



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Extracción y caracterización de compuestos fenólicos
obtenidos del muicle (*Justicia spicigera schl.*)**

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA
HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ OSCAR SAÚL

ASESOR:
DRA. MARÍA EUGENIA RAMÍREZ ORTIZ

COASESOR:
DR. MIGUEL ÁNGEL AGUILAR MÉNDEZ

Cuatitlán Izcalli, Estado de México 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

U.N.A.M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
SUPERIORES CUAUTITLAN



ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de Cuautitlán.
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Extracción y caracterización de compuestos fenólicos obtenidos del muicle (Justicia spicigera schl.)

Que presenta el pasante: Oscar Saúl Hernández Rodríguez
Con número de cuenta: 306684348 para obtener el Título de: Ingeniero en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Agosto de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Dra. María Eugenia Ramírez Ortiz	
SECRETARIO	Dra. María Olivia Noguez Cordova	
1er. SUPLENTE	I.A. Zaira Berenice Guadarrama Álvarez	
2do. SUPLENTE	Dr. Omar Reyes Martínez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, UNA/M, por permitirme vivir una de las etapas más importantes de mi vida, por la educación de calidad que recibí y la oportunidad de viajar.

A la Dra. María Eugenia por ayudarme a formar un criterio científico.

Al Dr. Miguel Ángel Aguilar Méndez, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y por su infinita paciencia que aunque en ocasiones lo saque de quicio, estuvo apoyándome.

A la Universidad Autónoma de Baja California Sur, UABCS, por recibirme un semestre y enseñarme el arte de pescar.

A la Profesora Mony y mis compañeros Ricardo, Yesenia, Mack, Ray.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, UTPL, Ecuador, por ampliar mi visión en el campo de alimentos funcionales y mostrarme que a pesar de estar distanciado de mi familia y amigos, hay personas que valen mucho.

El éxito radica en la perseverancia.

A la Dng. Ruth, Dng. Miguel, y mis compañeros, Divi, Katty, Deniza y por supuesto a ti, amigo Mario.

Dedicatorias:

A Dios por su amor y fidelidad. San Juan 3:16.

A mis padres; Bernabé y Rocio, por su amor, ayuda y comprensión. Por sus sabios consejos que me brindaron sin los cuales, no hubiera llegado hasta aquí.

Proverbios 22:6

A mi hermano, Carlos, que siempre me ayudo y enseñó. Eres un gran hermano mayor y ejemplo de perseverancia.

*Con cariño a TODA mi familia, que todos los días me repetía
Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente... Josué 1:9*

A mis amigos universitarios, Sergio, Marisol, Estefany, Bety...

A Oli que formaste parte de este proyecto.

A mis compañeros de generación 33.

Teniendo en cuenta mis acostumbrados olvidos seguro que no me he acordado de alguien, no por rencor ni por desagrado, es simplemente despiste.

Recordando que la gratitud es la memoria del corazón.

Jehová se manifestó a mí hace ya mucho tiempo, diciendo: Con amor eterno te he amado; por tanto, te prolongué mi misericordia.

Jeremias 31:3

Tabla de contenido

Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tablas	x
Índice de Ecuaciones:	x
Lista de Abreviaturas:.....	xi
Resumen	xii
Introducción.....	1
1 Antecedentes	3
1.1 Generalidades del Muicle	3
1.1.1 <i>Justicia spicigera schl.</i>	3
1.1.2 Historia y origen	3
1.1.3 Morfología.....	4
1.1.4 Clasificación Taxonómica	5
1.1.5 Distribución geográfica	6
1.1.6 Composición química.....	7
1.1.7 Información etnobotánica.....	7
1.2 Extracción	9
1.2.1 Extracción líquido-líquido.....	9
1.2.1.1 Extracción por disolventes	9
1.2.2 Extracción sólido-líquido	10
1.2.2.1 Métodos Convencionales	11
1.2.2.1.1 Maceración Dinámica	11
1.2.2.1.2 Maceración en Frío	11
1.2.2.1.3 Maceración con calor	12
1.2.2.1.4 Soxhlet	12
1.2.2.2 Métodos Alternativos	14
1.2.2.2.1 Extracción asistida por microondas.....	14
1.2.2.2.2 Extracción por fluidos supercríticos.....	14
1.2.2.2.3 Extracción turbo	15
1.2.2.2.4 Extracción eléctrica.....	15
1.2.2.2.5 Extracción asistida por ultrasonido	15
1.2.3 Disolventes empleados en la extracción.....	16

1.3	Compuestos fenólicos	16
1.3.1	Origen de los compuestos fenólicos	16
1.3.2	Clasificación	17
1.3.3	Antioxidantes.....	21
1.3.4	Tipos de antioxidantes	21
1.3.5	Reacciones de óxido-reducción	22
1.3.6	Radicales Libres	23
1.3.6.1	Factores que pueden estimular la producción de radicales libres.....	23
1.3.7	Estrés oxidativo	24
1.3.8	Beneficios e Importancia de los Antioxidantes	25
1.4	Determinación de actividad antioxidante	26
1.5	Justificación	28
2	Objetivos	30
2.1	Objetivo General.....	30
2.1.1	Objetivos Específicos	30
2.1.1.1	Objetivo particular 1.....	30
2.1.1.2	Objetivo particular 2.....	30
3	Materiales y métodos	31
3.1	Reactivos.....	31
3.2	Material biológico.....	32
3.3	Preparación de extractos	32
3.3.1	Acondicionamiento del material vegetal	32
3.3.2	Pruebas Preliminares	32
3.4	Métodos de extracción.....	33
3.4.1	Maceración	33
3.4.2	Vía ultrasónica.....	33
3.5	Determinación de fenoles totales por el Método de Folin-Ciocalteu.....	34
3.6	Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres (DPPH).....	35
3.7	Determinación de la capacidad reductora de hierro (FRAP).....	36
4	Análisis estadístico	36
5	Resultados y Discusión	37

5.1	Resultados de la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	37
5.2	Resultados de la determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres (DPPH).....	38
5.3	Resultados de la determinación de la capacidad reductora de hierro (FRAP).....	39
6	Conclusiones	41
7	Recomendaciones.....	42
8	Bibliografía.....	43
9	Anexos:.....	50

Índice de Figuras

Figura 1: Ejemplar adulto de <i>Justicia spicigera</i> schl. (muicle).	3
Figura 2: Partes que conforman a <i>Justicia spicigera</i> schl. a) Floración de vástago, b) base de la flor, con brácteas y cáliz, c) Punta de hoja del labio inferior, d) Estambres, e) Pistilos. (Colored Illustrations Popular, 1937).	4
Figura 3: <i>Justicia spicigera</i> schl. en la República Mexicana e Islas adyacentes, Centroamérica y Estados Unidos en puntos amarillos. Fuente: http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Justicia+spicigera&flags=col2 :	6
Figura 4: Estructura química de la kaempferitrina (de Souza et al. 2009)	7
Figura 5: Uso etnobotánico <i>Justicia spicigera</i> schl. (muicle).	8
Figura 6: Esquema de la extracción; antes de la extracción (izquierda) y después de la extracción (derecha): 1.-disolvente, 2.-material de extracción (fase portadora sólida con soluto, 3.-soluto, 4.-fase portadora sólida lixiviada, 5.- disolvente con el soluto de transición en el disuelto.	10
Figura 7: Equipo Soxhlet	13
Figura 8: Factores que favorecen la producción de Radicales Libres. (Venereo Gutiérrez, 2002)	23
Figura 9: Fundamento del método FRAP, capacidad reductora del complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (Fe^{3+} -TPTZ) se reduce a su forma ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ)	27
Figura 10: Las diez principales causas de muerte en el mundo según la OMS, 2011. Fuente: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html	29
Figura 11: Equipos empleados durante la experimentación.	31
Figura 12: Muicle secándose bajo condiciones de sombra.	32
Figura 13: Método de extracción maceración.	33
Figura 14: Extracción por vía ultrasónica de <i>Justicia spicigera</i> schl.	34
Figura 15.- Contenido fenólico total de extractos de muicle obtenidos con diferentes métodos de extracción. Los valores son expresados en equivalentes de ácido gálico. Barras con distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).	37
Figura 16: Evaluación de la capacidad secuestradora de radicales libres (DPPH) de extractos de muicle obtenidos con diferentes métodos de extracción. Se muestra el porcentaje de Inhibición del DPPH en <i>Justicia Spicigera</i> schl.	38
Figura 17: Evaluación de la capacidad reductora de hierro (FRAP) de extractos del muicle obtenidos con diferentes métodos de extracción. Los valores son expresados en μ ME de ácido ascórbico. Barras con distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$)	39

Índice de Tablas

<i>Tabla 1: Clasificación taxonómica de muicle.</i>	5
<i>Tabla 2: Clasificación de los compuestos fenólicos.</i>	17
<i>Tabla 3: Estructura molecular de los ácidos fenólicos simples y de las distintas familias de flavonoides, los derivados más comúnmente encontrados en la naturaleza y algunas de las fuentes de la dieta humana.</i>	19

Índice de Ecuaciones:

<i>Ecuación 1: Efecto de reducción del radical DPPH.</i>	35
--	----

Lista de Abreviaturas:

ANOVA: Análisis de la varianza.

DPPH: llamado así por el reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

EC_{50} : Efecto de reducción del 50% del radical DPPH (Porcentaje de inhibición)

FC: Folin-Ciocalteu

FRAP: Capacidad reductora de Hierro/antioxidante, por sus siglas en inglés “Ferric Reducing Antioxidant Power”.

mL: mililitros

REDOX: Reacciones de óxido-reducción

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RL: Radicales libres

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución

OH: Radical hidróxilo

UV: Ultravioleta

Vis: Visible

Resumen

Justicia spicigera schl. (muicle) es una planta nativa de Mesoamérica que ha sido empleada por la medicina tradicional desde tiempos remotos. Sin embargo, la información científica que sustente las propiedades benéficas que se le atribuyen a dicha planta es aún escasa. Debido a lo anterior, el propósito de este estudio fue extraer y caracterizar compuestos fenólicos con actividad antioxidante del muicle, empleando la extracción asistida por ultrasonido y el método tradicional de maceración. El contenido total de compuestos fenólicos fue determinado usando el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual se encontró en un intervalo de 98-134 mg EAG/ g de extracto seco. Se determinó también la capacidad reductora de Fierro por el método de FRAP, en el cual el valor mínimo se encontró en el extracto acuoso de maceración y el máximo en el extracto acuoso-etanólico de ultrasonido, con 51 y 232 μ ME de ácido ascórbico/ 10 mg de extracto seco, respectivamente. La capacidad anti radical fue cuantificada por el método de DPPH, obteniendo solamente el EC_{50} con la extracción asistida por ultrasonido a una concentración de 936 ppm. Estos resultados comprueban que la extracción asistida por ultrasonido puede ser una alternativa eficiente en la obtención de compuestos fenólicos sin afectar sus propiedades antioxidantes.

Introducción

El conocimiento y utilización de las plantas por los pueblos del mundo tiene una larga e interesante historia, reconociéndose que desde tiempos ancestrales, el ser humano ha encontrado en las plantas un fiel aliado para satisfacer muy diversas necesidades: alimento, techo, abrigo, armas, así como la recuperación y el mantenimiento de la salud. Las plantas constituyen un recurso muy valioso dentro de la medicina tradicional de los diferentes países. (Fabricant DS, 2001).

Actualmente, la gran mayoría de los países desarrollados y en desarrollo siguen haciendo uso de ellas. Los médicos tradicionales y sus plantas medicinales han dejado de ser calificados negativamente, lo que ha dado pie a que se establezcan programas y proyectos para la investigación, aplicación e industrialización de los productos derivados de plantas. Esto ha conducido a que muchos de los principios activos utilizados en la terapéutica moderna tienen sus orígenes en la medicina tradicional de diversas culturas antiguas (Patwardhan, 2005).

En Latinoamérica la medicina herbolaria es ampliamente utilizada, por lo que los metabolitos secundarios de los vegetales representan una fuente extremadamente rica para la obtención de extractos mediante los cuales se pueden aislar moléculas que puedan ser precursoras de potenciales compuestos bioactivos (Tsanko et al., 2014). En México, las plantas medicinales son el recurso material más amplio y valioso de la medicina indígena tradicional (Lozoya & Zolla, 1984).

Su estudio es un tema recurrente en la historia de México, tarea muy compleja si se piensa en la enorme riqueza cultural y florística del país (tercero en el mundo en biodiversidad y segundo en el hemisferio occidental de lenguas y culturas distintas). Se tiene estimado que en nuestro país existen cerca de 30,000 especies de plantas de las cuales, en 1994 el Instituto Nacional Indigenista documentó 3,000 con usos medicinales, esto es el 10% del total de la riqueza florística del país (Argueta et al., 1994).

En este contexto, la familia *Acanthaceae* es una importante fuente de fármacos con actividad terapéutica y el conocimiento etnofarmacológico de esta familia necesita urgentemente ser

documentado. Dentro de esta familia encontramos al género *Justicia* con aproximadamente 600 especies; de las cuales tres especies son altamente importantes para la medicina tradicional desde tiempos remotos: *Justicia spicigera schl.*, *Justicia secunda* y *Justicia pectoralis*. (Correa & Alcantara, 2012).

Justicia spicigera schl. es ampliamente utilizada como colorante, en la gastronomía, así como en la medicina popular para diferentes patologías, por lo que el presente trabajo pretende generar y aportar información para contribuir al uso de esta especie y en su caso al uso de sus extractos para contribuir en su integración a la formulación de un nutraceutico o como ingrediente funcional.

El propósito de este trabajo es la comparación de dos metodologías diferentes de extracción, la maceración convencional y una extracción asistida por ultrasonido, evaluándose el efecto de éstas en el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante.

1 Antecedentes

1.1 Generalidades del Muicle

1.1.1 *Justicia spicigera schl.*

El muicle (Figura 1) es una planta endémica de Mesoamérica. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). El nombre náhuatl es “mohuitli” y se tienen de él datos que señalan su uso por los pobladores prehispánicos en las siguientes formas:

- Como planta medicinal.
- Empleado en la gastronomía de algunas regiones.
- Como colorante, en el teñido de sus telas.



Figura 1: Ejemplar adulto de *Justicia spicigera schl.* (muicle).

(Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009)

1.1.2 Historia y origen

Francisco Hernández, en su obra “Historia de las Plantas de la Nueva España” cita un vegetal llamado “mohuitli”, es decir, “hierba purpurea”, cuya descripción enuncia en estos términos. (Hernández, 1942)

“Es una hierba con raíces ramificadas, de donde nacen tallos de dos palmos, sarmentosos, torcidos y cilíndricos, y flores escarlata alargadas; hojas como de yerbamora algo blanquecinas por debajo, que tienen un sabor exactamente como de pepinillo. Es de

naturaleza fría o templada y glutinosa... nace en los lugares planos o en las alturas de Oaxtepec...”

También es conocido como hierba púrpura, limanin, micle, mohuite, muele, muelle, muille, expaxihuitl, huitzilxochitl, muite, muitle. En Oaxaca: me tzi ña; Puebla: mouait, mouel, mouitl, moitle; San Luis Potosí: muu y en Yucatán: cruz k'aax. (Azpeitia, 1996)

1.1.3 Morfología

Planta que se encuentra como arbusto de 1 a 5 m de altura, ramificado, sus hojas son largas y vellosas. Las flores de 3 a 3.5 cm se encuentran en la parte apical de la planta, comúnmente de color anaranjado, pero algunas veces rojo pálido en forma de tubos que terminan rasgándose, formándose un labio. Los frutos son capsulares ovoides con 2 a 4 semillas (Figura 2) (Martínez, 1992; Cevallos & Sergio, 1998).



Figura 2: Partes que conforman a *Justicia spicigera schl.* a) Floración de vástago, b) base de la flor, con brácteas y cáliz, c) Punta de hoja del labio inferior, d) Estambres, e) Pistilos. (Colored Illustrations Popular, 1937).

1.1.4 Clasificación Taxonómica

El muicle (*Justicia spicigera schl.*) (Biología, 2010) es una planta medicinal integrante de la familia de las Acanthaceae. La clasificación actual (Acanthaceae), familia que reúne 256 géneros y 2770 especies de zonas tropicales y subtropicales; comprende 36 géneros y 28 especies (Tabla 1) (USDA, 2013)

Tabla 1: Clasificación taxonómica de muicle.

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Scrophulariales
Familia	Acanthaceae
Género	Justicia
Especie	spicigera
Nombre Científico	Justicia spicigera schl.

Fuente: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PV525864>

1.1.5 Distribución geográfica

El muicle (*Justicia spicigera schl.*) es una planta originaria de México, que crece en los estados de Chiapas, Nayarit, San Luís Potosí, Valle de México, Veracruz, Guerrero, Puebla, Morelos, Tlaxcala, Yucatán e Hidalgo (Hersch M., 1997; Martínez, 1996), aunque actualmente también se le puede encontrar en otras partes de Centro y Norteamérica. (Discover Life, 2013).

Se encuentra presente en climas cálido, seco y templado, desde a nivel del mar hasta los 3000 m. Cultivada en huertos familiares, crece a orillas de caminos (Callejo, 1996), y de igual forma crece en matorrales y bosques (Monroy & Castillo, 2007).



Figura 3: *Justicia spicigera schl.* en la República Mexicana e Islas adyacentes, Centroamérica y Estados Unidos en puntos amarillos. Fuente:

<http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Justicia+spicigera&flags=col2>:

1.1.6 Composición química

Se conoce muy poco acerca del contenido metabólico de *Justicia spicigera schl.* Euler y Alam (1982) aislaron el flavonoide kaempferitrina (Figura 4); por otro lado Domínguez et al. (1990) aislaron el glucósido de 3- β -o-sitosterol, alantoína y criptoxantina. Hasta la fecha, a ninguno de los metabolitos aislados de esta especie se le puede adjudicar alguna de las múltiples propiedades terapéuticas, sin embargo, se infiere la presencia de grandes concentraciones de polifenoles como flavonoides o antocianinas que pueden ser responsables de las propiedades antioxidantes atribuidas a esta especie.

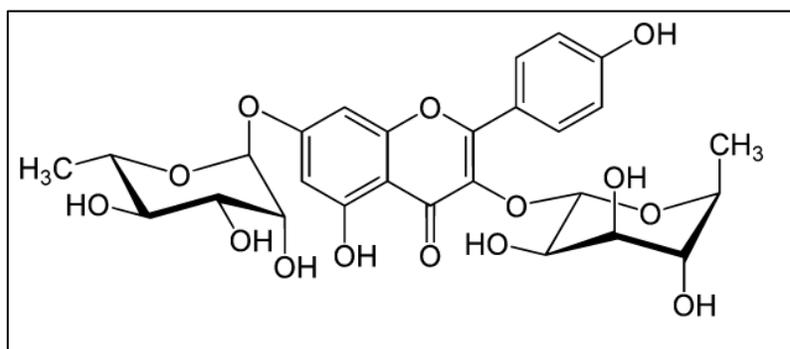


Figura 4: Estructura química de la kaempferitrina (de Souza et al. 2009)

1.1.7 Información etnobotánica

El muicle provee algunos de los colorantes naturales usados extensamente en la tradición popular (Véase Figura 5). De él se logra obtener el rosa mexicano, el violeta y el azul, los cuales se emplean en diferentes regiones de México en el ámbito gastronómico. Además, es una planta utilizada por algunas etnias de México para atender problemas de la sangre como es la anemia, mala circulación, presión arterial, problemas de la piel como pueden ser erupciones, varices, granos, llagas, manchas, mezquinos, verrugas, en el sistema urinario, para infecciones renales, aclarar la orina, mal de orín, dolor del riñón, también se ha utilizado para tratar la erisipela, sífilis, epilepsia, apoplejía; como tónico sanguíneo, estimulante, anti disentérico, antipirético, antiespasmódico, antiinflamatorio, para aliviar trastornos

menstruales, nervios, insomnio, bronquitis, desordenes intestinales incluyendo náuseas, diarrea y vómito, para tratar el cáncer. Cabe aclarar que para cualquiera de los padecimientos mencionados anteriormente se utiliza a menudo las hojas y las ramas. (Azpeitia, 1996; Domínguez et al. 1990; Alonso et al. 2011).



Figura 5: Uso etnobotánico *Justicia spicigera schl.* (muicle).

Dada la importancia etnobotánica del muicle, se buscan métodos eficientes, económicos y favorables al ambiente, para la extracción de sus metabolitos secundarios, sin que estos últimos afecten en la disponibilidad y eficiencia de dichas sustancias. La extracción es el paso inicial en el aislamiento de componentes bioactivos a partir de materiales vegetales, el objetivo es obtener la máxima concentración de compuestos y la mayor actividad antioxidante de los extractos (Spigno et al., 2007).

Las plantas aromáticas y medicinales poseen muchos compuestos bioactivos, que pueden ser de estructura polifenólica, y que presentan actividad antioxidante. Existe un gran número de

grupos de investigación que estudian la identificación de los compuestos activos de este grupo de materiales por su interés para aplicaciones alimentarias, cosméticas y farmacéuticas.

1.2 Extracción

En química, la extracción es un procedimiento de separación de una sustancia que puede disolverse en dos disolventes no miscibles entre sí, con distinto grado de solubilidad y que están en contacto a través de una interfase (Valcárcel C. & Gómez H., 1988).

De modo general se consideran dos tecnologías diferentes para la extracción; dependiendo del estado de la corriente residual: extracción líquido-líquido o sólido-líquido.

1.2.1 Extracción líquido-líquido

En la extracción líquido-líquido se separa un componente de una mezcla líquida, con ayuda de un disolvente, que preferentemente lo disuelve.

La sensibilidad y la eficacia del proceso de extracción dependen de la elección de los dos disolventes inmiscibles. Cuando se utiliza una fase acuosa y un disolvente orgánico, los compuestos más hidrofílicos quedarán preferentemente en la fase acuosa y los más hidrofóbicos pasarán al disolvente orgánico (Valcárcel C. & Gómez H., 1988).

1.2.1.1 Extracción por disolventes

Se basa principalmente en la selección de disolventes, con el fin de incrementar la solubilidad de los materiales y la velocidad de transferencia de masa (Gao & Liu, 2005). Se separan los compuestos con base en sus solubilidades por dos líquidos inmiscibles, usualmente agua y un disolvente orgánico. En la industria, este proceso se realiza continuamente bombeando una corriente orgánica y otra acuosa dentro de una mezcladora, donde se mezclan ambos

componentes y se permite el intercambio iónico hasta que se logra el equilibrio (Vinatoru, 2001).

1.2.2 Extracción sólido-líquido

Con la extracción sólido-líquido (Figura 6) se puede extraer componentes solubles de sólidos con ayuda de un disolvente. Un ejemplo de la vida cotidiana es la preparación de la infusión de café. En este proceso, la sustancia aromática del café (solute) se extrae con agua (disolvente) del café molido (material de extracción, formado por la fase portadora sólida y el soluto). En el caso ideal se obtiene la infusión de café (disolvente con la sustancia aromática disuelta) y en el filtro de la cafetera queda el café molido totalmente lixiviado (fase portadora sólida)

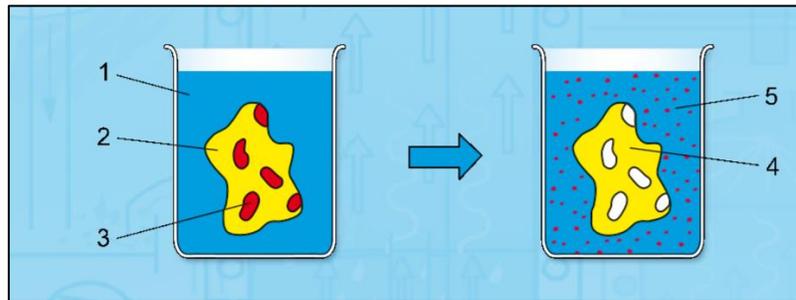


Figura 6: Esquema de la extracción; antes de la extracción (izquierda) y después de la extracción (derecha): 1.-disolvente, 2.-material de extracción (fase portadora sólida con soluto), 3.-solute, 4.-fase portadora sólida lixiviada, 5.- disolvente con el soluto de transición en el disuelto.

Existen diferentes técnicas en la extracción sólido-líquido como la maceración, método Soxhlet, entre otras y son considerados como métodos convencionales debido a que se han empleado desde tiempos antiguos, sin embargo tienen algunas desventajas.

1.2.2.1 Métodos Convencionales

1.2.2.1.1 Maceración Dinámica

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción, que son los que se pretende extraer. El proceso de maceración genera dos productos que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso. Existen dos métodos de maceración de acuerdo a la temperatura, caliente y en frío. La maceración, consiste en poner en contacto la muestra y el disolvente durante un tiempo determinado dando como resultado un equilibrio de concentración entre la muestra y el disolvente. Este proceso depende de la naturaleza del extracto, tamaño de partícula, contenido de humedad y selectividad o cantidad de disolvente; una variación de esta, es la maceración dinámica que consiste en dejar la muestra en contacto con el disolvente durante un determinado tiempo, utilizando agitación constante (Sharapin, 2000). Sin embargo, la maceración posee algunas limitaciones entre las cuales consume mucho tiempo, procedimientos de trabajo intensivo, etapas de concentración extendidos, y la implicación de grandes volúmenes de disolventes peligrosos (Siqueira et al. 2011).

1.2.2.1.2 Maceración en Frío

Consiste en sumergir el producto a macerar en un recipiente con la cantidad suficiente de disolvente para cubrir totalmente lo que se desea macerar. Esto se lleva a cabo por un lapso de tiempo largo, dependiendo de la materia prima que se vaya a macerar. Las ventajas de la maceración en frío consisten en la utilización de equipos simples que requieren mínimas cantidades de energía y en la capacidad de extraer la mayoría de las propiedades de lo que se macera (dependiendo del disolvente), prácticamente en su totalidad sin alterarla por efectos de temperatura. Sin embargo se necesitan periodos de tiempo mucho más extensos para lograr una extracción adecuada (Gómez-Miguez et al. 2007).

1.2.2.1.3 Maceración con calor

El proceso consiste en el contacto entre las fases, el producto a tratar y el disolvente; con la diferencia de la variación de temperatura, en este caso pueden variar las condiciones de la maceración. El tiempo de proceso varía mucho del de maceración en frío, ya que al utilizar calor se acelera el proceso. La desventaja de la maceración en calor es que no logra extraer totalmente pura la esencia del producto, ya que regularmente destruye algunas propiedades, es decir, muchas veces se trata de compuestos termolábiles que se ven afectados por la temperatura, además que requiere equipos más sofisticados que permitan el control de temperatura, sin mencionar el consumo energético que dicho proceso implica, aunque debe de considerarse que los periodos de tiempo se reducen favorablemente (Puértolas et al. 2011).

1.2.2.1.4 Soxhlet

La extracción con Soxhlet, usada durante décadas, es una técnica estándar y utilizada como referencia para evaluar los resultados de otros métodos de extracción sólido-líquido. Es una técnica general y bien establecida que supera los resultados de otras técnicas convencionales, aunque tiene un campo limitado en la extracción de compuestos termolábiles (Luque de Castro & García-Ayuso, 1998).

El equipo Soxhlet (Figura 7) es un tipo de material de vidrio utilizado para la extracción de compuestos, generalmente de naturaleza lipídica, contenidos en un sólido, por medio de un disolvente afín. El equipo está integrado por un extractor, un condensador especial de tipo bulbo y un matraz. Funciona cíclicamente. Cuando se evapora el disolvente sube hasta el área donde es condensado; aquí, al caer y regresar a la cámara de disolvente, va separando los compuestos, hasta que se llega a una concentración deseada.

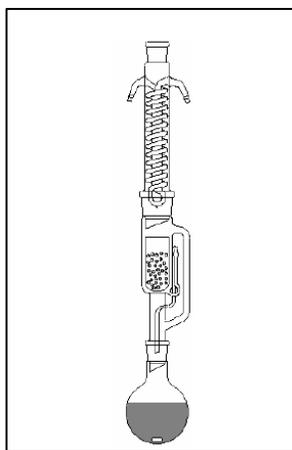


Figura 7: Equipo Soxhlet

El empleo de distintos disolventes da lugar a diferentes extractos y con diferente composición. El hexano es el disolvente más utilizado para extraer aceites comestibles de plantas. La extracción con Soxhlet presenta las siguientes ventajas: 1) la muestra está en contacto repetidas veces con porciones frescas de disolvente, 2) la extracción se realiza con el disolvente caliente, así se favorece la solubilidad de los compuestos, o no es necesaria la filtración después de la extracción, 3) se obtienen excelentes recuperaciones, existiendo gran variedad de métodos oficiales cuya etapa de preparación de muestra se basa en la extracción con Soxhlet y/o además, 4) la metodología empleada es muy simple y barata. (Luque de Castro & García-Ayuso, 1998). Diferentes autores han propuesto ciertas modificaciones al método Soxhlet, cuyos objetivos se centran en acortar el tiempo de extracción y automatizar el proceso.

La extracción Soxhlet ha sido la más utilizada tradicionalmente (Luque de Castro & García-Ayuso, 1998). Actualmente existen otros métodos alternativos que tienen mayor eficiencia, son más rápidos, tienen menor costo, son simples, menor consumo de disolventes orgánicos y reducción de contaminación, por lo tanto son amigables con el ambiente. (Yaminia, Seidib, & Rezazad, 2014). Algunos ejemplos de los métodos alternativos se puede mencionar a la extracción asistida por microondas, fluidos supercríticos, extracción acelerada con disolventes, pulsos eléctricos y vía ultrasónica etc (Assis Jacques, y otros, 2007; Vinatoru, 2001). A nivel industrial se emplean equipos de extracción discontinua y continua con disolventes convencionales (Sáiz & López, 2010).

1.2.2.2 Métodos Alternativos

Según Gao & Liu, 2005, los métodos de extracción más modernos se basan en la mejora de la eficiencia de los métodos tradicionales por acción física sobre el medio.

1.2.2.2.1 Extracción asistida por microondas

La irradiación con microondas causa un movimiento molecular por migración de iones y rotación de dipolos que contribuyen a una rápida transferencia de energía al disolvente y materia vegetal. Se ha utilizado la energía de microondas con diferentes finalidades, siendo una de ellas la extracción de compuestos solubles en fluidos específicos (líquidos o gases). La extracción asistida por microondas proporciona técnicas selectivas y rápidas en las que se obtienen mejores recuperaciones o similares a las obtenidas en los procesos de extracción convencionales (Pan, Niu, & Liu, 2003). Además, ofrece otras ventajas sobre las tecnologías utilizadas corrientemente como son un menor consumo de energía, menores volúmenes de disolventes, menor toxicidad (en ocasiones) de los disolventes empleados y, en general, menor cantidad de residuos.

1.2.2.2.2 Extracción por fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión sobre su punto crítico termodinámico. Tiene una habilidad única para difundirse a través de los sólidos como un gas y de disolver materiales como un líquido, generando disolvente de baja viscosidad, altas tasas de difusión y sin tensión superficial. Se utilizan, principalmente, dióxido de carbono y agua. Se puede realizar una extracción selectiva de diferentes compuestos utilizando distintas presiones del fluido supercrítico (Vinatoru, 2001).

1.2.2.2.3 Extracción turbo

Utiliza un agitador de alta velocidad, que induce cavitación hidrodinámica, aumentando el rendimiento de extracción, ya que se aumenta el contacto entre el material vegetal y el disolvente y el proceso de difusión a través de las paredes celulares se incrementa (Vinatoru, 2001).

1.2.2.2.4 Extracción eléctrica

El uso de la electroquímica en la manipulación de las extracciones de análisis iónico y neutro para la preparación de muestras se ha estudiado a través de los métodos sólido-líquido, líquido-líquido. Utilizando la extracción de la membrana de la fuerza de conducción eléctrica, ya que la energía auxiliar, conduce a mejoras sustanciales (Yaminia et al., 2014). Se aplican descargas eléctricas a la mezcla de extracción, incrementando la extracción hasta un 25% al formarse burbujas de cavitación (Vinatoru, 2001).

1.2.2.2.5 Extracción asistida por ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido utiliza sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al disolvente (Gao & Liu, 2005). Según Rostagno et al. (2003), esta técnica es la más económica y tiene los requerimientos instrumentales más bajos entre las últimas técnicas de extracción desarrolladas. Los fenómenos físicos que afectan la extracción de sustancias se ven afectados por la sonificación, ya sea que las sustancias de interés se encuentren en células internas o externas del tejido. Al reducir el tamaño de las partículas del material vegetal se aumenta el área de exposición al disolvente y a la cavitación producida. El ultrasonido además facilita la rehidratación del tejido si se están utilizando materiales secos al abrir los poros, lo cual a su vez incrementa el transporte de masa de los constituyentes solubles por difusión y procesos osmóticos (Vinatoru, 2001).

1.2.3 Disolventes empleados en la extracción

Los disolventes más utilizados para la extracción son: metanol, etanol, hexano y acetona, ya sea por separado, combinados o en disoluciones acuosas (Conde, 2009; Lim, Lim, & Tee, 2007; Thaipong, et al. 2006). Las polaridades de los disolventes orgánicos influyen en la selección de un disolvente específico para la extracción de un grupo de compuestos bioactivos (Hamid et al. 2010).

1.3 Compuestos fenólicos

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos (Tabla 2). Estos compuestos podemos denominarlos polifenoles. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario (compuestos omnipresentes en las plantas). Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.) (Quiñones et al., 2012). Constan de un gran grupo de compuestos biológicamente activos (por encima de 8.000 estructuras).

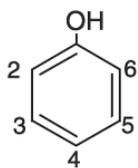
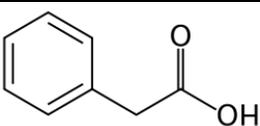
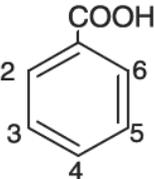
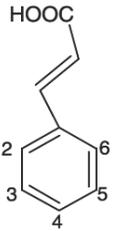
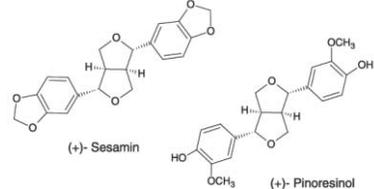
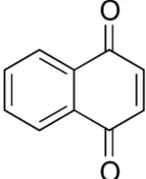
1.3.1 Origen de los compuestos fenólicos

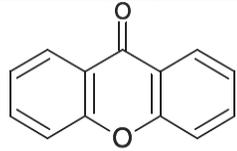
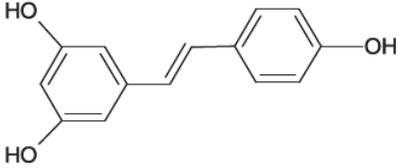
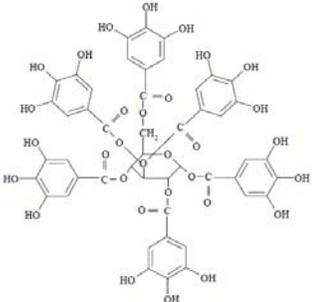
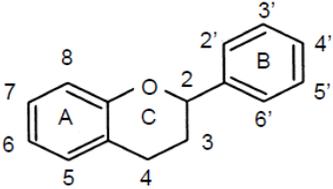
La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido shiquímico y la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido shiquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas.

1.3.2 Clasificación

A continuación se describen los principales grupos de compuestos fenólicos presentes en los alimentos vegetales.

Tabla 2: Clasificación de los compuestos fenólicos.

Nombre	Esqueleto carbonado	Estructura
Fenoles simples	(C6) (ej. fenol, cresol, timol, etc.)	
Ácidos fenilacéticos	(C6-C2)	
Ácidos fenólicos	(C6-C1) (ej. ácido gálico, vainílico o siríngico, y sus aldehídos)	
Fenilpropanoides	(C6-C3) (ej. p-cumárico, cafeico, clorogénico, ferúlico, sinápico)	
Ligninas y Lignanos	(C6-C3) ₂ (C6-C3) _n (ej. sesamin y pinoresinol)	
Naftoquinonas	(C6-C4)	

Xantonas	(C6-C1-C6)	
Estilbenos y antraquinonas	(C6-C2-C6) (ej. resveratrol)	
Taninos	(C6-C3-C6) _n (ej. procianidina)	
Flavonoides	(C6-C3-C6) (ej. Isoflavonas, antocianidinas etc.)	

(Macheix et al., 1990).

La Tabla 3 define la estructura molecular del ácido benzoico y cinámico y la estructura de las distintas familias de flavonoides, cita los derivados más comúnmente encontrados en la naturaleza y recoge algunas de las fuentes de ácidos fenólicos y flavonoides en la dieta humana.

Tabla 3: Estructura molecular de los ácidos fenólicos simples y de las distintas familias de flavonoides, los derivados más comúnmente encontrados en la naturaleza y algunas de las fuentes de la dieta humana.

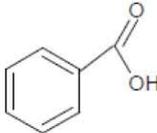
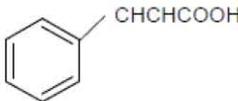
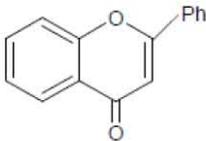
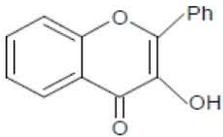
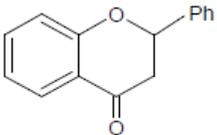
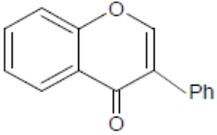
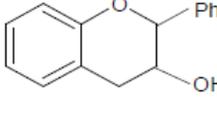
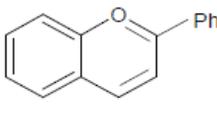
Estructura molecular	Compuestos representativos	Fuentes en la dieta
Ácidos fenólicos		
<p><i>Ácido benzoico</i></p> 	<p>Ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico Ácido vanílico Ácido siríngico Ácido gálico</p>	<p>Tomate, té verde, zanahoria Tomate, vino, Té verde Fresa, zumo de uva</p>
<p><i>Ácido cinámico</i></p> 	<p>Ácido <i>p</i>-cumárico Ácido ferúlico Ácido cafeico Ácido rosmarínico Hidroxitirosol Oleuropeina</p>	<p>Uva blanca, tomate, repollo Trigo, maíz, arroz, Uva blanca, oliva, café Pera Uva, pomelo Aceite de oliva, jengibre</p>
Flavonoides		
<p><i>Flavonas</i></p> 	<p>Apigenina Luteolina</p>	<p>Apio, perejil Oliva, cereales</p>
<p><i>Flavonoles</i></p> 	<p>Quercetina Miricetina Kaemferol Rutina Hesperidina</p>	<p>Cebolla, lechuga, fresa, té Uvas, vino tinto, arándano Endivia, brócoli, uva, puerro Vino tinto, piel de tomate Naranja</p>

Tabla 3: (Continuación)

<p>Flavanonas</p> 	<p>Naringenina Naringina Taxifolina</p>	<p>Cítricos Piel de cítricos Cítricos</p>
<p>Isoflavonas</p> 	<p>Genisteína Genistina</p>	<p>Haba de soja Haba de soja</p>
<p>Flavanoles</p> 	<p>Epicatequina Catequina Catequin-3-galato Galocatequina Galocatequin-3-galato</p>	<p>Té verde, té negro, vino tinto</p>
<p>Antocianidinas</p> 	<p>Apigenidina Cianidina Malvidina</p>	<p>Frutas coloreadas y pieles Cereza, frambuesa, fresa, uva Uva, vino tinto</p>

(Pokorny et al., 2001; Fuhrman & Aviram, 2002; Rice-Evans et al., 1996).

La investigación en extractos fenólicos ha ido creciendo debido a la creciente demanda mundial de compuestos fenólicos y su creciente aplicación en la industria alimentaria como agente antimicrobiano, antioxidante y estabilizadores de alimentos. Además de las propiedades biológicas de los compuestos fenólicos, se les han atribuido actividades farmacológicas y médicas relacionadas con la prevención y/o mejora del estado de salud. (Avello & Suwalsky, 2006).

Por su parte en los vegetales los polifenoles son muy importantes como antioxidantes. En los últimos tiempos la determinación del contenido de antioxidantes se ha empleado como una herramienta para promover el consumo y sumarle valor agregado a productos de origen natural tales como: el vino, la miel, Té verde, cacao y café, entre otros.

1.3.3 Antioxidantes

La etimología de la palabra antioxidante viene del término griego *anti* que significa opuesto o con propiedades contrarias y de la palabra oxidante cuyo significado químico es que oxida. (RAE, 2011). Por tanto, un antioxidante biológico ha sido definido como: “cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con las de un sustrato oxidable, previene significativamente o retrasa la oxidación de dicho sustrato” (Benzie & Strain, 1996).

1.3.4 Tipos de antioxidantes

Los antioxidantes que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos pueden bloquear parte de este daño debido a que estabilizan los radicales libres. Son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los radicales libres, actuando algunos a nivel intracelular y otros en la membrana de las células, siempre en conjunto para proteger a los diferentes órganos y sistemas.

Existen diferentes tipos de oxidantes:

- Antioxidantes endógenos: mecanismos enzimáticos del organismo (superóxidodismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión y la coenzima Q). Algunas enzimas necesitan cofactores metálicos como selenio, cobre, zinc y magnesio para poder realizar el mecanismo de protección celular.
- Antioxidantes exógenos: son introducidos por la dieta y se depositan en las membranas celulares impidiendo la lipoperoxidación (vitaminas E, C y β -caroteno).

Actualmente se utilizan tanto los de origen natural como sintéticos, de estos últimos solo algunos se han empleado en alimentos, pues es necesario comprobar la ausencia de toxicidad y actividad carcinogénica antes de utilizarlos. Los antioxidantes sintéticos se utilizan en los límites legales para reducir el deterioro, rancidez y la decoloración oxidativa de los aceites y grasas. Existen algunos problemas relativos a la seguridad y la toxicidad de los antioxidantes sintéticos relacionados con su metabolismo y la posible absorción y acumulación en los tejidos; por otra parte antioxidantes naturales se encuentran en algunos materiales vegetales tales como oleaginosas, cereales, verduras, frutas, hojas, cortezas, raíces y hierbas, los cuales se asocian a la reducción del riesgo de enfermedades crónicas (Abdalla et al., 2007). Las reacciones químicas de los radicales libres se dan constantemente en las células de nuestro cuerpo, pero el proceso debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante, por medio de alimentos ingeridos en la dieta (vitaminas y compuestos fenólicos) que permiten neutralizar las especies generadoras de radicales (Avello & Suwalsky, 2006).

Entre los principales antioxidantes se encuentran: ácido ascórbico (regeneración de tocoferoles), tocoferoles (protección de membranas lipídicas, bloqueo de la cadena de reacciones de peroxidación), carotenoides (bloqueo de la cadena de reacciones de peroxidación), compuestos fenólicos (capacitación de radicales libres y actividad quelante de metales).

1.3.5 Reacciones de óxido-reducción

Las oxidaciones son reacciones químicas de transferencia de electrones entre un agente oxidante y un reductor. Bajo determinadas condiciones, estas reacciones pueden generar moléculas altamente inestables capaces de reaccionar con oxígeno o con otras moléculas generando un desbalance REDOX, en el cual las oxidaciones se propagan a moléculas vecinas. Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, impidiendo o terminando las oxidaciones en cadena. Aunque las reacciones de oxidación son cruciales para la vida, también pueden ser perjudiciales; por lo tanto las plantas y los animales mantienen múltiples sistemas antioxidantes, tales como glutatión y otros tioles, vitamina C, y vitamina E, así como enzimas tales como la catalasa, superóxido dismutasa y varias peroxidasas.

1.3.6 Radicales Libres

Son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de las moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica y una vez que ha conseguido sustraer un electrón, la molécula estable que se lo cede se convierte en radical libre por microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando daños a moléculas (Avello & Suwalsky, 2006). Ejemplos de radicales libres que se forman en el organismo son súper óxido, hidroxilo, peróxido, alcoxilo, óxido de nitrógeno y triclorometilo (Halliwell & Whiteman, 2004).

Hay evidencias que sustentan el papel patogénico de los radicales libres en procesos biológicos, mostrando entre la incidencia de enfermedades inflamatorias y degenerativas y las bajas concentraciones de antioxidantes en la sangre (Sohal & Weindruch, 1996), los que pueden ser modificados al aumentar su ingesta (Avello & Suwalsky, 2006).

1.3.6.1 Factores que pueden estimular la producción de radicales libres

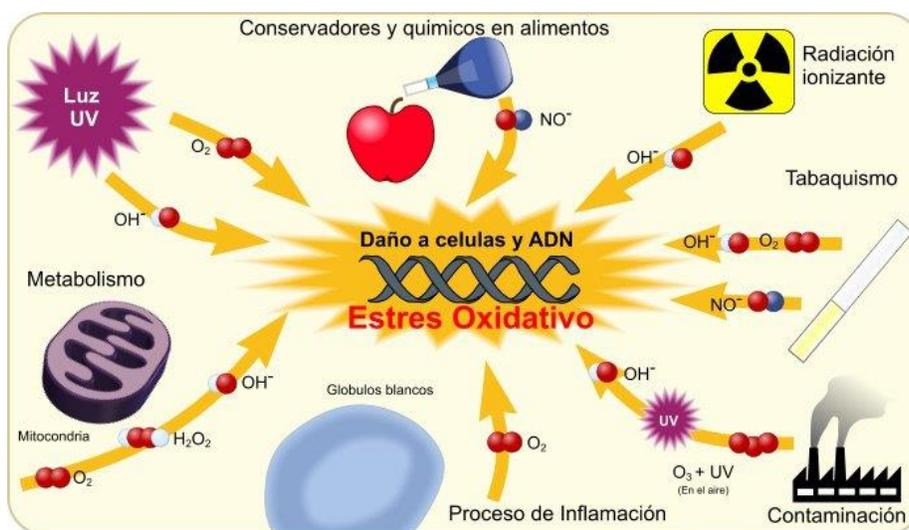


Figura 8: Factores que favorecen la producción de Radicales Libres. (Venereo Gutiérrez, 2002)

Algunos de los factores que favorecen la producción de radicales libres son expuestos en la Figura 8, existen otros como son: el ejercicio, las dietas altas en ácidos grasos polinsaturados, las isquemias y los carcinógenos.

En nuestro organismo, las mitocondrias son la fuente principal de producción de especies reactivas de oxígeno entre las que se incluyen los radicales libres. El superóxido es generado por la cadena respiratoria mitocondrial. Existe una transformación del superóxido, en peróxido de hidrógeno bajo ciertas condiciones, resultando radicales hidroxilo, los cuales son relevantes en enfermedades crónico no transmisibles y el envejecimiento a través de mecanismos que implican mutagénesis de ADN mitocondrial o aumento de las tasas de acortamiento de los telómeros de ADN. (Delgado O. et al., 2010).

Los radicales libres (RL) se producen normal y continuamente durante el metabolismo celular, que se llevan a cabo principalmente en la mitocondria, por las diversas reacciones redox, realizadas por enzimas como la NADHP oxidasa, lipoxigenasas, cicloxigenasas y peroxidasas (Adam V., 2005; Turrens , 2003), existen otras fuentes endógenas de RL como son las oxidaciones microsomales, los fagosómas, la autooxidación de sustratos y los neutrófilos (Roche & Romero , 1994).

Dentro de los efectos adversos de los radicales libres, se citan los daños a la membrana celular, al colágeno, al ADN, al material cromosómico y a las proteínas, enzimas y moléculas que nivelan los niveles de calcio intracelular y el estrés oxidativo.

1.3.7 Estrés oxidativo

Cuando el aumento del contenido intracelular de las moléculas radicales y no radicales sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula, se produce el estrés oxidativo, induciendo un daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados, alterando la funcionalidad celular y contribuyendo al desarrollo de enfermedades degenerativas (Avello & Suwalsky, 2006). El estrés oxidativo puede deberse a disminución de antioxidantes debido a mutaciones o a toxinas que causan disminución de

defensas o por el incremento en la producción de especies reactivas a causa de la exposición a elevados niveles de oxígeno.

La dieta juega un papel muy importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal, lo que está llevando a las industrias alimentarias a diseñar alimentos funcionales que supongan un aporte extra de antioxidantes naturales (García F. , 2006).

1.3.8 Beneficios e Importancia de los Antioxidantes

En los últimos años numerosos estudios han avalado los efectos benéficos de la ingesta de polifenoles sobre la salud, especialmente sobre el sistema cardiovascular. Esto es importante, porque las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo. Los efectos de los polifenoles son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos presentan efectos vasodilatadores, son capaces además de mejorar el perfil lipídico y atenúan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Presentan claros efectos antiinflamatorios y estos compuestos son a su vez capaces de modular los procesos de apoptosis en el endotelio vascular. Esta revisión define desde el punto de vista estructural, los distintos grupos de polifenoles que pueden formarse en los vegetales y actualiza los conocimientos sobre su biodisponibilidad.

Entre las actividades fisiológicas de los antioxidantes naturales se encuentra: actividad antibacteriana, antiviral, antimutagénica, antialérgica, anticarcinogénica, inhibidora del incremento de la presión arterial, antiúlceras, anticariogénica, antimicrobiana y antifúngica (Halliwell & Whiteman, 2004), todas derivadas del estrés oxidativo celular, además de su poder como: vasodilatadores, antiinflamatorios, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, efectos estrogénicos, o inhibidores de enzimas prooxidantes, como ciclooxigenasa y xantina oxidasa (García F. , 2006).

1.4 Determinación de actividad antioxidante

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan solo una idea aproximada de lo que ocurre *in vivo*. La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto (Kuskoski et al., 2005). Las técnicas espectrofotométricas si bien tienen interés desde el punto de vista del control de calidad, no aportan suficiente información desde el punto de vista nutricional y funcional, por lo que es necesario recurrir a técnicas más precisas como el acoplamiento de HPLC-Masas, o InfraRojo, entre otras técnicas, identificando individualmente los polifenoles de interés (Prior et al., 2005). La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se ve determinada por su estructura química (Belitz & Grosch, 1988).

Técnicas espectrofotométricas – Determina la actividad antioxidante frente a sustancias cromóforas de naturaleza radical, ocurriendo una pérdida de color proporcional con la concentración. La capacidad antioxidante de una muestra está dada por interacciones sinérgicas entre compuestos y por la acción en cada uno de ellos, por lo cual es necesario combinar más de un método para evaluar correctamente la capacidad de una muestra (Pulido et al., 2000). Entre los métodos utilizados se encuentran.

- DPPH, llamado así por el reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo. Es un método rápido y sencillo, se basa en la medición de la actividad secuestradora de radicales libres que presentan los compuestos antioxidantes (Castañeda, et al., 2008; Lim, Lim, & Tee, 2007). Es adecuado para medir la actividad antioxidante en alimentos y extractos vegetales (Sanchez-Moreno, 2002), en este método el radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade al contenido de la muestra sustancias antioxidantes. El DPPH puede obtenerse directamente, a diferencia del ABTS, que es generado tras una reacción química, enzimática o electroquímica (Castañeda et al., 2008) y mientras más antioxidante sea la muestra, menos será su valor (Pulido et al., 2000). La medida de la reacción DPPH – sustrato debe ser

estequiométrica, en caso de que el sustrato no tenga masa molar, como en extractos de plantas (Molyneux, 2004).

- FRAP, mide la capacidad reductora de fierro como un método para conocer el “Poder antioxidante” (Benzie & Strain, 1996). Es un ensayo sencillo y fácilmente automatizable (Pulido et al., 2000). El método se basa al determinar la capacidad que tiene la muestra para reducir el complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (Fe^{3+} -TPTZ) a su forma ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ) (Figura 9) (Saliha Esin et al., 2010), generando una coloración de intensidad proporcional a la actividad reductora de la muestra, que puede cuantificarse por colorimetría en base a un patrón de hierro. En esta técnica una sal de hierro, el $Fe(III)(TPTZ)_2Cl_3$, actúa como oxidante y cromóforo, ya que la forma reducida absorbe a 593 nm, no así la forma oxidada (García F., 2006).

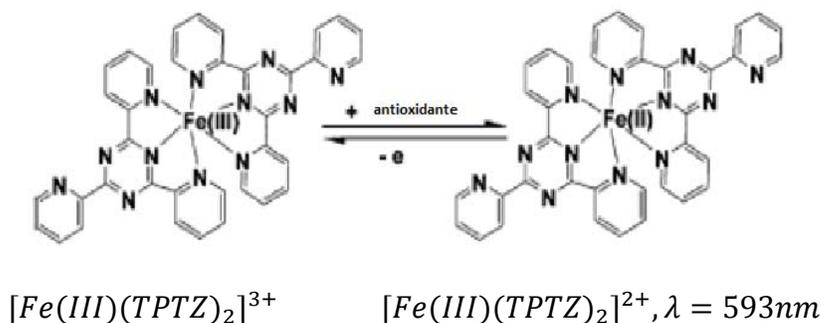


Figura 9: Fundamento del método FRAP, capacidad reductora del complejo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (Fe^{3+} -TPTZ) se reduce a su forma ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ)

- Fenoles totales, los fenoles totales no son un método de actividad antioxidante, pero permite conocer la cantidad de fenoles de una forma general. Folin – Ciocalteu, ha sido utilizado durante muchos años como una medida del contenido de compuestos fenólicos totales en productos naturales (Prior et al., 2005). Este análisis es complementario al cromatográfico proporcionando información valiosa a la hora de seleccionar variedades con mayor potencial antioxidante.

1.5 Justificación

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2011, realizó una lista con las 10 principales causas de muerte en el mundo (Figura 10). En su informe destaca que las causas de muerte pueden variar entre países de altos y bajos ingresos. En los países ricos las enfermedades no transmisibles representan el 87% de todas las muertes, mientras que en los países de bajos ingresos apenas representan el 36%. Hecha la aclaración anterior; se puede mencionar que la principal causa de muerte fueron las enfermedades cardiovasculares, unos 7 millones de personas fallecieron por una cardiopatía isquémica. Los casos de cáncer de tráquea, de bronquios y de pulmón causaron un millón y medio de muertes y la diabetes mellitus irrumpe en esta lista, de la que ha salido la tuberculosis, provocando en 2011 la muerte de 1,4 millones de personas en todo el mundo.

México, aunque es un país en vías de desarrollo, (INEGI, 2011) dio a conocer que las principales causas de muerte son similares a los países desarrollados en las que se encuentran las enfermedades del corazón, distintos tipos de cáncer y la diabetes mellitus en ese orden.

Estas enfermedades están directamente relacionadas con el estrés oxidativo, el cual ha sido implicado en el desarrollo de varias enfermedades crónicas no transmisibles y el envejecimiento (Halliwell & Whiteman, 2004). El estrés oxidativo hace referencia al desequilibrio entre la generación de especies reactivas y la capacidad de los sistemas de defensa del organismo para hacer frente a la agresión oxidativa y sus efectos adversos.

Ante este esquema global y nacional se buscan alternativas viables que reduzcan el índice de mortandad y aumente la calidad de vida con el fin de contrarrestar efectos negativos aprovechando los avances tecnológicos del siglo XXI. En base a lo anterior, el interés de antioxidantes naturales, se ha incrementado con el propósito de prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Justicia spicigera schl. es una planta medicinal y endémica de Mesoamérica. Ha sido empleada desde tiempos remotos para el tratamiento de la inflamación, como depurativo en la sangre, cáncer, entre otros síntomas (Alonso et al., 2011). Sin embargo, la información científica que sustente sus propiedades medicinales es muy escasa.

Las diez principales causas de muerte en el mundo según la OMS, 2011.

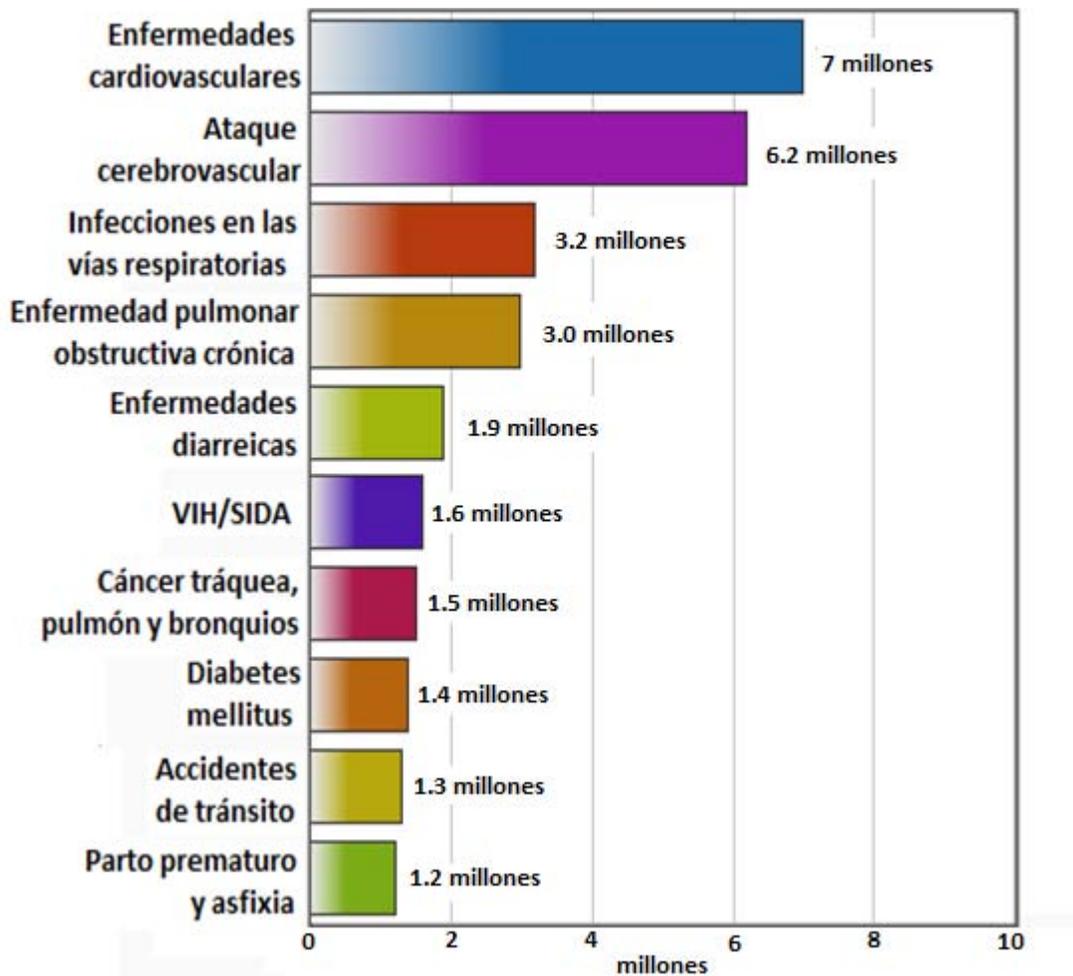


Figura 10: Las diez principales causas de muerte en el mundo según la OMS, 2011.

Fuente: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del método de extracción (maceración y vía ultrasónica) sobre la capacidad antioxidante de *Justicia spicigera schl.*, mediante la implementación y ejecución de las técnicas FRAP, DPPH y Folin-Ciocalteu, para su posible aplicación en nuevos productos alimenticios.

2.1.1 Objetivos Específicos

2.1.1.1 Objetivo particular 1

Evaluar dos métodos de extracción (maceración y vía ultrasónica) empleando como disolventes agua y una mezcla de etanol-agua (50% v/v) sobre la cantidad de compuestos fenólicos extraídos de *Justicia spicigera schl.* mediante la técnica de Folin-Ciocalteu.

2.1.1.2 Objetivo particular 2

Determinar la capacidad antioxidante, mediante las técnicas, FRAP y DPPH para establecer una relación entre los dos métodos de extracción.

3 Materiales y métodos

3.1 Reactivos

Reactivo de Folin Ciocalteu 2N, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), Tris-HCl, 2, 4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina (TPTZ), Cloruro férrico hexahidratado y ácido gálico se adquirieron en Sigma-Aldrich (USA). Ácido ascórbico, ácido clorhídrico, ácido acético y acetato de sodio fueron provistos por JT Baker (México). Carbonato de sodio usado fue de la marca Merck (Alemania). El etanol empleado fue de grado técnico y agua destilada.

En la Figura 11 se observan los equipos empleados durante la presente investigación.

- Espectrofotómetro Varian Cary 50 Bio UV/ Visible,
- Baño ultrasónico (Elma TI-H-5),
- Rotavapor (Yamato RE500),
- Centrífuga (International Centrifuga, Mod K. USA).

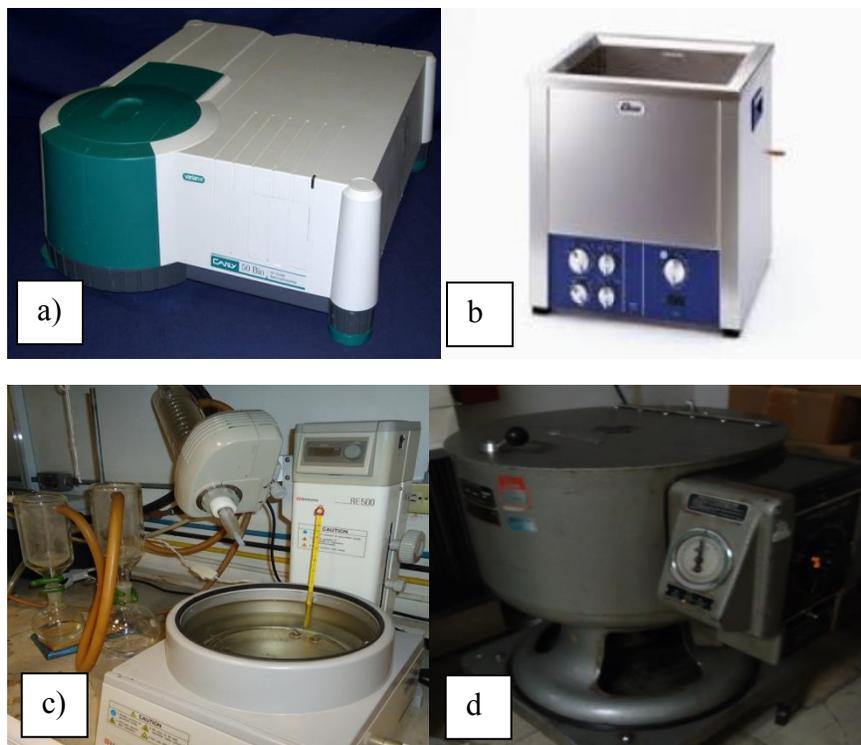


Figura 11: Equipos empleados durante la experimentación.

3.2 Material biológico

El material vegetal fue adquirido en el mercado de Sonora en la Ciudad de México.

3.3 Preparación de extractos

3.3.1 Acondicionamiento del material vegetal

El material vegetal fue transportado al Laboratorio de Biomateriales de CICATA- IPN Unidad Legaria, donde fue lavado con agua corriente, sanitizado en una solución de hipoclorito de sodio al 1% y secado bajo condiciones de sombra y temperatura ambiente (Figura 12). Finalmente las hojas fueron separadas de los tallos y molidas en un molino de discos (Modelo 148-2, The Bauer Bros Co., EUA). El polvo seco fue almacenado en bolsas de plástico previo a los análisis.



Figura 12: Muicle secándose bajo condiciones de sombra.

3.3.2 Pruebas Preliminares

Para elegir el disolvente más eficiente para la extracción de los compuestos bioactivos, se realizó una prueba comparativa entre agua y mezclas orgánico-ácidas teniendo en cuenta la polaridad de los disolventes.

3.4 Métodos de extracción

3.4.1 Maceración

Se realizó una extracción orgánico-ácida empleando el polvo seco. Para ello por cada gramo de material vegetal se agregaron 20 mL de solución acuoetanólica (50% v/v). La mezcla fue agitada constantemente durante 2 horas a temperatura ambiente (20-25°C) (Figura 13). Posteriormente se centrifugó (15 min, 1750 rpm). El sobrenadante fue filtrado y envasado, y los residuos se sometieron a una segunda extracción bajo las mismas condiciones. Finalmente la mezcla fue centrifugada y el sobrenadante combinado con los obtenidos previamente. Se repitió el mismo proceso antes mencionado pero utilizando ahora agua destilada como disolvente.



Figura 13: Método de extracción maceración.

3.4.2 Vía ultrasónica

La extracción orgánico-ácida del material vegetal se hizo de la siguiente forma: por cada gramo de polvo seco se adicionaron 20 mL de una solución acuoetanólica (50% v/v). La mezcla se sometió a sonicación (25 kHz) en un baño ultrasónico (Elma TI-H-5) por 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C). Posteriormente, tras centrifugar por 15 min, a

1750 rpm, los sobrenadantes se separaron. Una segunda extracción fue realizada con los residuos recuperados siguiendo el mismo procedimiento (Figura 14). Al finalizar, los sobrenadantes fueron combinados con los obtenidos previamente. Se repitió el mismo proceso antes mencionado pero utilizando únicamente agua destilada como disolvente.

Los extractos fueron concentrados en un Rotavapor (Yamato, RE500), secados en una estufa al vacío y almacenados en frascos ámbar en un lugar seco y oscuro hasta su empleo.



Figura 14: Extracción por vía ultrasónica de *Justicia spicigera schl.*
a) Agua y b) mezcla agua-etanol.

3.5 Determinación de fenoles totales por el Método de Folin-Ciocalteu

El contenido fenólico total se calculó a partir de la capacidad de reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como patrón. Se tomaron 100 μ L de cada muestra en matraces volumétricos ámbar de 10 mL, posteriormente se adicionaron 7 mL de agua, seguidos por 500 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu 2N, se agitó y mezcló con vortex durante 5 segundos, se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos, se adicionó 1.5 mL de la solución de carbonato de sodio al 20% y aforó a 10 mL con agua destilada en los matraces correspondientes, se mezcló con vortex por 5 segundos y se mantuvo en un cuarto oscuro por una hora 40 min. Posteriormente se cuantificó la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm, se sustrajo la absorbancia del blanco en todas las lecturas y se elaboró una curva de

calibración del estándar (Ver Anexo 1). Los valores fueron reportados como equivalentes de ácido gálico (GAE) usando unidades de mg/ g de extracto seco.

3.6 Determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres (DPPH)

Se pesaron 10 mg de muestra en matraces volumétricos ámbar de 10 mL y se aforaron (se realizaron diferentes diluciones del extracto). Se tomó una alícuota de 2 mL de extracto, se mezcló con 500µL de Buffer Tris-HCl 0.1M y se agitó con vortex durante 5 segundos. Posteriormente se agregaron 2 mL de 200µM de DPPH preparado previamente en metanol. Se mezcló vigorosamente durante 5 segundos en vortex y dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. (Cardozo et al., 2010)

La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 517 nm y el porcentaje de reducción de DPPH fue calculado con la siguiente ecuación.

$$\text{Efecto de reducción} = \left[1 - \frac{\text{Absorbancia Muestra}}{\text{Absorbancia Control}} \right] * 100 \quad \text{Ec. 1}$$

El EC_{50} está determinado como la cantidad necesaria del extracto estudiado para reducir la concentración de DPPH en un 50%. El valor de EC_{50} fue determinado a partir de los datos obtenidos en la gráfica de efecto de reducción de DPPH contra la concentración del extracto, (0 - 1000 ppm).

3.7 Determinación de la capacidad reductora de hierro (FRAP)

La determinación de FRAP está basada en la reducción del complejo Fe^{3+} -TPTZ al complejo azulado Fe^{2+} -TPTZ. El ensayo fue llevado a cabo por el método de Benzie & Strain (1996), con algunas modificaciones. Se preparó una solución de trabajo FRAP (25 mL de buffer de acetato, 2.5 mL de solución TPTZ, 2.5 mL de solución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y se calentó a 37°C por 4 minutos antes de usar. Se tomó una alícuota de 150 μL de extracto (0.01 mg de extracto seco/mL de disolvente para efectuar esta prueba), seguidos por 2850 μL de la solución FRAP preparada previamente, se agitó y dejó en reposo por 30 minutos en la oscuridad. Se realizó esta prueba por triplicado. La curva de calibración fue realizada con ácido ascórbico como estándar. La absorbancia fue leída a una longitud de onda de 593 nm y los valores fueron reportados en μM equivalentes de ácido ascórbico, usando unidades de $\mu\text{M}/10$ mg de extracto seco. (Ver Anexo 2).

4 Análisis estadístico

Las pruebas se realizaron por triplicado y los resultados analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey (Minitab 16). Diferencias significativas fueron consideradas a un nivel de significancia (α) de 0.05.

5 Resultados y Discusión

5.1 Resultados de la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

El contenido total de compuestos fenólicos puede contribuir significativamente con la actividad antioxidante (Thaipong, et al. 2006). En la Figura 15 se aprecia el contenido fenólico total de los extractos del muicle obtenidos por los métodos de maceración-agua (M-A), maceración-agua/etanol (M-A/E), ultrasonido- agua (U-A) y ultrasonido-agua/etanol (U-A/E). El extracto que presentó mayor contenido fenólico fue el M-A con 134 mg EAG/g de extracto seco, mientras que el U-A fue el extracto que presentó menor contenido fenólico con 98 mg EAG/ g de extracto seco. De acuerdo con el ANOVA no existe diferencia significativa ($P>0.05$) entre los métodos empleados y disolventes. Sin embargo, recalcamos que el método por ultrasonido solo se empleó un tiempo de 30 minutos, por lo que el método de ultrasonido fue más eficiente.

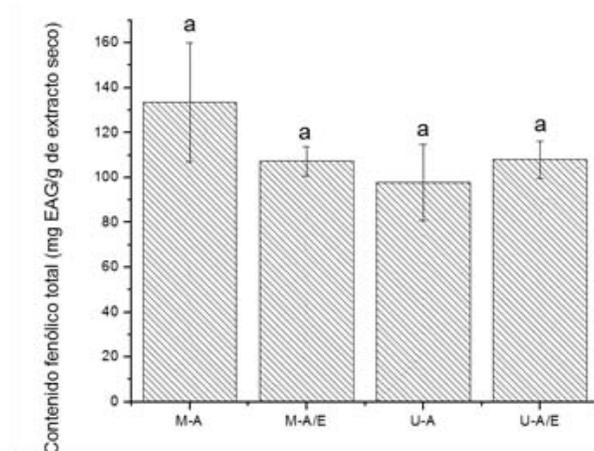


Figura 15.- Contenido fenólico total de extractos de muicle obtenidos con diferentes métodos de extracción. Los valores son expresados en equivalentes de ácido gálico. Barras con distintas letras indican diferencias significativas ($P<0.05$).

5.2 Resultados de la determinación de la capacidad secuestradora de radicales libres (DPPH)

En la Figura 16 se muestra la actividad secuestradora de radicales libres DPPH de los extractos obtenidos del muicle con los diferentes métodos de extracción. El IC_{50} es la concentración requerida de un antioxidante para quelar el 50% de los radicales del DPPH en la mezcla (Lan et al. 2007). Es evidente que el extracto obtenido por U-A/E fue el único que llego al EC_{50} a una concentración de casi 1000 ppm. Mientras que los extractos U-A, M-A/E y M-A no alcanzaron a quelar el 50% de los radicales libres del DPPH a la concentración máxima.

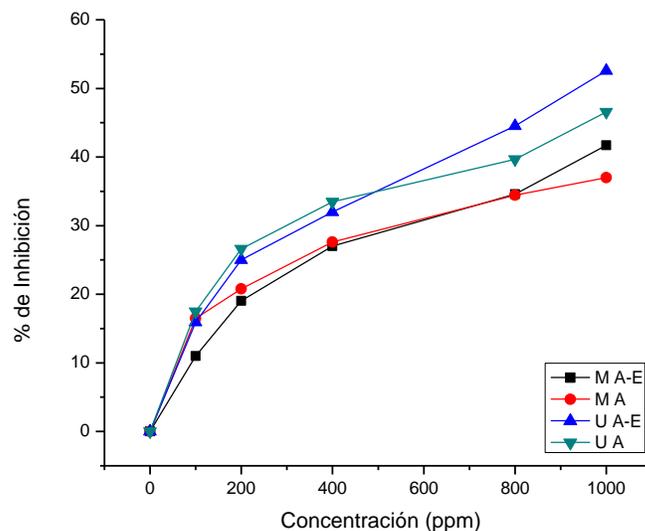


Figura 16: Evaluación de la capacidad secuestradora de radicales libres (DPPH) de extractos de muicle obtenidos con diferentes métodos de extracción. Se muestra el porcentaje de Inhibición del DPPH en *Justicia Spicigera schl.*

5.3 Resultados de la determinación de la capacidad reductora de hierro (FRAP)

Se observa en la Figura 17 que los extractos obtenidos por el método de extracción vía ultrasónica presentaron mayor capacidad reductora de hierro que aquellos extractos obtenidos por maceración, alcanzando un valor máximo de 232 μ ME de ácido ascórbico/10 mg de extracto seco para el extracto acuoso-etanólico. De acuerdo con el ANOVA, hubo una diferencia significativa entre los dos métodos de extracción, y para el caso de la maceración también existió diferencia significativa entre disolventes ($P < 0.05$). Assis Jacques et al. (2007) sugieren que el mecanismo más probable para la extracción por ultrasonido es la intensificación de la transferencia de masa y un acceso más fácil del disolvente a la célula vegetal debido al colapso de las burbujas de cavitación cerca de las paredes celulares. Este fenómeno produce disrupción celular lo que favorece una buena penetración del disolvente en las células a través de las ondas de tipo ultrasónico. Por lo cual se obtiene mayor actividad antioxidante en el método vía ultrasónica además que reduce tiempos de extracción eficientando la operación.

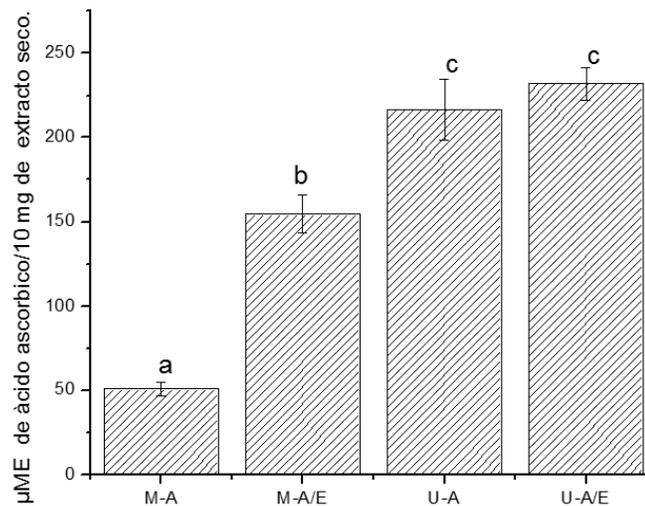


Figura 17: Evaluación de la capacidad reductora de hierro (FRAP) de extractos del muicle obtenidos con diferentes métodos de extracción. Los valores son expresados en μ ME de ácido ascórbico. Barras con distintas letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

De acuerdo a los resultados de este trabajo se establece que *Justicia spicigera schl.* es una fuente de compuestos bioactivos con actividad antioxidante, un aspecto que se debe considerar es su color característico (rojo-morado). Debido a lo anterior se infiere la presencia de antocianinas, sin embargo, es necesario hacer estudios fitoquímicos para confirmar su presencia. No obstante este grupo de metabolitos secundarios (antocianinas) son estables a pH ácidos, ya que existe conjugación en su estructura y su catión flavilio es estable en condiciones ácidas (Rodríguez & Wrolstad, 2001).

Diferentes autores han considerado el pH como una variable influyente durante la extracción. Por ejemplo Sheabar & Neeman (1988) encontraron un máximo de solubilidad de polifenoles de orujo de oliva en una fase orgánica a pH 4. Baublis et al. (2000) muestran como con un tratamiento ácido sobre salvado de trigo se mejora la capacidad antioxidante de las fracciones acuosas. Por lo que será necesario evaluar el efecto que tiene el pH sobre la extracción de compuestos bioactivos con actividad antioxidante del muicle.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos muestra variaciones basadas en el tipo de disolvente y su polaridad, el mecanismo de reacción, los parámetros de solubilidad, así como su estructura. (Saliha et al., 2007)

El tipo de compuesto bioactivo, los rendimientos de extracción y la actividad antioxidante de los extractos dependen del tipo de disolvente utilizado, debido al diferente potencial antioxidante de compuestos con distinta polaridad (Marinova & Yanishlieva, 1997). Los disolventes polares son los más utilizados para la extracción de compuestos fenólicos de medios acuosos. Sin embargo, los disolventes que se emplearon fueron el etanol y el agua por razones de ausencia de toxicidad y abundancia, respectivamente.

Algunos autores encontraron que existe correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante (Andarwulan et al., 1999; Tsaliki et al. 1999). Mientras que otros autores no encontraron tal correlación (Bocco et al. 1998; Kahkonen et al. 1999).

6 Conclusiones

- De acuerdo con los resultados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido fenólico total entre los métodos y disolventes de extracción empleados. Sin embargo, la capacidad antioxidante fue estadísticamente mayor en aquellos extractos obtenidos por ultrasonido.
- Se comprobó que la extracción asistida por ultrasonido puede ser una alternativa eficiente en la obtención de compuestos fenólicos sin afectar sus propiedades antioxidantes.
- No se encontró alguna correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante
- Este estudio promueve el uso de una planta endémica de México, *Justicia spicigera schl.* como fuente natural de compuestos bioactivos con actividad antioxidante.

7 Recomendaciones

- Establecer un perfil metabólico empleando un estudio fitoquímico de *Justicia spicigera schl.* para identificar los núcleos de metabolitos secundarios.
- Establecer la metodología adecuada para efectuar el aislamiento y caracterización de los compuestos bioactivos que se encuentren en *Justicia spicigera schl.*
- Realizar la identificación estructural de los metabolitos presentes en el muicle.
- Efectuar evaluaciones de toxicidad y las pruebas antimicrobianas, del extracto crudo como de las fracciones puras durante el proceso de aislamiento.
- Optimizar el proceso de extracción de compuestos bioactivos con actividad antioxidante explorando diferentes disolventes, tiempo, pH, temperatura del tratamiento y relación entre sólido y líquido.

8 Bibliografía

- Abdalla, A., Darwish, S., Ayad, E., & El-Hamahmy, R. (2007). Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. *Food Chemistry*, 103: 1141-1152.
- Adam V., V. (2005). Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: Contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidants and Redox Signaling*, 7: 1140-1149.
- Alonso, A. J., Villareal, M. L., Salazar, L. A., Gómez, M., Domínguez, F., & García, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 945-972.
- Andarwulan, N., Fardiaz, D., Wattimena, G., & Shetty, K. (1999). Antioxidant activity associated with lipid and phenolic mobilization during seed germination of *Pangium edule* Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3158-3163.
- Argueta, A., Cano, L., & Rodarte, M. (1994). *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*. México D.F.: Instituto Nacional Indigenista.
- Assis Jacques, R., dos Santos Freitas, L., Flores Pérez, V., Dariva, C., de Oliveira, A., de Oliveira, J. V., y otros. (2007). The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14: 6-12.
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 2: 161-172.
- Azpeitia, M. (1996). *Estudio químico de Justicia spicigera Schlecth*. México D.F.: UNAM.
- Baublis, A., Decker, E. A., & Clydesdale, F. M. (2000). Antioxidant effect of aqueous extracts from wheat based ready to eat breakfast cereals. *Food Chemistry*, 68: 1-6.
- Belitz, H., & Grosch, W. (1988). *Química de alimentos*. España: Zaragoza.
- Benzie, I. F., & Strain, J. (1996). The Ferric reducing ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- Bernardini, N., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. "Tommy Atkins") peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 18: 2208-2216.

- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). *Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*. Recuperado el 01 de Noviembre de 2013, de UNAM: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>
- Biología, I. d. (27 de 05 de 2010). *Unibio: Colecciones Biológicas*. Recuperado el 14 de Julio de 2013, de Universidad Nacional Autonoma de México: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PV525864>
- Bocco, A., Cuvelier, M., Richard, H., & Berset, C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:2123-2129.
- Callejo, J. (1996). *La historia oculta del mundo vegetal*. Madrid, España.: Lo otro.
- Cardozo, M., Ordoñez, R., Zampini, I., Cuello, A., Dibenedetto, G., & Isla, M. (2010). Evaluation of antioxidant capacity, genotoxicity and polyphenol content of non conventional foods: Prosopis flour. *Food Research International*, 43: 1505–1510.
- Castañeda, C., Ramos, L., & Ibañez, V. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista horizonte Médico*, 56-72.
- Cevallos, F., & Sergio, R. (1998). *Las plantas con flores*. Mexico D.F.: Ciencias.
- Conde, E. (2009). *Revalorización de residuos agroindustriales y forestales para la obtención de antioxidantes naturales con aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica*. Ourense: Universidad de Vigo.
- Correa, G., & Alcantara, A. F. (2012). Chemical constituents and biological activities of species of Justicia-a review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22: 220-238.
- de Souza, A., Vendramini, R., Brunetti, I., Regasini, L., Bolzani, V., Silva, D., y otros. (2009). Continuous treatment with alcohol extract from Pterogyne nitens leaves does not alter typical variables of experimental diabetes. *Revista brasileira de farmacognosia*, 19:2-19.
- Delgado O., L., Betanzos C., G., & Sumaya M., M. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia*, 18: 10-15.
- Discover Life. (2013). *Natural Resources Conservation Service*. Recuperado el 01 de Noviembre de 2013, de USDA: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Justicia+spicigera&flags=col2>:
- Domínguez, X., Achenbach, H., González, C., & Ferré-D' Amore, A. (1990). Estudio químico del "muñile" (Justicia spicigera). *Revista Química Latinoamericana*, 21: 142-143.

- Euler, K., & Alam, M. (1982). Isolation of Kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of Natural Products.*, 45: 220-221.
- Fabricant DS, F. N. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect*, 109: 69-75.
- Fernandes, I., Marques, F., Victor, d., & Mateus, N. (2013). Antioxidant and antiproliferative properties of methylated metabolites of anthocyanins. *Food Chemistry*, 141: 2923–2933.
- Fuhrman, B., & Aviram, M. (2002). Polyphenols and flavonoids protect LDL against atherogenic modifications. En E. Cadenas, & L. Packer, *Handbook of antioxidants* (págs. 303-327). Los Angeles, California.: University of Southern California School of Pharmacy.
- Gao, M., & Liu, C. (2005). Comparison techniques for the extraction of flavonoides from cultures cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21: 1461-1463.
- García, E. (2008). *Protección y estabilización de compuestos fenólicos obtenidos a partir de muítle (Justicia spicigera), por medio de su interacción intermolecular con proteína de soya*. México D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana.
- García, F. (2006). *Elaboración in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes*. Murcia: Universidad de Murcia.
- Gómez-Miguez, M., González Miret, M., & Heredio, F. J. (2007). Evolution of colour and anthocyanin composition of Syrah wines elaborated with pre-fermentative cold maceration. *Journal of Food Engineering*, 79: 271-278.
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal Pharmacology*, 142: 231-155.
- Hamid, K., Abdullah, A., Jusoh, K., & Subramaniam, V. (2010). Antioxidant activity of pink-flesh guava (*Psidium guajava* L): Effect of extraction techniques and solvents. *Food Analytical Methods.*, 4: 100-107.
- Hernández, F. (1942). *Historia de las plantas de Nueva España* (Vol. I). México: Imprenta Universitaria.
- Hersch M., P. (1997). Medicinal plants and regional traders in Mexico: Physiographic differences and conservational challenge. *Economy Botany*, 51(2): 107-120.
- INEGI. (2011). *INEGI*. Recuperado el 06 de Octubre de 2013, de <http://www3.inegi.org.mx/Sistemas/temasV2/Default.aspx?s=est&c=17484>

- Kahkonen, M., Hopia, A., Vuorela, H., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T., y otros. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954-3962.
- Kuskoski, M., Asuero, A., Troncoso, A., Malcini-filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de los alimentos.*, 25: 726-732.
- Lan, S., Jun-Jie, Y., Denys, C., Kequan, Z., Jeffrey, M., & Liangli, Y. (2007). Total phenolic contents, chelating capacities, and radical scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. *Food Chemistry*, 100: 990-997.
- Lehtinen, P., & Laakso, S. (1998). Effect of extraction conditions on the recovery and potency of antioxidants in oat fiber. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 46: 4842-4845.
- Lim, Y., Lim, T., & Tee, J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*, 103: 1003-1008.
- Lozoya, X., & Zolla, C. (1984). *La medicina invisible. Introducción al estudio de la medicina tradicional en México.* (2 ed.). México D.F.: Folios.
- Luque de Castro, M., & García-Ayuso, L. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 356: 1-10.
- Macheix, J., Fleuriet, A., & Billot, J. (1990). *Fruit phenolics.* Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Marinova, E., & Yanishlieva, N. (1997). Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. *Food Chemistry*, 58: 245-248.
- Martínez, M. (1992). *Las plantas medicinales de México* (Sexta ed.). México D.F.: Botas.
- Martínez, M. (1996). *Plantas medicinales mexicanas.* México D.F.: Botas.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M., & Gaspar, R. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenolicos de la dieta. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 50: 5-18.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hidrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal ScienceTechnology*, 26: 211-219.
- Monroy, C., & Castillo, P. (2007). *Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos.* (Segunda ed.). México.: CONABIO.
- Pan, X., Niu, G., & Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and teacaffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing*, 42: 129-133.

- Patwardhan, B. (2005). Ethnopharmacology and drug discovery. *Journal Ethnopharmacol*, 100: 50-52.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2001). Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. En H. III, *In Antioxidants in food*. (págs. 159-198). CRC. Woodhead publishing limited. Cambridge.
- Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53: 4290-4302.
- Puértolas, E., Saldaña, G., Álvarez, I., & Raso, J. (2011). Experimental design approach for the evaluation of anthocyanin content of rosé wines obtained by pulsed electric fields. Influence of temperature of rosé wines obtained by pulsed electric fields. Influence of temperature. *Food Chemistry*, 126: 1482–1487.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48: 3396-3402.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Alexandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27: 76-89.
- RAE. (2011). *Diccionario de la Lengua Española*. Recuperado el Agosto de 2013
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and medicine*, 20: 933-956.
- Roche, C., & Romero, A. (1994). Estrés oxidativo y degradación de proteínas. *Medicina clínica*, 103: 189-196.
- Rostagno, M., Palma, M., & Barroso, C. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography*, 1012: 119-128.
- Sáiz, M., & López, N. (2010). Obtención y aplicación de extractos naturales. *Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria*, 1-44.
- Saliha, E., Mustafa, Ö., & Kubilay, G. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12:1496-1547.
- Saliha Esin, C., Mustafa, Ö., & Kubilay, G. (2010). Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta*, 81: 1300-1309.

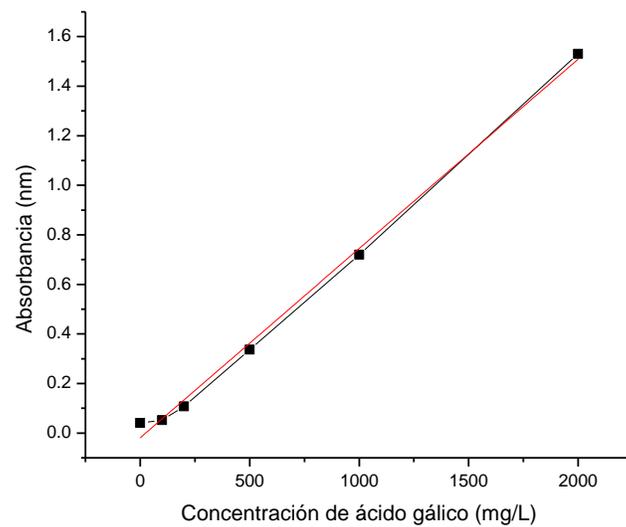
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology*, 8: 121-137.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. (Primera ed.). Colombia.
- Sheabar, F. Z., & Neeman, I. (1988). Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 65: 990-993.
- Siqueira, S., dos Santos Falcão-Silva, V., de Fátima Agra, M., Dariva, C., de Siqueira-Júnior, J. P., & Vieira Fonseca, M. J. (2011). Biological activities of *Solanum paludosum* Moric. extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 58: 391-397.
- Sohal, R., & Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction and aging. *National Institutes of health*, 273: 59-63.
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81: 200-208.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros Z., L., & Hawkins B., D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19: 669-675.
- Tsaliki, E., Lagouri, V., & Doxastakis, G. (1999).). Evaluation of the antioxidant activity of lupin seed flour and derivatives (*Lupinus albus* ssp. *Graecus*). *Food Chemistry*, 65: 71-75.
- Tsanko , S. G., Jacques, H., Herman , J. W., Benina, M., Mehterov, N., Toneva, V., y otros. (2014). Natural products from resurrection plants: Potential for medical applications. *Biotechnology Advances*, 01:1014-1022.
- Turrens , F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal Physiology*, 552: 335-344.
- Urala , N., & Lahteenmaki, L. (2007). Consumer's changing attitudes towards functional foods. *Food Quality and preference*, 18: 1-12.
- USDA. (2013). *Natural Resources Conservation Service.Plant database*. Recuperado el 08 de Septiembre de 2013, de United States Departament of Agriculture: <http://plants.usda.gov/java/nameSearch?keywordquery=justicia+spicigera&mode=sciname&submit.x=0&submit.y=0>
- Valcárcel C., M., & Gómez H., A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. Reverte.

- Venereo Gutiérrez, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31: 2-8.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 303-313.
- Yaminia, Y., Seidib, S., & Rezazad, M. (2014). Electrical field-induced extraction and separation techniques: Promising trends in analytical chemistry – A review. *Analytica Chimica Acta*, 814: 1-22.

9 Anexos:

ANEXO 1

Curva de calibración
Estándar ácido gálico.

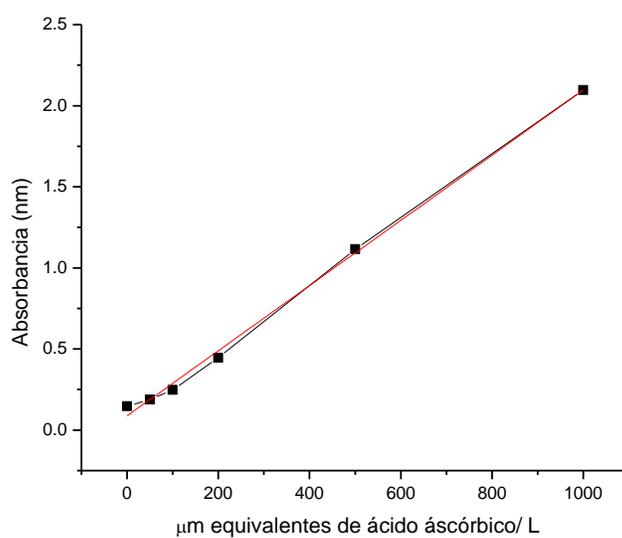


$$y = 0.0008x - 0.0194$$

$$R^2 = 0.9964$$

ANEXO 2

Curva de calibración:
Estándar ácido ascórbico.



$$y = 0.002x + 0.0873$$

$$R^2 = 0.9974$$