En espacios de 0.5 x 0.5 mm en una placa de TLC de 2.5 x 4 cm se inyectaron concentraciones conocidas de ácido ascórbico, un potente antioxidante natural conocido, como referencia, y de extractos de las hojas y la corteza, obtenidos por sonicación a diferentes tiempos. Las concentraciones conocidas de ácido ascórbico se utilizaron para realizar una curva estándar. A continuación, se asperjaron con solución metanólica del DPPH•. Se fotografiaron las placas y las fotografías de las mismas fueron analizadas con el software ImageJ 1.51k, a partir de los valores de densidad óptica obtenidos se establecieron mediciones semicuantitativas equivalentes a ácido ascórbico, al demostrar condiciones de actividad antioxidante.

6.5.2 Ensayo del DPPH•

La actividad antioxidante para la cinética de tiempo de sonicación, se determinó usando el radical libre DPPH modificado de Brand-Williams *et al.*, 1995. Se prepararon soluciones de trabajo del extracto etanólico con Tween 80. La disminución de la absorbancia se determinó a 517 nm, durante lecturas continuas cada 5 min, iniciando desde 0 hasta 30 min. Se empleó ácido ascórbico 5.67 mM como control positivo.

6.6 Determinación cuantitativa de la actividad antioxidante

6.6.1 Ensayo del DPPH•

Se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) del extracto sobre el radical DPPH mediante el método modificado de Brand-Williams *et al.*, (1995) para determinar parámetros cinéticos (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998). Para lo cual, se preparó una solución del DPPH• en metanol, ajustado a una absorbancia de 0.7 en 517 nm (espectrofotómetro marca GENESYS modelo 10S UV-VIS), en tubos de microcentrífuga se mezclaron la solución del DPPH• y diferentes concentraciones de los extractos disueltos en Tween 80, los cuales fueron leídos en 517 nm a los 0 (t_0) y 30 min de reacción. Los valores de absorbancia obtenidos a partir de diferentes concentraciones se usaron para calcular el parámetro IC_{50} , que refleja la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la concentración inicial del DPPH•, a través de un análisis de regresión lineal simple, previa determinación del porcentaje de inhibición.

6.6.2 Ensayo del ABTS•⁺

Se preparó una solución de buffer salino de fosfato (PBS) con agua destilada, se ajustó a un pH de 7.4 con NaOH 1N. Para determinar la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de las hojas y la corteza con 5 y 20 min de tratamiento de la UPAE, se empleó el radical ácido 2,2-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ($ABTS^+$), el cual se preparó a una concentración de 2 mM en PBS. El radical $ABTS^+$ se produjo mediante la mezcla de 10 mL de la solución ABTS 2 mM y 40 μ L de solución reductora de $K_2S_2O_8$. Se mantuvo a temperatura ambiente en oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical $ABTS^+$ se diluyó con la solución de PBS hasta alcanzar una absorbancia de 0.8, en una longitud de onda de 734 nm. Este valor se consideró como blanco. Para realizar el ensayo, en un tubo limpio se agregaron 990 μ L del $ABTS^+$ y 10 μ L de los extractos, con dos concentraciones diferentes. Se mezcló y se dejó incubando durante 6 min a temperatura ambiente. Se realizó una curva de Trolox, para lo cual se prepararon concentraciones de 0 a 2.5 mM. Los resultados se reportan como actividad antioxidante equivalente a Trolox (mM E a Trolox/mg de ES).

6.7 Fitoquímica Preliminar

6.7.1 Determinación de flavonoides por TLC

Se resuspendieron 10 mg del extracto etanólico en 1 mL de metanol, para obtener una reextracción metanólica (ExtMetOH), se completó la disociación del extracto llevando los tubos de reacción a baño maría a 60 °C (Wagner y Bladt, 1996). La disolución obtenida se centrifugó con el fin de recuperar los flavonoides de naturaleza lipofílica e hidrofílica. Se almacenó a 4 °C para uso posterior. A partir de ExtMetOH se prepararon placas de TLC empleando la fase móvil acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:26), planteada en este trabajo.

6.7.2 Determinación de alcaloides mediante reactivo de Dragendorff

Se disolvió 10 mg del extracto etanólico en 1 mL de metanol y se acidificó con HCl, verificó la acidez con papel tornasol. Posteriormente se adicionó gota a gota reactivo de Dragendorff, hasta la aparición de un precipitado naranja, lo cual se consideró una prueba positiva. Se empleó cafeína como control positivo.

6.8 Fitoquímica cuantitativa

6.8.1 Cuantificación de fenoles totales (Folin-Ciocalteu)

Se determinó el contenido de fenoles totales de acuerdo a Rios de Souza *et al.*, (2012). A 0.2 mL de extracto disuelto en etanol se le agregó 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, al 10 % (v/v) y 0.8 mL de Na₂CO₃ al 20 % (p/v). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Se midió la absorbancia de la mezcla de reacción de los extractos a 750 nm, se empleó una solución de ácido gálico como blanco. Los resultados fueron expresados como mg equivalente de ácido gálico por mg de extracto seco (mg GAE/mg de ES).

6.8.2 Cuantificación de alcaloides totales

La cuantificación se realizó de acuerdo al método reportado por Shamsa *et al.* (2008), con algunas modificaciones. A una solución de extracto de 10 mg/mL, se le adicionaron volúmenes iguales de buffer de fosfato, se agregó, además, una solución de verde de bromocresol y 0.2 mL de CHCl_3 , posteriormente se mezclaron en un tubo de ensaye. La fase clorofórmica se separó para ser combinada con las extracciones subsecuentes. Se agregaron 2, 3 y 4 volúmenes CHCl_3 y se aforó a un volumen de 2 mL con CHCl_3 . La absorbancia del extracto y del estándar se leyó a 420 nm (espectrofotómetro marca GENESYS modelo 10S UV-VIS). Para la curva de calibración se preparó una solución stock (0.1 mg/mL) de atropina y a partir de ella se obtuvieron diferentes concentraciones (2, 4, 6, 8, 10 y 12 $\mu\text{g/mL}$) para la cuantificación de alcaloides totales, la cual se expresó como mg equivalentes de atropina/g de extracto seco. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado en dos réplicas.

6.7 Análisis estadísticos

Se realizaron ANOVAS de una sola vía, los valores medios se sometieron a una prueba de Tukey usando el software Minitab® 17.1.0.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Características físicas de órganos de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida

El material biológico usado para desarrollar el presente trabajo de investigación, fueron hojas y corteza de *Byrsonima crassifolia*, con frutos característicos de sabor ácido. Pero, al compararlo con la anatomía de las hojas de *Byrsonima crassifolia*, con frutos característicos de sabor dulce, no se encontraron diferencias aparentes. También se observó que el momento de producción del fruto, la morfología florística era similares. Sin embargo, cabe mencionar, que los arboles eran de diferentes tamaños, al igual que sus frutos y la ubicación geográfica de las plantas. Por lo cual, se considera necesario realizar estudios más profundos, que permitan evidenciar las diferencias.

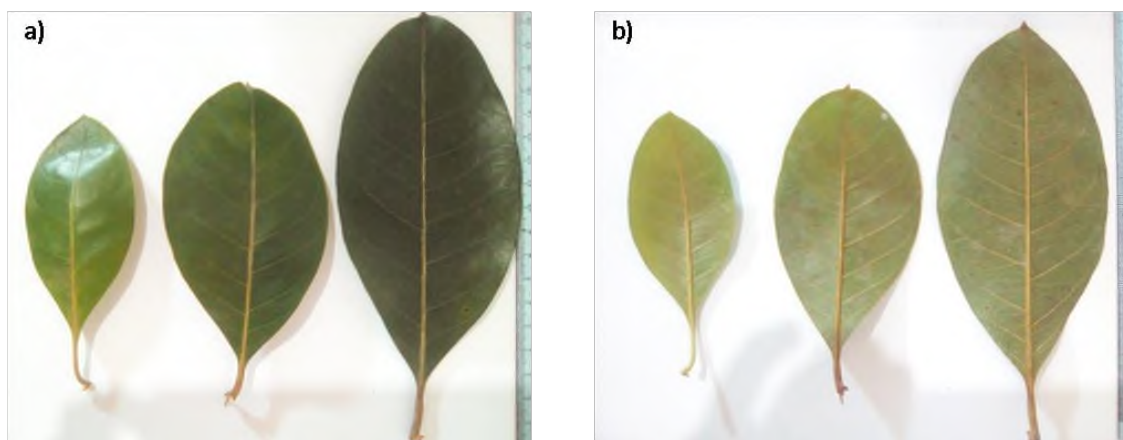


Figura 18. Hojas de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida. a) Muestra el haz de la hoja y b) el envés. El tamaño máximo de la hoja es de aproximadamente 19 cm.

En las Figuras 18 y 19 se muestran las imágenes de partes de las plantas fotografiadas para su ficha de identificación en el laboratorio de Biotecnología Agrícola y Transferencia de Tecnología. Cabe señalar que además de la fuente de obtención del material vegetal en este estudio, se localizaron varios ejemplares más, en ubicaciones geográficas distintas.



Figura 19. Fruto e inflorescencia de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida. a) Se observa una drupa con un tamaño de aproximadamente 2 cm, las inflorescencias se observan en un color rojo intenso.

7.2 Harina de las hojas y la corteza de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida

Para todos los ensayos realizados, se procesaron un aproximado de 700 g de harina a partir de las hojas y aproximadamente. 200 g de harina a partir de la corteza. En la **Figura 20** se muestran cada una de las harinas. La diferencia más notable entre ambos materiales fue: el color, debido al contenido de clorofila en el caso de las hojas, y la cantidad de fibra en el caso de la corteza. No se realizaron estudios de químico proximal al no ser el objetivo de esta tesis.

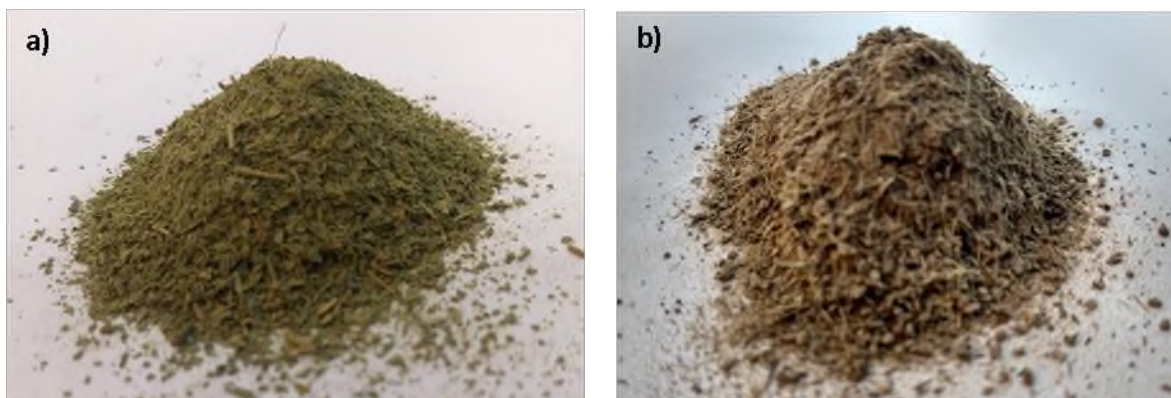


Figura 20. Harina de hojas (a) y corteza (b) de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida. Se muestra una harina de color verde para las hojas y café para la harina de corteza.

7.3 Comparación de la extracción asistida por ultrasonido y prensado con la extracción por maceración

Trabajos exploratorios previos, del grupo de investigación de Biotecnología Agrícola y Transferencia de Tecnología, de la Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec, demostraron que, extractos obtenidos del nanche ácido presentaron actividad antioxidante. Tales extractos, fueron obtenidos a partir de una extracción por agotamiento (Parra-Reyes *et al.*, 2017), lo que implica el uso de disolventes de polaridad creciente, los cuales permiten fraccionar los compuestos afines a los disolventes empleados (Maldini *et al.*, 2011; Espada-Domínguez *et al.*, 2016; Nakamura *et al.*, 2017). Debido a que en este estudio se buscó confirmar los resultados previos y mejorar el rendimiento de extracción, la estrategia que se estableció fue, usar un disolvente de mayor polaridad, etanol, seguido de diclorometano y finalmente hexano (Extracción por agotamiento inverso).

Adicionalmente, como señalan diferentes autores, el rendimiento de una extracción con disolventes se puede incrementar al asistir esta, con ultrasonido, la cual es una técnica ya ampliamente utilizada en los procesos de laboratorio (Robles y Ochoa, 2012; Da Porto *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2014; Lopez *et al.*, 2016; Safdar *et al.*, 2016;). Por otro lado, recientes investigaciones abordan el efecto de la potencia (100 y 400 W) y tiempos de ultrasonido (5, 10 y 20 min) sobre la producción de compuestos con actividad antioxidante, tras la sonicación (Ogutu y Mu, 2016). Sin embargo, en la presente tesis, se trabajó con una potencia de 50 W y tiempos similares (5, 20, 40 y 50 min). Tras los tratamientos, incluso con mayor tiempo no se observó un incremento de actividad antioxidante tiempo-dependiente, por lo que los resultados parecen demostrar que, a esta potencia de ultrasonido y a estos tiempos, se realiza únicamente extracción.

Por otro lado, aunque la estrategia de extracción asistida con ultrasonido es similar en muchos reportes, no existe un protocolo único, y este debe variar dependiendo de las características de la planta y los compuestos a extraer (Da Porto *et al.*, 2013; Lopez *et al.*, 2016). En este sentido, se probó un rango de tiempos de ultrasonido, de acuerdo a la literatura, como una propuesta viable para obtener el mejor rendimiento (Al-Juhaimi *et al.*, 2017, Maran *et al.*, 2017). Aunado a el proceso de extracción con disolventes asistido por

ultrasonido, se incorporó a la estrategia de extracción el prensado, con el fin de mejorar el rendimiento. El método empleado se definió como: Extracción con Disolventes Asistido por Ultrasonido y Prensado (UPAE, por sus siglas en inglés) (Roldan-Sabino *et al.*, 2018).

Los resultados de los rendimientos de extracción asistida por ultrasonido y prensado se muestran en la **Tabla 5**. En el extracto de la fracción etanólica, el rendimiento fue significativamente mayor ($p \leq 0.05$) que, en las otras dos, es decir, que en las extracciones con diclorometano y hexano. El rendimiento de las fracciones de diclorometano y hexano no muestra diferencias entre sí. Con respecto al tipo de órgano de *Byrsonima crassifolia*, es decir, las hojas y la corteza, el rendimiento fue significativamente mayor ($p \leq 0.05$) en las hojas al compararlo con la corteza, usando etanol y diclorometano. Para los sólidos obtenidos con hexano no se encontraron diferencias significativas entre los extractos de las hojas y la corteza (**Tabla 6**).

Tabla 5. Rendimientos de las extracciones etanólicas (% sólidos $\pm$ DS), empleando los métodos de la UPAE con diferentes tiempos y maceración por 24 h.

Método de extracción	Fuentes de extracción	
	Hojas	Corteza
Maceración 24 h	8.16 $\pm$ 0.1 ^c	7.99 $\pm$ 0.3 ^c
UPAE (ultrasonido, min)		
5	23.28 $\pm$ 3.6 ^a	19.34 $\pm$ 1.0 ^b
20	24.30 $\pm$ 2.4 ^a	21.44 $\pm$ 1.8 ^{ab}
40	24.48 $\pm$ 5.4 ^a	21.96 $\pm$ 1.4 ^a
50	23.42 $\pm$ 3.9 ^a	22.20 $\pm$ 1.9 ^a

Letras diferentes indican medias significativamente diferentes con una $n=6$ y $p \leq 0.05$ usando ANOVA de una sola vía.

Tabla 6. Rendimientos de las extracciones con diclorometano y hexano (% sólidos), de las hojas y la corteza de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, empleando el método de la UPAE.

UPAE (U ultrasonido, min)	Diclorometano		Hexano	
	Hojas [†]	Corteza [†]	Hojas	Corteza
5	1.36 $\pm$ 0.5 ^a	0.33 $\pm$ 0.1 ^a	0.72 $\pm$ 0.3 [*]	0.60 $\pm$ 0.4 [†]
20	1.46 $\pm$ 0.4 ^a	0.25 $\pm$ 0.7 ^a	0.74 $\pm$ 0.5 [*]	0.65 $\pm$ 0.5 [†]
40	0.97 $\pm$ 0.2 ^a	0.27 $\pm$ 0.1 ^a	0.72 $\pm$ 0.4 [*]	0.62 $\pm$ 0.4 [†]
50	1.1 $\pm$ 0.5 ^a	0.23 $\pm$ 0.1 ^a	0.66 $\pm$ 0.3 [*]	0.55 $\pm$ 0.4 [†]

[†]Denota diferencias significativas entre las fuentes de obtención de extractos mediante el método de UPAE. $n=6$ y $p \leq 0.05$ usando ANOVA de una sola vía.

La eficiencia de extracción con el método de UPAE se comparó contra el método de extracción por maceración con etanol por 24 h (**Figura 21**), el cual fue el disolvente más eficaz para extraer sólidos (**Tabla 5, 6**).

Mediante el método de maceración etanólica por 24 h, se obtuvieron rendimientos promedio de extracción de sólidos, de 8.16 ± 0.14 % y 7.99 ± 0.34 % para las hojas y la corteza, respectivamente. Mediante el método de UPAE, para el extracto etanólico se obtuvieron rendimientos promedio de 20 % tanto de las hojas como de la corteza (**Tabla 5**). Se observó, además, que con 5 y 20 min de sonicación existen diferencias significativas entre los sólidos obtenidos de las hojas y de la corteza (**Figura 21**). Adicionalmente, se estableció que a los 5 min de asistencia con ultrasonido se alcanza el porcentaje máximo de extracción de sólidos en las hojas, mientras que, en la corteza este porcentaje máximo se alcanza hasta los 20 min de sonicación (**Figura 21**).

Los resultados aquí mostrados, indican que la sonicación por tiempos prolongados (en hojas, mayores a 5 min y en corteza, mayores a 20 min) ya no contribuyen significativamente a los rendimientos de recuperación de sólidos, ni de los compuestos totales con actividad antioxidante. Al-Juhaimi *et al.*, (2016) reportaron que, con un tiempo de sonicación de 32 min, con etanol a 33 % y 38 °C, se logra el mejor resultado en la extracción de fenoles totales.

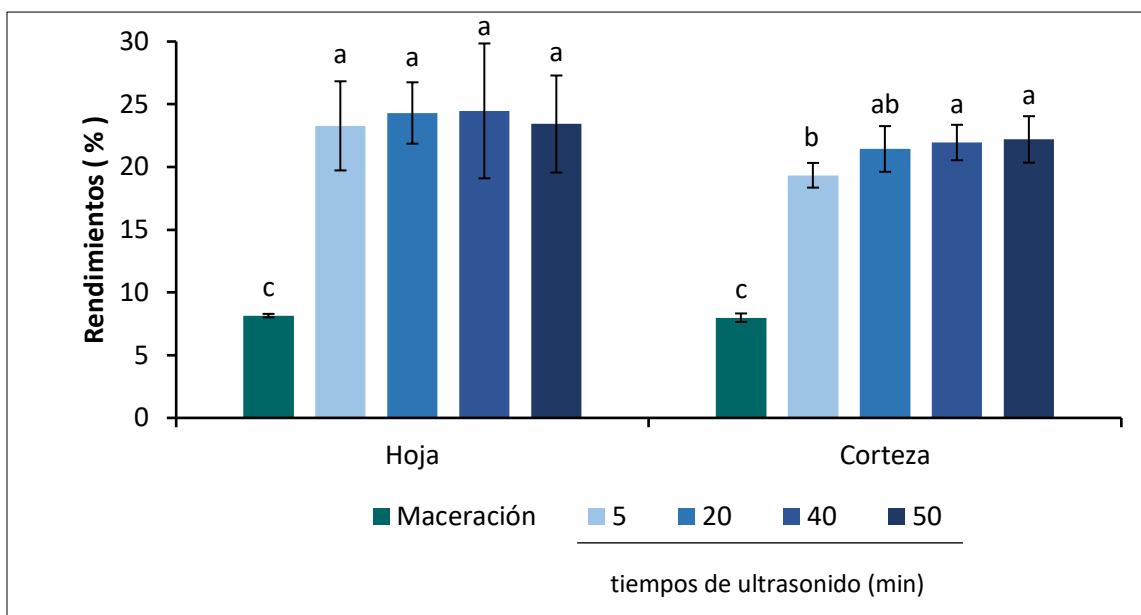


Figura 21. Eficiencia de la extracción aplicando diferentes tiempos de sonicación asistida y prensado (método UPAE) o maceración usando etanol. Se muestran los rendimientos obtenidos mediante la extracción por maceración y la extracción UPAE con diferentes tiempos de ultrasonido. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). $n=6$, usando ANOVA de una sola vía.

A partir de la extracción asistida con ultrasonido y prensado, se logró obtener un rendimiento total de sólidos en las hojas de 23.9 % con respecto al material vegetal inicial, este rendimiento es 2.9 veces mayor que cuando el extracto de las hojas es obtenido por maceración convencional. En la corteza, se obtiene 21.2 % de rendimiento, este resultado es 2.6 veces mayor al que se obtiene por maceración convencional. Los rendimientos de ambas fuentes de extracción superan la relación de rendimientos entre la recuperación por sonicación y las maceraciones convencionales, obtenidos por otros autores en extracciones similares (López *et al.*, 2016; Cui *et al.*, 2014; Safdar *et al.*, 2016; Da Porto *et al.*, 2013). Se observó la misma situación al comparar los resultados obtenidos por Maldini *et al.*, (2011), quienes reportaron una extracción por agotamiento doble por tres días empleando éter de petróleo, cloroformo y metanol, donde los rendimientos de extracciones obtenidas, fueron de 2.24, 0.5 y 22.06 g a partir de 174 g de harina de corteza de *Byrsonima crassifolia* empleando 1 L de cada disolvente. Usando una mayor cantidad de disolvente y tiempo de extracción, el método de UPAE superó la extracción de los autores anteriores, obteniendo un rendimiento promedio de 21.2 % en comparación al 12.6 %. Aún resta por determinar cuál de los dos factores, ultrasonificación o prensado, tienen un papel clave en la

recuperación de los metabolitos. Pues, autores como López *et al.*, (2016), adicional al ultrasonido han incorporado al proceso de extracción, un aumento de temperatura hasta 60 °C, lo que, de acuerdo a los autores pudo haber aumentado sus rendimientos de extracción. Por su parte, Oliveira de Souza *et al.*, (2017) mejoraron la extracción de polifenoles empleando una temperatura de 60 °C y aumentando el número de reextracciones. Tales factores han atribuido al incremento en los rendimientos extractivos de compuestos.

En el presente trabajo se prefirió optar por la extracción a temperatura ambiente y un solo ciclo de extracción sin descartar la posibilidad de cambiar estas condiciones y evaluar por separado, el mecanismo de prensado.

7.4 Actividad antioxidante y concentración inhibitoria 50

7.4.1 Actividad antioxidante preliminar por TLC

En la literatura se reportan una serie de diferentes metodologías para determinar la actividad antioxidante. El ensayo de secuestro de radicales libres con DPPH, es comúnmente empleado para tal determinación, ya sea para materiales sintéticos o naturales, debido a su simplicidad, eficiencia, rapidez y reproducibilidad.

En este trabajo de investigación se utilizó una nueva estrategia para la determinación preliminar semicuantitativa de la actividad antioxidante, con la cual, empleando concentraciones y volúmenes determinados, tanto de un extracto como la de un compuesto antioxidante conocido, en una placa de cromatografía fina (TLC, por sus siglas en inglés). Se obtuvo una correlación lineal a partir de una curva de ácido ascórbico, a partir del cual, se generó un análisis preliminar semicuantitativo de la actividad antioxidante en extractos de hoja y corteza de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida. Se demostró que los sólidos extraídos con etanol presentaban capacidad antioxidante independientemente del tiempo de extracción con asistencia de ultrasonificación (**Figura 22, b**). A través de una serie de “Spots”, con concentraciones diferentes de ácido ascórbico, se obtuvieron valores de intensidad óptica mediante un análisis de imagen por densitometría con el software ImageJ

(Figura 22 a), los cuales, al graficarlos, permitieron realizar una regresión lineal simple para calcular los valores equivalentes a la actividad antioxidante de ácido ascórbico, correspondientes a las muestras problemas (ANEXO I, Figura a). Así, además de contemplar de forma inmediata una posible actividad antioxidante de los extractos mediante autobiografía (Sharif y Al-kayali, 2016), se logró obtener un valor numérico que se relaciona con compuestos ya conocidos por su actividad (Figura 22 c).

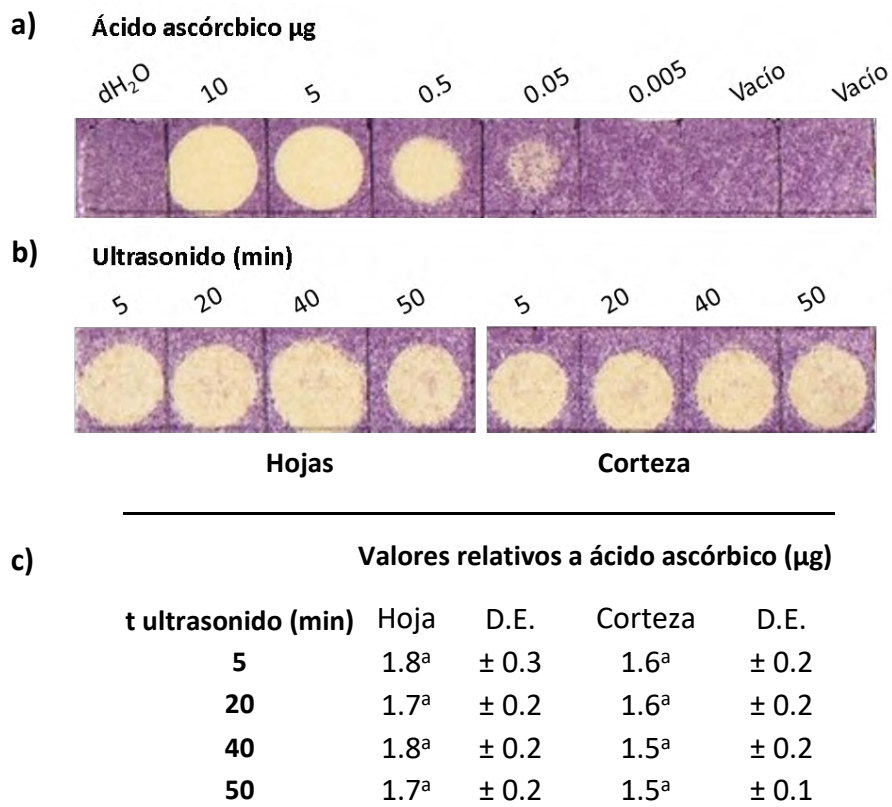


Figura 22. Determinación semicuantitativa de la actividad antioxidante preliminar (densitometría). a) Curva de calibración con ácido ascórbico, b) prueba de spots para la actividad antioxidante, de extractos de las hojas y la corteza de la UPAE. c) Valores relativos a ácido ascórbico. Letras diferentes indican diferencias significativas ($n=4$ y $p \leq 0.05$ con un ANOVA de una sola vía).

En el ensayo convencional de medición de la actividad antioxidante se mide (a 517 nm) el cambio de coloración púrpura/morado a amarillo (reducción del $\text{DPPH}^\bullet$), de una solución metanólica o etanólica, en presencia o ausencia del compuesto en evaluación. De los posibles inconvenientes son la necesidad de un espectrofotómetro, y en comparación con el método de “Spots” propuesto para este trabajo, una mayor cantidad de disolvente, pues de acuerdo con Sharma y Bath (2009), para preparar 1 mL de solución de lectura se requiere

la misma cantidad de disolvente, lo que al final de un estudio robusto y enfocado al análisis de una elevada cantidad de diferentes muestras requerirían elevados volúmenes de solución, como se ha venido mencionando. Por otro lado, se encuentra la necesidad de cubrir la demanda de cubetas (celdas para lecturas UV) de plástico, y aunado al gasto de disolventes, se presentan los inconvenientes de procesos secundarios para su recuperación y reutilización o los procesos de desecho a destino final, lo cual conlleva a generar fuentes de contaminación.

Dentro de las ventajas de la propuesta de medición de actividad antioxidante en “Spots” sobre placas de TLC, se destaca el poco tiempo requerido para llevar a cabo el ensayo, no se requiere de un equipo altamente especial y se emplea un software de licencia gratuita, lo cual la convierte en una opción viable de ensayo de bioactividad.

7.4.2 Determinación de la IC₅₀

Generalmente, se usa el agua como disolvente para compuestos inorgánicos y etanol para compuestos orgánicos, porque este alcohol absorbe muy débilmente a la mayoría de las longitudes de onda (Litter *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha descrito en la literatura que las células HeLa, la línea RAW 264.7 y los leucocitos, a concentraciones del 5 % y superiores de etanol, este compromete la viabilidad celular (Timm *et al.*, 2013).

Con el objetivo de proponer una solución disgregante, diferente a un disolvente orgánico, como el etanol o metanol, se montó un ensayo de evaluación de actividad antioxidante sobre el Tween 80, y usarlo como agente disgregante. Para evaluar si éste, tenía o no un efecto reductor sobre el radical DPPH, que pudiera interferir en las muestras de estudio, se planteó un ensayo con diferentes concentraciones del detergente como se observa en la **Figura 23**. Se determinó que el intervalo de absorción de las concentraciones de Tween 80 propuestas, se mantiene en 1.1 de valor de densidad óptica, en comparación al efecto provocado por el ácido ascórbico, que se usó como control positivo de actividad antioxidante en este ensayo, y cuyo valor de densidad óptica está por debajo de 0.5. Por lo tanto, este estudio permitió determinar que el agente disgregante, Tween 80, no afecta significativamente el comportamiento antioxidante de los extractos de *Byrsonima*

crassifolia, variedad ácida, durante el ensayo del DPPH•, cuyos valores de densidad óptica aparecen por debajo de 0.6. Además, se demostró que a concentraciones de 0.5, 1, 2, y 3 % de Tween 80 no tienen efecto de toxicidad, además es una sustancia que tiene aplicación en el área de alimentos (Guerra-Ramirez *et al.*, 2013).

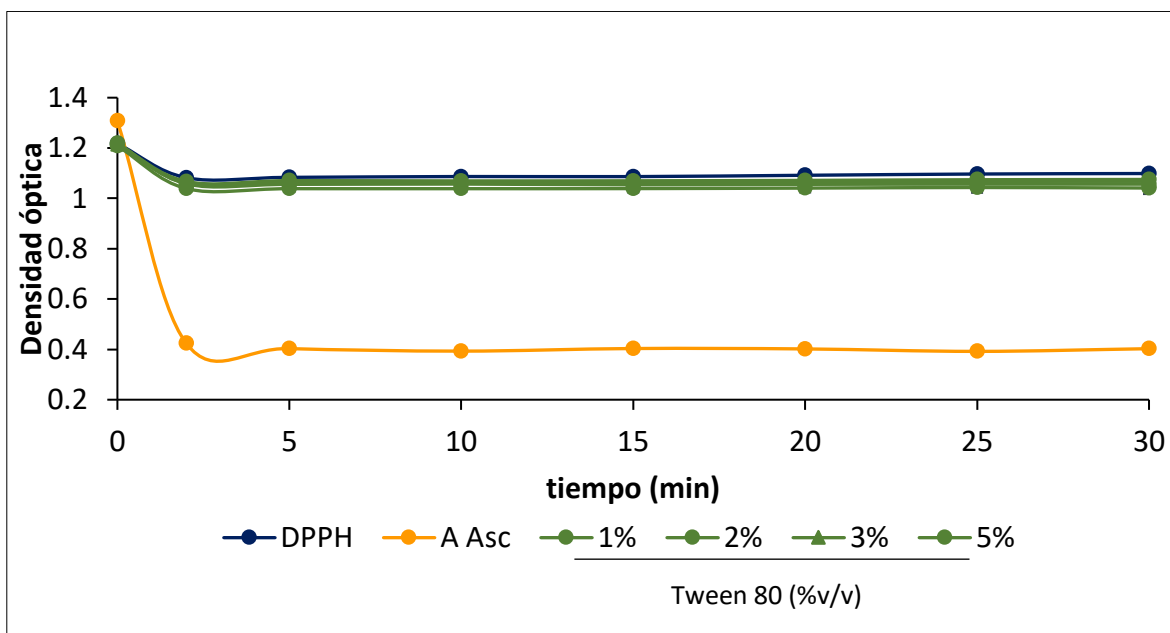


Figura 23. Efecto de la concentración del Tween 80 sobre la absorbancia a 517 nm. Se muestran las curvas correspondientes a cada uno de los porcentajes de Tween 80 estudiados (en verde, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, ($n=6$ y $p \leq 0.05$, con un ANOVA de una sola vía), en amarillo el control positivo correspondiente a Ácido ascórbico (A Asc) y en azul el control negativo (solución metanólica del DPPH•).

Se comparó la actividad antioxidante entre los extractos etanólicos de diferentes tiempos en el método de UPAGE, usando 3% de Tween 80 como control negativo y ácido ascórbico (A Asc) como control positivo como se muestran en las **Figuras 24, 25**. El control negativo (radical DPPH) no generó color a lo largo del tiempo, en comparación con el ácido ascórbico que presenta una caída en la absorbancia desde valores de densidad óptica de ~1.3 hasta menos de 0.5.

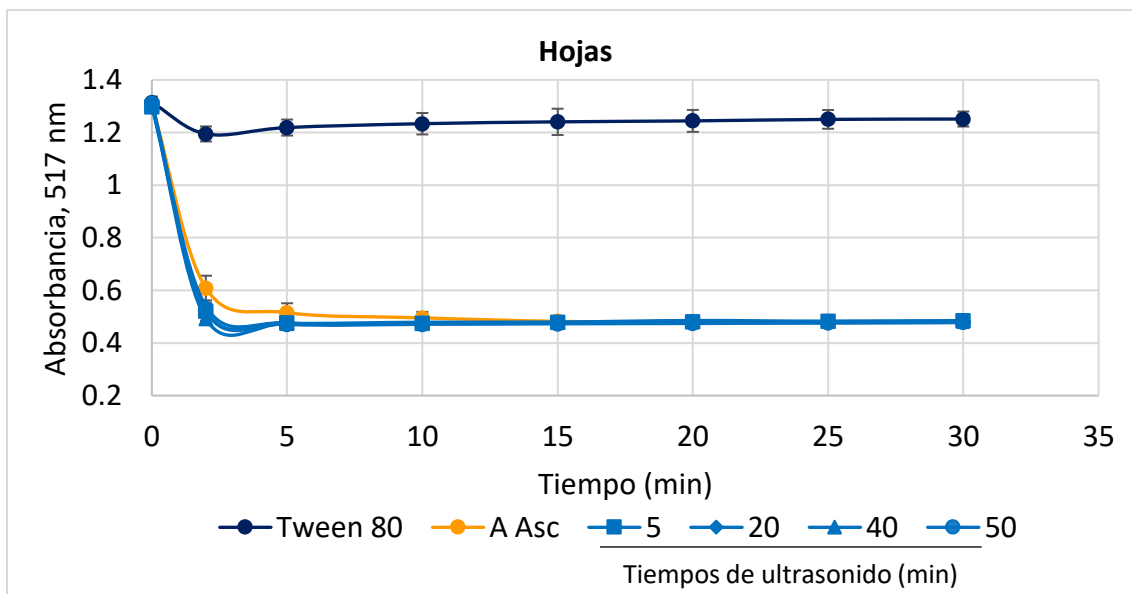


Figura 24. Determinación espectrofotométrica de la actividad antioxidante aparente por el método de Brand-Williams *et al.*, 1995 de extractos etanólicos de la UPAE de hojas de *Byrsonima crassifolia*, variedad *ácida*. Se muestran los controles, de Ácido ascórbico (positivo, A Asc) y solución metanólica del DPPH• (negativo), en azul se observan las muestras de la UPAE a diferentes tiempos de sonicación, las cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($n=6$ y $p \leq 0.05$, ANOVA de una sola vía).

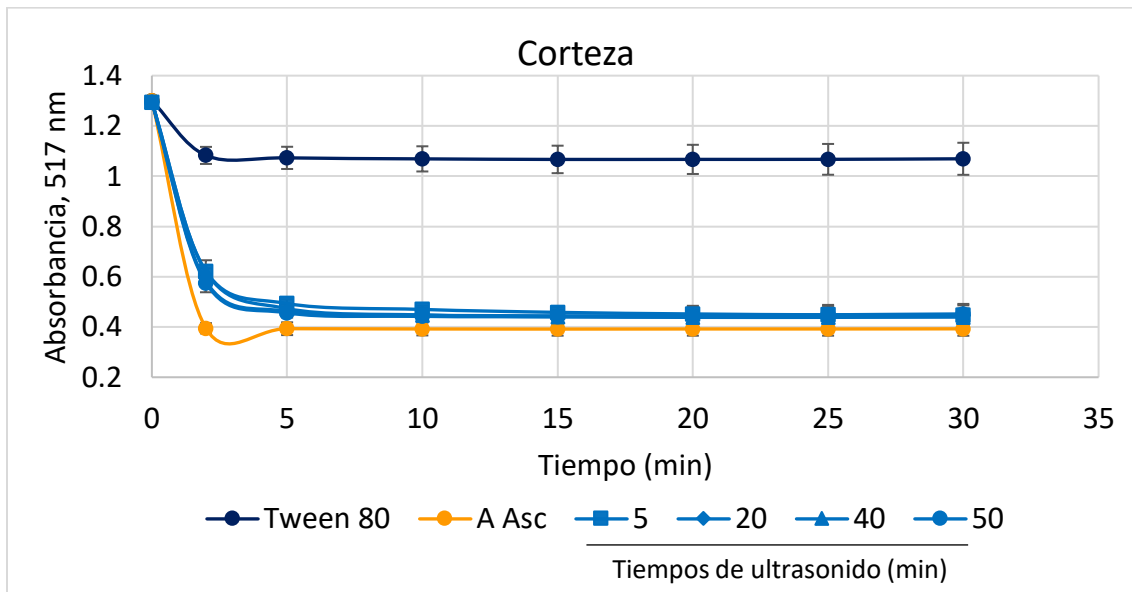


Figura 25. Determinación espectrofotométrica de la actividad antioxidante aparente por el método de Brand-Williams *et al.*, 1995 de extractos etanólicos de la UPAE de corteza de *Byrsonima crassifolia*, variedad *ácida*. Se muestran los controles de Ácido ascórbico (positivo, A Asc) y solución metanólica del DPPH• (negativo), en azul se observan las muestras de la UPAE a diferentes tiempos de sonicación, las cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($n=6$ y $p \leq 0.05$, ANOVA de una sola vía).

Los extractos obtenidos mediante la UPAE en las hojas, por 20, 40 y 50 min, tienen el mismo comportamiento en las caídas de absorbancia que el ácido ascórbico y no muestran diferencias significativas entre ellos. Por su parte, el extracto obtenido mediante asistencia con ultrasonido por 5 min, alcanza el mismo patrón de reacción a partir de los 10 min de incubación con el DPPH•. En cuanto a los extractos etanólicos obtenidos de la corteza, los extractos con los 4 tiempos de sonicación muestran el mismo patrón de absorbancia a lo largo de los 30 min de reacción, y alcanzan a igualar el potencial del ácido ascórbico para captar radicales libres hasta los 15 minutos de incubación (**Figura 9**). Se calculó el porcentaje de inhibición del radical PPH (Ec. 2), para cada una de las concentraciones de los extractos, propuestas para generar una curva dosis respuesta. A continuación, para obtener la concentración media necesaria de extracto para inhibir el 50 % de este (IC₅₀), para cada tiempo de sonicación, tanto para las hojas como para la corteza, se calculó a partir de regresiones lineales simples (Ec. 3).

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\text{Abs de la solución del DPPH}^\bullet - \text{Abs}_{t30 \text{ min}}}{\text{Abs de la solución del DPPH}^\bullet} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$\text{IC}_{50} = \frac{50-b}{m} \quad (\text{Ec. 3})$$

Se encontró que existe diferencia significativa entre el material biológico, es decir, entre las hojas y la corteza. Fueron más potentes los extractos de hoja, ya que se requiere menor concentración del extracto para reducir el 50 % del DPPH•. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tiempos de ultrasonido evaluados (**Tabla 7**).

Tabla 7. Porcentaje de inhibición y concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) sobre el radical DPPH, de los extractos etanólicos de las hojas y la corteza a diferentes tiempos de ultrasonificación

Método de extracción	Hojas		Corteza	
	Inhibición máx (%)	IC ₅₀ (µg/mL)	Inhibición máx (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
Maceración 24 h	65.74 ± 0.27	7.7 ± 0.4 ^{ac}	67.99 ± 0.06	0.0073 ± 0.002 ^{ac}
UPAE (ultrasonido, min)				
5	64.25 ± 2.59	8.3 ± 0.1 ^a	63.90 ± 2.58	11.5 ± 0.3 ^b
20	64.20 ± 2.47	7.6 ± 0.5 ^a	63.54 ± 3.63	10.9 ± 0.3 ^b
40	63.55 ± 3.50	8.7 ± 0.6 ^a	63.91 ± 2.25	10.6 ± 0.3 ^b
50	64.73 ± 2.60	8.7 ± 0.8 ^a	62.04 ± 2.71	13.5 ± 0.3 ^b

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. n=6 y p≤0.05, ANOVA de una sola vía. Máx=máximo

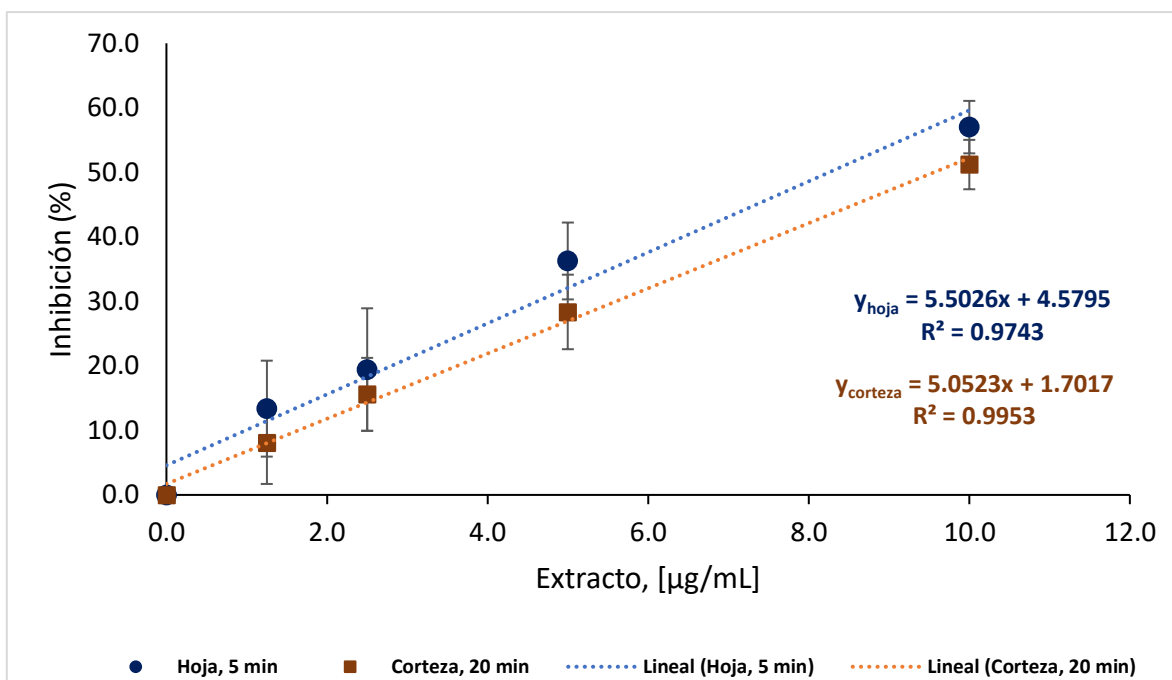


Figura 26. Efecto de la concentración de extractos de las hojas y la corteza de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, sobre el porcentaje de inhibición del radical DPPH. En azul se observa el análisis de datos por regresión lineal del porcentaje de inhibición del extracto de las hojas de la UPAE con 5 min de ultrasonificación, en marrón el extracto de corteza con 20 min. Se observan también las ecuaciones obtenidas mediante Excel® 2016, Microsoft office®. Se evaluaron una n=6 y $p \leq 0.05$, mediante ANOVA de una sola vía.

En la **Tabla 8** se observan los porcentajes de inhibición correspondiente a los extractos con diclorometano a diferentes tiempos de sonicación. Empleando una concentración máxima de extracto de 20 mg/mL, éstos no alcanzaron a reducir el 50 % del radical DPPH, por lo que no fue posible calcular la IC_{50} . Sin embargo, en el caso de las hojas, se determinó estadísticamente que aplicar tiempos de 5 y 20 min de sonicación permite obtener sólidos de metabolitos con una potencia antioxidante diferente, mayor capacidad para 20 min, mientras que; 40 o 50 min de sonicación no tienen diferencias significativas contra 5 min de UPAE.

Por otro lado, se observa que, en los extractos de diclorometano en corteza, en el porcentaje de inhibición, solo se presentan diferencias significativas entre los extractos con 5 min de sonicación asistida y 40 min. El potencial reductor de los sólidos de metabolitos correspondientes a 40 y 50 min de sonicación es estadísticamente igual a los de 20 min de sonicación, pero no a los de 5 min, que es el de mayor potencia antioxidante.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición y concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) sobre el radical DPPH, de los extractos con diclorometano de las hojas y la corteza, a diferentes tiempos de ultrasonificación.

Tiempo de sonicación (min)	Hojas		Corteza	
	Inhibición máx (%)	IC ₅₀ (mg/mL)	Inhibición máx (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
5	7.82 ± 2.3 ^b	-	14.63 ± 2.4 ^a	-
20	12.04 ± 1.3 ^a	-	11.68 ± 1.3 ^{ab}	-
40	7.33 ± 1.4 ^b	-	6.62 ± 8.7 ^b	-
50	5.87 ± 1.2 ^b	-	8.88 ± 1.2 ^{ab}	-

Las letras diferentes indican diferencias significativas, únicamente entre las medias en una misma columna. n=6 y $p \leq 0.05$ (-) No determinado. Máx=máximo.

En la **Tabla 9** se observan los porcentajes de inhibición correspondiente a los extractos hexánicos, en los cual se observan que el porcentaje de inhibición del radical DPPH, al igual que en extracciones con diclorometano, no se alcanza a reducir el 50 % del DPPH•, por lo que no fue posible calcular la IC₅₀ para tales extractos.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición y concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) sobre el radical DPPH, de los extractos hexánicos de las hojas y la corteza a diferentes tiempos de ultrasonificación

Tiempo de sonicación (min)	Hoja		Corteza	
	Inhibición max (%)	IC ₅₀ (mg/mL)	Inhibición max (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
5	21.76 ± 2.68 ^a	-	23.23 ± 2.48 ^{ab}	-
20	7.51 ± 2.68 ^c	-	15.82 ± 1.86 ^c	-
40	7.03 ± 1.42 ^c	-	20.35 ± 2.69 ^b	-
50	12.00 ± 1.65 ^b	-	26.68 ± 3.09 ^a	-

Las medias que tienen letras son significativamente diferentes. n=6 y $p \leq 0.05$, ANOVA de una sola vía. (-) No determinado. Máx=máximo.

En el caso de las hojas, se determinó estadísticamente que aplicar tiempos de 20 y 40 min de sonicación, permiten obtener sólidos de metabolitos con una potencia antioxidante iguales, mientras que 5 y 50 min de sonicación, en comparación con los dos anteriores, presentan entre sí diferencias significativas, siendo el extracto con mayor potencial el de 5 min obtenido mediante la UPAE. En el caso de la corteza, la diferencia significativa en el porcentaje de inhibición, se presentó entre todos los tiempos de sonicación, y aunque 5 y 50 min son estadísticamente iguales, el extracto de mayor potencia, estadísticamente significativo, fue el de 50 min y el más bajo el 20 min.

Finalmente, es importante destacar que el tiempo de sonicación con el método de UPAE, no altera significativamente la actividad antioxidante total, ni por regiones, ni la potencia

de los extractos. Por lo tanto, en el caso del nanche, *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, se sugiere que para las hojas se requieren 5 min de la UPAE y para la corteza un máximo de 20 min para obtener un mayor rendimiento de sólidos y compuestos con actividad antioxidante. Maran *et al.*, (2017) establecieron condiciones óptimas para la extracción de antocianinas y polifenoles a partir de la cáscara de *Nephelium lappaceum* L. (rambután), en la cual reportaron 20 W de potencia para la extracción asistida con ultrasonido, con el que se logró el mejor rendimiento, consideraron otros factores como :temperatura de 50 °C, un tiempo de 20 min y una relación disolvente-sólido de 1:18.6 (g/ml), sin embargo, los autores señalan un incremento de rendimiento al aumentar la potencia de 20 a 50 Watts, no así al aumentar el tiempo de extracción, pues después de los 20 minutos de sonicación, se presentó una disminución en el rendimiento. Resulta importante resaltar, que determinaron, además, que de una temperatura de 30 a 50 °C hay un incremento lineal en la eficiencia de extracción de compuestos bioactivos.

Se han reportado valores de actividad antioxidante en *Byrsonima crassifolia*, de frutas y de las hojas, valores de IC₅₀ de 10 µg/mL y 1.82 µg/mL, respectivamente (Mariutti *et al.*, 2014; de Sousa *et al.*, 2017). Las IC₅₀ de las hojas, reportadas en el presente trabajo, dista mucho de los descritos previamente, lo cual se puede deber al pretratamiento de purificación del extracto que, de Sousa *et al.*, (2017) propusieron en su investigación. Por otro lado, Guilhon-Simplicio *et al.*, (2013) reportaron que para la corteza de *Byrsonima japurensis* A. Juss se determinó una IC₅₀ de 7.1 µg/mL, empleando el método del DPPH•. Tales resultados demuestran que la variedad ácida del nanche tiene un alto potencial antioxidante, tanto en las hojas como en la corteza. Es importante resaltar que en este trabajo se reporta por primera vez el uso de ultrasonidos para la obtención de compuestos con potencial antioxidante en *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida.

7.4.3 Análisis de compuestos antioxidantes por su polaridad

Para analizar el comportamiento antioxidante del total de los compuestos extraídos con etanol, se diseñó un ensayo en TLC (en el sistema correspondiente, ver Materiales y métodos) que permitió evaluarlos cualitativamente de forma general y de forma puntual

por su naturaleza polar o no polar, esto último al establecer regiones de análisis de actividad antioxidante. En la **Tabla 10** se muestran los resultados del análisis digital. Se determinó que el análisis de compuestos totales no presentaba diferencias con respecto al tiempo de sonicación, ni en hojas ni en corteza, ni en compuestos polares ni apolares.

Tabla 10. Evaluación de la distribución de los compuestos con actividad antioxidante en placas de TLC, empleando ImageJ, un análisis de distribución por polaridad.

Tiempo de sonicación (min)	POLARES					
	HOJA			CORTEZA		
	DPPH	365 nm	365 nm + DPPH	DPPH	365 nm	365 nm + DPPH
5	A	A	A	A	A	A
20	A	A	A	A	A	A
40	A	A	A	A	A	A
50	A	A	A	A	A	A
	NO POLARES					
	HOJA			CORTEZA		
	DPPH	365 nm	365 nm + DPPH	DPPH	365 nm	365 nm + DPPH
5	A	A	A	A	A*	A
20	A	A	A	A	AB	A
40	A	A	A	A	AB	A
50	A	A	A	A	B	A

*A es mejor que B, es decir; valores mayores de densidad óptica. n=6 y $p \leq 0.05$. Anova de una sola vía.

7.4.4 Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo del ABTS•⁺

En la **Figura 27** se observa el comportamiento de la actividad antiradicalaria para el ABTS•⁺, expresado como Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox por mg de extracto seco (TEAC mM/mg de ES) de los extractos de 5 y 20 min de la UPAE para las hojas y la corteza, respectivamente. Los valores para las hojas corresponden a 774.04 TEAC mM/mg de ES y 714.70 TEAC mM/mg de ES para la corteza. Se determinó que las hojas presentaron mayor capacidad antioxidante en comparación con la corteza, efecto que corroboró los análisis previamente descritos con el método del DPPH•. Tales resultados indican una vez más, que los extractos de las hojas son estadísticamente mejores en la captación de radicales libres.

En comparación con los valores de IC₅₀ de 49.30 µg/mL, de hojas de moringa, las hojas estudiadas en este trabajo presentan como máximo un 8.7 µg/mL. Además, presenta valores muy similares al IC₅₀ del Trolox, que es de 5.89 µg/mL (Fitriana *et al.*, 2016).

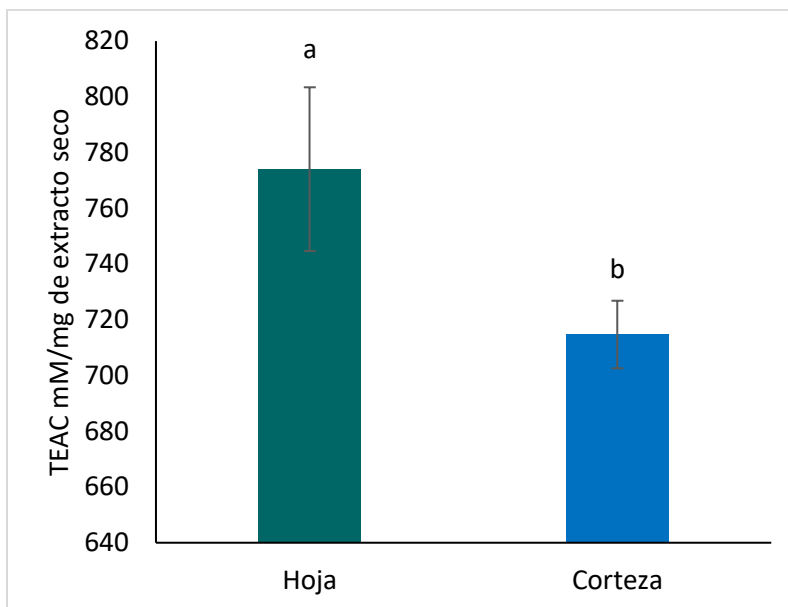


Figura 27. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) en mM/mg de extracto seco (ES) para extractos etanólicos, con tiempos de sonicación de 5 y 20 min en las hojas y la corteza respectivamente. Se muestran diferencias estadísticamente significativas entre el material biológico analizado (n=6 y p≤0.05).

Una vez cuantificados los fenoles totales, en extractos obtenidos mediante el método de la UPAE y por maceración, se utilizó la prueba de Tukey (p≤0.05) para evaluar diferencias significativas en cuatro órdenes diferentes de comparación.

Primero, se determinó que el contenido de fenoles totales no se ve afectado por el proceso de extracción, es decir, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos de fenoles totales obtenidos por maceración de 24 h o los tratamientos de la UPAE (**Figura 28**). No obstante, es importante resaltar que el porcentaje de sólidos recuperados es estadísticamente mayor mediante el método de la UPAE que por maceración (**Figura 21**), lo que en un proceso de extracción de diferentes metabolitos a partir del total de sólidos recuperados, significaría un incremento de recuperación de los compuestos bioactivos.

En cuanto a la recuperación de fenoles, se ha demostrado que uno de los disolventes más eficaces para la extracción de compuestos con actividad antioxidantes, entre los que

se encuentran los flavonoides, es el etanol (Santos y Gonçalves, 2016). En el presente trabajo se pudo verificar que independientemente del método, el contenido de fenoles totales se mantiene en los extractos recuperados.

En un segundo análisis, al comparar entre órganos, según el método de extracción, fue posible observar que el contenido de fenoles totales es estadísticamente mayor en la corteza (0.704 ± 0.04 mg GAE/mg de ES) al compararlo con el contenido en las hojas (0.496 ± 0.05 mg GAE/mg de ES). Por otro lado, se observa que los fenoles totales obtenidos por el método de la UPAE, no se ven afectado por tipo de órgano del cual se extraen (**Figura 28**).

7.5 Determinación y cuantificación de fenoles totales (Folin-Ciocalteu)

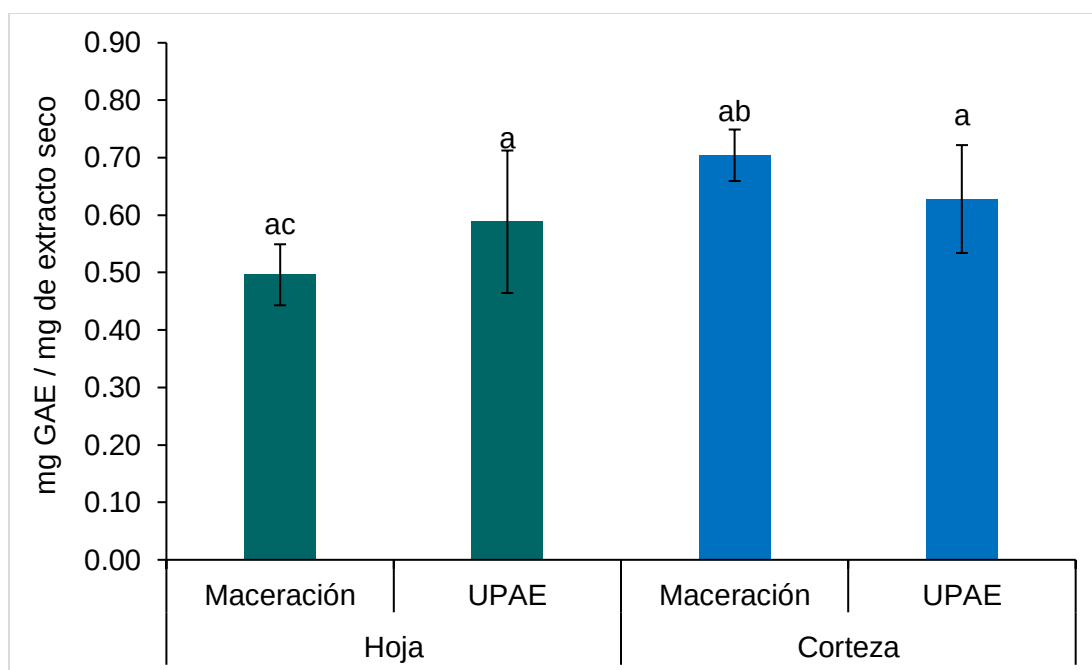


Figura 28. Contenido de fenoles totales en las hojas y la corteza de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, determinado mediante Folin-Ciocalteu. Se muestran los resultados de los extractos de maceración y del método UPAE, se expresan en mg equivalentes de ácido gálico (GAE) / por mg de extracto seco (ES). Letras diferentes y * indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Al analizar el efecto del tiempo de sonicación en el método de la UPAE, según el órgano, se observó que ninguno de los tiempos propuestos en este trabajo (5, 20, 40 y 50 min) afecta, estadísticamente, el contenido de fenoles totales obtenidos al final del proceso de extracción (**Figura 29**). Cabe resaltar, que en este análisis se observó un fenómeno similar al del realizado para determinar la eficiencia para los diferentes extractos con diferentes

tiempos de ultrasonificación (**Figura 21**). En este sentido, si el proceso requiere únicamente de la recuperación de fenoles totales, 5 y 20 min de la UPAE, tanto en las hojas como en corteza, respectivamente, serían suficientes para extraer una mayor cantidad de fenoles en comparación a la extracción por maceración por 24 h; esto debido a la cantidad de sólidos recuperados al final de la extracción. Además, es evidente que el tiempo se reduciría de horas a minutos. Rocha *et al.*, (2016) ya habían reportado que el aumento en el tiempo de sonicación sí interfiere en el incremento de contenidos de fenoles totales por recuperar al finalizar un proceso de extracción asistida por ultrasonido, sin embargo, su aseveración consideraba la relación de la harina-disolvente empleado. Para estos investigadores, una relación de 20 a 25 % p/v y un rango de tiempo de sonicación de 33 a 62 min lograron los contenidos fenólicos totales más altos en sus extracciones.

En este trabajo, sin embargo, el contenido de fenoles totales no varió, independientemente de los tiempos de sonicación asistida, lo cual pudiera relacionarse con lo descrito por Pompeu *et al.*, (2009), quienes señalaron que una alta proporción de disolvente reduce la energía necesaria para separar las moléculas, facilitando de esta forma la transferencia de masa, desde la matriz de la harina hacia el disolvente. Es decir, una baja relación p/v de harina-disolvente, requeriría menos potencia de sonicación para lograr el mismo efecto, o en su caso un menor tiempo de sonicación a una potencia constante. La relación harina disolvente empleada para desarrollar la presente investigación fue de 1.02 % p/v. Finalmente, se comparó el efecto del tiempo de sonicación sobre la extracción de compuestos fenólicos entre las hojas y la corteza de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, se determinó que solo 40 min de sonicación asistida, influyó sobre la recuperación de fenoles totales, resultando para la corteza ser estadísticamente mayor que la hojas, con 0.611 ± 0.08 y 0.522 ± 0.09 mg de GAE/mg de ES, respectivamente (**Figura 29**).

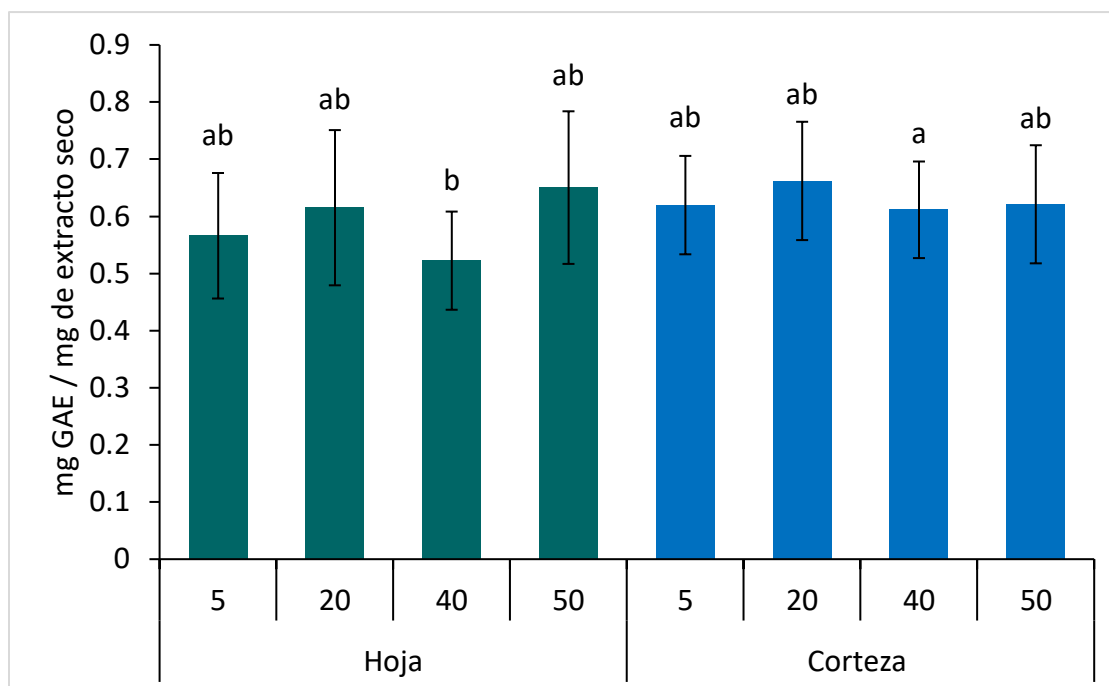


Figura 29. Contenido de fenoles totales en las hojas y la corteza de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida.

Se muestran los resultados de cada uno de los extractos de la UPAE según los tiempos de sonicación, se expresan en mg equivalentes de ácido gálico (GAE) / por mg de extracto seco (ES). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=12$).

7.6 Fitoquímica preliminar de flavonoides en placas de TLC

La fitoquímica preliminar de los subextractos metanólicos, obtenidos a partir de los extractos etanólicos, permitió observar bandas de posibles flavonoides presentes tanto en extractos de las hojas como de la corteza en *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida. Se observa, que, a diferentes longitudes de onda, 365 nm (**Figura 30 a, c**) o 254 nm (**Figura 30 b, d**) el patrón de bandeo cambia, ya sea para las muestras de las hojas o de la corteza (flechas rojas, **Figura 30 a** y **Figura 30 c**). En ambas condiciones de luz UV, quercetina (carril Q) se mantiene estable con un R_f de 0.96, similar ($R_f=0.9$) a lo reportado por Wagner y Bladt

(1996).

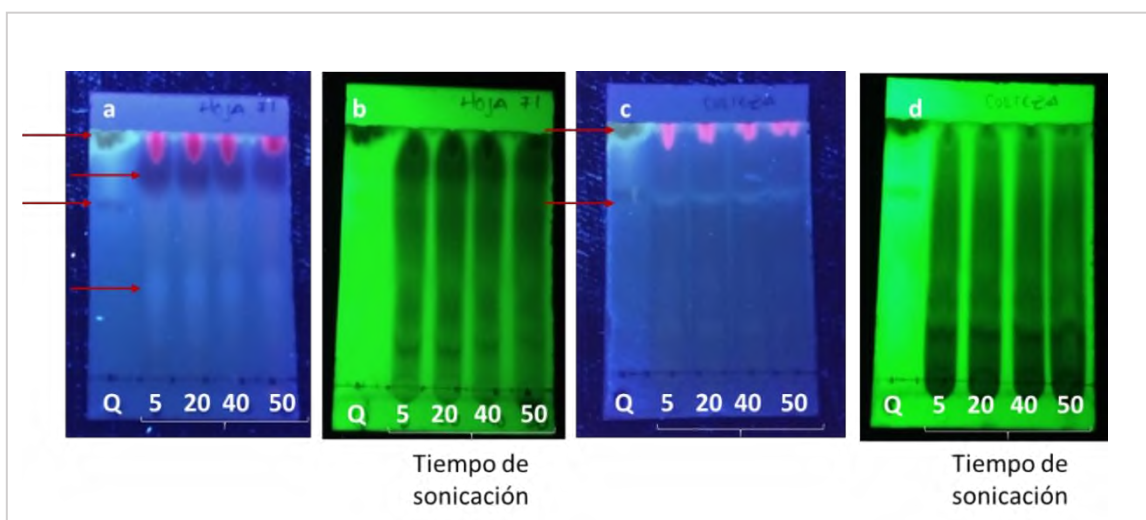


Figura 30. TLC para flavonoides. a, c) 365 nm y b, d) 264 nm.

Es importante resaltar que el comportamiento de las bandas en cada uno de los tratamientos de la UPAE (carriles con tiempos de sonicación), no cambia, por lo cual se puede decir que no hay un efecto del tiempo de sonicación sobre la apreciación de los diferentes flavonoides recuperados mediante el método de la UPAE. Considerando lo reportado por Wagner y Bladt (1996), se determinó la presencia de flavonoides específicos a partir de la comparación de los valores de R_f determinados en las muestras de la UPAE y los descritos en el libro (Tabla 11).

Tabla 11 Posibles compuestos de la familia de los flavonoides, localizados mediante valores de R_f como se visualiza en las placas de TLC de la Figura 31, según lo reportado por Wagner y Bladt, (1996).

Compuesto	R_f^* (wagner y Bladt, 1996)	R_f muestras UPAE
Isorhamnetina-rutinosil-glucósido	0.2	0.16
Rutina	0.4	0.3
Isorhamnetina e isoquercetina	0.6-0.7	0.66-0.84
Ácido cafeico o quercetina	0.9	0.96

*Los valores de R_f se calcularon a partir de una imagen reportada por Wagner y Bladt, (1996).

Es importante resaltar que la subextracción se realizó con el objetivo de concentrar los flavonoides en cada una de las muestras analizadas, por lo cual se enfatiza la detección de compuestos de la familia de los flavonoides. En la **Figura 31 a y b**, de las hojas y la corteza

respectivamente, se señalan con flechas rojas cada una de las bandas consideradas como posibles flavonoides, con sus respectivos valores de R_f , se puede observar, que en las hojas no se encontró el valor de $R_f=0.3$, que pudiera pertenecer a rutina.

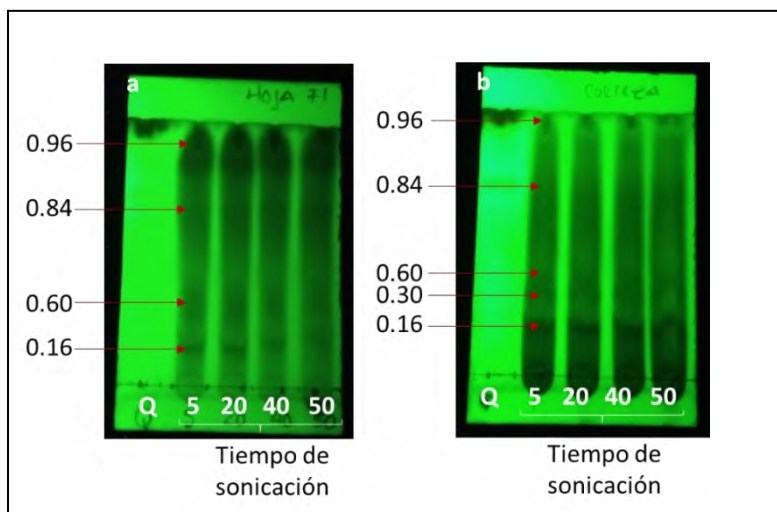


Figura 31. Placas de cromatografía en capa fina para la identificación de flavonoides a partir de valores de R_f reportados por Wagner y Bladt, (2016). Q) denota el control, quercetina, 5, 20, 40 y 50) denotan los tiempos de la sonicación del método de la UPAE. Se empleó la fase móvil de acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:26).

Con respecto a lo ya reportado para *Byrsonima crassifolia*, se ha señalado la identificación de compuestos como: la quercetina, isoquercetina (Bejar *et al.*, 1993; Amarquaye *et al.*, 1994; Bejar *et al.*, 1995), mismos que fueron observados a groso modo en este estudio fitoquímico preliminar en placas de TLC. Recientemente, de Sousa *et al.*, (2017) informaron sobre la presencia de quercetina 3- β -O-D-glucopiranosido en las hojas de *Byrsonima crassifolia*, confirmando la presencia de diversas moléculas del tipo de los flavonoides.

La presencia de tales compuestos con actividad antioxidante, además del alto contenido de fenólicos totales, pudiera correlacionarse con la elevada actividad antioxidante (Rolim *et al.*, 2013; Fraige *et al.*, 2016; dos Santos *et al.*, 2017).

7.7 Determinación y cuantificación de alcaloides totales

Diversas normas oficiales como la NOM-199-SCFI-2017 para bebidas alcohólicas-denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de

prueba; consideran la determinación de alcaloides como parte de la regulación mexicana para demostrar que las bebidas no produzcan efectos tóxicos. La NOM-AA-83-1982 para el análisis de agua-determinación de olor, así como el aviso de la declaratoria de vigencia consideran a los alcaloides como compuestos generadores de olor, por lo que es de suma importancia la verificación de la presencia o ausencia de compuestos alcaloides, bajo el contexto de un análisis fitoquímico preliminar.

Existen diferentes metodologías para la determinación de alcaloides. Las técnicas cualitativas más empleadas se basan en la capacidad de que tales compuestos forman sales; al combinarse con el yodo, y con los metales pesados se forman precipitados. Los reactivos más comunes para detectarlos son los siguientes: de Dragendorff, de Hager, de Bertrand, de Ehrlich y de Vitali-Morin, este último se usa para la detección de alcaloides básicos (Arango, 2008).

Entre los métodos oficiales para la determinación de alcaloides totales se describen la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), la fluorometría, la cromatografía iónica, la cromatografía de gases y la electrocromatografía. La desventaja de estos últimos es la de emplear elevadas temperaturas para extraerlos y prolongados tiempos de reacción (Shamsa *et al.*, 2008).

Se realizó, la metodología de Dragendorff, para la determinación de alcaloides tanto de las hojas como de la corteza, tal como se describe en materiales y métodos, los resultados obtenidos muestran que ninguno de los dos órganos fue positivos a alcaloides por esta técnica. Mientras que, en los tubos de reacción con cafeína, como control positivo, se generó un precipitado naranja al reaccionar con el yodo (**Figura 32 a, b**).

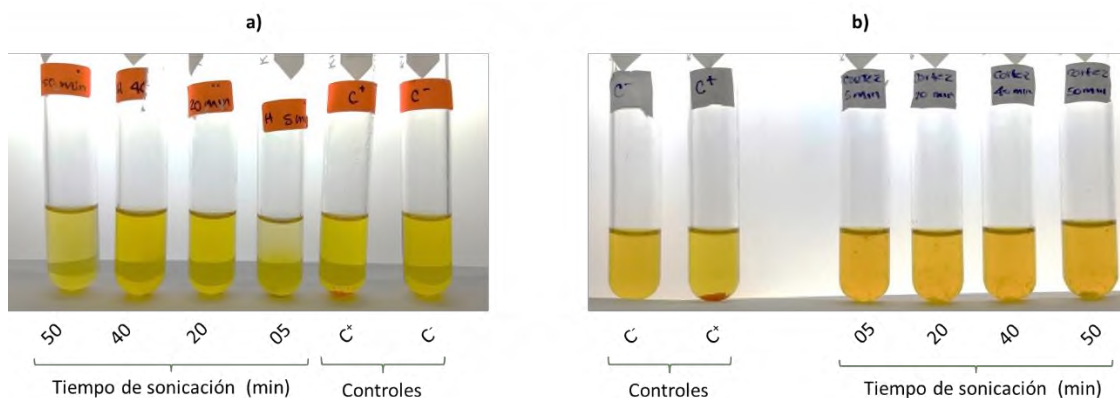


Figura 32. Determinación cualitativa de alcaloides en extractos etanólicos de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, mediante el método de Dragendorff. Se observan a) los extractos obtenidos de las hojas y b) los extractos obtenidos de la corteza. 5, 20, 40 y 50 min son los tiempos de ultrasonido. C⁺ denota control positivo (cafeína) y C⁻ control negativo (sin cafeína).

Tradicionalmente, se ha considerado a la prueba de Dragendorff como poco sensible para la detección de alcaloides, por lo que se corroboraron los resultados mediante un método analítico. Para este propósito se empleó la metodología propuesta por Shamsa *et al.*, (2008), quienes reportaron, que mediante la formación de un complejo de transferencia de carga alcaloide-verde de bromocresol, a un pH de 4.7, es posible correlacionar los valores de absorbancia a 420 nm, con la concentración equivalente a un alcaloide de referencia.

Los resultados de cuantificación de alcaloides obtenidos mediante la modificación de la técnica de Shamsa *et al.*, (2008), sugieren que solo las hojas contienen esta familia de compuestos, con un promedio de hasta 18.82 µg/ml de alcaloides equivalentes a Atropina por mg de extracto seco (**Figura 33**). No se detectó en la corteza empleando una concentración de lectura de 300 µg/ml (la sensibilidad y estabilidad corroboradas en este trabajo fue de hasta 2 µg/ml de Atropina a partir de 4 µg). Por otro lado, destaca que el contenido de metabolitos en las hojas de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, es indistinto de la metodología de extracción y de los tiempos de sonicación asistido empleados en la metodología de la UPAE, pues con una significancia del 95 % se corroboró que no presentan diferencias estadísticamente significativas.

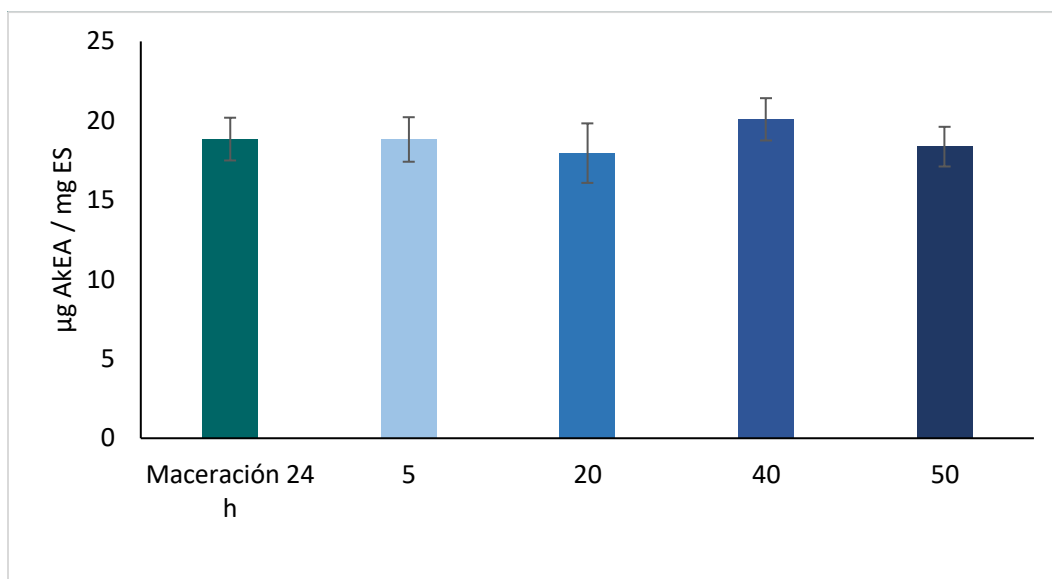


Figura 33. Alkaloides totales en extractos etanólicos de las hojas de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, empleando la técnica de Shamsa *et al.*, (2008). Se muestran los valores en microgramos de alcaloides equivalentes a atropina/mg de extracto seco ($\mu\text{g AKEA/mg ES}$), en extractos obtenidos por el método de maceración por 24 h y extractos de la UPAE con los diferentes tiempos de ultrasonido propuestos.

Al comparar los resultados aquí obtenidos, se encontró que extractos acuosos de las hojas de *Moringa oleifera* Lam., contienen entre 0.58 y 0.77 μg de alcaloides equivalentes de atropina por mg de extracto determinado mediante HPLC (Cabrera-Carrion *et al.*, 2017), una menor concentración de alcaloides a los determinados en este trabajo. A partir de lo cual, se concibe la idea de encontrar estructuras de compuestos con potencial actividad relacionado a alcaloides. Dado que el objetivo del presente trabajo no consistió en definir la presencia de alcaloides en las plantas, se considera que esta puede ser una perspectiva interesante por abordar, dado la incongruencia que se presentó al determinar alcaloides con dos métodos diferentes.

8. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se optimizó el tiempo en función del rendimiento de sólidos recuperados, en el proceso de extracción con disolventes asistida con ultrasonido y prensado.

Se corroboró que la actividad antioxidante en las hojas de *Byrsonima crassifolia* previamente reportada por de Sousa *et al.*, (2017), se contribuyó demostrando que la corteza también presenta actividad antioxidante. Además, se estableció un método para la extracción de compuestos con actividad antioxidante con disolventes asistido con ultrasonido y prensado (UPAE) (Roldan-Sabino *et al.*, 2018). Se determinó que el método de extracción con disolventes asistido con ultrasonido y prensado es más eficiente que la extracción por maceración.

El tiempo óptimo de sonicación en este estudio, se determinó para las hojas de 5 min, mientras que para la corteza de 20 min. Tiempos mayores de sonicación en la extracción de compuestos antioxidantes de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, son innecesarios. La mayor actividad antioxidante se determinó en extractos etanólicos, seguido del hexánico y finalmente del diclorometano.

La actividad se distribuye entre compuestos polares y no polares. De forma presuntiva se observó la presencia de flavonoides, de entre los cuales se identificaron de manera tentativa la quercetina 3- β -O-D-glucopiranosido, la isorhamnetina-rutinosil-glucósido, la rutina, la isorhamnetina, y un compuesto con valores de R_f similares a la isoquercetina o al ácido cafeico. Aunado a esto, mediante la metodología de Folín-Ciocalteu, para la determinación de fenoles totales, se cuantificó 0.59 y 0.704 mg GAE/mg de ES en las hojas y la corteza respectivamente.

La metodología de Draguendorff no fue un buen método para la determinación de alcaloides en extractos de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, sin embargo, el método de Shamsa *et al.*, (2008) permitió estimar una concentración de 18.82 μ g de alcaloides equivalentes a atropina/mg de extracto seco de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida.

9. PERSPECTIVAS

Se considera importante la evaluación de la capacidad de los agentes antioxidantes en el desarrollo de productos alimenticios o los procesos de producción. Además, de evaluar efectos farmacológicos o nutraceuticos de los mismos.

Se propone la evaluación de otras actividades biológicas, como la antimicrobiana, a partir de los extractos de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida. El estudio de actividad antihipoglucemiante y de antiproliferación de células cancerígenas.

Es importante, además, el aislamiento, identificación y elucidación de las estructuras químicas que puedan relacionarse con los estudios de actividad biológica.

Por otra parte, se propone avanzar en los estudios relacionados con el proceso de extracción con disolvente asistido por ultrasonido y prensado, para determinar el factor o las condiciones de extracción óptimos en el método de UPAE, teniendo en cuenta el prensado, la temperatura, relación disolvente-harina, porcentaje de pureza de disolvente y la potencia del ultrasonido.

10. REFERENCIAS

- Aherne, S. A., O' Brien, N. M. (2000). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 18(1), 75–81.
- Albíter, C. J., de los Santos, G. G., Carballo, A. C., Zavala, G. C., Albíter, F. J., y Sánchez, J. A. C. (2014). Tolerancia a la desecación en semillas de nanche (*Byrsonima crassifolia* L.) Kunth. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(5), 819-831.
- Al-Juhaimi, F., Adiamo, O. Q., Ghafoor, K., & Babiker, E. E. (2016). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seed. *CyTA-Journal of Food*, 14(3), 369-374.
- Almeida, M. M. B., de Sousa, P. H. M., Arriaga, Â. M. C., do Prado, G. M., de Carvalho Magalhães, C. E., Maia, G. A., y de Lemos, T. L. G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44(7), 2155-2159.
- Amarquaye, A., Che, C. T., Bejar, E., Malone, M. H., y Fong, H. H. (1994). A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. *Planta Medica*, 60(01), 85-86.
- Amirkia, V., y Heinrich, M. (2014). Alkaloids as drug leads—A predictive structural and biodiversity-based analysis. *Phytochemistry Letters*, 10(2014), 48-53.
- Anderson, W. R., Anderson, C., y Davis C. C. 2006. Malpighiaceae. University of Michigan: Recuperado de <http://herbarium.lsa.umich.edu/malpigh/index.html>
- Antonio Blanco, Gustavo Blanco, Chapter 10 - Antioxidants, Editor(s): Antonio Blanco, Gustavo Blanco, Medical Biochemistry, Academic Press, 2017, Pages 205-214 , ISBN 9780128035504.
- Arango, G. (2008). Alcaloides y compuestos nitrogenados. Universidad de Antioquía. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, Colombia, 31-32.
- Ávalos, G. A. y Pérez, C.U. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal 2(3), 119-145.

- Azuola, R., y Vargas-Aguilar, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Revista Tecnología en Marcha*, 20(4).
- Balasundram, N., Sundram, K., y Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
- Barrera, C. A. C., Parra, J., y Suarez, L. E. C. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (rutaceae). *Elementos*, 4(4), 31-39.
- Bejar, E., Amarquaye, A., Che, C. T., Malone, M. H., y Fong, H. H. (1995). Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. *International journal of pharmacognosy*, 33(1), 25-32.
- Béjar, E., y Malone, M. H. (1993). Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima crassifolia*, a medicinal tree from Mexico. Part I. *Journal of Ethnopharmacology*, 39(2), 141-158.
- Bertoli, A., Ruffoni, B., Pistelli, L., y Pistelli, L. (2010). Analytical methods for the extraction and identification of secondary metabolite production in 'in vitro' plant cell cultures. In *Bio-Farms for Nutraceuticals* (pp. 250-266). Springer, Boston, MA.
- BIBLIOTECA DIGITAL de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009-2018). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. México, México.: Recuperado de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=nanche&id=7985>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., y Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., y Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.
- Brusotti, G., Cesari, I., Dentamaro, A., Caccialanza, G., y Massolini, G. (2014). Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 87(2014), 218-228.

- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Burton, G. J., y Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *best practice and research clinical obstetrics and gynaecology*, 25(3), 287-299.
- Buszewski, B., y Noga, S. (2011). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 402(1), 231-47.
- Cabrera-Carrion, J. L., Jaramillo-Jaramillo, C., Dután-Torres, F., Cun-Carrion, J., Garcia, P. A., y Rojas, A. (2017). Variation of alkaloid, phenol, flavonoid, and tanin content in *Moringa oleifera* Lam. as a function of plant age and height. *Bioagro*, 29(1), 53-60.
- Caceres, A., Cano, O., Samayoa, B., y Aguilar, L. (1990). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 30(1), 55-73.
- Cáceres, A., Fletes, L., Aguilar, L., Ramirez, O., Figueroa, L., Taracena, A. M., y Samayoa, B. (1993). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 38(1), 31-38.
- Caceres, A., Lopez, B. R., Giron, M. A., y Logemann, H. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 31(3), 263-276.
- Cheeke, P. R. (2001) Glycosides: naturally occurring. In *eLS*, John Wiley y Sons, Recuperado de 10.1038/npg.els.0000692
- Chin, Y. W., Balunas, M. J., Chai, H. B., y Kinghorn, A. D. (2006). Drug discovery from natural sources. *The American Association of Pharmaceutical Scientists journal*, 8(2), 239-253.
- Correa A, Mireya D. (2002). *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth. Vozzo, J. A. (Ed.), Tropical tree seed manual (pp. 342-345). Washington, EUA: United States Department of Agriculture Forest Service. Recuperado de <https://rngr.net/publications/ttsm/species/PDF.2003-11-13.2105>
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, 3(2), 156.

- Croft, G. K., y Schaal, B. A. (2012). Development of microsatellite markers in *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae). *American journal of botany*, 99(3), 111-113.
- Cui, H. Y., Niranjana Murthy, H., Moh, S. H., Cui, Y. Y., Lee, E. J., y Paek, K. Y. (2014). Comparison of conventional and ultrasound-assisted methods for extraction of nutraceutical compounds from *Dendrobium candidum*. *CyTA-Journal of Food*, 12(4), 355-359.
- Da Porto, C., Porretto, E., y Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(4), 1076-1080.
- de Souza, R. O., Alves, G. D. A. D., Forte, A. L. S. A., Marquele, O. F., da Silva, D. F., Rogez, H., y Fonseca, M. J. V. (2017). *Byrsonima crassifolia* extract and fraction prevent UVB-induced oxidative stress in keratinocytes culture and increase antioxidant activity on skin. *Industrial Crops and Products*, 108(2017), 485-494
- Dias, D. A., Urban, S., y Roessner, U. (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2), 303-336.
- dos Santos, V. S., Nascimento, T. V., Felipe, J. L., Boaretto, A. G., Damasceno-Junior, G. A., Silva, D. B., y Carollo, C. A. (2017). Nutraceutical potential of *Byrsonima cydoniifolia* fruits based on chemical composition, anti-inflammatory, and antihyperalgesic activities. *Food Chemistry*, 237(2017), 240-246.
- Duarte, O. (2011). Nance (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth). Yahia E. M. (Ed.), Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits (pp. 44-50). Padstow, Cornwall, UK: Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition.
- El-Bahr, S. M. (2013). Biochemistry of free radicals and oxidative stress. *Science international*, 1(5), 111-117.
- Espada-Domínguez, L., Ferrer-Serrano, A., Batista-King, Y., Bandera-Nápoles, A., y Almeida-Acosta, Y. (2016). Separación y clasificación de los alcaloides presentes en las hojas y flores de la especie *Spilanthes urens* Jacq. *Revista Cubana de Química*, 28(1), 409-430.

- Ezoddin, M., Adlnasab, L., y Karimi, M. A. (2019). Ultrasonically formation of supramolecular based ultrasound energy assisted solidification of floating organic drop microextraction for preconcentration of methadone in human plasma and saliva samples prior to gas chromatography–mass spectrometry. *Ultrasonics sonochemistry*, 50(2019), 182-187.
- Fitriana, W. D., Ersam, T., Shimizu, K., y Fatmawati, S. (2016). Antioxidant activity of *Moringa oleifera* extracts. *Indonesian Journal of Chemistry*, 16(3), 297-301.
- Foti, M. C. (2007). Antioxidant properties of phenols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(12), 1673-1685.
- Fraige, K., Cabral, R. S., Freitas, L., Young, M. C. M., y Bolzani, V. S. Screening of antioxidant, antiglycation and anti-acetylcholinesterase activities of plants from malpighiaceae family. November 22–25, 2016, Termas de Chillan–Chile, 199.
- Franco, D., y Moure, A. (2010). Antioxidantes naturales. Aspectos saludables, toxicológicos y aplicaciones industriales. Editorial Xunta de Galicia. ISBN, 978-84.
- Geiss, F., Heinrich, M., Hunkler, D., y Rimpler, H. (1995). Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. *Phytochemistry*, 39(3), 635-643.
- González, T. M. C., Betancourt R. M. y Ortiz M. R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1).
- Guerra-Ramírez, D., Hernández-López, A., Guerra-Ramírez, P., Reyes-Trejo, B., Ibarra Vega, P. (2013). ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Heliocarpus appendiculatus* Turcz en *Artemia franciscana*. 2DO CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIAS BASICAS Y AGRONOMICAS. UNACH. Chapingo. México.
- Guilhon-Simplicio, F., Pereira De Souza, T., Antônio-Alonso, A., Oliveira de Almeida, O. D., Alexandre dos Santos, p., Teixeira-Ohana, D., Silva-Lima, E. y de Meneses-Pereira M. (2013). Antioxidant activity of a standardized extract of *Byrsonima japurensis* A. Juss. (Malpighiaceae) stem bark. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(26), 1926-1930.
- Gutierrez, R. M. P., y Flores, J. M. M. (2014). Effect of chronic administration of hexane extract of *Byrsonima crassifolia* seed on β -cell and pancreatic oxidative parameters in streptozotocin-induced

- diabetic rat. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(2), 231-236.
- Gutiérrez, R. M. P., y Ramirez, A. M. (2013). Hexane extract of the seeds of *Byrsonima crassifolia* accelerates wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 1-7.
- Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 373(1), 23-30.
- Jones, W. P., y Kinghorn, A. D. (2006). Extraction of plant secondary metabolites. In 'Natural products isolation'. 2nd edn. (Eds SD Sarker, Z Latif, Al Gray) pp. 323–351.
- Jones, W. P., y Kinghorn, A. D. (2006). Extraction of plant secondary metabolites. *In Natural products isolation* (pp. 323-351). Humana Press.
- Knorr, D. (2003). Impact of non-thermal processing on plant metabolites. *Journal of Food Engineering*, 56(2), 131-134.
- Kunth, C. S. (1822). *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth. *Nova Genera et Species Plantarum* (5), 149. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/35-malpi1m.pdf.
- Li, J., Zhao, W., Li, J., Xia, W., Lei, L., y Zhao, S. (2014). Research methods to study plant secondary metabolic pathways and their applications in the analysis of the biosynthetic pathway of stilbenes from '*Polygonum multiflorum*'-a review. *Plant Omics*, 7(3), 158.
- López, Á. M., Alvarez, E., Cortés, C., Rosero, M., Taborda, G., & Garzón, W. (2016). Implementación de una extracción dinámica con disolvente asistida por sonicación (DSASE) en matrices de hoja de *Erythroxylum coca* para el posterior análisis de cocaína por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG–FID). *Scientia Chromatographica*, 8(2):115-120.
- Lopez-Romero, J. C., Ansorena, R., Gonzalez-Aguilar, G. A., Gonzalez-Rios, H., Ayala-Zavala, J. F., y Siddiqui, M. W. (2016). Chapter 5: Applications of plant secondary metabolites in food systems. *Plant Secondary Metabolites*, 2, 195-232.

- Loyola, V., V. M., Sánchez, I., P., Canto, C., B., Gutiérrez, P., L. C., Galaz, Á., R. M., y Moreno, V., O. (2004). Biosíntesis de los alcaloides indólicos: Una revisión crítica. *Revista de la Sociedad Química de México*, 48(1), 67-94.
- Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., y Chen, C. (2009). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(4), 840-60.
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, 224, 164-175.
- Maldini, M., Sosa, S., Montoro, P., Giangaspero, A., Balick, M. J., Pizza, C., y Della L. R. (2009). Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. *Journal of ethnopharmacology*, 122(3), 430-433.
- Maldonado Peralta, M. D. L. Á., García de los Santos, G., García Nava, J. R., Corona Torres, T., Cetina Alcalá, V. M., y Ramírez Herrera, C. (2016). Calidad morfológica de frutos y endocarpios del nanche rojo (*Malpighia mexicana*, Malpighiaceae). *Acta botánica mexicana*, (117), 37-46.
- Maran, J. P., Manikandan, S., Nivetha, C. V., y Dinesh, R. (2017). Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. *Arabian journal of chemistry*, 10(2017), 1145-1157.
- Mariutti, L. R., Rodrigues, E., Chisté, R. C., Fernandes, E., y Mercadante, A. Z. (2014). The Amazonian fruit *Byrsonima crassifolia* effectively scavenges reactive oxygen and nitrogen species and protects human erythrocytes against oxidative damage. *Food research international*, 64(2), 618-625.
- Martínez, A. J. S., Sierra, A. J. I., Arrubla, J. R. C., y Martínez, Y. P. N. (2011). Metabolitos secundarios en el guayacán amarillo y en el guayacán rosado. *Scientia et technica*, 17(47), 297-301.
- Martínez, F. S., González, G. J., Culebras, J. M., y Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17(6), 271-278.
- Martínez, V. M., Gonzalez, E. A. R., Luna, L. C., Gutiérrez, M. M., y García A. A. N. (1999). Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) HBK. *Journal of ethnopharmacology*, 66(1), 79-82.

- Martínez-Moreno, E., Corona Torres, T., Avitia García, E., Castillo González, A. M., Terrazas, T., Colinas León, M. y Medina Torres, R. (2010). Caracterización morfológica de hojas de nanche (*Byrsonima crassifolia* (L.) HBK). *Revista fitotecnica mexicana*, 33(4), 15-19.
- Martínez-Moreno, E., Corona-Torres, T., Avitia-García, E., Castillo-González, A. M., Terrazas-Salgado, T., y Colinas-León, M. T. (2006). Caracterización morfométrica de frutos y semillas de nanche (*Byrsonima crassifolia* (L.) HBK). *Revista Chapingo serie Horticultura*, 12(1), 11-17.
- McDonnell, C., y Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound: A Clean, Green Extraction Technology for Bioactives and Contaminants. *Green Extraction Techniques: Principles, Advances and Applications*, 76, 111.
- Moraes, V. D. F., Müller, C. H., De Souza, A. G. C., y Antonio, I. C. (1994). Native fruit species of economic potential from the Brazilian Amazon. *Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em periódico indexado*, 68(1-2), 47-52.
- Nakamura, M., Ra, J. H., Jee, Y., y Kim, J. S. (2017). Impact of different partitioned solvents on chemical composition and bioavailability of *Sasa quelpaertensis* Nakai leaf extract. *Journal of food and drug analysis*, 25(2), 316-326.
- Navarro, V., Villarreal, M. L., Rojas, G., y Lozoya, X. (1996). Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of ethnopharmacology*, 53(3), 143-147.
- Ndam, L. M., Mih, A. M., Fongod, A. G. N., Tening, A. S., Tonjock, R. K., Enang, J. E., y Fujii, Y. (2014). Phytochemical screening of the bioactive compounds in twenty (20) Cameroonian medicinal plants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(12), 768-778.
- Ogut, F. O., y Mu, T. H. (2017). Ultrasonic degradation of sweet potato pectin and its antioxidant activity. *Ultrasonics sonochemistry*, 38(2017), 726-734.
- Ovodov, Y., S. (2010). Bioglycans and natural glycosides as a promising research topic in bioorganic chemistry. *Acta Naturae*, 2(2), 28-36.
- Pagni, R. M. (2003). Techniques in organic chemistry: miniscale, standard taper microscale, and Williamson microscale. New York, Estados Unidos: W. H. Freeman and Company.

- Pompeu, D. R., Rogez, H. L. G., Tinti, S. V., Monteiro, K. M., y Carvalho, J. E. D. (2012). Capacidad antioxidante e triagem farmacológica de extratos brutos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e de *Inga edulis*. *Acta Amazonica*, K(1), 165-172.
- Pompeu, D. R., Silva, E. M., y Rogez, H. (2009). Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. *Bioresource technology*, 100(23), 6076-6082.
- Pozos, G., Madai, A., Cruz Cruz, E., y Miranda, C. C. A. (2013). Germinación de semillas de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 4(20), 82-89.
- Pradedova, E. V., Isheeva, O. D., y Salyaev, R. K. (2011). Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants. *Russian Journal of plant physiology*, 58(2), 210-217.
- Quintanar, E. M. A., y Calderón, S. J. V. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de educación bioquímica*, 28(3), 89-101.
- Rafiee Z., Jafari S., Alami M., y Khomeiri M., Microwave assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *The Journal of Animal y Plant Sciences*, 21(4), 2011, Page: 738-745
- Rao, P. S., Kalva, S., Yerramilli, A., y Mamidi, S. (2011). Free radicals and tissue damage: role of antioxidants. *Free radicals and antioxidants*, 1(4), 2-7.
- Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39(5), 603-613.
- Raya-Pérez, J. C., Aguirre-Mancilla, C. L., Gil-Vega, K., y Simpson, J. (2010). La domesticación de plantas en México: Comparación de la forma cultivada y silvestre de *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae). *Polibotánica*, (30), 239-256.
- Rezende, C. M., y Fraga, S. R. (2003). Chemical and aroma determination of the pulp and seeds of murici (*Byrsonima crassifolia* L.). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14(3), 425-428.
- Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Current Medical Chemistry*, 8, 797-807.

- Rivero-Cruz, J. F., Sánchez-Nieto, S., Benítez, G., Casimiro, X., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A., y Rivero-Cruz, B. (2009). Antibacterial compounds isolated from *Byrsonima crassifolia*. *Revista Latinoamericana de Química*, 37, 155-163.
- Robles-Ozuna, L. E., y Ochoa-Martínez, L. A. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. *Revista iberoamericana de tecnología postcosecha*, 13(2), 129-122.
- Rocha, G, J. C., Procópio, R, F., Mendonça, C, A., Vieira, M, L., Perrone, T, Í., Barros, de R, F. A. y Stringheta, P. C. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from jussara (*Euterpe edulis* M.) and blueberry (*Vaccinium myrtillus*) fruits. *Food Science and Technology*, 38(1), 45-53.
- Rodrigues, S. M., Moura, E. F., Ramos, G. K., ana Oliveira, M. S. (2016). Genetic variability analysis of *Byrsonima crassifolia* germplasm collected in Pará State using ISSR markers. *Genetic Molecular Research*, 15(4), 1-11.
- Roldan-Sabino, C., Viñas-Bravo, O., Parra-Reyes, A., Galero-Martínez, N., Avila-Alejandro, A. y Hernández-López A. (2018). Effect of sonication and pressing on recovery of compounds with antioxidant activity from leaves and bark of *Byrsonima crassifolia*. *Journal Of Bioengineering And Biomedicine Research*. 2(3), 1-8.
- Rolim, T. L., Wanderley, F. T. S., Cunha, E. V. L., Tavares, J. F., Oliveira, A. M. F., y Assis, T. S. (2013). Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Byrsonima gardneriana* (Malpighiaceae). *Química Nova*, 36, 524-527.
- Roque, A. C., Vela, G., Pérez, J., Escobar, R., y Ballinas, J. (2012). Nota Científica: Uso de nanche (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) en gelatina artesanal para niños. *Etnobiología*, 10(2), 50-55.
- Safdar, M. N., Kausar, T., & Nadeem, M. (2017). Comparison of Ultrasound and Maceration Techniques for the Extraction of Polyphenols from the *Mango Peel*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4), e13028.
- Santos, M. C., & Gonçalves, É. C. (2016). Effect of different extracting solvents on antioxidant activity and phenolic compounds of a fruit and vegetable residue flour. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 7-14.

- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., y Yoga Latha, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 8(1), 1–10.
- Schieber, M., y Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology : CB*, 24(10), R453-62.
- Sepúlveda, J., G., Porta, D., H., y Rocha Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (/snics) (2017-2018). Nanche (*Byrsonima crassifolia* L.)*. Generalidades de la Red del Nanche. México. gob.mx. Recuperado de: <https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/nanche-byrsonima-crassifolia-l>
- Shahidi, F. (2015). Antioxidants: Principles and applications. In *Handbook of antioxidants for food preservation. Food Science, Technology and Nutrition*. pp. 1-14.
- Sharif, S. N., y Al-kayali, R. (2016). TLC screening and evaluation of antioxidant, antibacterial activity of *Onopordon Macrocephalum* by bioautography method. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(2), 1-8.
- Sherma, J. (2018). Biennial review of planar chromatography: 2015–2017. *Journal of AOAC International*, 101(4), 905-913
- Thammana, M. (2016). A review on high performance liquid chromatography (HPLC). *Department of Pharmacy, Vignan Institute of Pharmaceutical Technology, Duvvada, India*, 25.
- Thorat, I. D., Jagtap, D. D., Mohapatra, D., Joshi, D. C., Sutar, R. F., y Kapdi, S. S. (2013). Antioxidants, their properties, uses in food products and their legal implications. *International Journal of Food Studies*, 2(1), 81-104.
- Timm, M., Saaby, L., Moesby, L., y Hansen, E. W. (2013). Considerations regarding use of solvents in *in vitro* cell based assays. *Cytotechnology*, 65(5), 887–894.
- Tistaert, C., Dejaegher, B., y Vander Heyden, Y. (2011). Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: a review. *Analytica chimica acta*, 690(2), 148-161.

- Tiwari, R., y Rana, C. S. (2015). Plant secondary metabolites: a review. *International Journal Of Engineering Research and General Science*, 3(5), 661-670.
- Ung, L., Pattamatta, U., Carnt, N., Wilkinson-Berka, J. L., Liew, G., y White, A. J. (2017). Oxidative stress and reactive oxygen species: a review of their role in ocular disease. *Clinical Science*, 131(24), 2865-2883.
- Vaishnav, P., y Demain, A. L. (2011). Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 29(2), 223-229.
- Vásquez, M. R. S. (2015). Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. In *Crescendo*, 6(1), 33-43.
- Vazquez-Cahuich, D. A., Espinosa Moreno, J., Centurion Hidalgo, D., Velazquez Martinez, J. R., Borges-Argaez, R., y Caceres Farfan, M. (2013). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of *Malvaviscus arboreus* cav, *Pimenta dioica* (L.) merr., *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth and *Psidium guajava* l. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16(3), 505-513.
- Venereo, G. J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*, 31(2), 126-133.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics sonochemistry*, 8(3), 303-313.
- Visht, S., y Chaturvedi, S. (2012). Isolation of natural products. *Current Pharma Research*, 2(3), 584.
- Wagner, H., y Bladt, S. (1996). Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. *Springer Science y Business Media*.
- Wink, M. (2010). Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. *Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, Second Edition*, 1-19.
- World Health Organization. (2000). General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine (No. WHO/EDM/TRM/2000.1). Geneva: *World Health Organization*.

- Yadav, N., Yadav, R., y Goyal, A. (2014). Chemistry of terpenoids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 27(2), 272-278.
- Zapata, S., Piedrahita, A. M., y Rojano, B. (2014). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic content of fruits and vegetables from Colombia. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 16(1), 25-36.
- Zenil, L. N., Colinas, L. M. T., Bautista, B. C., Vázquez, R. T. R., Lozoya, S. H., y Martínez, D. M.T. (2014). Fenoles totales y capacidad antioxidante estimada con los ensayos DPPH/ABTS en rosas en soluciones preservantes. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(6), 1029-1039.
- Zhong, Y., y Shahidi, F. (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. In *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (pp. 287-333).

11. ANEXO

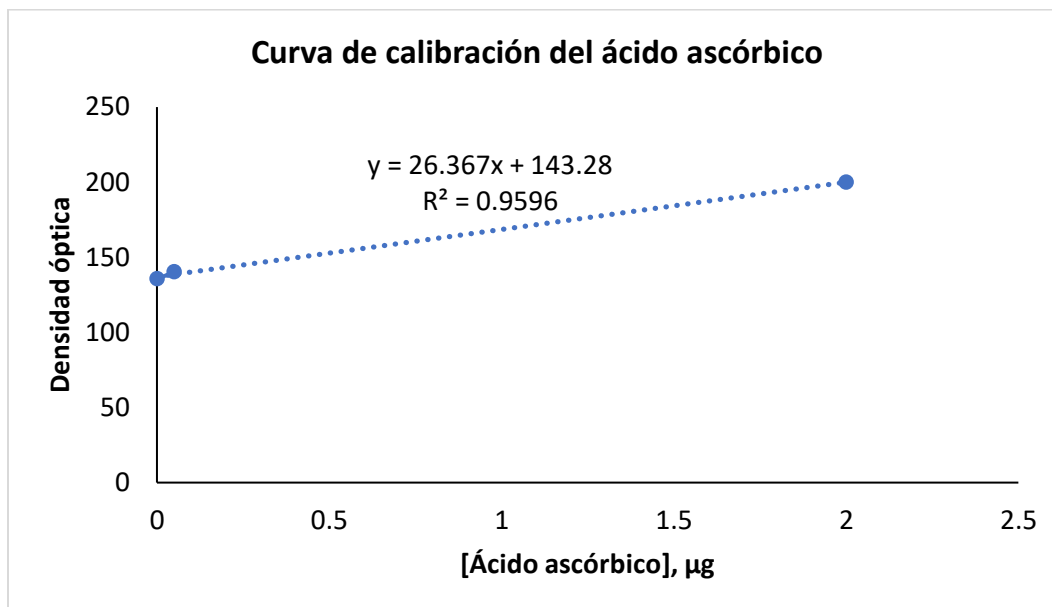


Figura a. Curva de calibración del ácido ascórbico para la cuantificación de equivalentes a ácido ascórbico en extractos etanólicos de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, mediante el ensayo de actividad antioxidante en TLC.

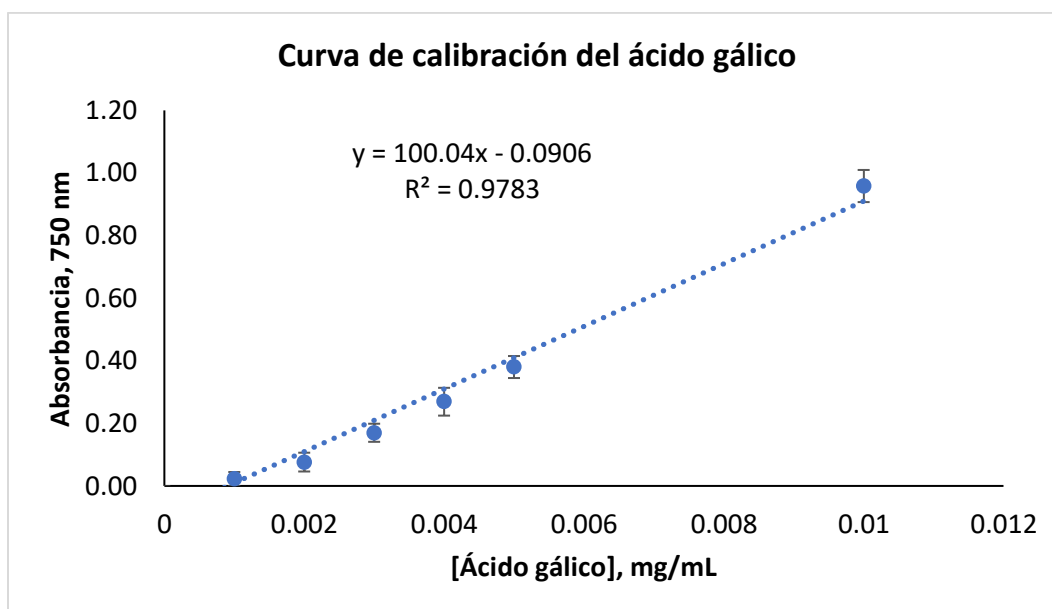


Figura b. Curva de calibración del ácido gálico para la determinación de equivalentes de ácido gálico en extractos etanólicos de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu.

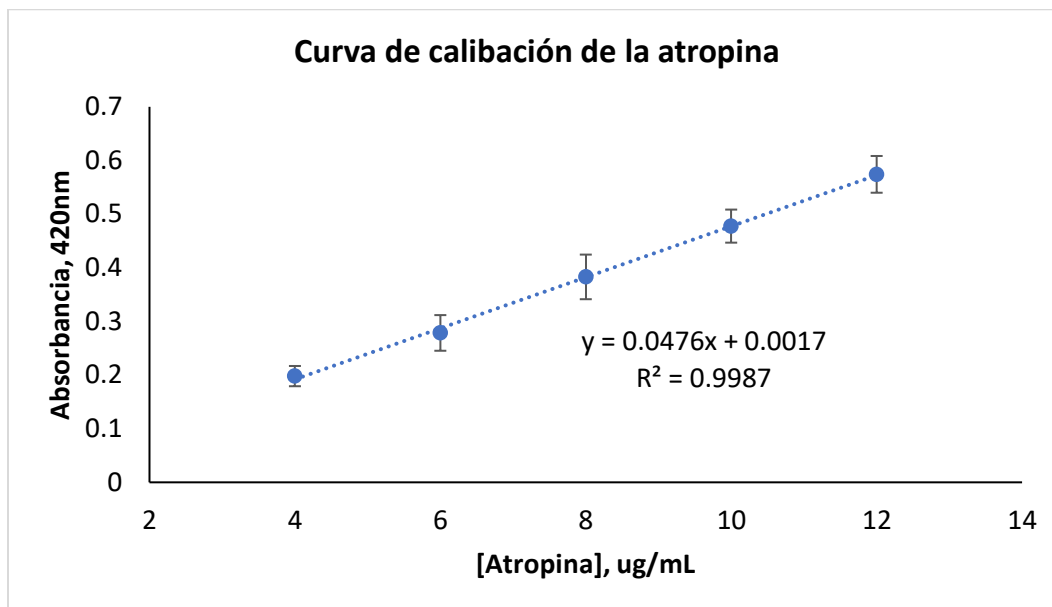


Figura c. curva de calibración de la atropina para la determinación de equivalentes a atropina en extractos etanólicos de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, mediante el método de Shamsa *et al.*, 2008 (modificado).

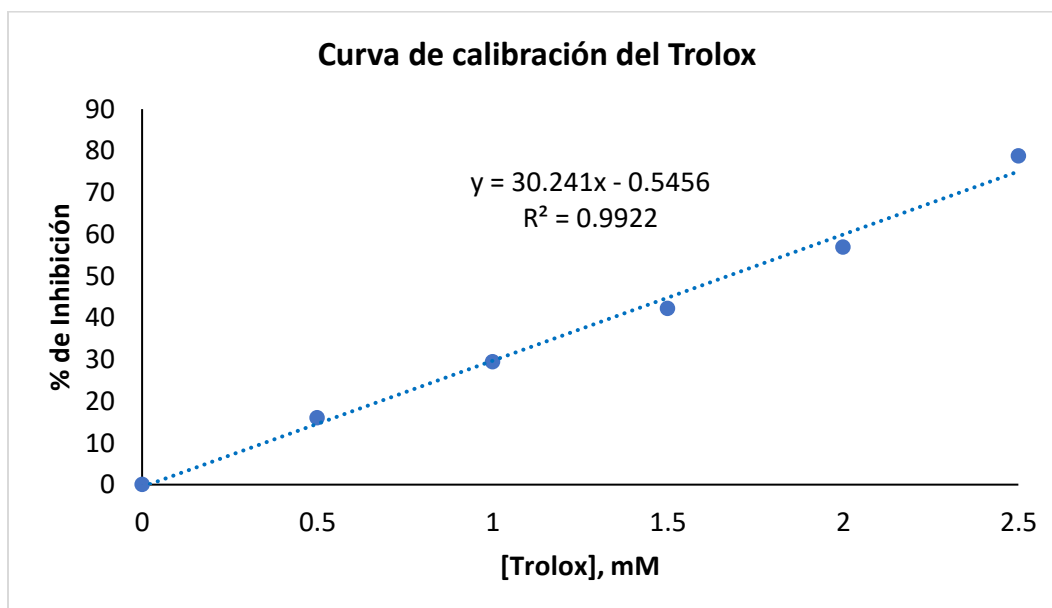


Figura d. Curva de calibración del Trolox para la determinación de equivalentes a Trolox en extractos etanólicos de *Byrsonima crassifolia*, variedad ácida, mediante el ensayo del ABTS^{•+}.

Research article

Effect of sonication and pressing on recovery of compounds with antioxidant activity from leaves and bark of *Byrsonima crassifolia*

Roldan-Sabino Crisanto^{1,4}, Viñas-Bravo Omar^{2,4}, Parra-Reyes Aridaith⁴, Galero-Martínez Nelda X^{2,4}, Avila-Alejandro Alma X^{3,4}, Hernández-López Alejandro^{*1,4,5}

¹ División de estudios de posgrado, Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Circuito Central # 200, Col. Parque Industrial, C.P. 68301, Tuxtepec, Oax, México.

² Instituto de Química aplicada, Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Circuito Central # 200, Col. Parque Industrial, C.P. 68301, Tuxtepec, Oax, México.

³ Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Circuito Central # 200, Col. Parque Industrial, C.P. 68301, Tuxtepec, Oax, México.

⁴ Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Circuito Central # 200, Col. Parque Industrial, C.P. 68301, Tuxtepec, Oax, México.

⁵ Sistema Producto Nopal del Distrito Federal A.C. Sonora sur n.2 Barrio Los Ángeles, Milpa Alta, C.P. 12000 CDMX, México.

*Corresponding author: alehz74@yahoo.com.mx

Received: 14 April 2018/ Accepted: 26 June 2018/ Published online: 18 September 2018

Abstract. One of the traditional techniques to extract metabolites is maceration with solvents assisted by mechanical-grinding. Recently, ultrasound has been proposed as a factor to improve extraction. However, information about ultrasound times necessary is insufficient. Additionally, the pressing method helps the solids recuperation, abating loss of extract. This work established an efficient extraction methodology of metabolites with antioxidant activity, combining the ultrasound assisting solvent extraction and pressing (UPAE). Leaves and bark of *B. crassifolia*, dried by forced air, ground and sieved to form a flour, were used to make the UPAE, the results of the yields were compared with a conventional maceration (95% ethanol, 1: 4 p / v, control). The assisted ultrasound time were 5, 20, 40 and 50 min. The separation was carried out by pressing in a glass syringe. Antioxidant activity was determined qualitatively by fine chromatography plates and quantitatively by spectrophotometry DPPH antioxidant assay at 517 nm. The UPAE method increased the total solids extract, without affect the antioxidant activity of compounds in leaves as in bark, since 5 and 20 minutes, respectively. Without a specific identification, it was evidenced that *B. crassifolia* produces a great variety of antioxidant compounds in both leaves and the bark, that polar as apolar type, which remain unchanged independently of ultrasound assisted time. With this method is possibly make extractions with small amounts of powdered sample (4 g of flour), which would be advisable in studies when the biological material is limited.

Keywords. Ultrasound assisted extraction, antioxidant activity, *Byrsonima crassifolia*, pressing, maceration.

Resumen. Una de las técnicas tradicionales para extraer metabolitos es la maceración con solventes, ayudado de molienda mecánica. Recientemente, el ultrasonido se ha propuesto como un factor para mejorar la extracción. Sin embargo, la información sobre los tiempos de ultrasonido necesarios es insuficiente. Además, el prensado ayuda a la separación del bagazo y disminuye la pérdida de extracto.