



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

Liberación de compuestos antioxidantes de ajenjo
(*Artemisia absinthium*) y aranthó (*Decatropis
bicolor*) por diferentes métodos de extracción.

TESIS

Que para obtener el título de
Licenciada en Nutrición

PRESENTA

P. L. Nutrición Tania Hernández Sánchez

No. Cuenta: 244460

Bajo la Dirección de:

Dra. Elizabeth Contreras López

Co-director: Dr. Juan Ramírez Godínez



Pachuca, Hgo., noviembre, 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN



De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

"Liberación de compuestos antioxidantes de ajeno (*Artemisia absinthium*) y aranthó (*Decatropis bicolor*) por diferentes métodos de extracción."

Que para obtener el Título de Licenciada de Nutrición sustenta la Pasante

C. Tania Hernández Sánchez

ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo, 6 de noviembre del 2018
"Amor, Orden y Progreso"

PRESIDENTE:	DRA. NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO
SECRETARIO:	DRA. ESTHER RAMÍREZ MORENO
PRIMER VOCAL:	DRA. JUDITH JAIMEZ ORDAZ
SEGUNDO VOCAL:	DR. JUAN RAMÍREZ GODÍNEZ
TERCER VOCAL:	DRA. ELIZABETH CONTRERAS LÓPEZ
PRIMER SUPLENTE:	MTRA. ARIANNA OMAÑA COVARRUBIAS
SEGUNDO SUPLENTE:	MTRA. ZULI GPE. CALDERÓN RAMOS

Firmas manuscritas de los miembros del jurado de examen recepcional, escritas en azul sobre líneas horizontales. Se reconocen las firmas de Nelly del Socorro Cruz Cansino, Esther Ramírez Moreno, Judith Jaimez Orda, Juan Ramírez Godínez, Elizabeth Contreras López, Arianna Omaña Covarrubias y Zuli Gpe. Calderón Ramos.



Esta investigación se realizó en el laboratorio de
Fisicoquímica de Alimentos II
Área Académica de Química
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

DEDICATORIAS

Este trabajo lo dedicó a mi familia, especialmente a mis padres Martha y Rubén, a mi hermano, a mi mamá y a mi papá, gracias a su amor, esfuerzo, sacrificios y enseñanzas a lo largo de mi vida he tenido la oportunidad de vivir muchas cosas buenas y una de ellas es el poder estudiar. Todo lo que he logrado en gran parte ha sido posible a ustedes, siempre serán lo que me inspire a ser mejor día a día, son el motivo por el cual me esfuerzo cuando en ocasiones parezca que no pueda más. Son todo en mi vida.

Dedicó también este trabajo a mis hijos perrunos, Valentina, Rutila, Ramón y al nuevo integrante de la familia Tomás, son las criaturas más bellas de mi mundo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la vida, al universo y a Dios por darme la oportunidad de vivir durante mi año de servicio social y realización de esta investigación muchas experiencias inolvidables, que me ayudaron a crecer profesionalmente y como persona.

A mi madre Martha, gracias por apoyarme siempre, por su amor y esfuerzo, no hay manera de retribuirte todo lo que me has dado, eres lo que más amo en mi vida, y eres el principal motivo de querer ser la mejor profesionista, para así poder darte todo lo que mereces. Quiero que siempre seas feliz, y que una parte de esa felicidad sea yo. Gracias a mi padre Rubén, por todo su esfuerzo que ha dado durante toda mi vida.

A mi hermano Rubén, eres mi persona favorita en el mundo, mi superhéroe. Gracias por siempre cuidarme, protegerme y motivarme a ser mejor persona y profesional.

Mamasa y Papanacho, gracias por todo su amor, por ser parte de los momentos más importantes en mi vida, así como por hacer mi vida tan feliz. Mamasa, no sé cómo agradecerte todo lo que me has compartido, gracias por siempre estar pendiente de que coma. ¡Eres genial!

Andrés, gracias por compartir tu vida conmigo estos casi 4 años, por todo lo que hemos vivido, te has ganado gran parte de mi corazón, gracias por llevarme de comer al laboratorio, a la escuela y a la oficina. Por esperarme, por soportarme, gracias por llevarme en tu bici, gracias por darme ánimo en los momentos difíciles y en especial por darme tu amor, te has convertido en una persona sumamente importante en mi vida.

Gracias a la doctora Elizabeth, y al doctor Juan por darme la oportunidad de realizar mi servicio social bajo su tutoría y de compartirme el laboratorio. Gracias por su apoyo

y por ser tan buena onda, y permitirme realizar muchas cosas durante el servicio social. Juan, muchas gracias por todo, agradezco a la vida la oportunidad que me dio de conocerte.

Muchísimas gracias a todas las personas que me han otorgado su ayuda y amistad, gracias a mis amigos de la preparatoria Bety, Jessi, Adry, Luis Alberto, Luis Angel, Manolo, Jaime e Isa, aunque pasemos mucho tiempo sin vernos, es muy grato cuando nos encontramos, espero que nuestra amistad perdure para siempre.

A mis amigos de la universidad, les agradezco todos los momentos divertidos que hemos pasado juntos, el apoyo en los momentos difíciles, gracias Max por hacerme reír en el laboratorio, y por tus consejos, eres una persona única y divertida. Denny, gracias por el apoyo moral, así como motivacional durante este tiempo.

Agradezco de manera infinita, el poder haber conocido a muchas personas del laboratorio en especial a Lupito, eres un gran amigo, gracias por todo tu apoyo, por escucharme y apoyarme en los momentos difíciles, por explicarme muchas cosas, espero que esta amistad que apenas comenzó dure mucho tiempo. Así mismo agradezco a Sandy, por su apoyo y por aclarar mis dudas.

Finalmente agradezco a todas las personas que contribuyeron con un consejo, apoyo moral, o en ayuda para poder culminar este trabajo de manera menos complicada.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FÍGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	VII
1 Resumen	1
Abstract.....	3
2 Marco teórico	5
2.1 Radicales libres	5
2.2 Antioxidantes	6
2.3 Antioxidantes naturales y su efecto en la salud	6
2.4 Plantas Medicinales.....	8
2.5 Ajenjo (<i>Artemisia absinthium</i>)	10
2.5.1 Descripción botánica.....	10
2.5.2 Origen y distribución	11
2.5.3 Usos en la medicina tradicional.....	11
2.5.4 Composición química del ajeno.....	12
2.6 Aranthó (<i>Decatropis bicolor</i>)	13
2.6.1 Descripción botánica	13
2.6.2 Origen y distribución	14
2.6.3 Usos en la medicina tradicional.....	14
2.6.4 Composición química del aranthó	14
2.7 Métodos de extracción de liberación de antioxidantes	15
2.7.1 Extracción sólido-líquido o convencional.....	15
2.7.2 Extracción con ultrasonido	16

2.7.3 Extracción con microondas	18
2.7.4. Extracción con prensa francesa	20
2.8 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	21
2.9 Técnicas para evaluar actividad antioxidante	21
3 Problema de investigación	23
4 Justificación	24
5 Objetivos	26
5.1 General.....	26
5.2 Específicos	26
6. Diseño metodológico.....	27
6.1 Obtención de muestras.....	28
6.2 Obtención de extractos acuosos por medio de un diseño de experimentos Box- Behnken para determinar las condiciones físicas de extracción convencional, con ultrasonido, microondas y prensa francesa.....	28
6.3 Preparación de extractos acuosos	30
6.3.1 Extracción convencional.....	30
6.3.2 Extracción con ultrasonido	30
6.3.3 Extracción con microondas	30
6.4 Obtención de extractos acuosos con prensa francesa por medio de un diseño de experimentos compuesto centrado	31
6.5 Preparación de extractos acuosos	31
6.5.1 Extracción con prensa francesa	31
6.6 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	32
6.7 Determinación de actividad antioxidante.....	32
6.7.1 Método del radical DPPH•	32

6.7.2 Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP).....	33
6.8 Bioaccesibilidad.....	34
6.9 Análisis de resultados.....	35
7 Resultados y discusión	37
7.1 Resultados del diseño de experimentos Box-Behnken de la actividad antioxidante y fenoles totales de extractos acuosos de ajeno y aranthó obtenidos a partir de diferentes métodos de extracción	37
7.1.1 Extracción convencional de ajeno	37
7.1.1.1 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de la extracción convencional de ajeno	37
7.1.1.2. Efecto de las condiciones de extracción sobre la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes de ajeno a partir de extracción convencional	40
7.1.1.3 Optimización de las condiciones de extracción convencional de ajeno y validación del modelo	44
7.1.1.4 Correlación entre fenoles totales y la actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP de la extracción convencional de ajeno	45
7.1.2 Extracción convencional de aranthó.....	47
7.1.2.1 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de la extracción convencional de aranthó.....	47
7.1.2.2 Efecto de las condiciones de extracción sobre la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes de aranthó a partir de extracción convencional	49
7.1.2.3 Optimización de las condiciones de extracción convencional de aranthó y validación del modelo	52
7.1.2.4 Correlación entre fenoles totales y la actividad antioxidante medida por	

DPPH• y FRAP de la extracción convencional de aranthó.....	53
7.1.3 Extracción de ajeno con ultrasonido	54
7.1.3.1 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de extractos ultrasonificados de ajeno.....	54
7.1.3.2 Efecto de las condiciones de extracción sobre la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes de ajeno a partir de extracción con ultrasonido.....	56
7.1.3.3 Optimización de las condiciones de extracción de ajeno con ultrasonido y validación del modelo	60
7.1.3.4 Correlación entre fenoles totales y actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP de extractos ultrasonificados de ajeno.....	61
7.1.4 Extracción de aranthó con ultrasonido	62
7.1.4.1 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de extractos ultrasonificados de aranthó	62
7.1.4.2 Efecto de las condiciones de extracción sobre la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes de aranthó a partir de extracción con ultrasonido.....	64
7.1.4.3 Optimización de las condiciones de extracción de aranthó con ultrasonido y validación del modelo	68
7.1.4.4 Correlación entre fenoles totales y actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP de extractos ultrasonificados de aranthó.....	69
7.1.5 Extracción de ajeno con microondas.....	70
7.1.5.1 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de la extracción de ajeno con microondas	70
7.1.5.2 Efecto de las condiciones de extracción sobre la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes de ajeno a partir de extracción con microondas.....	72

7.1.5.3 Optimización de las condiciones de extracción de ajeno con microondas y validación del modelo	76
7.1.5.4 Correlación entre fenoles totales y la actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP de la extracción con microondas de ajeno	77
7.1.6 Extracción de aranthó con microondas	78
7.1.6.1 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de la extracción de aranthó con microondas	78
7.1.6.2 Efecto de las condiciones de extracción sobre la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes de aranthó a partir de extracción con microondas.....	79
7.1.6.3 Optimización de las condiciones de extracción de aranthó con microondas y validación del modelo	83
7.1.6.4 Correlación entre fenoles totales y la actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP de la extracción de aranthó con microondas	84
7.2 Obtención de extractos acuosos de ajeno y aranthó por medio de un diseño de experimentos compuesto centrado.....	85
7.2.1 Extracción de ajeno con prensa francesa.....	85
7.2.1.1 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de la extracción de ajeno con prensa francesa	85
7.2.1.2 Efecto de las condiciones de extracción sobre la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes de ajeno a partir de extracción con prensa francesa	87
7.2.1.3 Optimización de las condiciones de extracción con prensa francesa de ajeno y validación del modelo.....	89
7.2.1.4 Correlación entre la actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP y fenoles totales	89
7.2.2 Extracción de aranthó con prensa francesa	90

7.2.2.1 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de la extracción de aranthó con prensa francesa	90
7.2.2.2 Efecto de las condiciones de extracción sobre la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes de aranthó a partir de extracción con prensa francesa.....	91
7.2.2.3 Optimización de las condiciones de extracción de aranthó con prensa francesa y validación del modelo	93
7.2.2.4 Correlación entre fenoles totales y la actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP y de la extracción de aranthó con prensa francesa	94
7.3 Comparación de los métodos de extracción	95
7.3.1. Comparación de los métodos de extracción de ajeno	96
7.3.2 Comparación de los métodos de extracción de aranthó	98
7.4 Bioaccesibilidad intestinal in vitro.....	100
8. Conclusiones	106
9 Referencias.....	107
10 Anexos	131
Anexo A.....	131
Anexo B.....	132

ÍNDICE DE FÍGURAS

Figura 1. <i>Artemisia absinthium</i>	10
Figura 2. <i>Decatropis bicolor</i>	13
Figura 3. Baño de ultrasonido	18
Figura 4. Horno de microondas casero	19
Figura 5. Prensa francesa	20
Figura 6. Diseño metodológico.....	27
Figura 7. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre el contenido de fenoles totales, obtenido por extracción convencional de ajeno.....	42
Figura 8. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por DPPH•, obtenida por extracción convencional de ajeno.....	43
Figura 9. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por FRAP, obtenida por extracción convencional de ajeno.....	44
Figura 10. Correlación entre fenoles totales vs a) DPPH• y b) FRAP de la extracción convencional de ajeno.....	46
Figura 11. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre el contenido de fenoles totales, obtenido por extracción convencional de aranthó	50
Figura 12. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por DPPH•, obtenida por extracción convencional de aranthó	51
Figura 13. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por FRAP, obtenida por extracción convencional de aranthó	52
Figura 14. Correlación entre fenoles totales vs a) DPPH• y b) FRAP de la extracción convencional de aranthó	54

Figura 15. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre el contenido de fenoles totales, obtenido de la extracción de ajeno con ultrasonido	58
Figura 16. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por DPPH•, obtenida de la extracción de ajeno con ultrasonido	59
Figura 17. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por FRAP, obtenida de la extracción de ajeno con ultrasonido	60
Figura 18. Correlación entre fenoles totales vs a) DPPH• y b) FRAP de la extracción de ajeno con ultrasonido	62
Figura 19. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre el contenido de fenoles totales, obtenido de la extracción de aranthó con ultrasonido.....	66
Figura 20. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por DPPH•, obtenida de la extracción de aranthó con ultrasonido.....	67
Figura 21. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por FRAP, obtenida de la extracción de aranthó con ultrasonido.....	68
Figura 22. Correlación entre fenoles totales vs a) DPPH• y b) FRAP de la extracción de aranthó con ultrasonido.....	70
Figura 23. Gráficos de contorno del efecto de a) Potencia*Tiempo, b) Potencia*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre el contenido de fenoles totales, obtenido de la extracción de ajeno con microondas.....	74
Figura 24. Gráficos de contorno del efecto de a) Potencia*Tiempo, b) Potencia*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por DPPH•, obtenida de la extracción de ajeno con microondas	75
Figura 25. Gráficos de contorno del efecto de a) Potencia*Tiempo, b) Potencia*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por FRAP,	

obtenida de la extracción de ajeno con microondas	76
Figura 26. Correlación entre fenoles totales vs a) DPPH• y b) FRAP de la extracción de ajeno con microondas	78
Figura 27. Gráficos de contorno del efecto de a) Potencia*Tiempo, b) Potencia*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre el contenido de fenoles totales, obtenido de la extracción de aranthó con microondas	81
Figura 28. Gráficos de contorno del efecto de a) Potencia*Tiempo, b) Potencia*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por DPPH•, obtenida de la extracción de aranthó con microondas.....	82
Figura 29. Gráficos de contorno del efecto de a) Potencia*Tiempo, b) Potencia*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por FRAP, obtenida de la extracción de aranthó con microondas.....	83
Figura 30. Correlación entre fenoles totales vs a) DPPH• y b) FRAP de la extracción de aranthó con microondas.....	85
Figura 31. Gráficos de contorno del efecto de Tiempo*Muestra, sobre el contenido de a) fenoles totales y la actividad antioxidante por a) DPPH• y c) FRAP, obtenida de la extracción de ajeno con prensa francesa	88
Figura 32. Correlación entre fenoles totales vs a) DPPH• y b) FRAP de la extracción de ajeno con prensa francesa	90
Figura 33. Gráficos de contorno del efecto de Tiempo*Muestra, sobre el contenido de a) fenoles totales y la actividad antioxidante por a) DPPH• y c) FRAP, obtenida de la extracción de aranthó con prensa francesa.....	93
Figura 34. Correlación entre fenoles totales vs a) DPPH• y b) FRAP de la extracción de aranthó con prensa francesa.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos utilizados para la evaluación de la actividad antioxidante	22
Tabla 2. Condiciones para la obtención de extractos acuosos	29
Tabla 3. Condiciones utilizadas en el diseño experimental compuesto centrado.....	31
Tabla 4. Valores de fenoles totales y actividad antioxidantes por DPPH•, FRAP en extractos acuosos de ajeno mediante extracción convencional.....	38
Tabla 5. Capacidad antioxidante de muestras de ajeno determinada por fenoles totales y DPPH•, reportada por distintos autores	39
Tabla 6. Polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del diseño de experimentos Box-Behnken para los extractos acuosos de ajeno obtenidos por extracción convencional	40
Tabla 7. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden, para fenoles totales, DPPH• y FRAP de la extracción convencional de ajeno	41
Tabla 8. Valores óptimos predichos y experimentales, de la extracción convencional de ajeno	45
Tabla 9. Valores de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH•, FRAP en extractos acuosos de aranthó mediante extracción convencional	47
Tabla 10 Determinación de la capacidad antioxidante de diversas plantas medicinales realizada por distintos autores	48
Tabla 11. Polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del diseño de experimentos Box-Behnken para los extractos acuosos de aranthó	49
Tabla 12. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden, para fenoles totales, DPPH• y FRAP de la extracción convencional de aranthó	50
Tabla 13. Valores óptimos predichos y experimentales,.....	53
Tabla 14. Valores de fenoles totales y actividad antioxidantes por DPPH•, FRAP	55
Tabla 15. Polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del diseño de experimentos Box-Behnken para la extracción de ajeno con ultrasonido	56
Tabla 16. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden, para	57

Tabla 17. Valores óptimos predichos y experimentales,.....	61
Tabla 18. Valores de fenoles totales y actividad antioxidantes por DPPH•, FRAP	63
Tabla 19. Polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del diseño de experimentos Box-Behnken para los extractos de aranthó ultrasonicados	64
Tabla 20. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden, para	65
Tabla 21. Valores óptimos predichos y experimentales, de la	69
Tabla 22. Valores de fenoles totales y actividad antioxidantes por DPPH•, FRAP	71
Tabla 23. Polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del diseño de experimentos Box-Behnken para la extracción de ajeno con microondas	72
Tabla 24. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden, para	73
Tabla 25. Valores óptimos predichos y experimentales,.....	77
Tabla 26. Valores de fenoles totales y actividad antioxidantes por DPPH•, FRAP	79
Tabla 27. Polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del diseño de experimentos	80
Tabla 28. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden, para	80
Tabla 29. Valores óptimos predichos y experimentales, de la extracción de aranthó con	84
Tabla 30. Valores de fenoles totales y actividad antioxidantes por DPPH•, FRAP	86
Tabla 31. Polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del diseño de experimentos Box-Behnken para la extracción de ajeno con prensa francesa	87
Tabla 32. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden, para	88
Tabla 33. Valores óptimos predichos y experimentales, de la extracción de ajeno con	89
Tabla 34. Valores de fenoles totales y actividad antioxidantes por DPPH•, FRAP	91
Tabla 35. Polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del diseño de experimentos compuesto centrado para la extracción de aranthó con prensa francesa	

.....	92
Tabla 36. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden, para	
.....	92
Tabla 37. Valores óptimos predichos y experimentales, de la extracción	94
Tabla 38. Condiciones óptimas de extracción	96
Tabla 39. Fenoles totales y actividad antioxidante de extractos de ajeno con los	
métodos de extracción optimizados	96
Tabla 40. Comparación de fenoles totales y actividad antioxidante de extractos de	
aranthó utilizando distintos métodos de extracción.	98
Tabla 41. Comparación de fenoles totales y capacidad antioxidante de extractos de	
ajeno antes y después del proceso de digestión <i>in vitro</i> y porcentaje de fracción	
dializada (%FD)	101
Tabla 42. Comparación de fenoles totales y capacidad antioxidante de extractos de	
aranthó antes y después del proceso de digestión <i>in vitro</i> y porcentaje de fracción	
dializada (%FD)	101

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- ABTS•+ Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico
- AG Ácido gálico
- BHA 2-ter-butyl-hidroxianisol
- BHT 2-ter-butyl-hidroxitolueno
- DBB Diseño Box-Behnken
- DCC Diseño Compuesto Centrado
- DPPH• 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- FRAP Poder antioxidante reductor del hierro
- TBHQ ter-butylhidroquinona
- TPTZ 4,6-tripiridil-s-triazina

1 Resumen

Un importante producto de extracción natural que se utiliza en la vida cotidiana, pero tal vez no se considere normalmente como un extracto solvente: son los extractos de plantas o mejor conocidos como tés. El consumo de un extracto acuoso de plantas secas en agua caliente es mundial y se remonta durante siglos al Lejano Oriente. Estos también se basan en la extracción simple de componentes solubles en agua de materiales vegetales para hacer bebidas, siendo el consumo de plantas o extractos de ellas lo que proporcionaba curas para toda una gama de dolencias. Aunado a esto en los últimos años ha aumentado el interés en la investigación de compuestos antioxidantes naturales, provenientes de plantas que podrían aplicarse tanto en la industria alimentaria como en el área de salud humana, por lo cual una efectiva extracción de estos compuestos es requerida.

Un factor importante que influye en la actividad antioxidante de los diferentes compuestos presentes tanto en plantas como en frutos, es el método de extracción; el cual puede modificar su estructura química y afectar su actividad biológica. Diversos estudios revelan que factores como la temperatura, el tiempo, tamaño de muestra, así como el método de extracción, influyen sobre la eficiencia de la extracción en términos de calidad y rendimiento del producto a obtener, pudiendo ocasionar la pérdida de compuestos antioxidantes, disminuyendo su capacidad antioxidante.

Por lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo, evaluar el efecto de cuatro diferentes métodos de extracción (convencional, ultrasonido, microondas y prensa francesa) a través de la aplicación de diseños de experimentos (DBB y DCC), para así conocer las mejores condiciones físicas de liberación de compuestos antioxidantes de ajeno (*Artemisia absinthium*) y aranthó (*Decatropis bicolor*), y elegir el método de extracción con mayor liberación de compuestos. Se evaluó el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante fue evaluada por los métodos de DPPH•, FRAP.

La aplicación de los diseños de experimentos Box-Behnken y compuesto centrado, permitieron identificar las condiciones físicas de extracción de compuestos antioxidantes en los diferentes métodos evaluados (convencional, ultrasonido, microondas y prensa francés) para ajeno y aranthó. De los factores físicos analizados, la concentración de muestra fue identificada como un factor determinante en la extracción de compuestos con actividad antioxidante, principalmente de tipo fenólico ya influyó a $p < 0.05$ en todas las extracciones.

La extracción con prensa francesa generó los extractos acuosos con mayor cantidad de compuestos antioxidantes, principalmente de tipo fenólicos, en ambas especies de plantas. Finalmente, a pesar de la alta actividad antioxidante mostrada por los extractos de ajeno y aranthó obtenidos por extracción convencional, con ultrasonido, microondas y prensa francesa la bioaccesibilidad analizada mediante pruebas *in vitro* fue limitada.

Palabras clave: Extracción, Convencional, Ultrasonido, Microondas, Prensa francesa Antioxidantes, *Artemisia absinthium*, *Decatropis bicolor*

Abstract

An important product of natural extraction that is used in everyday life, but perhaps not normally considered as a solvent extract: are the plant extracts or better known as teas. The consumption of an aqueous extract of dried plants in hot water is worldwide and goes back to the Far East for centuries. These are also based on the simple extraction of water-soluble components from plant materials to make beverages, with the consumption of plants or extracts of them providing cures for a range of ailments. Added to this in recent years has increased interest in the research of natural antioxidant compounds, from plants that could be applied both in the food industry and in the area of human health, so an effective extraction of these compounds is required.

An important factor that influences the antioxidant activity of the different compounds present in both plants and fruits, is the extraction method; which can modify its chemical structure and affect its biological activity. Various studies reveal that factors such as temperature, time, sample size, as well as the extraction method, influence the extraction efficiency in terms of quality and yield of the product to be obtained, which can cause the loss of antioxidant compounds, decreasing its antioxidant capacity.

Therefore, this work aimed to evaluate the effect of four different extraction methods (conventional, ultrasound, microwave and French press) through the application of experimental designs (DBB and DCC), in order to know the best conditions of the release of antioxidant compounds of absinthe (*Artemisia absinthium*) and aranthó (*Decatropis bicolor*), and choose the method of extraction with greater release of compounds. The content of total phenols was evaluated by the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant activity was evaluated by the methods of DPPH •, FRAP.

The application of the Box-Behnken and centered compound design experiments allowed to identify the physical conditions of extraction of antioxidant compounds in the different methods evaluated (conventional, ultrasound, microwave and French press)

for wormwood and aranthó. Of the physical factors analyzed, the sample concentration was identified as a determining factor in the extraction of compounds with antioxidant activity, mainly of phenolic type, and it influenced $p < 0.05$ in all extractions.

The extraction with French press generated the aqueous extracts with greater amount of antioxidant compounds, mainly of phenolic type, in both species of plants. Finally, despite the high antioxidant activity shown by extracts of wormwood and aranthó obtained by conventional extraction, with ultrasound, microwave and French press the bioavailability analyzed by in vitro tests was limited.

Key words: Extraction, Conventional, Ultrasound, Microwaves, French Press Antioxidants, *Artemisia absinthium*, *Decatropis bicolor*

2 Marco teórico

2.1 Radicales libres

Los 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 moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena (Avello y Suwalsky, 2006; Sánchez y Méndez, 2013).

Debido a que estas especies reactivas no poseen receptores específicos, tienen una capacidad de agresión indiscriminada sobre células y tejidos vivos. En condiciones fisiológicas normales, el organismo neutraliza los radicales libres a través de varios mecanismos antioxidantes que involucran la producción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y otras, para prevenir el daño oxidante. Sin embargo, cuando la capacidad de control de las sustancias oxidantes es superada, se establece una situación conocida como estrés oxidativo (Maldonado, Jiménez, Guapillo, Ceballo, Méndez, 2010).

Muchas enfermedades crónicas se inician por procesos de estrés oxidativo mediados por radicales libres. El estrés oxidativo conduce progresivamente a una disfunción celular que acaba con la muerte de dichas células. Este estrés se podría definir como un desbalance en la producción de especies reactivas del oxígeno y la defensa antioxidante, el cual lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales permitirán el deterioro y muerte celular; proceso que debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante (Mamani y Mejía, 2018; Sánchez y Méndez, 2013; Tomás y Espín, 2009).

2.2 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que están presentes en los organismos en muy bajas concentraciones y entre sus funciones están las de retardar, controlar o prevenir el inicio e incremento de enfermedades degenerativas (Shahidi y Zhong, 2015). Estos compuestos o sistemas pueden interactuar de forma segura con los radicales libres y terminar la reacción en cadena antes de que las moléculas vitales resulten dañadas, mediante la inhibición de la iniciación o propagación de reacciones en la cadena oxidante (Oroian y Escriche, 2015; Velioglu, Mazza, Gao y Oomah, 1998).

Las funciones antioxidantes implican disminución del estrés oxidativo, mutaciones del ADN, transformaciones malignas, prevención y tratamiento de los trastornos relacionados con los radicales libres, así como otros parámetros de daño celular (Djeridane *et al.*, 2006; Pisoschi y Pop, 2015).

Existen dos categorías de antioxidantes, sintéticos y naturales (Velioglu *et al.*, 1998), los primeros se han utilizado como aditivos en alimentos, suplementos y drogas. Sin embargo, los antioxidantes naturales son más potentes, eficientes y seguros (Maslarova-Yanishlieva, 2001), estos últimos resultan de interés para este estudio.

2.3 Antioxidantes naturales y su efecto en la salud

Son sustancias que se encuentran en plantas, microorganismos, hongos y tejidos animales. La mayoría de los antioxidantes naturales son compuestos de tipo fenólico. Se encuentran en casi todas las partes de las plantas, ya que las protegen contra lesiones del tejido, oxidándose y combinándose con otros componentes, así como contribuyendo a la defensa del envejecimiento celular (Horubala, 1999; Podsedek, 2007).

Los antioxidantes son potenciadores de la salud y su utilización supone entre otras cosas la prevención de enfermedades crónicas y no transmisibles como algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares entre otras, de ahí la importancia del consumo de alimentos con un alto contenido de sustancias antioxidantes como las frutas y vegetales (Bojórquez *et al.*, 2013).

En el caso de la diabetes, los posibles mecanismos de los antioxidantes se relacionan con la inhibición en el intestino de la digestión de los carbohidratos, en particular la glucosa, de la cual también se modula su liberación por el hígado. Podrían también estimular la secreción de insulina en el páncreas y activar los receptores de la misma y de alguna manera activar la recaptura de glucosa en los tejidos blanco para la hormona (Reyes *et al.*, 2011). Siendo de gran importancia cuantificar la proporción de los antioxidantes ingeridos que están disponibles para su uso en el sistema biológico, a lo cual se le conoce como “bioaccesibilidad” y se refiere específicamente a la cantidad de antioxidantes que se liberan de la matriz alimentaria y se presentan en el borde del cepillo intestinal para el transporte a la célula, lo que hace posible tales beneficios a la salud (Garret, Failla y Sarama, 1999).

Respecto del cáncer, cada vez aumenta la evidencia de que el riesgo de esta enfermedad, asociada con los genotipos humanos relacionados al estrés oxidativo, pueden modificarse con el consumo de flavonoides los cuales han demostrado poseer efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos, participando en el bloqueo o supresión de diversos procesos (Mayor, 2010).

De igual manera se ha estudiado el efecto de los antioxidantes durante el ejercicio físico, ya que es posible que durante el sobreentrenamiento se genere una producción de radicales libres, que conduzcan a un estado de estrés oxidativo, lo que algunos estudios indican que al incluir en la dieta de atletas entrenados alimentos ricos en antioxidantes, redujo el estrés oxidativo. Además, la producción de ácido láctico durante el ejercicio puede convertir el superóxido (radical poco dañino) a un hidroxilo,

altamente lesivo para la célula. Por lo tanto, como apoyo, siempre deben recomendarse antioxidantes dietarios durante el entrenamiento físico (Clarkson *et al.*, 2000; Fernández, Da Silva-Grigoletto y Túnez-Fiñana, 2009; González y García, 2012).

Existen algunos estudios que apoyan los beneficios para la salud, del consumo de alimentos de origen vegetal como las plantas medicinales, en la prevención de enfermedades relacionadas con procesos oxidativos (Pabón, Rodríguez y Hernández, 2017; Peuchant *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 1990).

2.4 Plantas Medicinales

Las plantas medicinales han sido utilizadas por miles de años debido a su gran importancia para la salud de las personas (Balunas y Kinghorn, 2005; Edeoga, Okwu y Mbaebie, 2005). Se definen como aquellas especies a las que se les atribuye un efecto curativo sobre las enfermedades (Fuentes, Villavicencio y Pérez, 2013).

Recientemente ha surgido el interés por el potencial terapéutico de algunas plantas medicinales como antioxidantes en la reducción de los radicales libres que provocan la lesión de los tejidos (Edeoga *et al.*, 2005; Pourmorad, Hosseinimehr y Shahabimajd, 2006). Su valor medicinal se debe principalmente a que contienen metabolitos o compuestos secundarios, los cuales ejercen sus efectos una vez que han sido ingeridos o aplicados los contenidos en infusiones, cataplasmas y otras preparaciones produciendo una acción fisiológica sobre el cuerpo humano (Cortés, 2005; Pourmorad *et al.*, 2006).

Diversos estudios sugieren que la acción biológica de estos metabolitos está relacionada con su actividad antioxidante, Estos compuestos se agrupan en compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, lignanos, quinonas, estilbenos, fitoestrógenos) nitrogenados (alcaloides, aminas, bataalaínas), vitaminas,

terpenos (carotenoides) y algunos otros metabolitos endógenos (Cai, Luo, Sun, y Corke, 2004; Edeoga *et al.*, 2005).

Algunas plantas y sus componentes han sido usados en la medicina de los pueblos en diversas partes alrededor del mundo para la cura de varias enfermedades del tracto digestivo, respiratorias y de la piel (Yasunaka *et al.*, 2005). La Organización Mundial de la salud (OMS) a lo largo de muchos años ha intentado identificar todas las plantas que existen en el mundo, existiendo más de 250,000 especies de plantas, de las cuales entre 35,000 a 70,000 han sido utilizadas en algunas culturas con propósitos medicinales (Farnsworth y Soejarto, 1991).

La gran variedad vegetal y la amplia riqueza cultural de México han favorecido el aprovechamiento de las plantas con fines medicinales desde épocas prehispánicas, las cuales son un elemento importante en el sistema medicinal de México (García *et al.*, 2012a; Heinrich, Ankli, Frei, Waimann y Sticher, 1998). Se estima que alrededor de 3,103 especies de plantas son usadas para la medicina tradicional mexicana, la cual ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas (Heinrich *et al.*, 1998; Yasunaka *et al.*, 2005).

En el estado de Hidalgo se han reportado más de 3,239 especies de plantas, de las cuales cerca de 850 se utilizan con propósitos medicinales. A la fecha se ha documentado el uso medicinal de aproximadamente 500 de ellas, entre las que destacan el ajeno y el aranthó (Fuentes *et al.*, 2013).

2.5 Ajenjo (*Artemisia absinthium*)

2.5.1 Descripción botánica

Artemisia absinthium (Figura 1), es comúnmente conocida como ajeno en México y en otras partes del mundo (Msaada *et al.*, 2005; Tariq, Chishti, Ahmad y Shawl, 2009). Pertenece al género *Artemisia*, el cual es uno de los más grandes miembros de la familia Compositae (Asteraceae), subfamilia *Asteroideae*, y comprende alrededor de 800 especies distribuidas en todo el mundo (González *et al.*, 2012; Juteau *et al.*, 2003; Singh, Kumar y Sigh 2012).



Figura 1. *Artemisia absinthium*

Es una planta herbácea aromática y amarga de 50 cm a 1.30 m de altura. Las hojas son blancas a gris-verde, las flores amarillentas y los frutos son secos y comprimidos (Argueta y Gallardo, 1994; Escamilla y Moreno, 2015). Tiene ramas blancas, tallo erecto y ramificado, sus hojas tienen un tamaño de 7,5 cm de largo por 3,8 cm de ancho, haz y envés densamente cubiertos por un vello blanquecino. Las cabezuelas florales, pequeñas y semiglobosas, se disponen en una espiga erecta y foliosa, de un color verdoso-amarillo. El fruto es un aquenio muy pequeño (Derwich, Benziane y Boukir, 2009; Julio *et al.*, 2015).

2.5.2 Origen y distribución

El ajenjo es nativo de Europa, África y México; sin embargo, ahora crece por diversas regiones del mundo como Norteamérica y Asia (CONAFOR, 2010; Singh y Sharma, 2011). En México crece en los estados de Veracruz, Puebla, Chiapas, Tabasco, Michoacán, Sinaloa, Chihuahua, Oaxaca e Hidalgo. En Hidalgo crece en los municipios de Epazoyucan, Huasca de Ocampo, Mineral del Chico, Mineral de la Reforma, Mineral del Monte, Omitlán de Juárez (Aguilar, Camacho, Chino y López, 1994; Villavicencio, Pérez y Ramírez, 1998).

Florece entre verano y otoño, dando lugar a un fruto en aquenio unilocular monospermo. En condiciones silvestres la especie se desarrolla en medios secos y áridos, sin embargo, su posible cultivo se reduce a zonas de regadío ya que, si bien se la puede considerar como poco exigente en cuanto a recursos hídricos, los riegos durante el verano aumentan notablemente los rendimientos de la cosecha. En cualquier caso, precisa una pluviometría superior a los 400 mm/año. En lo que respecta a la altitud, el ajenjo crece espontáneamente a partir de altitudes en torno a los 600 m, pudiendo hallarse hasta 2.300 metros sobre el nivel del mar (Llorens, Castel y Pascual, 2008).

2.5.3 Usos en la medicina tradicional

El ajenjo siempre ha sido de gran interés botánico y farmacéutico, se emplea en la medicina popular debido a sus propiedades relacionadas con actividad antihelmíntica, antimicótica, antimicrobiana, antiséptica, antiespasmódica, anticancerígena y de estimulación cardiaca (Mahmoudi, Ebrahimzadeh, Ansaroudi y Nabavi, 2009; Singh y Sharma, 2011; Tariq *et al.*, 2009).

Sus hojas se usan como antipirético, en conjuntivitis y mordedura de serpiente, el tallo es usado contra la infertilidad femenina, se usa como analgésico dental,

hipocolesterolémico, en dismenorrea, cólicos menstruales, antidiabético, en paludismo, tifoidea y úlceras estomacales. Finalmente, la raíz es usada contra la infertilidad femenina, en las hemorragias postmestruales, como cardiotónico, antianémico, antiinflamatorio, tónico cerebral y en el tratamiento del reumatismo (Castillo, Martínez, Mendocilla y Villar, 2016; Llorans *et al.*, 2008).

Los extractos acuosos y aceites esenciales de ajeno han demostrado poseer una fuerte actividad antiradical y antioxidante *in vitro*, actividad antiparasitaria y antiinflamatoria en modelos animales, así como antibacterial contra patógenos humanos comunes (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Pseudomonas aeruginosa*) (Amat, Upur y Blazekovic, 2010; Berechet, Stelescu y Craiciun, 2015; Singh y Shama, 2011).

2.5.4 Composición química del ajeno

Mediante estudios químicos se ha encontrado que *A. absinthium* contiene aceites esenciales, lactonas sesquiterpénicas de tipo guayanólido como: absintina, artabsina, matricina y anabsintina (principios amargos); resinas, ácidos orgánicos, poliacetilenos, lignanos, oligosacáridos, beta- bisabolol, beta-curcumeno, espatulenol, felandreno. Incluso contiene flavonoides como quercentina, rutina, patuletina y ácidos fenólicos como ácido cumarico, clorogénico, siríngico y vanílico (Berechet *et al.*, 2015; Singh y Shama, 2011).

En las infusiones de ajeno se han identificado también dos cumarinas con actividad alelopática: escopoletina y umbelliferona, así como diferentes aminoácidos. También es muy evidente la presencia de saponinas por la formación de espuma permanente cuando se agitan sus extractos acuosos (Llorens *et al.*, 2008).

Así mismo, entre los mayores componentes reportados en sus ácidos esenciales se encuentran: alfapineno, sabineno, mirceno, alfa-felandreno, 1,8-cinazol, para-cimeno,

alfa-tujona, beta-tujona, acetato de transsabinilo, cis-epoxiocimeno, acetato de crisantenilo, linalol, 1,8-cineol, cariofileno, acetato de sabinilo y alfa-terpineol (Berechet *et al.*, 2015; Julio *et al.*, 2015).

2.6 Aranthó (*Decatropis bicolor*)

2.6.1 Descripción botánica

Decatropis bicolor (Figura 2), es una planta conocida comúnmente como aranthó (Villavicencio, 1990; Estanislao, Aquino, Pérez, San Martín y Morales, 2016), pertenece al género *Decatropis* y a la familia Rutaceae (CONABIO, 2016), la cual comprende 161 géneros y 1813 especies alrededor del mundo (Estanislao *et al.*, 2016).



Figura 2. *Decatropis bicolor*

Es un arbusto de entre 2 a 7 metros de alto (Domínguez, Butruile y Wapinsky, 1971; García, Ramírez, Parra, Velázquez y Martínez, 2000), con pequeñas flores blancas en largas panículas terminales compuestas por 5 a 10 folíolos elípticos a lanceolados, verdes en la parte superior y café-amarillentos en la inferior (Villavicencio y Pérez, 2002; Estanislao *et al.*, 2016); corola dialipétala; androceo de 10 estambre o más; ovario pentalocular y fruto capsular, de 3 a 5 carpelos (Callejas, 2006). Florece de febrero a abril (Villavicencio y Pérez, 2002).

2.6.2 Origen y distribución

D. bicolor se encuentra distribuido en bosques mesófilos y tropical perennifolio de México y Centroamérica (Estanislao *et al.*, 2016). En México se encuentra en los estados de Chiapas, Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz (CONABIO, 2016). En cuanto a Hidalgo, se encuentra principalmente en las regiones de San Salvador, Actopan, Ixmiquilpan, Tepehuacán, Tulancingo, Huazalingo, Huejutla, Yahualica, Huehuetla, San Bartolo Tutotepec, Tlanchinol y Tenango (Villavicencio y Pérez, 2002; Sánchez, Álvarez y López, 2016).

2.6.3 Usos en la medicina tradicional

En la medicina tradicional mexicana las diversas partes de *D. bicolor*, son utilizadas para tratar las infecciones bacterianas (García *et al.*, 2000; Ríos *et al.*, 2011); para curar dolencias como dolor de espalda, dolor de cabeza, resfriado, cálculos en vesícula, diarreas, afecciones renales, y cáncer (Villavicencio, 1990; Cortés, 2005; Estanislao *et al.*, 2016). Asimismo, la planta ha sido utilizada para tratar enfermedades inflamatorias y oxidativas. En comunidades como El Cardonal, en el estado de Hidalgo, las hojas, son utilizadas para preparar infusiones como tratamiento del cáncer de seno (Estanislao *et al.*, 2016).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que los extractos de esta planta inhiben ligeramente el desarrollo de *Aspergillus flavus* (Cárdenas, Pérez, Zavala Aguirre y Pérez, 2005) y de *Bacillus subtilis* (Villavicencio, 1990).

2.6.4 Composición química del aranthó

Diversos estudios fitoquímicos realizados en *D. bicolor*, han demostrado la presencia de esteroides, cumarinas (Cárdenas *et al.*, 2005), flavonoides y triterpenos (Cortés, 2005). El primer análisis fotoquímico realizado en *D. bicolor*, reportó la presencia del

alcaloide eskimmianina y la cumarina, dictamina, los cuales son compuestos frecuentemente aislados de la familia Rutaceae (Domínguez *et al.*, 1971).

En estudios posteriores realizados por García *et al.*, (2000) y García, González, Márquez y Martínez (2003) en extractos orgánicos en diclorometano y metanol se identificaron las cumarinas felopterina, isopimpinelinam heraclenin, seselin, psoralen, impertor y heraclenol, así como al triterpeno lupeol. La evaluación *in vitro* de dichos compuestos permitió establecer que la seselina y heraclenol son los principales responsables del efecto antiinflamatorio de dicha planta. Así mismo se encontró que seselin es un potente agente antifúngico durante el almacenamiento del maíz (Kovač, Kovač, Strelec, Nevistić y Molna, 2017).

Estanislao *et al.*, en el 2006, identificaron los compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas frescas, y encontraron 23 compuestos los cuales fueron separados en 7 clases, hidrocarburos, terpenos, alcoholes, ácidos carboxílicos, aldehídos, derivados del benceno y otros compuestos. Los componentes con mayor abundancia del aceite esencial fueron 1,5-ciclooctadieno, 3-(metil-2) propenil, β -terpineol, 1-(3-metil-ciclopent-2-enil)-ciclohexeno, 2-heptanol, y limoneno. Tales compuestos fueron identificados a partir de una extracción sólido-líquido.

2.7 Métodos de extracción de liberación de antioxidantes

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, Tramelli y De Faveri, 2007). Algunas de los métodos más utilizados se describen a continuación.

2.7.1 Extracción sólido-líquido o convencional

La extracción sólido-líquido se refiere a la extracción de uno o varios componentes

solubles de un sólido mediante el contacto de éste con un solvente líquido selectivo. Es muy utilizada en la separación de compuestos antioxidantes a partir de residuos sólidos, los cuales requieren ser extraídos con disolventes convencionales y posteriormente eliminar el disolvente para obtener un extracto concentrado. Los disolventes más habituales son: hexano, agua, etanol y metanol (Conde, 2009).

La extracción convencional se realiza cuando el solvente está a una temperatura cercana a su punto de ebullición. Es muy usada para extraer sustancias inorgánicas, solubles, de minerales sólidos. También muchas sustancias orgánicas son obtenidas de su estado natural mediante extracción, como se hace con el azúcar, contenido en la remolacha o el café o el té. En la industria farmacéutica, este tipo de extracción es muy usada para obtener compuestos con actividad antioxidante de las raíces y hojas de las plantas (Patiño, 2000).

2.7.2 Extracción con ultrasonido

La extracción con ultrasonido es una técnica ampliamente extendida, que se ha usado recientemente para la extracción de compuestos antioxidantes en manzanas, uvas, moras, semillas de chía, chícharo, mango (Aybastier, Isik, Sahin y Demir, 2013; Corona, Martínez, Ruiz y Carranza, 2016; Dua, Jiang, Shi, Duan y Wu, 2016; Jakobek, Boc y Barron, 2015; Nguyen, Phan y Le, 2014). En plantas como belladona (*Atropa belladonna*), ajenjo (*Artemisia absinthium*), Calendula (*Calendula officinalis*) y menta (*Mentha piperita*) (Sahin, Aybastier, Isik, 2013; Vinatoru, 2001).

Se basa en el fenómeno de la cavitación dado por la formación, crecimiento y colapso de burbujas de vapor o gas debido a la acción del campo ultrasonoro dentro de un líquido. El tiempo de vida de la burbuja es del orden de los microsegundos, su implosión violenta genera, de manera localizada y transitoria, elevadas temperaturas (5000 oC) en el interior de la burbuja, presiones (100 MPa) y la formación de especies muy reactivas tales como los radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$), hidroxiperoxilo ($\bullet\text{OOH}$) y el

peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La extracción asistida por US utiliza ondas de una frecuencia determinada que facilitan la extracción de los compuestos bioactivos 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 solvente (Vinaotu, 2001; Gao y Liu, 2005; Rodríguez, 2014).

Los fenómenos físicos que afectan la extracción de sustancias, se ven afectados por la sonicación, 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 solvente y a la cavitación producida. El ultrasonido además facilita la rehidratación del tejido si se está utilizando materiales secos, al abrir los poros, lo cual a su vez incrementa el transporte de masa de los constituyentes por difusión y procesos osmóticos (Azuola y Vargas, 2007).

Uno de los dispositivos más empleados en los estudios sobre extracción asistida por US a escala de laboratorio es el baño de ultrasonido (Figura 3) (González, *et al.*, 2010), los cuales originalmente concebidos para propósitos de limpieza, pero son ampliamente usados en las investigaciones sonoquímicas debido a su disponibilidad y bajo costo. Este tipo de reactores posee uno o varios transductores en su parte inferior y un líquido entre el baño y el recipiente de reacción que generalmente es agua. El baño también puede utilizarse como recipiente de reacción y en ese caso se necesita agitación mecánica. Cuando no hay un contacto directo entre los transductores y la mezcla de reacción (sonicación indirecta) la potencia ultrasónica que llega a la mezcla reaccionante es menor si se le compara con los otros sistemas ultrasónicos (Kulkarni y Rathod, 2014).



Figura 3. Baño de ultrasonido

2.7.3 Extracción con microondas

Al igual que la extracción con ultrasonido, la extracción con microondas ha sido empleada para extraer sustancias antioxidantes en una gran cantidad de matrices, tales como moras, uvas, tomate, manzana, cáscara de cacahuete, (Bai, Yue y Zhang, 2010; Ballard, Mallikarjunan, Zhou y O'Keefe, 2010). Así mismo ha tenido una mejor capacidad antioxidante en plantas medicinales como *Eucommia ulmoides*, *Terminalia bellerica*, *Artemisia sphaerocephala*, en comparación con la extracción convencional y el ultrasonido (Wang et al., 2009; Yedhu, Neelesh, Vellingiri y Rajan, 2016; Yedhu y Rajan, 2015).

Consiste en el calentamiento del disolvente en contacto con la muestra. El proceso implica la perturbación de los enlaces por puente de hidrógeno, como resultado de la rotación de dipolos por la radiación en las moléculas y la migración de los componentes; con la consiguiente penetración del solvente en la matriz, y transporte al seno del líquido (León, Osorio y Martínez, 2015; Puerta, 2013; Salomón et al., 2013; Shuntaro, Hiroyuki, Masahiro, Jun-ichi, 2008).

Las microondas, por su naturaleza, son radiaciones electromagnéticas no ionizantes, con una frecuencia que oscila entre los 0.3 y 300 GHz, correspondiente a una longitud de onda de 1 m a 1 mm, que se caracteriza por desplazarse en forma de ondas sinusoidales. (Martínez, Contreras y Belares, 2010; Salomón et al., 2013). En

comparación con los métodos convencionales de calefacción, las microondas generan calor dentro del material sin necesidad de calentar el vaso reactor, así es posible alcanzar con rapidez el punto de ebullición, disminuyendo el tiempo de extracción y el volumen de disolvente (Martínez *et al.*, 2010; Puertas-Mejía, Ríoz-Yepes, Alberto, 2013; Salomón *et al.*, 2013).

Su principal efecto, cuando interactúan con un material receptivo, es de naturaleza térmica lo que causa el calentamiento a partir de la transmisión de la energía al material de forma indirecta (radiación, convección, conducción). Es un proceso rápido, eficiente y relativamente económico (Martínez *et al.*, 2010; Salomón *et al.*, 2013; Puerta, 2013; León *et al.*, 2015).

La tecnología de microondas está siendo utilizada en una gran variedad de operaciones a nivel doméstico e industrial. Actualmente los hornos de microondas domésticos han encontrado importantes aplicaciones en la investigación debido a que generan ondas que pasan a través de los alimentos. El agua, las grasas y otras sustancias polares absorben estas ondas y se calientan mediante un proceso llamado calentamiento dieléctrico. Este efecto de calentamiento puede ser muy útil en un laboratorio de investigación (Araballo, Goñi y Mascheroni, 2017). En la Figura 4 se muestra un horno de microondas casero.



Figura 4. Horno de microondas casero

2.7.4. Extracción con prensa francesa

La prensa francesa es utilizada principalmente para la extracción de café, ya que permite obtener un sabor más auténtico, con más aceites y un cuerpo único, siempre que se lleve un control de tiempo y temperatura adecuado (Illy, 2002; Pérez, *et al.*, 2010). La extracción con prensa francesa trata sobre un vaso cilíndrico estrecho generalmente de cristal, equipado con una tapa y un émbolo de metal o plástico que se ajusta firmemente; consta de un alambre fino o un filtro de malla, el cual separa el soluto en la parte inferior y se va presionando para infundir (Figura 5). El soluto se deposita en el fondo de la prensa, se remueve y la suspensión empujada por el émbolo (manual) se filtra a través de la tela metálica muy tupida para separar la infusión del soluto ya extraído (Amanpour y Selli, 2015; Fálder, 2005; Illy, 2002). Funciona a una presión de 0.5 bar, que le permite extraer más sólidos totales (López *et al.*, 2007).

Se ha visto que el uso de la prensa francesa en la extracción de plantas y café ha demostrado una alta capacidad antioxidante en los extractos obtenidos, por la presencia de compuestos hidrofílicos tanto fenólicos (ácidos mono- y dicafeolquínicos) como no fenólicos (Carew, Sparrow, Curtin, Close y Dambergs, 2005; Illy, 2002; Pérez, *et al.*, 2010).



Figura 5. Prensa francesa

2.8 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Para estimar la cantidad de fenoles se utiliza el método de Folin-Ciocalteu; este método consiste en la reacción entre el reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR) de color amarillo y los grupos fenólicos, lo cual produce un complejo de color azul con máxima absorción a 725 nm; los resultados usualmente se expresan como mg ácido gálico/100 g (Restrepo *et al.*, 2009).

Los compuestos fenólicos solo pueden reaccionar con el FCR en condiciones básicas, donde la disociación del protón fenólico conduce a un anión fenolato, que es capaz de reducir FCR. Por lo tanto, el ensayo usa una reacción de transferencia de electrones. Es simple, reproducible y conveniente, ha sido ampliamente utilizado cuando se estudia antioxidantes fenólicos (McDonald-Wicks, Wood, Garg, 2006).

2.9 Técnicas para evaluar actividad antioxidante

En las décadas recientes se han desarrollado diversos métodos para el análisis de antioxidantes. Estos métodos involucran la evaluación de la actividad antioxidante total y la identificación y cuantificación individual de las diferentes sustancias antioxidantes (Oroian y Escriche, 2015). Los diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar dicha actividad frente a sustancias cromógenas de naturaleza radicalaria; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones realizadas dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Kyskoski *et al.*, 2005).

La evaluación de la actividad antioxidante a través de fuentes generadoras de radicales libres en el sistema de prueba, asume que la oxidación es inhibida en un alto porcentaje por la captura de estos; por tanto, se enfoca en monitorear la capacidad de

aditivos y extractos para la captura de radicales o la inhibición de su formación. Este es el principio de los métodos más modernos de ensayo tales como los ensayos de ABTS•+ (ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenziazolina)-6-sulfónico), DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y ficoeritrinna (Antolovich, Prenzler y Patsalides, 2002). En la Tabla 1, se muestran diferentes métodos utilizados para la evaluación de la actividad antioxidante.

Tabla 1. Métodos utilizados para la evaluación de la actividad antioxidante

Método	Fundamento	Ventajas	Desventajas	Referencia
DPPH•	Se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH•, por antioxidante	<ul style="list-style-type: none"> - El DPPH• es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa - Simplicidad y el bajo requerimiento instrumental - Bajo costo y corto tiempo (20 a 60 minutos) 	<ul style="list-style-type: none"> - Dificultad de interpretar los resultados cuando se tienen sustancias cuyo espectro de absorción se solapa con el del radical - Solo puede disolverse en medio orgánico - Presenta un pico de absorbancia a 515 nm 	(Goupy, Dufour, Loonis y Dangles, 2003; Karadag, Ozcelik y Saner, 2009; Kuskoski, Aduero, Troncoso, Mancini-filho y Fett, 2005; Londoño, 2012; Uribe <i>et al.</i> , 2015; Molyneuz, 2004).
FRAP	Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe ³⁺ a Fe ²⁺ que es menos antioxidante	<ul style="list-style-type: none"> - Es sencillo y fácilmente automatizable. - Es rápido, generalmente la reacción se completa entre 4 y 8 minutos 	<ul style="list-style-type: none"> - Como el potencial de reducción del Fe³⁺ a Fe²⁺ es de 0,77 V, cualquier compuesto con un potencial redox inferior podría reducir al Fe³⁺, sobreestimando el valor de FRAP 	(Benzie y Strain, 1996; Ou, 2002; Karadag <i>et al.</i> , 2009; Kuskoski <i>et al.</i> , 2005; Uribe <i>et al.</i> , 2015)
ABTS•+	Se fundamenta en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado ABTS•+, el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS•+	<ul style="list-style-type: none"> - Puede ser usado en un amplio rango de pH y fuerza iónica - Es soluble tanto en medio acuoso como orgánico y permite la evaluación de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos - Amplio rango de pH - Muy rápido (6 minutos) 	<ul style="list-style-type: none"> - El ABTS•+ debe ser generado previamente, que no es un radical fisiológico y que la cinética de reacción con algunos antioxidantes suele ser bastante lenta y, por lo tanto, el punto final de medición debe fijarse de manera arbitraria 	(Gádor y Almajano, 2017; Karadag <i>et al.</i> , 2009; Londoño, 2012)

3 Problema de investigación

Las crecientes demandas en temas de seguridad con respecto al uso de antioxidantes sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), terbutilhidroxiquinona (TBHQ) y propilgalato (PG), a los que se les ha asociado con una dudosa seguridad, impone la necesidad de buscar nuevas fuentes de antioxidantes derivados de plantas, como alternativas viables y naturales, que a su vez generen un beneficio a la salud, por lo cual una efectiva extracción de estos compuestos es requerida.

Un factor importante que influye en la actividad antioxidante de los diferentes compuestos presentes tanto en plantas como en frutos, es el método de extracción; el cual puede modificar su estructura química y afectar su actividad biológica. Diversos estudios revelan que factores como la temperatura, el tiempo y tamaño de muestra son factores importantes que influyen sobre la eficiencia de la extracción en términos de calidad y rendimiento del producto a obtener, pudiendo ocasionar la pérdida de compuestos antioxidantes.

A pesar de las investigaciones que se han realizado para evaluar el efecto que tienen los diferentes métodos de extracción sobre la actividad antioxidante de plantas, son pocos los estudios dirigidos en evaluar las condiciones físicas de extracción, así como la mejor tecnología extractiva (convencional, ultrasonido, microondas y prensa francesa) para sustancias antioxidantes naturales y más aún enfocadas al aprovechamiento de especies de plantas como el ajeno (*Artemisia absinthium*) y aranthó (*Decatropis bicolor*), utilizando como solvente de extracción agua, por lo cual nace la inquietud de realizar la presente investigación.

4 Justificación

En los últimos años ha aumentado el interés en la investigación de compuestos antioxidantes naturales, provenientes de plantas que podrían aplicarse tanto en la industria alimentaria como en el área de salud humana. Lo anterior a que tales compuestos podrían prevenir las reacciones de oxidación, como principales causas de deterioro de varios productos alimenticios, mejorando su calidad y valor nutricional. Adicionalmente, muchos de estos compuestos han sido reconocidos por sus propiedades medicinales y su impacto beneficioso para la salud.

Aunado a esto es de gran utilidad investigar diferentes métodos de extracción para obtener extractos con la mayor cantidad de polifenoles posibles y elevados valores de actividad antioxidante, que permitan disminuir el uso de solventes orgánicos los que puedan ser un riesgo para la salud, por lo cual se decidió el uso de agua como solvente.

Así mismo la selección de los diferentes métodos de extracción depende de las ventajas y desventajas de los procesos tales como el rendimiento de extracción, complejidad, costo del proceso, tiempo de extracción, temperatura o uso de presión por lo cual se eligieron métodos de bajo costo que a su vez fueran sencillos de usar, como la extracción convencional, por ser la manera tradicional de infundir una planta, por su parte el ultrasonido ha demostrado ser igual o más eficiente en la extracción de compuestos orgánicos polares que otros métodos así como reducir tanto el tiempo de extracción, el uso de temperaturas elevadas y de solventes.

En cuanto al microondas permite ciertas ventajas sobre las técnicas de extracción convencionales, al ser más simple, rápido y económico, además de que aumenta la solubilidad del compuesto de interés, mejorando su extracción. Por último, la prensa francesa al aplicar una pequeña presión sobre el soluto, disminuye el uso de

temperaturas de ebullición y permite extraer más sólidos totales.

Una de las plantas extensamente utilizada e investigada en la mayor parte del mundo, debido a sus beneficios a la salud, es el ajeno (*Artemisia absinthium*), del cual se han identificado diversos compuestos que varían según su lugar de origen. Sus extractos son utilizados en muchas preparaciones herbales gástricos, en suplementos dietarios y en bebidas. Sin embargo, existe poca investigación acerca de la optimización de las condiciones físicas para su extracción con la finalidad de obtener la mayor capacidad antioxidante.

Por otro lado, el aranthó (*Decatropis bicolor*), es una especie que se localiza especialmente en el estado de Hidalgo, donde se usa para el tratamiento del cáncer de mama en varias comunidades. Sin embargo, es una especie poco investigada, especialmente no existe información acerca de su capacidad antioxidante.

La extracción los componentes antioxidantes de ajeno y aranthó podrían ser usadas como suplementos dietarios o aditivos alimenticios, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de cuatro diferentes métodos de extracción (convencional, ultrasonido, microondas y prensa francesa) a través de la aplicación de diseños de experimentos, para así conocer las mejores condiciones físicas de liberación de compuestos antioxidantes de *Artemisia absinthium* y *Decatropis bicolor* y elegir el método de extracción con mayor liberación de compuestos.

5 Objetivos

5.1 General

Evaluar el efecto de diferentes métodos de extracción (convencional, ultrasonido, microondas y prensa francesa) sobre la liberación de compuestos antioxidantes de ajeno (*Artemisia absinthium*) y aranthó (*Decatropis bicolor*).

5.2 Específicos

- Evaluar el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de extractos acuosos de ajeno y aranthó mediante técnicas espectrofotométricas.
- Analizar la influencia de los factores analizados (tiempo, cantidad de muestra, temperatura y potencia) mediante el análisis estadístico de los datos obtenidos para conocer su efecto en la liberación de compuestos antioxidantes presentes en los extractos acuosos de *Artemisia absinthium* y *Decatropis bicolor*.
- Optimizar las condiciones de extracción a través de la aplicación de diseños de experimentos (Box-Behnken y compuesto centrado).
- Establecer la correlación entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante por DPPH• y FRAP, mediante el análisis estadístico de los datos obtenidos para determinar su posible origen fenólico.
- Seleccionar el mejor método de extracción de antioxidantes mediante la comparación de los resultados a partir de la optimización de las condiciones físicas de extracción.
- Evaluar la bioaccesibilidad *in vitro* de los extractos de *Artemisia absinthium* y *Decatropis bicolor*, a partir de los distintos métodos de extracción optimizados.

6. Diseño metodológico

En la Figura 6, se muestra el diseño metodológico a seguir para lograr los objetivos planteados.

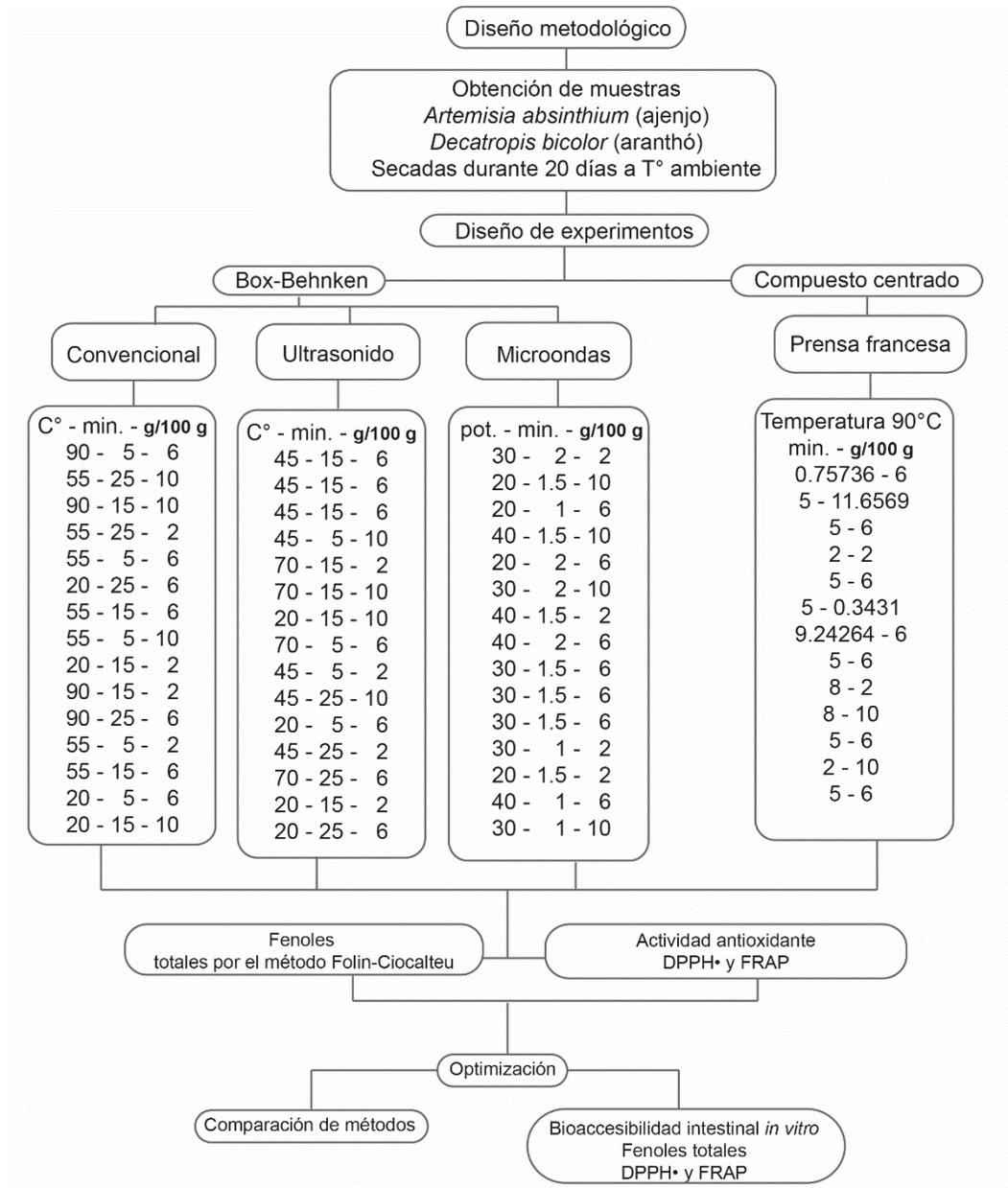


Figura 6. Diseño metodológico

6.1 Obtención de muestras

Las muestras de ajeno y aranthó fueron adquiridas en el mercado 1º de mayo, de la ciudad de Pachuca de Soto, Hidalgo, México. Se secaron al aire libre durante aproximadamente 20 días a temperatura ambiente, se molieron en una licuadora (Oster BLSTEG7881R, México) hasta pulverizarse y se almacenaron en frascos de plástico hasta su uso.

6.2 Obtención de extractos acuosos por medio de un diseño de experimentos Box-Behnken para determinar las condiciones físicas de extracción convencional, con ultrasonido, microondas y prensa francesa.

Para determinar las mejores condiciones de extracción de *Artemisia absinthium* y *Decatropis bicolor* con mayor actividad antioxidante, se realizó un diseño de experimentos Box- Behnken (DBB), de tres variables (temperatura o potencia en el caso del microondas (A), tiempo (B) y concentración de muestra (C)) y 3 puntos centrales. El modelo matemático correspondiente al DBB es el siguiente (Ecuación 1):

$$y = \beta_0 + \sum_{A=1}^k \beta_A x_A + \sum_{A=1}^k \beta_B x_B + \sum_{C=1}^k \beta_C x_C + \sum_{A=1}^k \beta_{AA} x_A^2 + \sum_{B=1}^k \beta_{BB} x_B^2 + \sum_{C=1}^k \beta_{CC} x_C^2 + \sum_{A<B} \beta_{AB} x_A x_B + \sum_{A<C} \beta_{AC} x_A x_C + \sum_{B<C} \beta_{BC} x_B x_C + \varepsilon \quad \text{Ec. 1}$$

donde y hace referencia a la respuesta estudiada. Para este trabajo las respuestas evaluadas fueron el contenido de compuestos fenólicos totales y las capacidades antioxidantes medida por los métodos DPPH• y FRAP. Por otra parte, el término x se refiere a las variables utilizadas en el estudio, el término β_0 es la constante del modelo, mientras que los coeficientes del modelo están representados por los efectos lineales β_A , β_B , β_C , cuadráticos β_{AA} , β_{BB} , β_{CC} y la interacción entre las variables β_{AB} , β_{AC} , y β_{BC} . Finalmente, el término ε representa el error experimental (Box y Behnken, 1960).

Los factores de control y niveles seleccionados en el diseño (Tabla 2) se eligieron

considerando las condiciones normales de preparación de una infusión mediante extracción convencional (Ramírez *et al.*, 2016), con ultrasonido (Reza, Heidarizadi y Benvidi, 2012) y microondas (Routray y Orsat, 2012). Cada variable independiente puede tomar tres posibles valores, codificados como -1, 0 y 1, en función de si se trata del valor mínimo, medio o máximo, respectivamente. Con esta codificación, el diseño indicó la realización de 15 experimentos realizados por triplicado, los resultados de las combinaciones de variables se encuentran en el Anexo A.

Tabla 2. Condiciones para la obtención de extractos acuosos

Extracción convencional		Niveles seleccionados		
Factores de control		-1	0	1
A	Temperatura (°C)	20	55	90
B	Tiempo (min)	5	15	25
C	Muestra (g/100g)	2	6	10
Extracción con ultrasonido		Niveles seleccionados		
Factores de control		-1	0	1
A	Temperatura (°C)	20	45	70
B	Tiempo (min)	5	15	25
C	Muestra (g/100g)	2	6	10
Extracción con microondas		Niveles seleccionados		
Factores de control		-1	0	1
A	Potencia (%)	20	30	40
B	Tiempo (min)	1	1.5	2
C	Muestra (g/100 g)	2	6	10

6.3 Preparación de extractos acuosos

6.3.1 Extracción convencional

Se realizó una extracción sólido-líquido convencional en un vaso de doble chaqueta de 250 ml (Schott Duran®, Alemania) sobre una parrilla con agitación (Nuova Sarrer-Barnstead Thermolyne® SP-131325, Georgia, E. U. A.) a 600 rpm y un baño de recirculación (VWR® MX07R-20, E. U. A.), utilizando como solvente agua. Los extractos acuosos de ajeno y aranthó fueron puestos bajo diferentes condiciones de temperatura (20, 55 y 90 °C), tiempo (5, 15 y 25 min.) y porcentaje de muestra (2, 6 y 10%) (Tabla 2).

6.3.2 Extracción con ultrasonido

Se siguió el método de extracción con ultrasonido realizado por Guo *et al.*, (2014a) y Torres *et al.*, (2018) con algunas modificaciones. Los extractos de ambas plantas se colocaron en vasos de precipitado de 250 ml para ser tratados con un baño de ultrasonido (Branson Ultrasonics® 2510R-DTH, Connecticut, E. U. A.), utilizando agua como solvente. Se aplicaron diferentes condiciones de temperatura (20, 45 y 70°C), tiempo (5, 15 y 25 min.) y porcentaje de muestra (2, 6 y 10%) (Tabla 2).

6.3.3 Extracción con microondas

Se realizó basado en la metodología descrita por Li, Skouroumounis, Eelsey y Taylor (2011) y Routray y Orsat (2012) con algunas modificaciones. Se empleó un microondas (LG® MB-359ME, Corea) de 750 W de potencia y 60 Hz de frecuencia, en un vaso de precipitado de 250 ml (Schott Duran®, Alemania) las muestras se sometieron a diferentes potencias (20, 30 y 40 %), tiempos de extracción (1, 1.5 y 2 min), y muestra del 2, 6 y 10 % (Tabla 2), utilizando agua como solvente.

6.4 Obtención de extractos acuosos con prensa francesa por medio de un diseño de experimentos compuesto centrado

Con la finalidad de determinar el efecto de la extracción con prensa francesa en la liberación de compuestos antioxidantes de ajeno y aranthó se utilizó un diseño de experimentos compuesto centrado (DCC) por dos variables independientes (tiempo (A) y muestra (B)) con 5 puntos centrales. A partir del diseño establecido, se llevaron a cabo 13 experimentos (Anexo 2) para preparar los extractos acuosos bajo diferentes condiciones de tiempo y muestra, utilizando una temperatura fija de 90°C para todos los experimentos (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones utilizadas en el diseño experimental compuesto centrado extracción con prensa francesa

Prensa francesa		Rangos	
A	Tiempo (min)	0.76	9.2
B	Muestra (g/100 g)	0.34	11.6

Los datos resultantes del DCC se ajustaron de igual manera que para el DBB a un polinomio de segundo orden de la forma de la ecuación 2.

$$y = \beta_0 + \sum_{A=1}^k \beta_A x_A + \sum_{B=1}^k \beta_B x_B + \sum_{A=1}^k \beta_{AA} x_A^2 + \sum_{B=1}^k \beta_{BB} x_B^2 + \sum \sum_{A < B} \beta_{AB} x_A x_B + \varepsilon$$

Ec. 2

6.5 Preparación de extractos acuosos

6.5.1 Extracción con prensa francesa

A partir de la metodología descrita por López *et al.*, (2007) y Rocha, Maeztu, Barros, Cid y Coimbra (2003), se utilizó una prensa francesa (Bodum, Copenhague, Dinamarca) con capacidad de 250 mL, para preparar los extractos acuosos utilizando

diferentes porcentajes de muestra (0.34 a 11.6%). Se agregó agua caliente a 90°C y dejando en contacto con la muestra durante rangos de tiempo de 0.76 a 9.2 minutos (Tabla 3), antes de que el émbolo fuera empujado hacia abajo lentamente. Los extractos se filtraron y se analizó su actividad antioxidante mediante las técnicas FRAP y del radical DPPH• así como el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

En todos los tratamientos para cada método de extracción se realizaron por triplicado, los extractos obtenidos se filtraron y se analizó el contenido de fenoles totales de los extractos acuosos por el método de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante mediante las técnicas DPPH• y FRAP.

6.6 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Para la cuantificación de fenoles totales se construyó una curva de calibración en un intervalo de concentración de 0 a 15 mg/L a partir de una solución estándar de ácido gálico (AG) 1000 mg/L. Se tomó el volumen correspondiente de cada estándar, se adicionaron 2 mL de Na₂CO₃ al 7.5%, 2 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y se aforó a 10 mL con agua destilada. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 760 nm. Para la determinación de fenoles en los extractos acuosos de ajeno o aranthó, se siguió el mismo procedimiento que para la curva de calibración estándar, sustituyendo el AG por 1 mL de cada muestra. Los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de ácido galico por 100 g de muestra en peso seco (mg EAG/100 g).

6.7 Determinación de actividad antioxidante

6.7.1 Método del radical DPPH•

Para realizar esta determinación, se utilizó el método propuesto por Brand-Williams, Cuvelier y Berset (1995) con algunas modificaciones (Chen *et al.*, 2008). Se preparó

una curva de calibración, (0 a 33 μ M), a partir de una solución patrón de Trolox 1mM en MeOH (metanol). A cada solución estándar de la curva se añadió 2.9 mL de DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) 0.1 mM en MeOH. Todas las soluciones estándar se llevaron a un volumen final de 3 mL con MeOH. A la par de los estándares se preparó una muestra control que únicamente contenía 0.1 mL de MeOH y 2.9 mL de DPPH•. Los estándares se dejaron reaccionar durante 50 minutos en la oscuridad y se midió la absorbancia a 515 nm, utilizando como blanco MeOH. La actividad antioxidante de los extractos acuosos se midió utilizando el mismo procedimiento que para la curva de calibración, reemplazando la solución de Trolox por 100 μ L de cada extracto.

Finalmente se construyó la curva de calibración de Trolox vs % DPPH• remanente, a partir de los valores obtenidos de absorbancia para el control y para cada uno de los estándares. El % de DPPH• remanente se calculó a partir de la Ecuación 3.

$$\%DPPH \cdot remanente = \left[\frac{Amuestra - A_{blanco}}{A_{control}} \right] \times 100 \quad Ec (3)$$

Donde:

Amuestra = Absorbancia obtenida para la muestra

Ablanco = Absorbancia obtenida para el metanol

Acontrol = Absorbancia obtenida para el control

La capacidad antioxidante fue expresada como miligramos de equivalentes de Trolox por 100 g de muestra en peso seco (mg ET/100 g).

6.7.2 Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP)

Este análisis se realizó utilizando la técnica FRAP de Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones propuestas por Chohan *et al.*, (2008). El reactivo FRAP se preparó mezclando buffer de acetatos (300 mM a pH 3.6), cloruro férrico hexahidratado

(FeCl₃•6H₂O) (20 mM) y TPTZ (4,6-tripryridyl-s-triazina) 10 mM, preparada en HCl 40 mM. Las tres soluciones se mezclaron en proporciones 10:1:1 (v/v/v).

Se preparó una curva de calibración, (0 a 100 mM), a partir de una solución patrón de cloruro ferroso tetrahidratado (FeCl₂•4H₂O) en HCl 40 mM. A cada solución estándar de la curva se añadió 1 mL de reactivo de FRAP y se llevó a un volumen final de 10 mL con agua destilada. Todas las soluciones se incubaron a 37 °C por 4 minutos y se midió su absorbancia a 593 nm utilizando un blanco que contenía únicamente reactivo de FRAP. La actividad antioxidante de los extractos acuosos se midió utilizando el mismo procedimiento que para la curva de calibración, reemplazando la solución de cloruro férrico por 250 µL de cada extracto. Los valores fueron expresados como miligramos de equivalentes de hierro ferroso por 100 g de muestra en peso seco (mg EFe²⁺/100 g).

6.8 Bioaccesibilidad

A partir de las condiciones óptimas de extracción resultantes de la optimización de los diseños de experimentos DBB y DCC para cada método, se realizó el estudio de la bioaccesibilidad. Se utilizó el modelo de digestión *in vitro* seguido por diálisis (Trinidad, Wolever y Thompson, 1996), basado en el método propuesto por Miller, Schricker, Rasmussen y VanCampen (1981), con algunas modificaciones de Ramírez-Moreno, Marques, Sánchez-Mata, y Goñi (2011). Se homogeneizaron 10 mL de extracto (ajenjo o aranthó) y se ajustó a pH 2.0 con HCl 6M. El homogeneizado se incubó sucesivamente en un baño de agua con agitación con 120 µl de solución de pepsina (40 mg/mL de pepsina Sigma-Aldrich-P-7000 en HCl 0.1 molL⁻¹) a 37 °C durante 2 h.

Después de la incubación, se añadieron 1.5 mL de solución de pancreatina-colato sódico y de desoxicolato sódico (5 mg de enzima pancreatina P-1750 Sigma Aldrich más 12.5 mg de hidrato de colato sódico C6445 y 12.5 mg de desoxicolato D6750 Sigma Aldrich – 0.1 NaHCO₃ 0.1 molL⁻¹). Los productos de digestión se colocaron en

membranas de diálisis (Sigma Aldrich) y se dializaron en 200 mL de solución de NaHCO₃ (pH 7.5) durante 16 h. Los valores de bioaccesibilidad del contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH• y FRAP) de las muestras (control, extracción convencional, con ultrasonido, microondas y prensa francesa de la condición óptima) fue determinada como la diferencia de los parámetros obtenidos antes y después del tratamiento de digestión *in vitro* (% de fracción dializada).

6.9 Análisis de resultados

A partir del software Minitab V.17, se analizaron los resultados de los experimentos obtenidos de los DBB y DCC. Así como la significancia estadística de los coeficientes de regresión, la interacción entre las diferentes variables independientes y su correspondiente efecto sobre la respuesta, fueron probados mediante el análisis de varianza (ANOVA). Se obtuvieron los polinomios del diseño de experimentos, y se construyeron los gráficos de contorno. Los modelos matemáticos obtenidos para el DBB y DCC fueron optimizados por medio de la metodología de superficie de respuesta (MSR) para determinar los niveles de los factores que entregan los máximos valores de la variable respuesta. La significancia de los términos del modelo se estableció con un nivel de confianza del 95 %.

Los modelos se validaron a partir de la comparación del valor predicho y experimental mediante la prueba t con un nivel de significancia del 95% usando Microsoft Excel versión 2010 (Microsoft Corporation, EEUU). Bajo estas condiciones óptimas, se realizó la comparación de los métodos de extracción y las pruebas de bioaccesibilidad.

La comparación de los valores experimentales óptimos de los métodos de extracción y sus % de fracción dializada se compararon según la metodología analítica descrita en Granato, Araújo y Jarvis (2014) donde se sugiere usar el test de la normalidad seguido del test de Tukey para comparación entre muestras, con un nivel de confianza de $p < 0.05$, utilizando el software Minitab V.17.

Con el fin de determinar la correlación entre la concentración de compuestos antioxidantes medidos por DPPH• y FRAP con respecto al contenido de fenoles totales presentes en los extractos acuosos de ajeno y aranthó, se realizó un análisis de relación lineal con Microsoft Excel versión 2010 (Microsoft Corporation, EEUU), donde se obtuvieron los diagramas de dispersión con su coeficiente de correlación.

7 Resultados y discusión

7.1 Resultados del diseño de experimentos Box-Behnken de la actividad antioxidante y fenoles totales de extractos acuosos de ajeno y aranthó obtenidos a partir de diferentes métodos de extracción

7.1.1 Extracción convencional de ajeno

7.1.1.1 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de la extracción convencional de ajeno

La Tabla 4, muestra los resultados de los 15 puntos experimentales del diseño de experimentos Box-Behnken de fenoles totales y de actividad antioxidante de los extractos acuosos de ajeno medidos por DPPH•, FRAP. Todos los extractos acuosos mostraron valores de compuestos fenólicos entre 668 y 2465.4 mg EAG/ 100 g. La actividad antioxidante de las muestras mediante la determinación de DPPH•, osciló entre 361.9-2439.2 mg ET/ 100 g. Los valores más altos para ambas determinaciones se obtuvieron de los extractos obtenidos a partir de 2% de muestra, extraídos a 90° C durante 15 minutos.

Respecto a la actividad antioxidante de los extractos determinada por FRAP, los valores se encontraron entre 115.7-763.9 mg EFe²⁺/ 100 g. El valor más alto correspondió al extracto obtenido a partir de 2% de muestra, extraído a 55° C durante 5 minutos. Mientras que el segundo resultado más alto se obtuvo en condiciones de 90°C, 15 minutos y 2% de muestra (731.6 mg EFe²⁺/100 g), lo que podría indicar que la extracción a tiempos prolongados y a altas temperaturas puede dar lugar a la oxidación de los compuestos que pueden llevar a cabo reacciones de óxido-reducción, por la luz, exposición al oxígeno y a la degradación (Restrepo, Narváez, y Restrepo, 2009; Spigno *et al.*, 2007).

Tabla 4. Valores de fenoles totales y actividad antioxidantes por DPPH•, FRAP en extractos acuosos de ajeno mediante extracción convencional

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Muestra (g/100 g)	Fenoles totales (mg EAG/100 g)		DPPH• (mg ET/100 g)		FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	
			Media	SD	Media	SD	Media	SD
90	5	6	1,196.7	7.7	814.9	1.8	221.8	1.7
55	25	10	751.1	0.5	507.7	1.2	144.6	1.4
90	15	10	837.3	6.8	515.3	1.2	115.7	0.6
55	25	2	1,706.1	2.9	1,483.5	6.5	470.4	2.5
55	15	6	1,151.4	1.0	837.4	2.8	216.0	2.1
20	25	6	923.5	12.5	684.3	1.6	188.3	1.1
55	15	6	1,159.5	4.8	839.2	2.7	216.1	0.5
55	5	10	776.0	10.3	496.6	0.7	132.6	17.0
20	15	2	1,602.4	8.1	899.7	6.5	446.0	9.0
90	15	2	2,465.4	2.9	2,439.2	1.6	731.6	2.9
90	25	6	1,386.0	2.1	782.6	2.5	147.3	0.9
55	5	2	1,380.9	2.9	1,883.0	4.6	763.9	6.0
55	15	6	1,162.4	6.1	839.2	2.7	216.9	0.3
20	5	6	810.6	1.4	640.7	3.3	230.6	0.9
20	15	10	668.0	0.6	361.9	1.2	157.9	0.2

(n=3±SD: Desviación estándar)

En la Tabla 5, se presentan resultados de algunos estudios de la actividad antioxidante de ajeno medida principalmente por fenoles totales y DPPH•. En estos trabajos, los solventes de extracción utilizados han sido etanol, metanol, acetato de etilo, cloroformo y agua obteniéndose valores muy variables de DPPH• (958.36 - 7742.675 mg ET/100 g muestra) y fenoles totales (51.49 – 5587 mg EAG/100 g muestra), estos son comparables a los resultados obtenidos en la presente investigación. De acuerdo a los datos presentados en la Tabla 5, hay muchas variables (condiciones físicas de extracción, parte de la planta utilizada, tipo de solvente y métodos de extracción) influyen de manera determinante en la extracción de compuestos con actividad antioxidante.

Tabla 5. Capacidad antioxidante de muestras de ajeno determinada por fenoles totales y DPPH•, reportada por distintos autores

Referencia	Muestra	Condiciones de extracción		Fenoles totales (mg EAG/100 g)	DPPH• (mg ET/100 g)
Jaramillo <i>et al.</i> , 2016	Hojas	Etanol	20 g de muestra en 100 mL de etanol al 70 %, a temperatura ambiente, durante 48 hrs.	560	-
Lee, Thiruvengad	Hojas	Acetato de etilo	5 g de muestra en 0.2 L porciones de acetato de etilo	51.49	-
am, Chung, Nagella, 2013		Metanol	5 g de muestra en 2 L de metanol por 24 h.	131.18	-
		Agua	5 g de muestra en 0.5 L de agua destilada	134.47	-
Msaada <i>et al.</i> , (2015)	Hojas, tallo, y flores	Metanol	1 g de la muestra en 10 mL de metanol a 25° durante 24 hrs.	9,989	-
Sahin, Aybastier, Isik, 2013	Hojas	Metanol	0.5 g de muestra, utilizando un baño de ultrasonido a 50°C a 70 minutos	2793.5	-
Singh y Sharma, 2011	Hojas	Metanol	100 g de muestra en metanol mediante Soxhlet durante 20 hrs.	1220	-
Singh <i>et al.</i> , 2012	Hojas	Agua	100 g de la muestra en 500 mL del solvente en un percolador	2000	-
		Etanol	por una combinación de maceración y percolación a temperatura ambiente	2152	-
		Clorofor -mo		1417	-
Özgen, Mavi, Terzi, Cozkun y Yildirim, 2004	Hojas	Agua	20 g de muestra en 400 ml de agua por reflujo durante 90 minutos y se filtró	360	958.36
Villavicencio, 2014	Hojas	Etanol	500 g de la muestra fue sometido a maceración dinámica por un periodo de 4 hrs con disolventes	3829.5	7742.67
		Agua		2167	2432.07
		Metanol		521.4	

7.1.1.2. Efecto de las condiciones de extracción sobre la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes de ajeno a partir de extracción convencional

Los coeficientes de correlación y los polinomios obtenidos del diseño de experimentos Box-Behnken de la actividad antioxidante mediante extracción convencional de ajeno determinada por DPPH• y FRAP, así como de fenoles totales se presentan en la Tabla 6. Los coeficientes de correlación determinados fueron superiores al 95% para las tres metodologías empleadas, por lo que este diseño de experimentos resulta útil para optimizar las condiciones de extracción convencional a las cuales se debe someter el ajeno para lograr la mayor extracción de compuestos con actividad antioxidante.

Tabla 6. Polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del diseño de experimentos Box-Behnken para los extractos acuosos de ajeno obtenidos por extracción convencional

Análisis	R ²	Polinomios
Fenoles totales	0.96	1078 + 6.04 A + 65.8 B - 145.6 C + 0.0691 A*A - 1.605 B*B + 9.93 C*C + 0.055 A*B - 1.277 A*C - 2.19 B*C
DPPH•	0.95	1184 + 29.3 A - 6.2 B - 270 C - 0.059 A*A - 0.36 B*B + 18.15 C*C - 0.054 A*B - 2.499 A*C + 2.57 B*C
FRAP	0.98	891 + 6.17 A - 15.2 B - 178.9 C - 0.0148 A*A - 0.012 B*B + 10.29 C*C - 0.0230 A*B - 0.585 A*C + 1.955 B*C

Donde: A=Temperatura (°C), B= Tiempo (min) y C = Concentración de muestra (g/100 g)

En la Tabla 7, se muestran los coeficientes de regresión y diferencias significativas para cada factor, con el objetivo de observar aquellos que afectan significativamente a la respuesta del modelo.

Tabla 7. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden, para fenoles totales, DPPH• y FRAP de la extracción convencional de ajeno

Factor	Coeficiente de regresión		
	Fenoles totales	DPPH•	FRAP
β_0	1155	839	216.3
Lineal			
β_A	237.8 ^c	247.3 ^d	24.2
β_B	75.4	-47.1	-50.7 ^d
β_C	-517.9 ^a	-604.7 ^b	-233.6 ^a
Cuadrático			
β_{AA}	84.6	-72	-18.1
β_{BB}	-160.5	-36	-1.2
β_{CC}	158.9	290	164.6 ^c
Interacción			
β_{AB}	19.1	-19	-8
β_{AC}	-178.7 ^d	-350 ^d	-82 ^d
β_{BC}	-87.5	103	78.2 ^d

Nivel de significancia: ^ap<0.0001, ^bp<0.001, ^cp<0.01, ^dp<0.05

El modelo indica que el factor temperatura en su término lineal (β_A) afecta significativamente la liberación de compuestos fenólicos (p<0.01) y antioxidantes por DPPH• (p<0.05) como se observa en la Figuras 7a y 8a, en donde se obtienen valores superiores a 1400 mg EAG/100 g y 1000 mg ET/100 g respectivamente en los extractos sometidos a más de 80° C. Los resultados se muestran acorde a lo obtenido por Flores, León, Estarrón y Orozco (2016) y García *et al.*, (2012b), en donde la temperatura resultó ser el factor con mayor efecto positivo sin evidencia de degradación térmica dentro de los niveles ensayados. Así mismo, Qu, Shi, Li, Pan y Venkitasamy (2014) y Zgorka (2009) reportaron que la temperatura constituye el principal efecto positivo en el rendimiento de extracción de fenoles totales. Este hecho está principalmente asociado al incremento de la solubilidad y las velocidades de difusión de los compuestos por efecto de esta variable, que promueve la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes rompiendo los constituyentes de las células vegetales (Flores *et al.*, 2016; García *et al.*, 2012; Wang, Sun, Cao, Tian y Li, 2007).

Sin embargo, no se consideró aumentar la temperatura más de 90° C, ya que se a visto que ha temperaturas mayores algunos compuestos fenólicos no estables podrían empezar a degradarse y el valor obtenido no correspondería a un valor real de la muestra inicial (Liyana-Pathirana y Shahidi, 2005). Por lo tanto, a partir de los

resultados obtenidos se puede deducir que la mayoría de los compuestos fenólicos extraídos de ajenjo son termoestables.

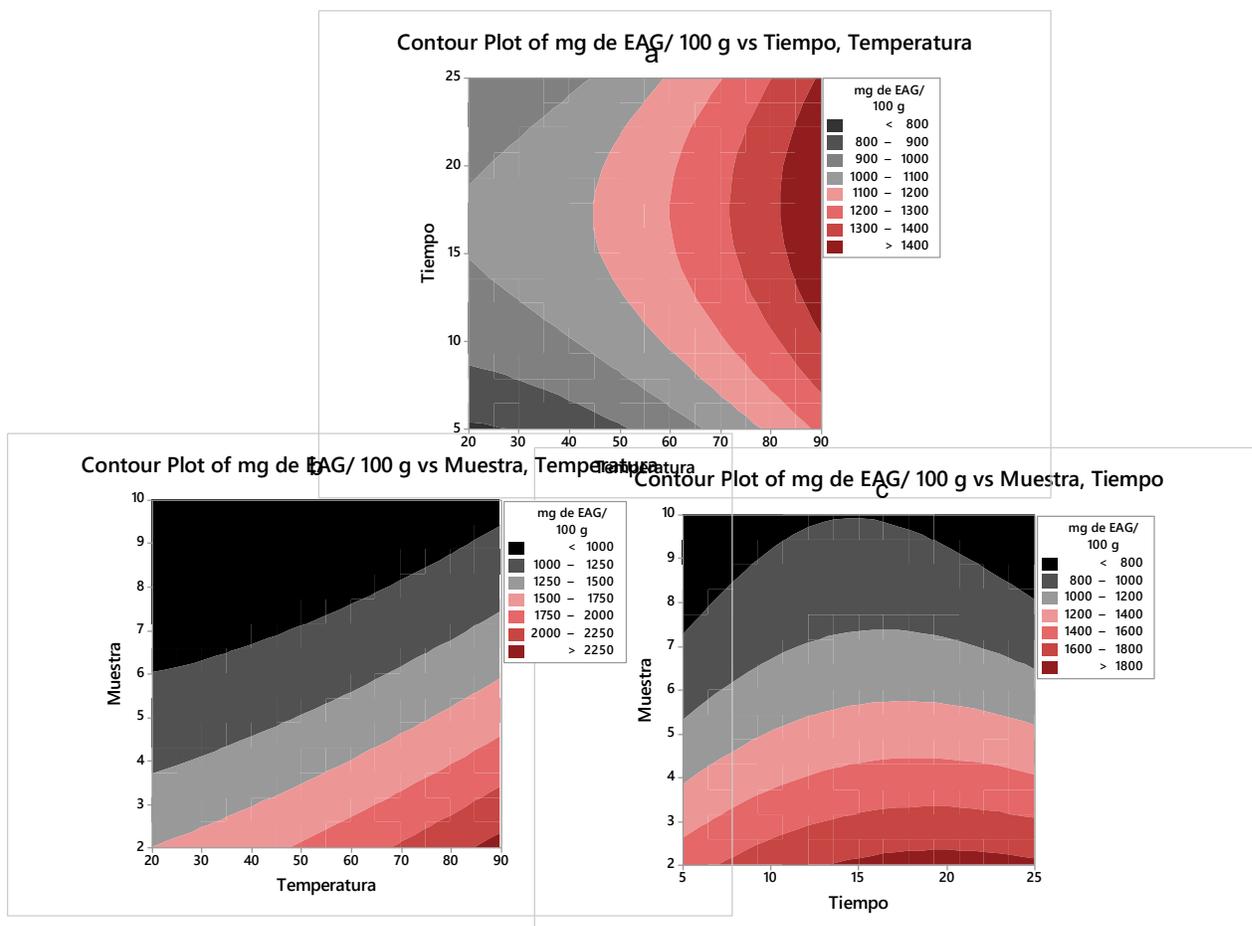


Figura 7. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre el contenido de fenoles totales, obtenido por extracción convencional de ajeno

El factor tiempo tuvo efecto significativo únicamente en FRAP ($p < 0.05$), ya que a menor tiempo de exposición se obtiene una mayor liberación de compuestos antioxidantes (Figura 9a y 9c). Las tres determinaciones fueron significativamente afectadas por la concentración de muestra en términos lineales (β_c) (fenoles totales y FRAP $p < 0.0001$, DPPH• $p < 0.001$), así como en términos cuadráticos (β_{cc}) influyó $p < 0.01$ en FRAP. En cuanto a los términos de interacción que resultaron significativos fueron temperatura y muestra (β_{AC}) en las tres determinaciones, estas tendencias se pueden apreciar en los

gráficos de contorno obtenidos del diseño de experimentos Box-Behnken en la Figuras 7b, 8b y 9b, ya que a una concentración de muestra menor de 3% y a una temperatura mayor de 60°C hay mayor liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes.

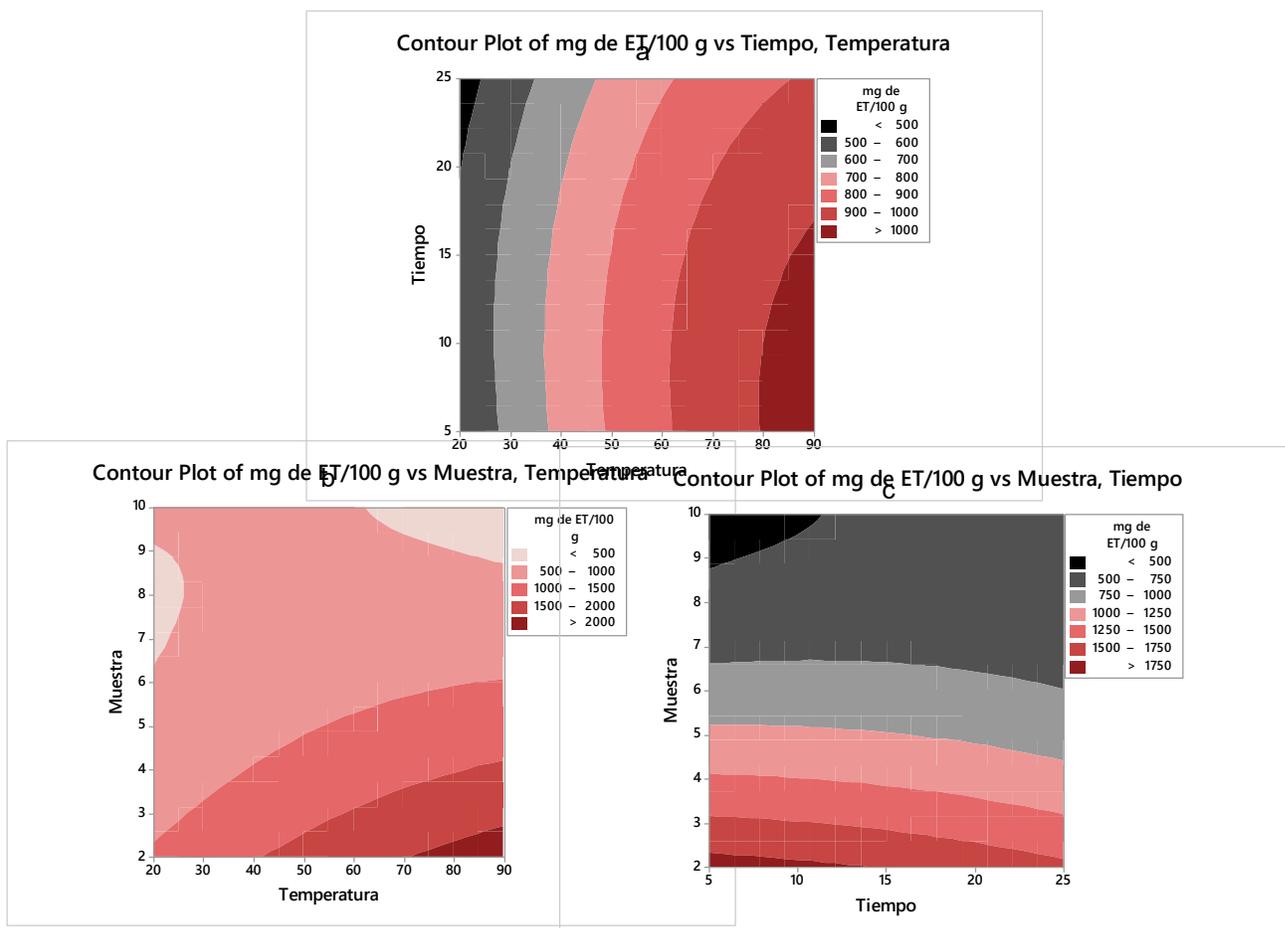


Figura 8. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por DPPH•, obtenida por extracción convencional de ajeno

De igual manera se observa en la Figura 9c, el efecto significativo de la interacción entre tiempo y muestra (β_{BC}) para FRAP ($p < 0.05$), donde se obtiene una liberación mayor de 700 mg EFe²⁺/ 100 g, a una concentración de muestra de 2%, en tiempos menores de 10 minutos.

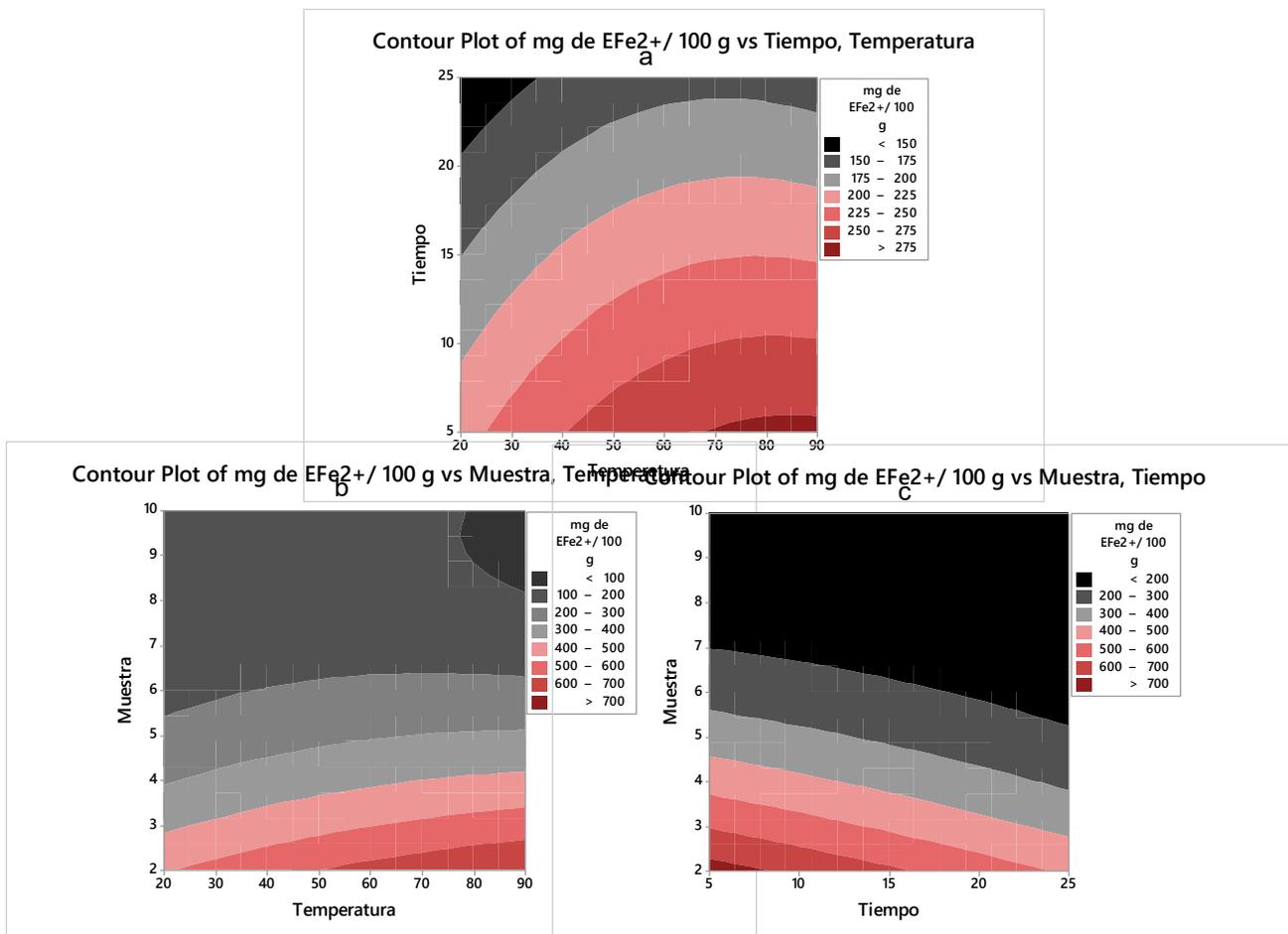


Figura 9. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por FRAP, obtenida por extracción convencional de ajonjolito

7.1.1.3 Optimización de las condiciones de extracción convencional de ajonjolito y validación del modelo

Una vez obtenidas los resultados del modelo obtenido a partir de los resultados del DBB, se procede a optimizar la respuesta final maximizando los resultados de los tres parámetros a analizar, con el objetivo de determinar los niveles de los factores que permitan maximizar la extracción de los compuestos fenólicos y antioxidantes presentes en los extractos de ajonjolito. Para obtener los valores óptimos en las tres metodologías empleadas, (fenoles totales, DPPH• y FRAP), se deben exponer los extractos de ajonjolito a 90°C, durante 10 minutos con una concentración de muestra de

2%.

Para confirmar la validez de la optimización se realizaron tres extracciones bajo las condiciones antes señaladas, y se compararon los valores predichos y experimentales (Tabla 8), en ninguno de los tres casos se observan diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el valor predicho y el valor experimental, lo cual indica que los valores experimentales del proceso óptimo son reproducibles.

Tabla 8. Valores óptimos predichos y experimentales, de la extracción convencional de ajeno

Análisis	Valor predicho	Valor experimental
Fenoles totales (mg EAG/100 g)	2490.45	2486.6±2.9
DPPH• (mg ET/100 g)	2454.32	2452.5±1.6
FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	729.43	731.16±2.9

7.1.1.4 Correlación entre fenoles totales y la actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP de la extracción convencional de ajeno

Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas y es sabido que tienen una gran influencia en el mecanismo de actividad antioxidante (Carlsen *et al.*, 2010; Chul, Yeop, Gyeong, Song y Kim, 2018; Halliwell, Rafter y Jenner, 2005; Wiart, 2007). Como se muestra en la Figura 10a, la correlación entre la actividad antioxidante, medida por el contenido de fenoles totales y DPPH•, fue de $R^2=0.7886$. Este valor indica que los compuestos responsables de la actividad antioxidante en los extractos acuosos de ajeno analizados, son predominantemente de tipo fenólico, ya que el 78% de la actividad evaluada resulta de la contribución de estos compuestos. Así mismo, la correlación entre la actividad antioxidante medida por FRAP y el contenido de fenoles totales, dio un valor de $R^2=0.6139$ (Figura 10b). Refiriendo que para ambas técnicas más de 60% de los compuestos fenólicos,

parecen ser los principales responsables de la capacidad antioxidante de los extractos de ajeno mediante extracción convencional.

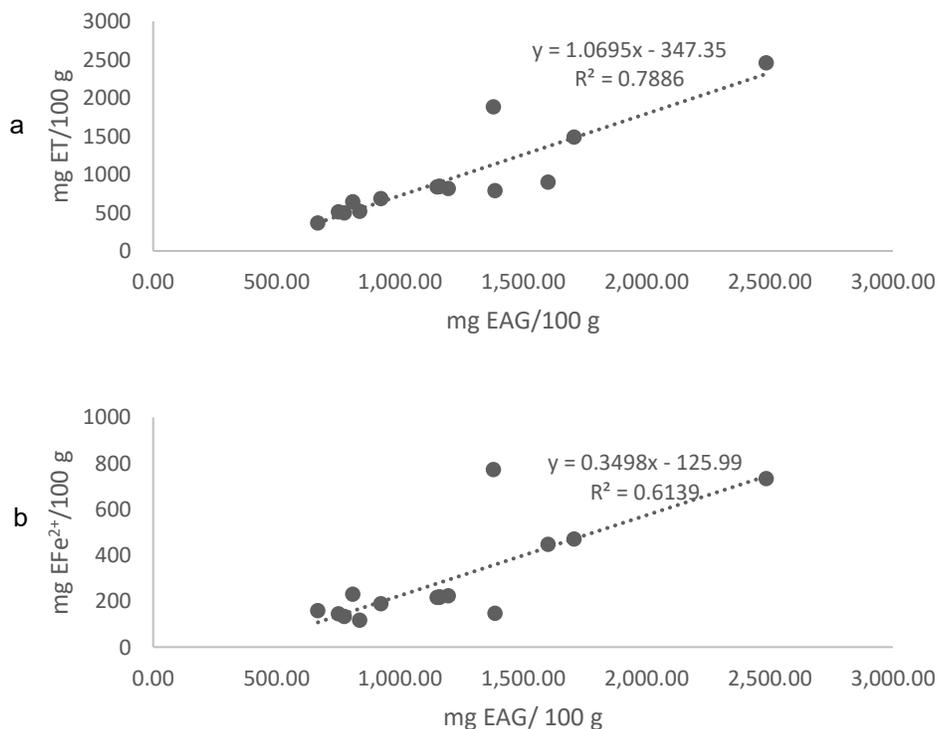


Figura 10. Correlación entre fenoles totales vs a) DPPH• y b) FRAP de la extracción convencional de ajeno

Algunos autores han estudiado la correlación entre actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos en muestras de ajeno, y han encontrado una correlación positiva, por lo cual, el contenido de compuestos fenólicos totales en los extractos podría explicar sus altas actividades antioxidantes. Así mismo, estos compuestos fenólicos muestran actividad antioxidante debido a sus propiedades redox, que juegan un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres (Huang y Mau, 2006; Lee *et al.*, 2013; Li, *et al.*, 2007)

Cabe destacar que las correlaciones no son completamente lineales porque el método

de Folin-Ciocalteu es específico para compuestos fenólicos, y la actividad antioxidante también puede ser exhibida por compuestos no fenólicos (Asami, Hong, Barrett y Mitchell, 2003; McDonald-Wicks *et al.*, 2006). Incluso es probable que se presenten interacciones antagonistas o sinergistas entre los compuestos fenólicos y otros metabolitos que pueden afectar dicha la actividad (Odabasoglu *et al.*, 2005).

7.1.2 Extracción convencional de aranthó

7.1.2.1 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de la extracción convencional de aranthó

Los resultados de la determinación del contenido de fenoles totales y de actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de los 15 puntos experimentales del diseño de experimentos Box-Behnken de extractos acuosos de aranthó se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH•, FRAP en extractos acuosos de aranthó mediante extracción convencional

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Muestra (g/100 g)	mg EAG/100 g		mg ET/100 g		mg EFe ²⁺ /100 g	
			Media	SD	Media	SD	Media	SD
90	5	6	1480.8	5.5	532.8	1.4	247.4	1.8
55	25	10	1050.0	2.5	522.7	0.4	142.4	0.1
90	15	10	1380.2	5.2	301.5	1.2	151.2	1.4
55	25	2	2139.0	5.7	1,234.6	2.8	679.6	6.3
55	15	6	1296.3	4.8	687.3	2.9	219.8	1.3
20	25	6	1073.0	4.4	581.0	1.0	225.8	2.9
55	15	6	1296.3	1.0	691.0	0.8	219.5	1.4
55	5	10	969.3	1.1	516.1	0.7	138.9	0.8
20	15	2	1596.3	2.9	828.9	2.8	666.5	1.6
90	15	2	2232.2	2.9	1,511.5	5.7	691.6	11.1
90	25	6	1547.0	4.8	295.5	1.0	244.5	5.5
55	5	2	1622.8	5.7	885.0	2.3	683.4	8.8
55	15	6	1296.1	2.8	689.9	2.4	220.8	1.7
20	5	6	972.5	1.0	424.8	1.6	236.8	2.0
20	15	10	739.6	5.2	314.5	3.6	144.4	1.6

(n=3 ± SD: Desviación estándar)

Los valores de fenoles totales se situaron entre 739.6 y 2232.2 mg EAG/100 g. Los

extractos analizados mediante DPPH• mostraron valores de actividad antioxidante de 295.5 a 1,511.5 mg ET/100 g. En cuanto a la actividad antioxidante determinada por FRAP, se encontraron valores entre 138.9 - 691.6 Fe²⁺/100 g. Para las tres determinaciones el valor más alto se obtiene a partir de 2% de muestra, extraído a 90° C durante 15 minutos.

En la Tabla 10, se muestran algunos resultados de la actividad antioxidante y compuestos fenoles de diversas plantas medicinales obtenidos en otros estudios, en los cuales se reportan valores muy variables según la especie de planta. Sin embargo, comparando con los valores obtenidos de la extracción convencional de aranthó, se puede decir que esta planta tiene una alta capacidad antioxidante tanto en compuestos de vía radicalaria, vía redox y fenoles totales en comparación a las especies descritas, las cuales muestran variabilidad en sus resultados.

Tabla 10 Determinación de la capacidad antioxidante de diversas plantas medicinales realizada por distintos autores

Referencia	Especie	Fenoles totales (mg EAG/100 g)	Actividad antioxidante	
			DPPH• (mg ET/100 g)	FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)
Hamdy <i>et al.</i> , 2013;	<i>Acanthopanax gracilistylus</i>	2957	305	454
	<i>Brassica alba L. Boiss</i>	594	513	606
Li <i>et al.</i> , 2013;	<i>Curcuma aromatica Salisb.</i>	610	507	347
	<i>Drosera burmannii Vahl</i>	1207	305	107
Nikolic <i>et al.</i> , 2014;	<i>Erythrina variegata L.</i>	1561	1467	302
	<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	523	401	548
Rajha <i>et al.</i> , 2014;	<i>Geranium wilfordii Maxim.</i>	1790	1303	215
	<i>Houttuynia cordata Thunb.</i>	1738	757	135
Sheng <i>et al.</i> , 2013;	<i>Isatis tinctoria L.</i>	4730	1083	157
	<i>Juncus effusus L.</i>	3790	317	604
Skotti <i>et al.</i> , 2014.	<i>Magnolia liliflora Desr.</i>	858	938	957
	<i>Rosa chinensis Jacq.</i>	725	587	1432
	<i>Salvia miltiorrhiza Bge.</i>	988	1544	601

7.1.2.2 Efecto de las condiciones de extracción sobre la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes de aranthó a partir de extracción convencional

Los resultados del DBB de los coeficientes de correlación y polinomios de la actividad antioxidante mediante extracción convencional de aranthó determinada por DPPH• y FRAP, así como de fenoles totales se presentan en la Tabla 11. Los coeficientes de correlación determinados fueron superiores al 95% para fenoles totales y FRAP, así como mayor al 90% para DPPH•, lo que nos indica que este diseño de experimentos resulta útil para optimizar las condiciones de extracción convencional a las cuales se debe someter el aranthó para lograr la mayor extracción de compuestos con actividad antioxidante y fenoles totales.

Tabla 11. Polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del diseño de experimentos Box-Behnken para los extractos acuosos de aranthó

Análisis	R ²	Polinomios
Fenoles totales	0.98	1449 + 7.88 A + 37.3 B - 206.5 C + 0.0045 A*A - 0.335 B*B + 11.41 C*C - 0.025 A*B + 0.028 A*C - 2.72B*C
DPPH•	0.90	109 + 26.1 A + 59.1 B - 130.1 C -0.1138 A*A -0.913 B*B + 11.97 C*C - 0.280 A*B -1.259 A*C - 2.14B*C
FRAP	0.99	1064.95 - 0.601 A - 2.957 B - 203.33 C + 0.00923 A*A + 0.0728 B*B + 11.485 C*C + 0.00581 A*B -0.0431 A*C + 0.0460 B*C

Donde: A=Temperatura (°C), B= Tiempo (min) y C = Concentración de muestra (g/100 g)

Los coeficientes de regresión y diferencias significativas para cada factor se plasman en la Tabla 12. La temperatura influyó significativamente en la liberación de compuestos fenólicos y en la actividad antioxidante determinada por FRAP, tanto en términos lineales (β_A) ($p < 0.0001$ fenoles y 0.001 FRAP) como cuadráticos (β_{AA}) ($p < 0.01$ fenoles y 0.001 FRAP). Lo cual puede ser observado en los gráficos de contorno (Figura 11a y 12a) donde a mayor temperatura mayor liberación de compuestos.

Tabla 12. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden, para fenoles totales, DPPH• y FRAP de la extracción convencional de arañthó

Factor	Coeficiente de regresión		
	Fenoles totales	DPPH•	FRAP
β_0	1296.3	689	220.04
Lineal			
β_A	286.4 ^a	62.6	8.52 ^b
β_B	95.5 ^d	34.3	-1.77
β_C	-435.4 ^a	-351.9 ^c	-268.76 ^a
Cuadrático			
β_{AA}	5.6 ^c	-139.4	11.31 ^b
β_{BB}	-33.5	-91.2	7.28 ^c
β_{CC}	182.5	191.5	183.77 ^a
Interacción			
β_{AB}	-8.6	-98.2	2.03
β_{AC}	4	-176.3	-6.03
β_{BC}	-108.9 ^d	-85.8	1.84

Nivel de significancia: ^ap<0.0001, ^bp<0.001, ^cp<0.01, ^dp<0.05

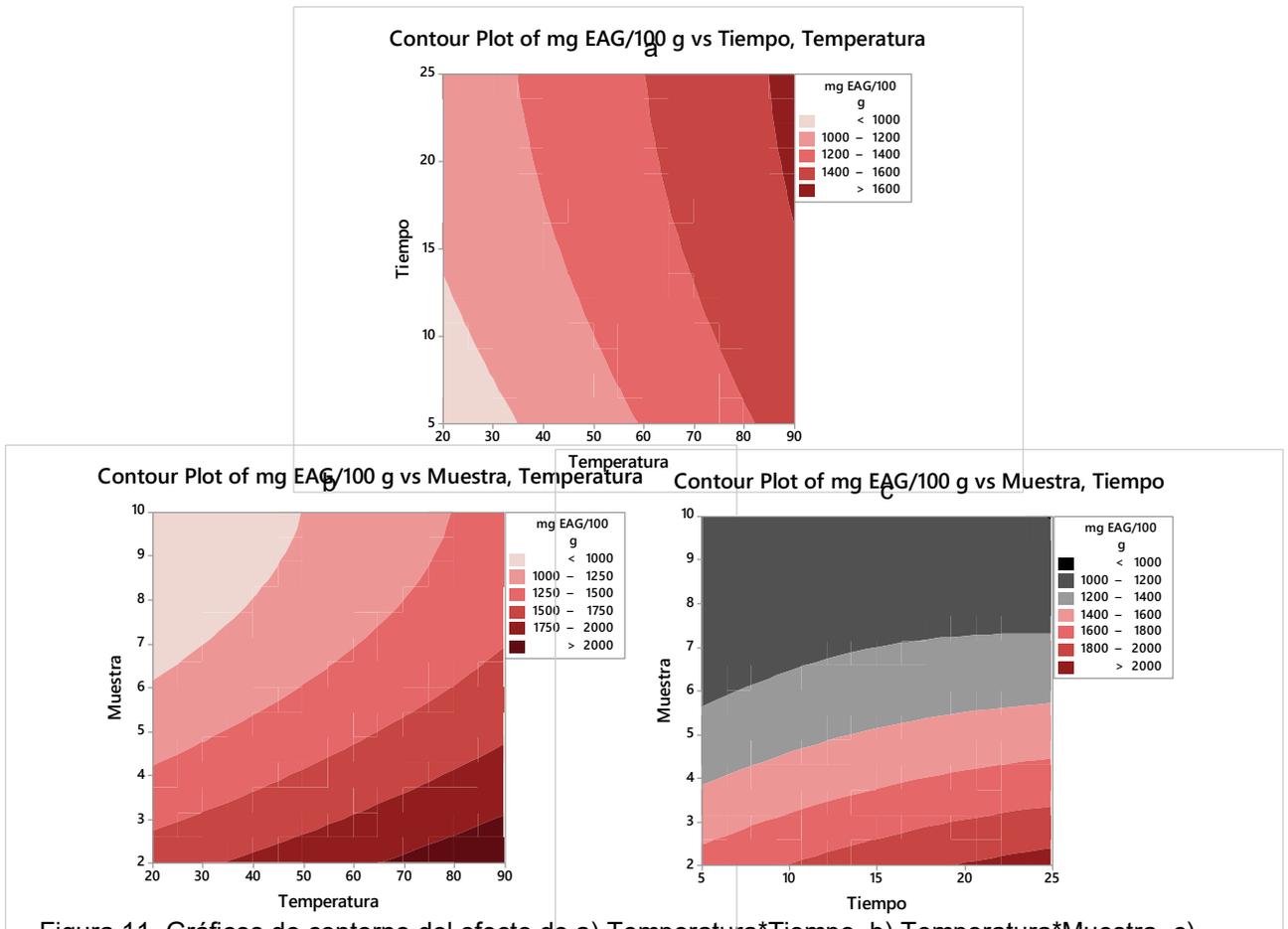


Figura 11. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre el contenido de fenoles totales, obtenido por extracción convencional de arañthó

Por otro lado, el tiempo mostró afectar de manera significativa en la liberación de compuestos fenólicos en su forma lineal (β_B) ($p < 0.05$), lo cual se percibe en la Figura 11c, obteniéndose valores mayores de 2000 mg EAG/100 g de muestra tras 20 minutos de exposición. Mientras que, en su forma cuadrática (β_{BB}), el tiempo tuvo un efecto significativo de $p < 0.01$ en FRAP. Las tres determinaciones se vieron influenciadas significativamente por la concentración de muestra a $p < 0.01$ DPPH• y a $p < 0.0001$ fenoles totales y FRAP, así como este último en su forma cuadrática a $p < 0.0001$.

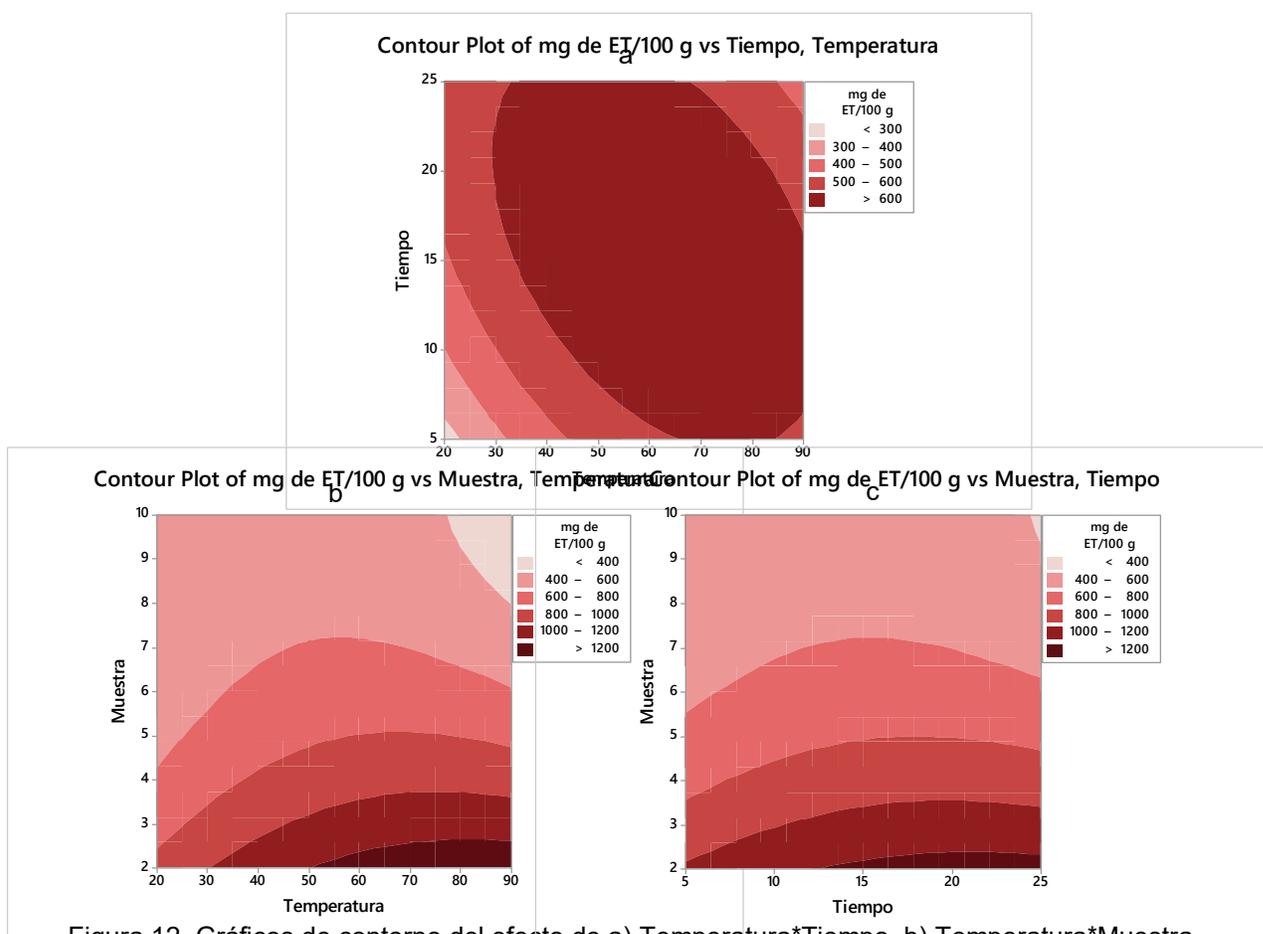


Figura 12. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por DPPH•, obtenida por extracción convencional de aranthó

En la Figura 11c, se puede observar que la interacción tiempo-muestra (β_{BC}) influyó significativamente ($p < 0.05$) en fenoles totales, donde a tiempos entre 20 y 25 minutos con una concentración de muestra menor de 3%, se obtienen más de >2000 mg EAG/100 g.

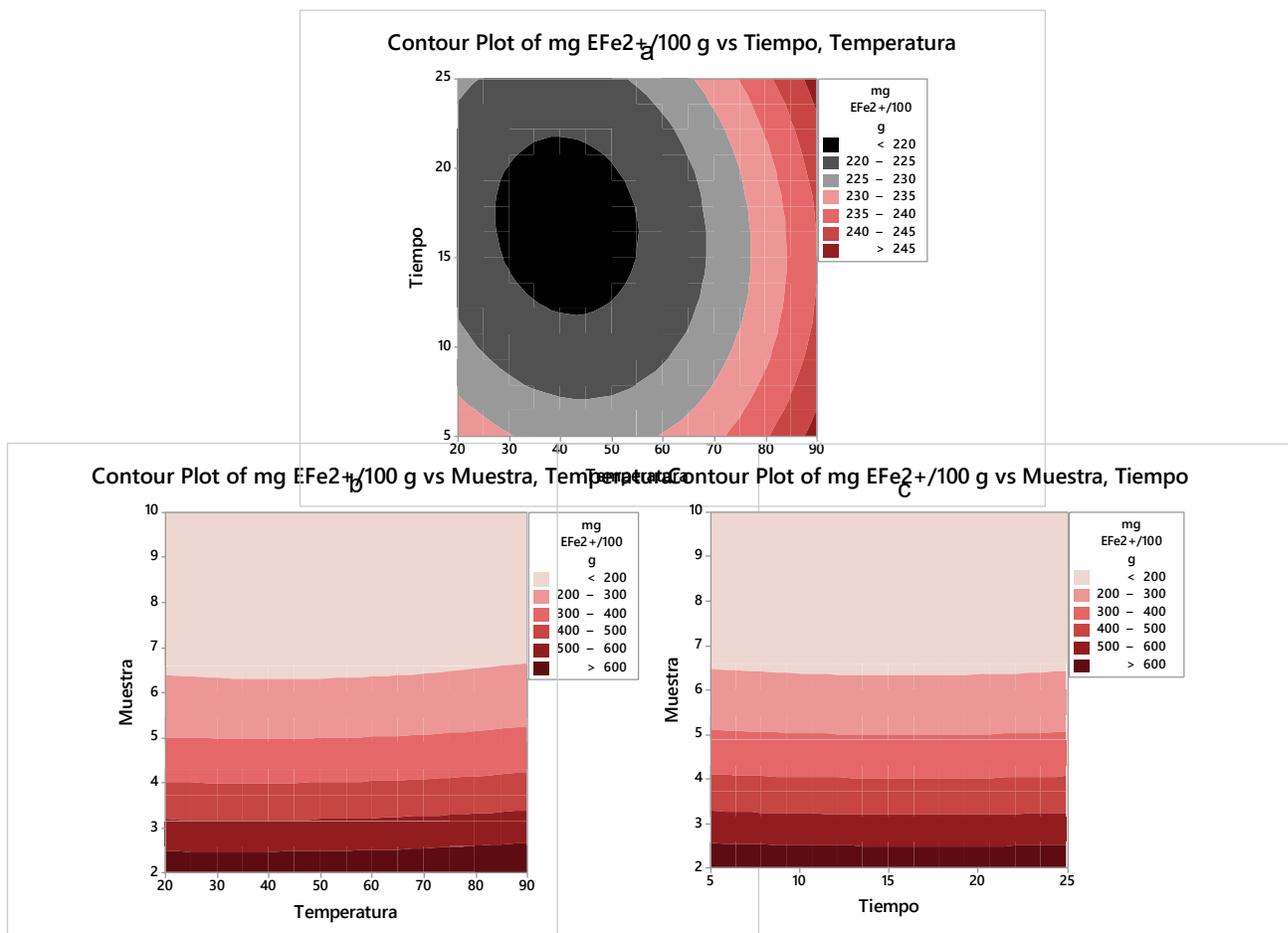


Figura 13. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por FRAP, obtenida por extracción convencional de aranthó

7.1.2.3 Optimización de las condiciones de extracción convencional de aranthó y validación del modelo

El modelo obtenido a partir de los resultados del DBB para la extracción convencional de aranthó, se sometió a un procedimiento de optimización. Las condiciones óptimas

propuestas para la extracción fueron: 90°C de temperatura; 17 minutos; 2% de concentración de muestra. Se validó el modelo mediante la comparación de los valores predichos y experimentales de compuestos fenólicos y antioxidantes (Tabla 13), no se encontraron diferencias significativas entre si ($p>0.05$). Lo que permite que el modelo sea adecuado para obtener los mejores valores de temperatura, tiempo y muestra para la extracción convencional de aranthó, así como estos valores sean reproducibles.

Tabla 13. Valores óptimos predichos y experimentales, de la extracción convencional de aranthó

Análisis	Valor predicho	Valor experimental
Fenoles totales (mg EAG/100 g)	2244.5	2242.7±2.9
DPPH• (mg ET/100 g)	1518.9	1,521.2±5.7
FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	699.4	697.9±11.1

7.1.2.4 Correlación entre fenoles totales y la actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP de la extracción convencional de aranthó

En las Figuras 14a y 14b, se presenta la correlación entre la actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP, en relación al contenido de fenoles totales, obteniéndose una $R^2=0.6655$ y $R^2: 0.6756$ respectivamente. Ambos valores nos indican que los compuestos responsables de la actividad antioxidante en la extracción convencional de aranthó, no son predominantemente de tipo fenólico, sin embargo, en diversos estudios realizados en esta planta se han identificado además de los compuestos fenólicos, terpenos, cumarinas y alcaloides como principales causantes de su actividad antioxidante (Domínguez *et al.*, 1971; García *et al.*, 2000; Fylaktakidou, Hadjipavlou, Litinas y Nicolaidis, 2004; Estanislao *et al.*, 2016; Kovač *et al.*, 2017).

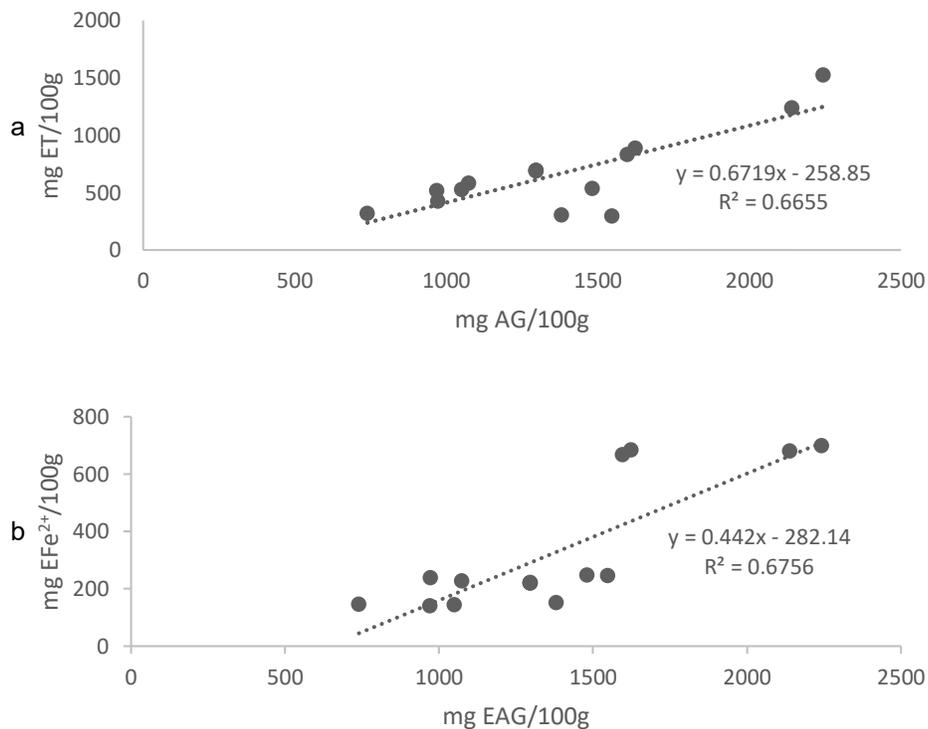


Figura 14. Correlación entre fenoles totales vs a) DPPH• y b) FRAP de la extracción convencional de aranthó

7.1.3 Extracción de ajeno con ultrasonido

7.1.3.1 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de extractos ultrasonificados de ajeno

Se muestran en la Tabla 14, los resultados de la liberación de compuestos fenoles y antioxidantes de la extracción de ajeno con ultrasonido, de los 15 experimentos obtenidos del DBB. Los valores obtenidos de compuestos fenólicos, se situaron entre 652.7 y 2299.3 mg EAG/100 g. Los valores obtenidos de la liberación de compuestos antioxidantes mediante el método DPPH•, se encontraron entre 310.8 y 818.2 5 mg ET/100 g. En cuanto a la capacidad antioxidante determinada por el método FRAP, se

mostraron valores entre 113.1-551.6 mg EFe²⁺/ 100g. Se observó que los valores más altos para las tres determinaciones se obtuvieron a una concentración de 2%, durante 15 minutos y a una temperatura de 70°C.

Tabla 14. Valores de fenoles totales y actividad antioxidantes por DPPH•, FRAP en extractos acuosos de ajeno mediante extracción con ultrasonido

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Muestra (g/100 g)	Fenoles totales (mg EAG/100 g)		DPPH• (mg ET/100 g)		FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	
			Media	SD	Media	SD	Media	SD
45	15	6	1005.0	6.2	344.7	7.9	193.3	1.8
45	15	6	1010.0	3.1	343.1	9.1	193.3	1.0
45	15	6	1004.6	5.5	345.9	5.5	194.4	0.9
45	5	10	668.7	7.0	312.4	1.3	113.1	0.8
70	15	2	2299.3	8.6	818.2	4.8	551.6	3.8
70	15	10	703.6	2.1	386.5	2.5	114.7	1.1
20	15	10	734.1	0.9	493.3	4.7	145.2	0.7
70	5	6	1052.8	3.9	437.1	0.9	193.5	1.4
45	5	2	2039.1	4.7	474.3	5.9	494.9	4.9
45	25	10	652.7	0.9	310.8	0.6	114.7	1.0
20	5	6	1000.5	3.9	443.3	1.1	178.5	1.2
45	25	2	2001.7	0.7	524.8	1.3	541.8	4.7
70	25	6	1113.1	5.7	416.6	2.3	195.9	2.2
20	15	2	2049.9	17.2	619.0	7.4	515.6	7.1
20	25	6	1070.6	2.9	451.1	1.0	189.7	1.8

(n=3 ± SD: Desviación estándar)

Los resultados de fenoles totales obtenidos de los extractos ultrasonificados de ajeno son inferiores a los reportados por Sahin *et al.*, (2013), quienes reportaron un contenido de fenoles totales de 2080 a 2793.5 mg EAG/100 g de ajeno utilizando como solventes metanol y HCL a diferentes concentraciones, durante 70 minutos de exposición a una temperatura de 50° C. Las diferencias encontradas pueden atribuirse al tipo de solvente utilizado ya que en el caso del agua se ha reportado que actúa como el agente de hinchamiento de la planta, mientras otros tipos de solventes como el metanol y etanol interrumpe la unión entre los solutos y matrices de plantas. Por lo cual, los resultados pueden estar relacionados con la polaridad del solvente y la solubilidad de los polifenoles del ajeno, (Sahin y Samli, 2013; Spigno y De Faveri, 2009). Así mismo se atribuye, este mayor contenido de fenoles al tiempo de exposición.

En consecuencia, el ultrasonido es un buen método alternativo para la extracción de

compuestos, conservación y el procesamiento de los alimentos y, además, no se ha demostrado ningún efecto adverso en la salud humana (Sahin y Soysal, 2013).

7.1.3.2 Efecto de las condiciones de extracción sobre la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes de ajeno a partir de extracción con ultrasonido

En la Tabla 15, se plasman los coeficientes de correlación y los polinomios obtenidos del DBB de fenoles totales y la actividad antioxidante (DPPH• y FRAP) mediante extracción de ajeno con ultrasonido. El diseño de experimentos resulta útil para optimizar las condiciones de extracción con ultrasonido a las cuales se debe someter el ajeno para lograr la mayor extracción de compuestos con actividad antioxidante y fenoles totales, ya que los coeficientes de correlación resultaron superiores al 95% para las tres metodologías DPPH •, FRAP y fenoles totales.

Tabla 15. Polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del diseño de experimentos Box-Behnken para la extracción de ajeno con ultrasonido

Análisis	R ²	Polinomios
DPPH•	0.97	815 - 13.89 A + 15.86 B - 66.1 C + 0.2129 A*A - 0.406 B*B + 6.35 C*C - 0.0283 A*B - 0.765 A*C - 0.326 B*C
FRAP	0.99	696.7 + 0.440 A + 5.86 B - 138.08 C + 0.00916 A*A - 0.0995 B*B + 8.276 C*C - 0.0089 A*B - 0.1664 A*C - 0.2833 B*C
Fenoles totales	0.99	2803 - 5.53 A + 8.61 B - 417.0 C + 0.1271 A*A - 0.267 B*B + 22.55 C*C - 0.0097 A*B - 0.700 A*C + 0.134 B*C

Donde: A=Temperatura (°C), B= Tiempo (min) y C = Concentración de muestra (g/100 g)

El análisis de los coeficientes de regresión y diferencias significativas (Tabla 16), mostró que la temperatura tuvo una influencia significativa en la liberación de compuestos fenólicos ($p < 0.05$) en su término lineal (β_A) y cuadrático (β_{AA}), lo cual se plasma en las Figuras 15a y 15b, obteniéndose más de 2100 EAG/100 g a temperaturas mayores de 60°C. De igual manera la temperatura fue significativamente mayor en su término cuadrático (β_{AA}) para DPPH• a $p < 0.001$.

Tabla 16. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden, para fenoles totales, DPPH• y FRAP de la extracción de ajeno con ultrasonido

Factor	Coeficiente de regresión		
	Fenoles totales	DPPH•	FRAP
β_0	1006.5	344.6	193.65
Lineal			
β_A	39.2 ^d	6.5	3.33
β_B	9.6	4.5	7.77 ^d
β_C	-703.9 ^a	-116.7 ^a	-202.02 ^a
Cuadrático			
β_{AA}	79.4 ^d	133.1 ^b	5.73
β_{BB}	-26.7	-40.6	-9.95 ^d
β_{CC}	360.8 ^a	101.7 ^c	132.42 ^a
Interacción			
β_{AB}	-2.4	-7.1	-2.22
β_{AC}	-70 ^d	-76.5 ^c	-16.64 ^c
β_{BC}	5.3	-13	-11.33 ^d

Nivel de significancia: ^ap<0.0001, ^bp<0.001, ^cp<0.01, ^dp<0.05

Por su parte el factor tiempo influyó significativamente en FRAP tanto en su término lineal (β_B) como cuadrático (β_{BB}) ($p<0.05$), ya que a tiempos entre 15 a 25 minutos se genera la mayor liberación de compuestos (Figura 17a). Así mismo se puede observar en las Figura 15, 16 y 17, que la concentración de muestra fue el principal parámetro que influyó en la liberación de fenoles totales y compuestos antioxidantes (vía radicalaría y redox), teniendo un efecto significativamente alto para las tres determinaciones tanto de manera lineal (β_C) ($p<0.0001$) y cuadrática (β_{CC}) (fenoles totales y FRAP a $p<0.0001$ y DPPH• a $p<0.01$), teniéndose a concentraciones de 2%, la mayor liberación de compuestos.

En las Figuras 15b, 16b y 17b se percibe, que la interacción entre la temperatura y la muestra (β_{AC}), generó un efecto significativo tanto para fenoles totales ($p<0.05$), así como para DPPH• y FRAP ($p<0.01$), siendo al aumentar la temperatura más de 50°C y utilizando poca concentración de muestra se generan los mayores valores. Este comportamiento es similar al obtenido por Aybastier, Isik, Sahin y Demir (2013) y Sahin *et al.*, (2013) en donde se optimizo la extracción con ultrasonido de ajeno y hojas de mora azul respectivamente, obteniéndose niveles superiores de fenoles totales, al incrementar la temperatura y reducir la concentración de muestra.

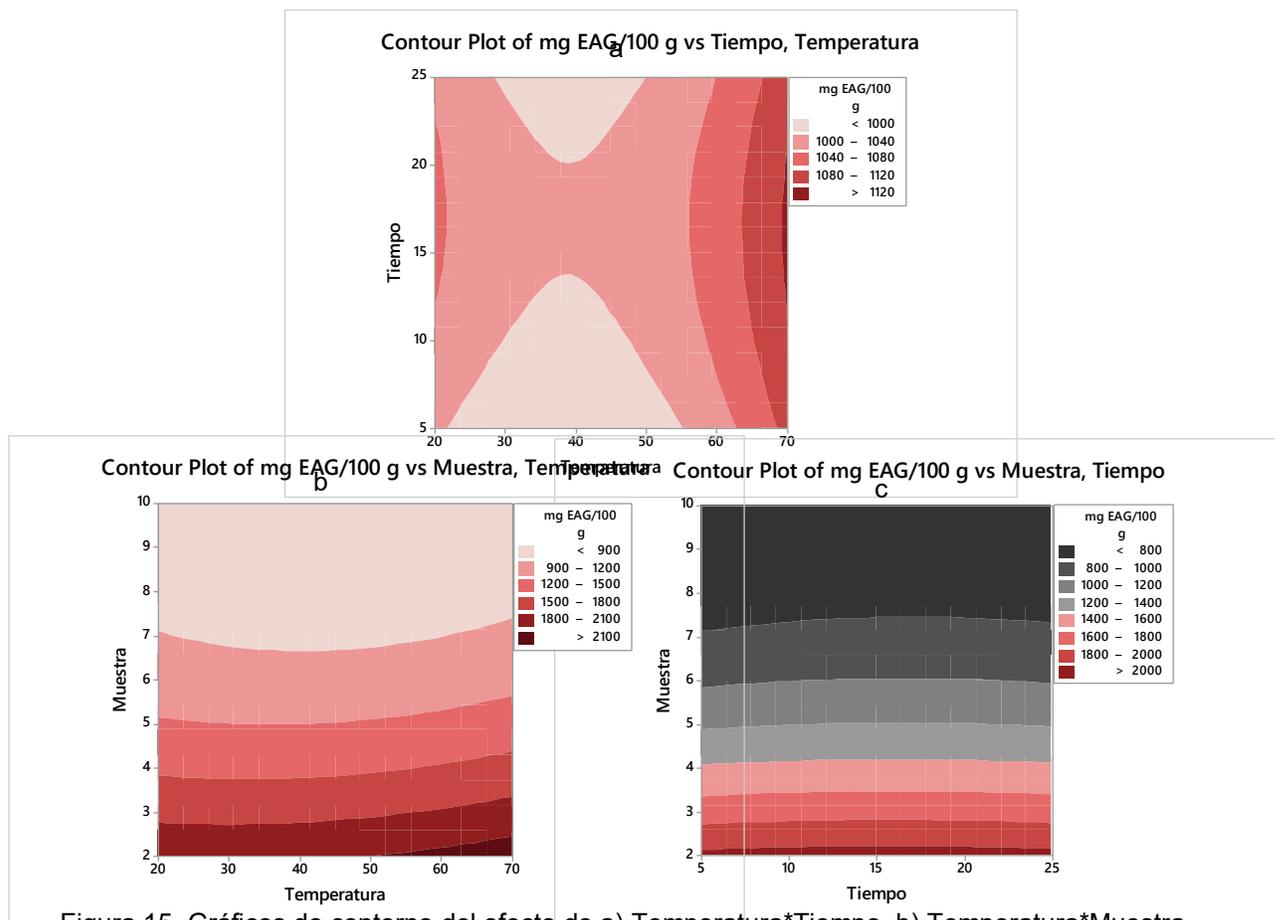


Figura 15. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre el contenido de fenoles totales, obtenido de la extracción de ajeno con ultrasonido

Algunos autores han reportado la eficiencia de utilizar altas temperaturas en la extracción con ultrasonido, este efecto se ha justificado por un aumento en el número de burbujas de cavitación y en el área de contacto sólido-solvente más grande, mejorando de la difusividad del solvente, con la mejora consiguiente de la desorción y la solubilidad de los compuestos de interés (Esclapez, García-Pérez, Mulet y Cárcel, 2011; Palma y Barroso, 2002; Sahin *et al.*, 2013; Shirsath, Sonawe y Gogate, 2012; Zhang *et al.*, 2008).

Sin embargo, este efecto disminuye cuando la temperatura está cerca del punto de ebullición del solvente lo cual podrían también afectar la actividad de los extractos debido a la degradación y pérdida de los compuestos fenólicos o que puedan reaccionar con otros componentes del material vegetal (Dorta, Lobo y González, 2012; Esclapez *et al.*, 2011; Palma y Barroso, 2002; Yap *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008). Estas condiciones permitieron, en su conjunto, obtener los mejores niveles de solubilidad, selectividad, estabilidad y accesibilidad del solvente hacia los compuestos antioxidantes.

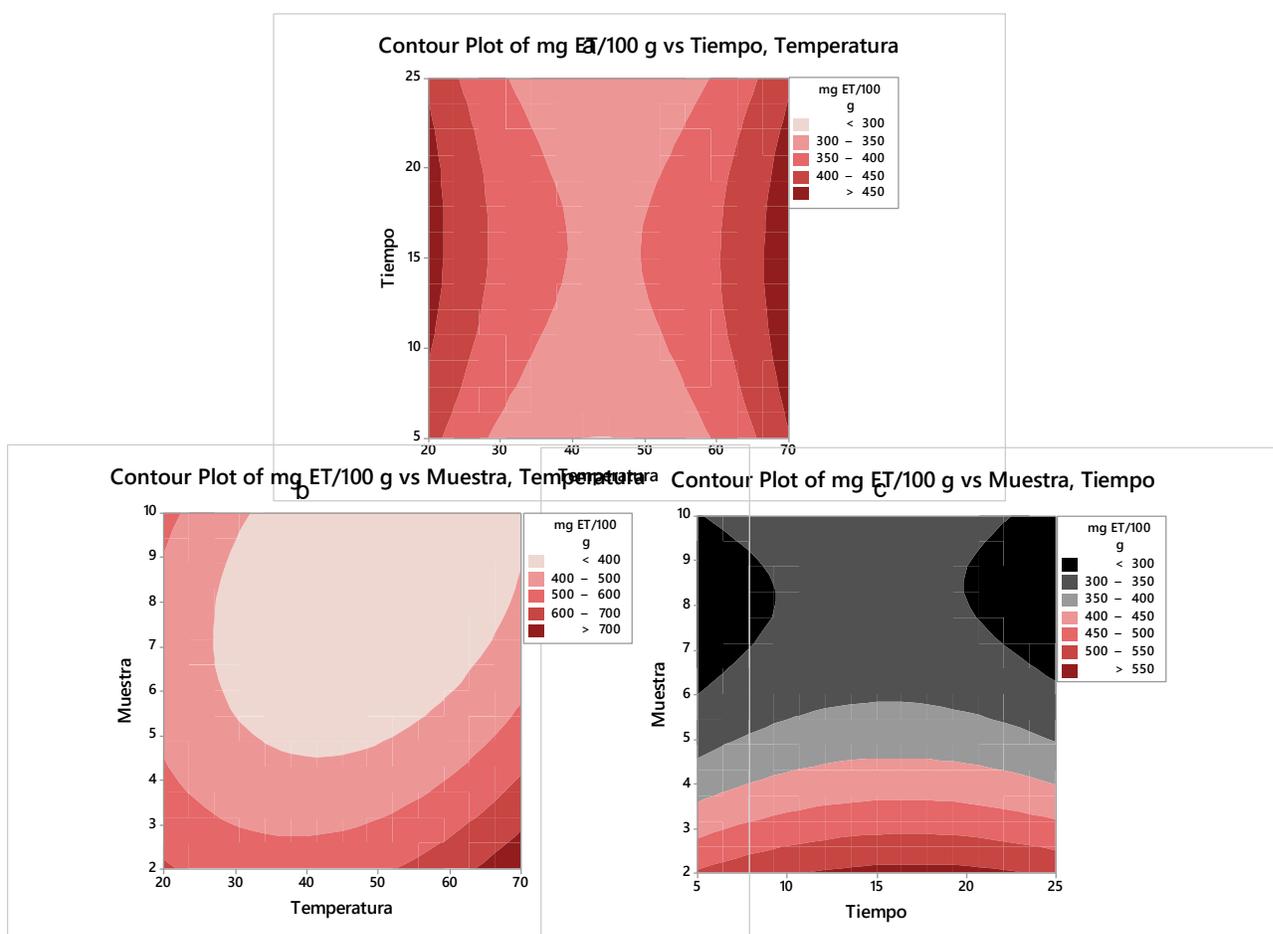


Figura 16. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por DPPH•, obtenida de la extracción de ajeno con ultrasonido

También se puede observar en la Figura 17c, el efecto significativo ($p < 0.05$) que tuvo la interacción tiempo-muestra (β_{BC}) sobre la actividad antioxidante determinada por FRAP, obteniéndose valores superiores a 500 mg EFe²⁺/100 g de muestra a menor concentración de muestra y mayor tiempo de exposición.

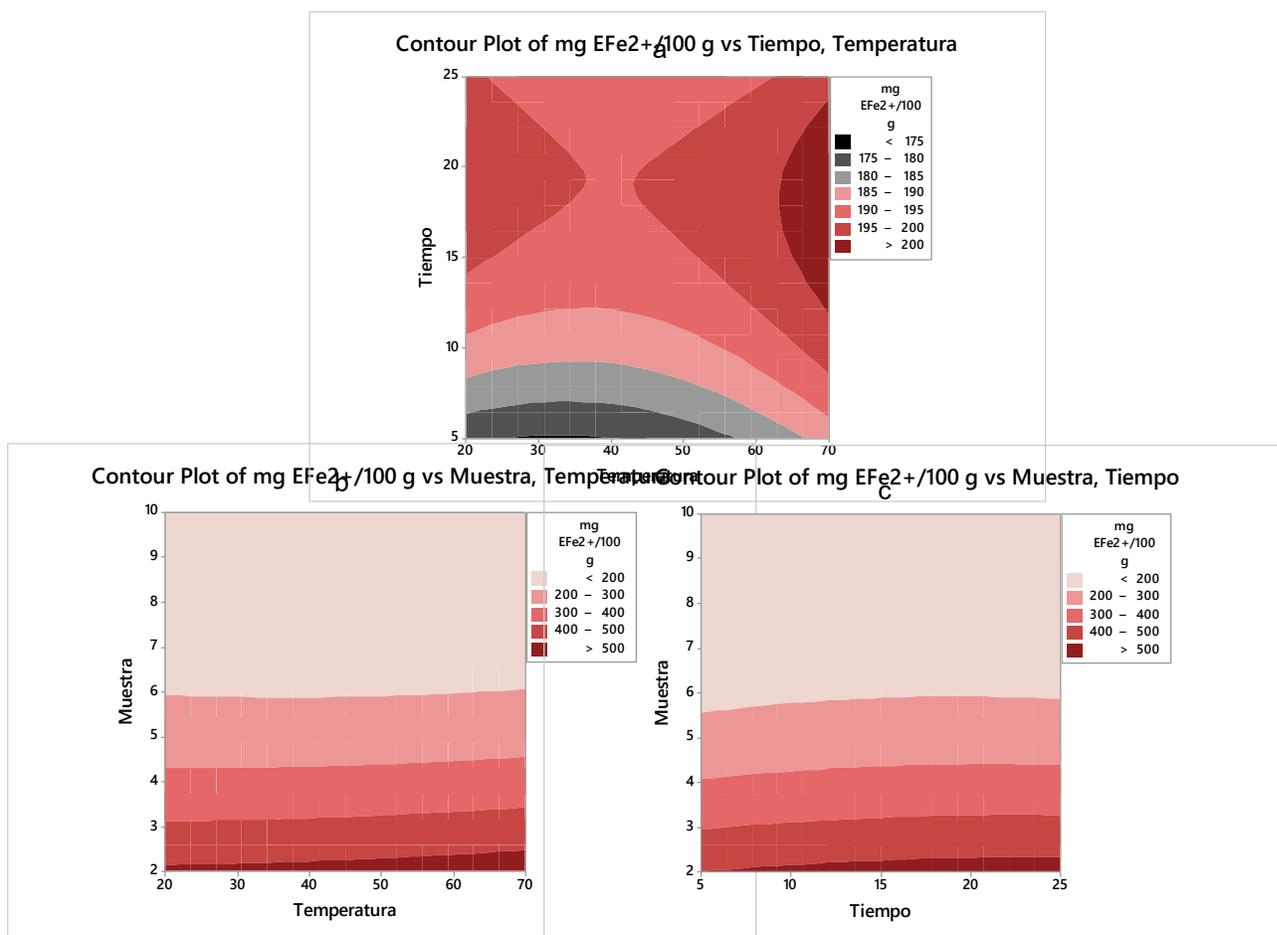


Figura 17. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por FRAP, obtenida de la extracción de ajenojo con ultrasonido

7.1.3.3 Optimización de las condiciones de extracción de ajenojo con ultrasonido y validación del modelo

Una vez obtenido el punto óptimo se llevó a cabo la reproducibilidad la cual se realizó por triplicado, bajo condiciones óptimas de 70°C de temperatura, 15 minutos y 2% de

muestra. Se realizó la comparación de los valores predichos y experimentales (Tabla 17), correspondientes a fenoles totales y actividad antioxidante de la extracción de ajeno con ultrasonido. De acuerdo al análisis estadístico, no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre los valores predichos y el experimentales de fenoles totales, DPPH• y FRAP, lo cual indica que los modelos formulados en el presente estudio permiten predecir con precisión los valores experimentales y ser reproducibles

Tabla 17. Valores óptimos predichos y experimentales, de la extracción de ajeno con ultrasonido

Análisis	Valor predicho	Valor experimental
Fenoles totales (mg EAG/100 g)	2301.3	2299.3±8.6
DPPH• (mg ET/100 g)	819.4	818.2±4.8
FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	553.3	551.6±3.8

7.1.3.4 Correlación entre fenoles totales y actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP de extractos ultrasonificados de ajeno

Para tener una idea del mecanismo de acción de los antioxidantes se deben establecer correlaciones entre el contenido de fenoles y los diversos ensayos antioxidantes (Mesa *et al.*, 2015). La correlación entre la actividad antioxidante medida por DPPH• y fenoles totales fue de $R^2=0.6541$ (Figura 18a), expresada en un 65.41% la concentración de fenoles contra la actividad antioxidante. Mientras que la regresión lineal entre FRAP y fenoles totales describe fuertemente en un 98.12% ($R^2=0.9812$) el fenómeno oxidativo (Figura 18b); de tal manera que la mayoría de los compuestos fenólicos contenidos en los extractos ultrasonificados de ajeno, se expresan muy bien como agentes reductores que reaccionan fundamentalmente mediante un mecanismo de transferencia de electrones.

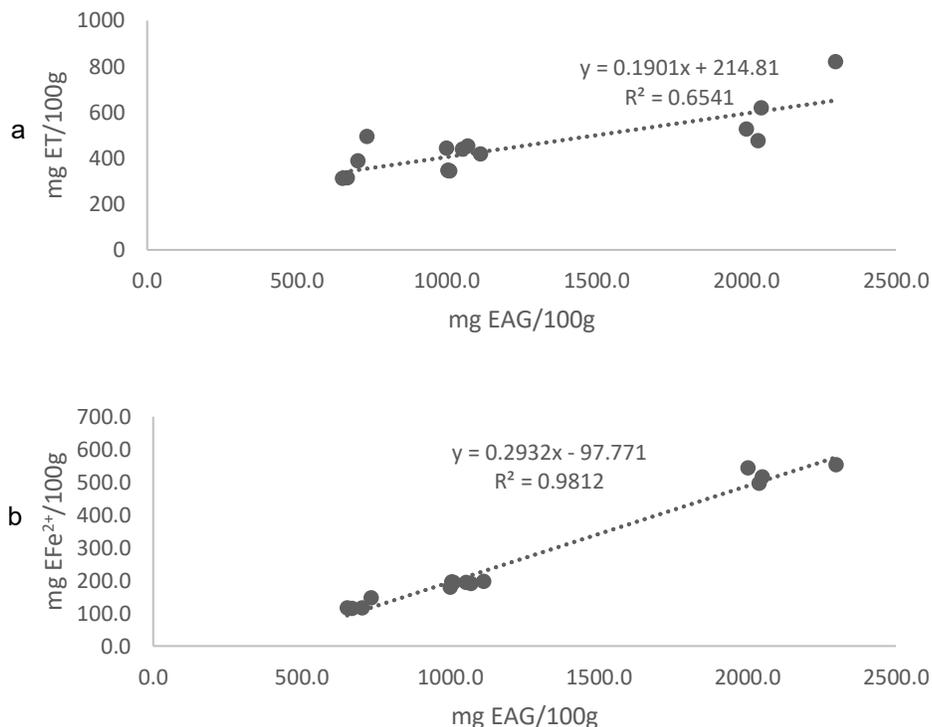


Figura 18. Correlación entre fenoles totales vs a) DPPH• y b) FRAP de la extracción de ajenojo con ultrasonido

7.1.4 Extracción de aranthó con ultrasonido

7.1.4. Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de extractos ultrasonificados de aranthó

En la Tabla 18, se plasman los resultados de la liberación de compuestos fenoles y antioxidantes de la extracción de aranthó con ultrasonido a partir de los 15 experimentos obtenidos del DBB. Los resultados de fenoles totales oscilaron entre 1257.7 y 2971 mg EAG/ 100 g, mientras que la actividad antioxidante de los extractos analizados con la metodología DPPH•, osciló entre 292.4 y 1215.8 mg ET/100 g para ambas determinaciones el valor más alto, se obtuvo con una concentración de muestra al 2%, manteniéndose a una temperatura de 70° C, durante 15 minutos, lo cual se

relaciona a lo obtenido por Xu *et al.*, (2017), en donde observaron que al aumentar el tiempo de sonicación de *Limonium sinuatum* por encima de los 15 minutos había una degradación de los compuestos. Para la capacidad antioxidante determinada mediante la metodología la FRAP los valores más altos fueron 553.2 y 633.6 mg EFe²⁺/ 100g obteniéndose con 2% de muestra ambos, pero con una temperatura de 45 y 70°C, así como una exposición de 5 y 15 minutos respectivamente. La temperatura fue un factor importante en la liberación de compuestos, lo cual se ha descrito por otros autores, quienes al incrementar la temperatura mejora la extracción de compuestos (García *et al.*, 2015; Rodríguez, Franco, Sánchez, Zapata y Vázquez, 2014; Turkmen, Sari y Velioglu, 2006; Yang *et al.*, 2009).

Tabla 18. Valores de fenoles totales y actividad antioxidantes por DPPH•, FRAP en extractos acuosos de arañthó mediante extracción con ultrasonido

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Muestra (g/100 g)	Fenoles totales (mg EAG/100 g)		DPPH• (mg ET/100 g)		FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	
			Media	SD	Media	SD	Media	SD
45	15	6	1257.7	5.7	705.4	1.9	166.6	3.1
45	15	6	1258.4	8.6	708.7	9.5	165.0	1.4
45	15	6	1261.3	6.1	705.4	1.9	165.6	2.5
45	5	10	2071.7	1.1	508.7	3.1	109.9	1.1
70	15	2	2971.0	2.3	1215.8	9.6	553.2	2.4
70	15	10	2187.6	5.2	506.7	0.7	135.2	1.4
20	15	10	1845.1	0.9	447.6	1.8	132.8	2.5
70	5	6	1684.6	1.9	292.4	2.2	149.9	1.1
45	5	2	2556.4	4.7	669.4	8.6	633.6	2.4
45	25	10	2019.9	5.3	506.5	3.4	111.1	1.1
20	5	6	1616.8	9.6	643.4	10.1	182.9	0.6
45	25	2	1887.0	5.7	968.7	5.3	542.2	3.3
70	25	6	1908.1	1.9	574.5	5.1	219.8	2.2
20	15	2	1910.0	2.3	848.9	7.8	476.5	5.8
20	25	6	1380.1	4.8	715.5	7.7	164.3	1.0

(n=3 ± SD: Desviación estándar)

En cuanto al tiempo de sonicación se vio que los mayores valores para las tres técnicas se obtuvieron a no más de 15 minutos, esto se debe a que el ultrasonido permite mayores rendimientos de extracción en periodos más cortos de tiempo y en cambio un tiempo mayor con ultrasonido podría inducir a la degradación de compuestos debido al colapso asimétrico continuo de las microburbujas (Prakash, Manikandan, Thirugnanasambandham, Vigna y Dinesh, 2013; Ying, Han, Li, 2011;).

Existe evidencia en un estudio con extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) que sugiere que la mayoría de los compuestos antioxidantes y fenólicos son extraídos a los 15 minutos de sonicación (Albu, Joyce, Paniwnyk, Lorimer, Mason, 2004).

7.1.4.2 Efecto de las condiciones de extracción sobre la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes de aranthó a partir de extracción con ultrasonido

La Tabla 19, muestra los polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del DBB de fenoles totales y la actividad antioxidante determinada por DPPH• y FRAP, de la extracción con ultrasonido de aranthó. En relación a los coeficientes de correlación determinados en los polinomios, fueron superiores a 95% para las FRAP y fenoles totales, mientras que para DPPH• fue mayor al 90%, lo que indican que es factible utilizar este diseño de experimentos para optimizar las condiciones físicas de extracción con ultrasonido de compuestos con propiedades antioxidantes presentes en *D. bicolor*.

Tabla 19. Polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del diseño de experimentos Box-Behnken para los extractos de aranthó ultrasonificados

Análisis	R ²	Polinomios
Fenoles totales	0.95	4095 - 20.9 A - 97.1 B - 560.4 C + 0.386 A*A + 1.468 B*B + 45.49 C*C + 0.460 A*B - 1.796 A*C + 3.86 B*C
DPPH•	0.91	497 + 5.4 A + 46.2 B - 49.5 C - 0.047 A*A - 1.207 B*B + 4.85 C*C + 0.210 A*B - 0.769 A*C - 1.88 B*C
FRAP	0.98	928 + 1.11 A - 13.68 B - 177.2 C - 0.0090 A*A + 0.191 B*B + 10.27 C*C + 0.0885 A*B - 0.186 A*C + 0.579 B*C

Donde: A=Temperatura (°C), B= Tiempo (min) y C = Concentración de muestra (g/100 g)

En la Tabla 20, se muestran los coeficientes de regresión y diferencias significativas obtenidos de la ecuación polinómica, se consideran que influyen de manera estadísticamente significativa sobre la respuesta aquellos con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 20. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden, para fenoles totales, DPPH• y FRAP de la extracción de aranthó con ultrasonido

Factor	Coeficiente de regresión		
	Fenoles totales	DPPH•	FRAP
β_0	1259	706.5	165.7
Lineal			
β_A	249.9 ^d	-8.3	12.7
β_B	-91.8	81.4	-4.8
β_C	-150 ^d	-216.7 ^d	-214.6 ^a
Cuadrático			
β_{AA}	241.5 ^d	-29.3	-5.6
β_{BB}	146.8	-120.7	19.1
β_{CC}	727.8 ^b	77.6	164.3 ^a
Interacción			
β_{AB}	115.1	52.5	22.1
β_{AC}	179.6	-76.9	-18.6
β_{BC}	154.4	-75.4	23.1

Nivel de significancia: ^ap<0.0001, ^bp<0.001, ^cp<0.01, ^dp<0.05

El factor temperatura influyó significativamente en la liberación de compuestos fenólicos en su término lineal (β_A) y cuadrático (β_{AA}) ($p<0.05$), lo cual se puede observar en los gráficos de contorno de la Figuras 19a y 19b, donde se liberaron más compuestos a mayores temperaturas.

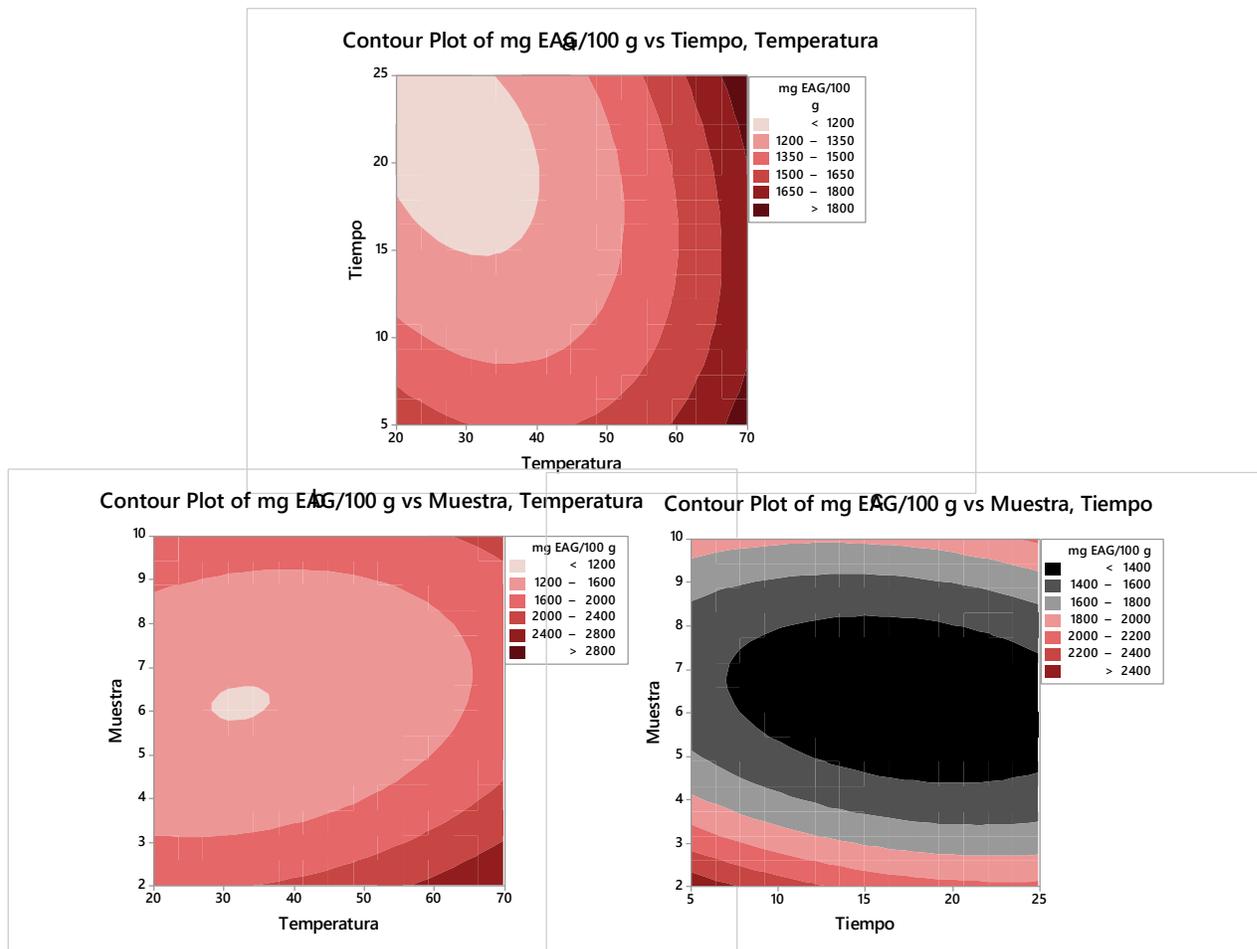


Figura 19. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre el contenido de fenoles totales, obtenido de la extracción de aranthó con ultrasonido

En cuanto al factor muestra, influyó significativamente en su término lineal (β_c) en la liberación de compuestos fenólicos y DPPH• ($p < 0.05$), así como mostró una mayor influencia en la determinación FRAP tanto linealmente como cuadrática a $p < 0.0001$. Siendo innecesario una gran cantidad de muestra, ya que concentraciones de muestra de 2% permitieron la mayor liberación de compuestos (Figura 19, 20 y 21). Por su parte el factor tiempo, así como las interacciones entre factores no mostraron influir significativamente en la extracción.

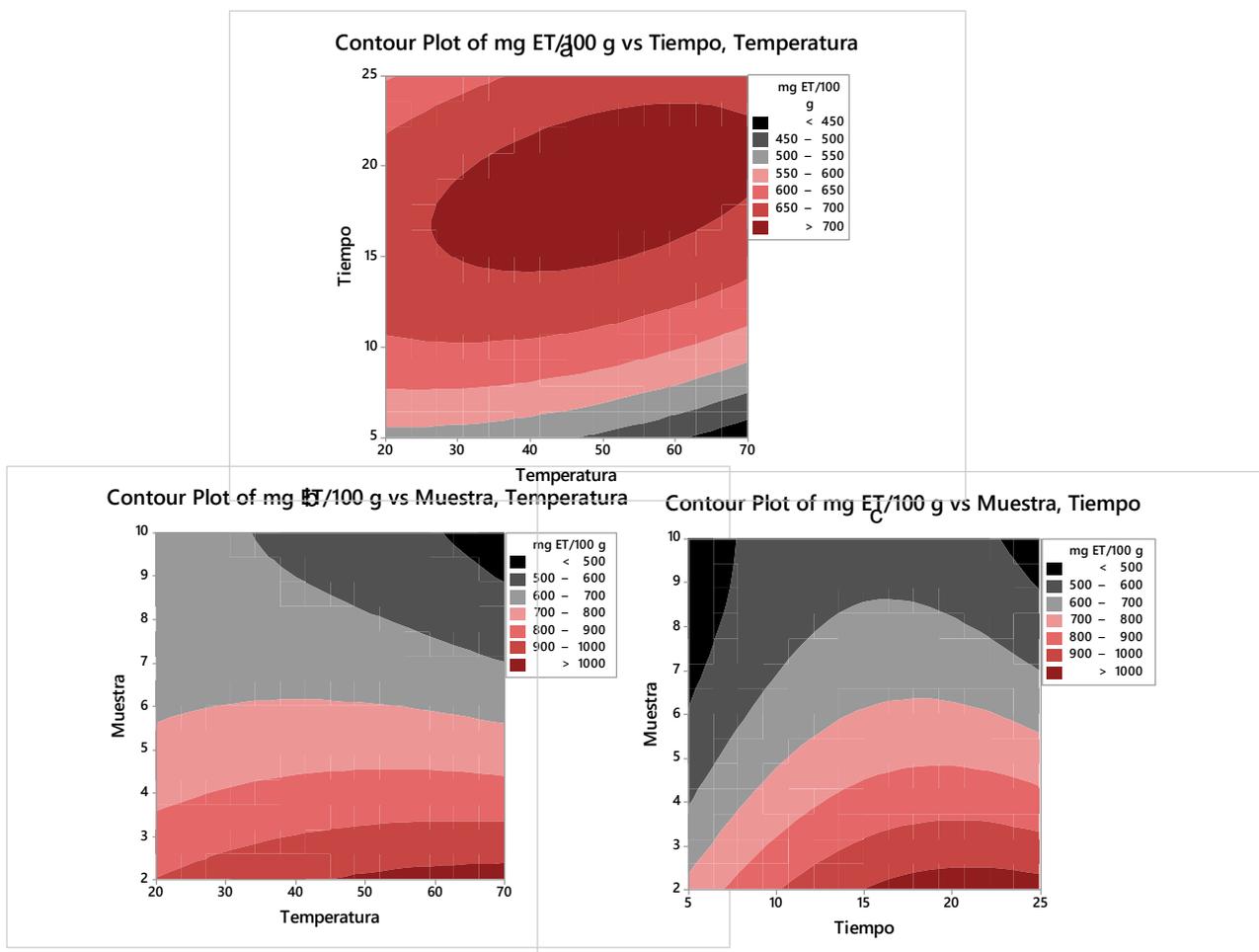


Figura 20. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por DPPH[•], obtenida de la extracción de arañthó con ultrasonido

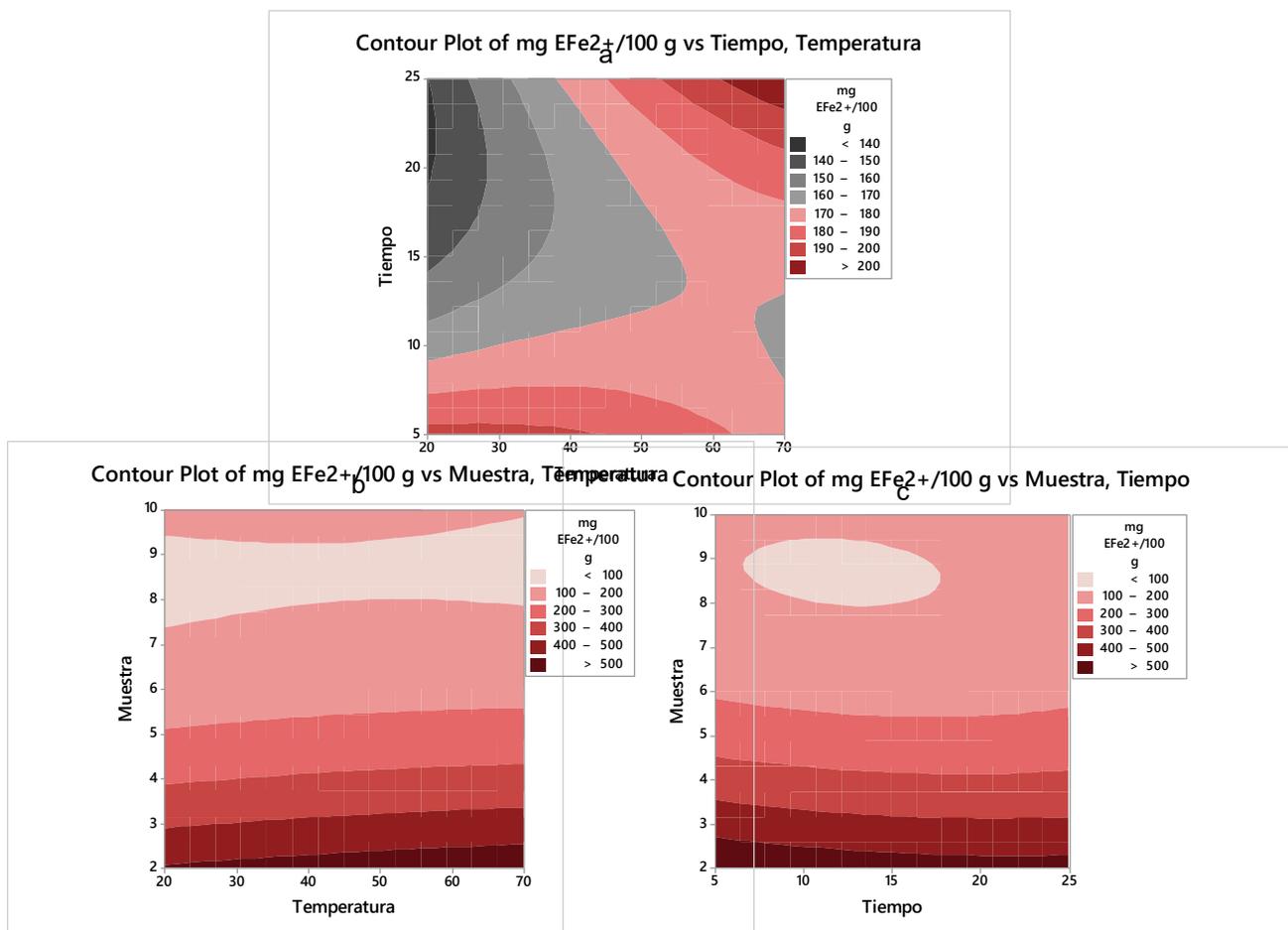


Figura 21. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por FRAP, obtenida de la extracción de aranthó con ultrasonido

7.1.4.3 Optimización de las condiciones de extracción de aranthó con ultrasonido y validación del modelo

Para obtener los valores óptimos en las tres metodologías empleadas, (fenoles totales, DPPH• y FRAP), en la extracción de aranthó con ultrasonido, se deben exponer los extractos de ajenjo a 70°C, durante 15 minutos con una concentración de muestra de 2%. Al comparar los valores predictivos y experimentales resultantes de la optimización no se encontraron diferencias significativas entre si ($p > 0.05$) representando valores similares, lo cual permite validar el modelo y que los valores experimentales sean reproducibles (Tabla 21).

Tabla 21. Valores óptimos predichos y experimentales, de la extracción con ultrasonido de aranthó

Análisis	Valor predicho	Valor experimental
Fenoles totales (mg EAG/100 g)	2973.4	2971.0±2.3
DPPH• (mg ET/100 g)	1215.9	1215.8±9.6
FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	554.9	553.2±2.4

7.1.4.4 Correlación entre fenoles totales y actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP de extractos ultrasonificados de aranthó

En los últimos años, la identificación de compuestos fenólicos de extractos de diferentes plantas se ha convertido en un área importante de la investigación en salud, relacionada con la nutrición, debido a sus potentes propiedades antioxidantes, su abundancia en la dieta y efectos en la prevención de diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo (Dai y Mumper, 2010). La Figura 22, se muestra la correlación entre la actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP en relación al contenido de fenoles totales. Para la capacidad antioxidante determinada por el método DPPH• se obtuvo una $R^2=0.104$ (Figura 22a) y para el método FRAP fue $R^2: 0.3627$ (Figura 22b), lo cual indicaría que después de haber expuesto los extractos acuosos de aranthó a ultrasonido disminuye el predominio de compuestos antioxidantes de tipo fenólico, pudiendo provenir esta actividad antioxidante de la presencia de otros metabolitos antioxidantes como vitaminas y alcaloides, entre otros (Gutiérrez, Pino y Cuesta, 2011).

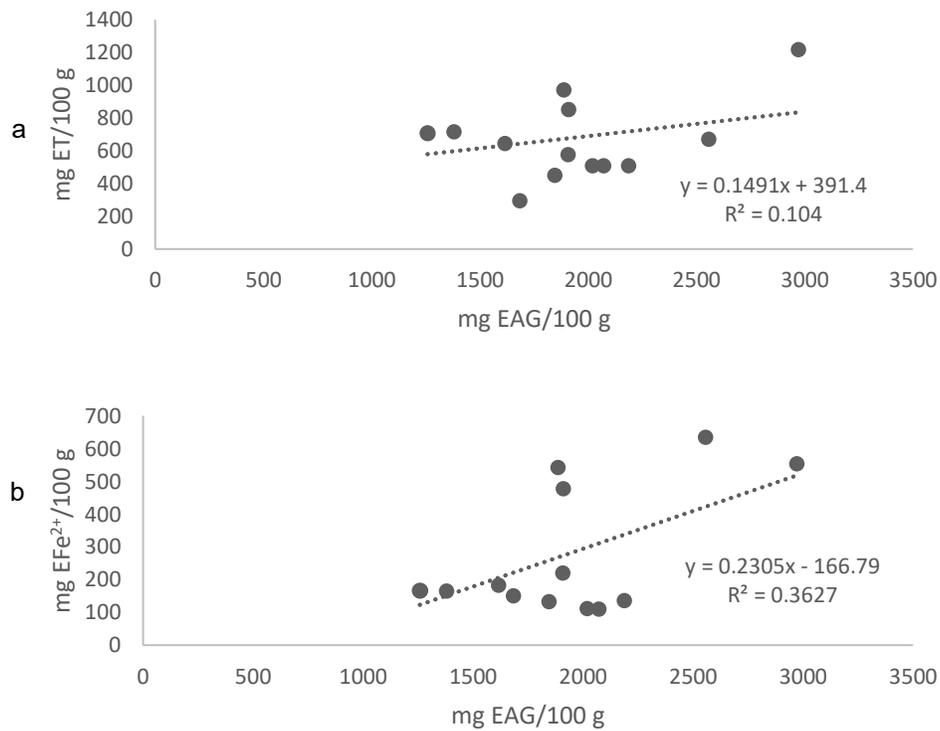


Figura 22. Correlación entre fenoles totales vs a) DPPH• y b) FRAP de la extracción de aranthó con ultrasonido

7.1.5 Extracción de ajeno con microondas

7.1.5.1 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de la extracción de ajeno con microondas

Tras la realización de las determinaciones de fenoles totales y actividad antioxidante en los 15 experimentos obtenidos del DBB, de la extracción de ajeno con microondas, los resultados se muestran en la Tabla 22. Todos los extractos analizados mediante DPPH• mostraron valores de 399-930.7 mg ET/100 g. Los valores más altos (884.2 y 942.5 mg ET/100 g) se obtuvieron bajo condiciones de 2% de muestra, extraídos a 40 y 30% de potencia durante 1.5 y 2 minutos, respectivamente.

Tabla 22. Valores de fenoles totales y actividad antioxidantes por DPPH•, FRAP en extractos acuosos de ajonjolillo mediante extracción con microondas

Potencia (%)	Tiempo (min)	Muestra (g/100 g)	Fenoles totales (mg EAG/100 g)		DPPH• (mg ET/100 g)		FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	
			Media	SD	Media	SD	Media	SD
30	2	2	2439.3	2.9	942.5	4.3	612.7	4.9
20	1.5	10	634.1	2.3	399.0	1.8	115.9	1.4
20	1	6	1057.5	2.9	475.4	2.3	164.8	1.1
40	1.5	10	684.3	2.5	500.0	3.5	134.2	0.8
20	2	6	1054.1	1.9	466.3	14.0	181.3	1.4
30	2	10	670.7	1.4	489.0	2.5	117.2	0.9
40	1.5	2	2390.0	8.6	884.2	6.8	674.1	4.8
40	2	6	1039.1	7.1	588.6	0.8	204.5	0.8
30	1.5	6	1056.3	2.8	503.8	0.7	200.2	1.8
30	1.5	6	1058.1	2.4	497.0	3.8	199.9	0.5
30	1.5	6	1056.1	1.0	499.7	5.5	199.7	1.9
30	1	2	2002.9	2.9	720.9	2.9	539.1	2.5
20	1.5	2	2129.2	2.9	767.6	2.3	532.0	1.9
40	1	6	1032.3	6.2	544.4	3.4	176.4	1.3
30	1	10	640.9	4.9	401.4	3.0	109.9	0.4

(n=3 ± SD: Desviación estándar)

Respecto al contenido de compuestos antioxidantes de los extractos determinados por FRAP, los valores se encontraron entre 109.9 y 674.1 mg EFe²⁺/100 g. El valor más alto correspondió al extracto obtenido a 40° C durante 1.5 minutos, con una concentración de muestra de 2%, siendo estas condiciones las mismas con las cuales se obtuvo el segundo valor más alto de compuestos antioxidantes determinados por la técnica DPPH•, lo que podría indicar que el incremento de la temperatura favorece la liberación de compuestos que pueden llevar a cabo reacciones de óxido-reducción.

Al analizar la actividad antioxidante de los extractos mediante la determinación de fenoles totales, el valor más alto fue de 2439.3 mg EAG/100 g, el cual se obtuvo bajo las mismas condiciones del valor más alto para la técnica DPPH•, a 30% de potencia, durante 2 minutos con 2% de muestra. En contraste a esto en un estudio realizado por Ballard et al., (2010) encontraron que aplicar una mayor potencia de microondas por un corto tiempo puede ser la forma más efectiva para extraer compuestos fenólicos de vegetales usando microondas, ya que la prolongación del tiempo de irradiación con una mayor potencia de microondas puede conducir a la generación térmica y por ende

a la degradación de los fenoles; por lo cual la potencia debe elegirse correctamente para evitar temperatura excesiva, lo que podría conducir a la degradación y sobrepresión del soluto dentro del recipiente (Mandal, Mohan y Hemaltha, 2007).

7.1.5.2 Efecto de las condiciones de extracción sobre la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes de ajeno a partir de extracción con microondas

Los coeficientes de regresión obtenidos del DBB de la actividad antioxidante mediante extracción de ajeno con microondas, dieron resultados mayores a 95% para todos los métodos utilizados para determinar la capacidad antioxidante, por lo cual este diseño de experimento resulta apropiado para optimizar las condiciones de extracción con ultrasonido de compuestos antioxidantes y fenoles totales de ajeno (Tabla 23).

Tabla 23. Polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del diseño de experimentos Box-Behnken para la extracción de ajeno con microondas

Análisis	R2	Polinomios
Fenoles totales	0.99	$2061 + 9.7 A + 585 B - 378.6 C + 0.014 A^*A - 50 B^*B + 25.07 C^*C + 0.51 A^*B - 1.32 A^*C - 54.3 B^*C$
DPPH•	0.98	$924 - 4.5 A - 3 B - 116.9 C + 0.104 A^*A + 32.6 B^*B + 7.95 C^*C + 2.66 A^*B - 0.097 A^*C - 15.3 B^*C$
FRAP	0.99	$452 + 5.91 A + 285 B - 146.0 C + 0.003 A^*A - 73.9 B^*B + 10.204 C^*C + 0.58 A^*B - 0.759 A^*C - 8.28 B^*C$

Donde: A=Potencia (°C), B= Tiempo (min) y C = Concentración de muestra (g/100 g)

El análisis de coeficientes de regresión, y sus diferencias significativas se muestran en la Tabla 24. Tanto el factor potencia (β_A), así como el tiempo (β_B) influyeron significativamente ($p < 0.05$) en su forma lineal en la liberación de compuestos antioxidantes de vía radical y de óxido-reducción. Lo cual es evidenciado por los gráficos de contorno de las Figuras 24a y 25a, en donde a potencias mayores a 35%, así como un tiempo mayor de 1.5 minutos se genera una mayor liberación de estos compuestos. Lo cual concuerda con lo encontrado por Yoeh, Shi y Langrish (2008), en donde la extracción de los componentes aumento gradualmente con el incremento del

tiempo de extracción. Este factor fue clave en la extracción de compuestos antioxidantes al utilizar el microondas, por lo cual es necesario seleccionar un tiempo de irradiación adecuado para asegurar la máxima extracción, ya que una exposición excesiva en el campo de microondas puede causar la degradación de los mismos (Prakash, Sivakumar, Thirugnanasambandham y Sridhar, 2013; Xianzhe, Fangping, Chenghai y Xiangwen, 2011).

Tabla 24. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden, para fenoles totales, DPPH• y FRAP de la extracción de ajeno con microondas

Factor	Coeficiente de regresión		
	Fenoles totales	DPPH•	FRAP
β_0	1056.9	500.2	199.9
Lineal			
β_A	33.0	51.1 ^d	24.12 ^d
β_B	62.2	41.6 ^d	15.68 ^d
β_C	-749.9 ^a	-189.3 ^a	-234.81 ^a
Cuadrático			
β_{AA}	1.4	10.4	0.3
β_{BB}	-12.5	8.1	-18.5
β_{CC}	401.1 ^a	127.2 ^c	163.3 ^a
Interacción			
β_{AB}	2.5	13.3	2.9
β_{AC}	-52.6	-3.9	-30.4 ^d
β_{BC}	-108.7 ^d	-30.5	-16.6

Nivel de significancia: ^ap<0.0001, ^bp<0.001, ^cp<0.01, ^dp<0.05

Para las tres determinaciones la concentración de muestra influyó de manera altamente significativa a p<0.0001 en forma lineal (β_C), así como cuadrática (β_{CC}) a excepción para DPPH• (p<0.001). Mostrando la misma tendencia que con los métodos de extracción anteriores, a menor concentración de muestra se obtiene una mayor liberación de compuestos antioxidantes y fenólicos (Figura 23, 24 y 25). Lo cual probablemente se debió al hecho de que el volumen de disolvente de extracción es mayor, lo que causa un hinchamiento excesivo de la muestra y se absorben las microondas directamente por los tejidos de la planta, provocando que las paredes celulares se rompan, facilitando la liberación de los compuestos antioxidantes en el medio circundante (Guo *et al.*, 2001b; Prakash *et al.*, 2013).

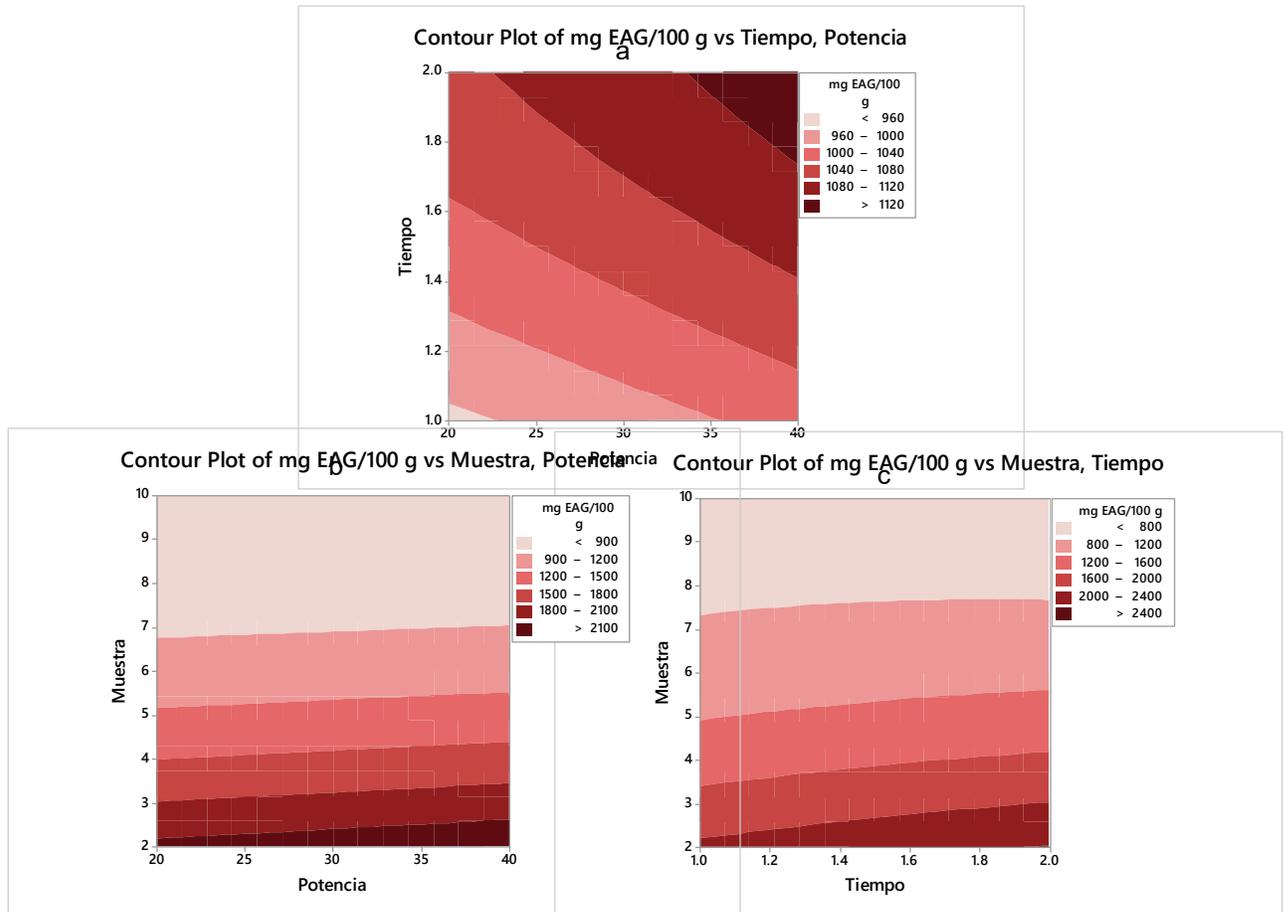


Figura 23. Gráficos de contorno del efecto de a) Potencia*Tiempo, b) Potencia*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre el contenido de fenoles totales, obtenido de la extracción de ajeno con microondas

Al interactuar el tiempo con la concentración de muestra (β_{BC}), generó impacto significativo ($p < 0.05$) en la liberación de fenoles totales, teniéndose una mayor liberación al aumentar gradualmente el tiempo de exposición y utilizar poca cantidad de muestra. Así mismo la potencia en conjunto con el factor muestra (β_{AC}), tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre FRAP, lo cual se evidencia en la Figura 25b, donde a una potencia mayor 30% y a 2% de muestra se obtienen más de 600 $\text{Fe}^{2+}/100 \text{ g}$ de muestra. Cabe destacar que al aumentar simultáneamente la potencia y el tiempo de extracción se aumenta la temperatura del extracto acuoso.

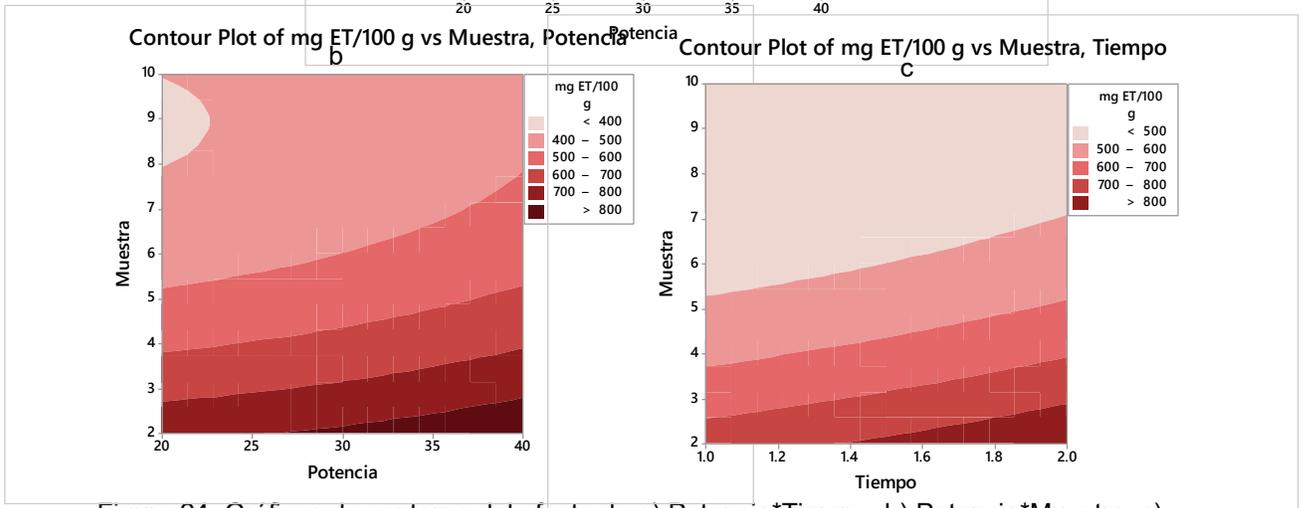
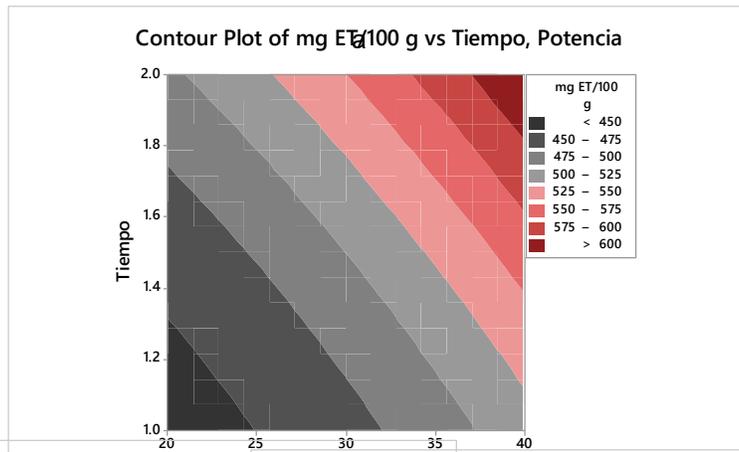


Figura 24. Gráficos de contorno del efecto de a) Potencia*Tiempo, b) Potencia*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por DPPH•, obtenida de la extracción de ajeno con microondas

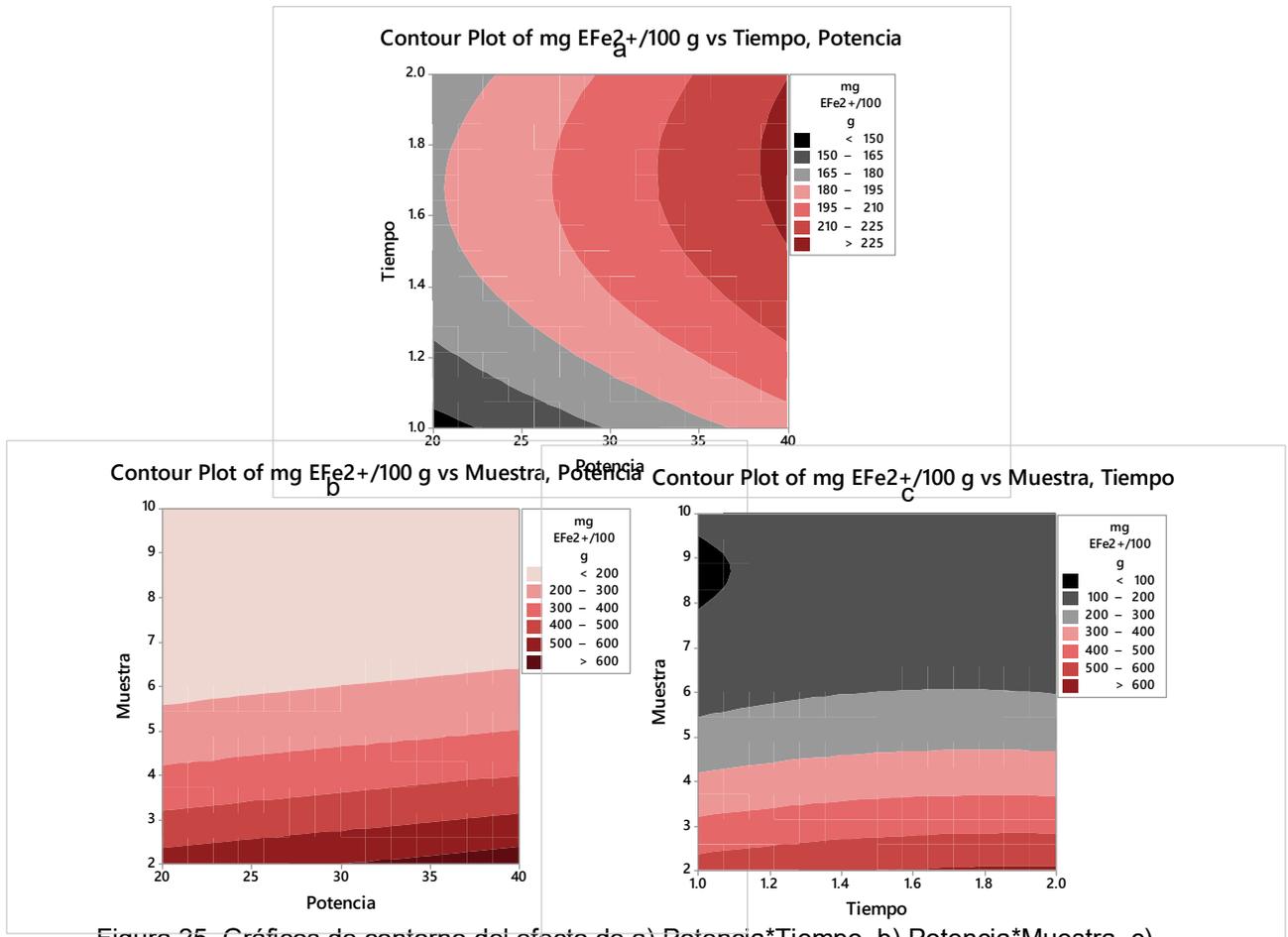


Figura 25. Gráficos de contorno del efecto de a) Potencia*Tiempo, b) Potencia*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por FRAP, obtenida de la extracción de ajeno con microondas

7.1.5.3 Optimización de las condiciones de extracción de ajeno con microondas y validación del modelo

Se procede a optimizar la respuesta final maximizando los resultados de los tres parámetros a analizar. Para obtener los valores óptimos en las tres metodologías empleadas, (fenoles totales, DPPH• y FRAP), la extracción de ajeno con microondas se debe realizar bajo condiciones de 40% de potencia, durante 2 minutos a una concentración de muestra de 2%.

Se realizó la extracción bajo las condiciones antes señaladas, y se compararon los

valores predichos y experimentales (Tabla 25), para así validar el modelo. En ninguna de las tres metodologías se observan diferencias significativas ($p>0.05$) entre el valor estimado y el valor experimental, indicando que los modelos formulados son adecuados para optimizar la extracción de ajeno con microondas, así como la reproducibilidad de los valores experimentales.

Tabla 25. Valores óptimos predichos y experimentales, de la extracción de ajeno con microondas

Análisis	Valor predicho	Valor experimental
Fenoles totales (mg EAG/100 g)	2468.5	2467.4±2.9
DPPH• (mg ET/100 g)	932.3	930.7±4.3
FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	670.4	671.8±4.8

7.1.5.4 Correlación entre fenoles totales y la actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP de la extracción con microondas de ajeno

La correlación entre los compuestos antioxidantes de vía radical y fenoles totales fue de $R^2=0.9293$ (Figura 26a), mientras que la correlación entre los compuestos antioxidantes determinados por FRAP y fenoles fue de $R^2=0.9766$ (Figura 26b), lo cual expresa que más del 90% de la actividad antioxidante resultante de la extracción con microondas de ajeno proviene de compuestos fenólicos.

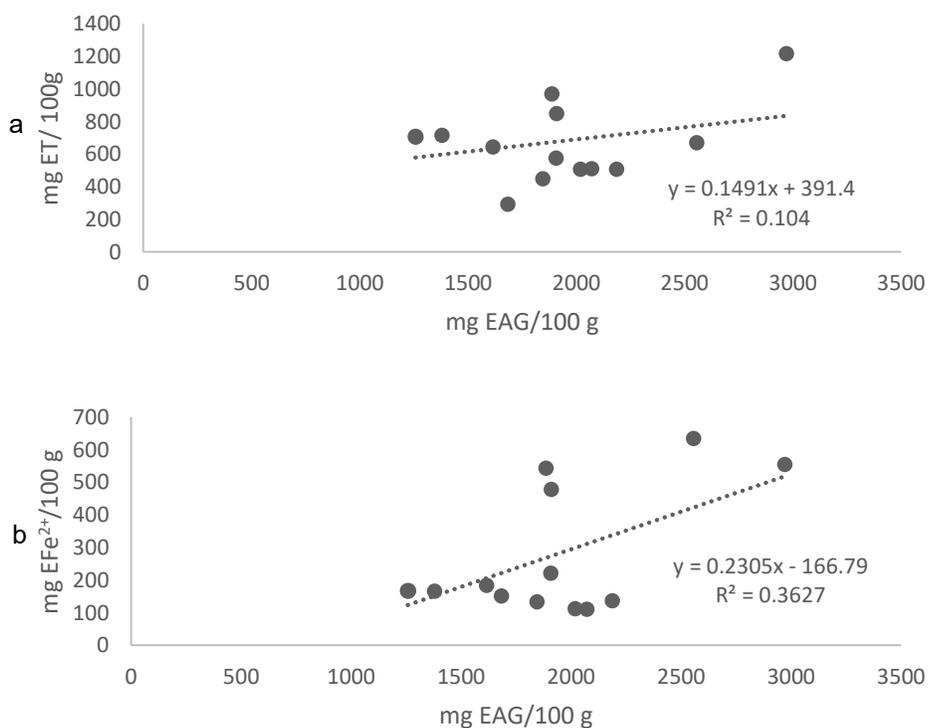


Figura 26. Correlación entre fenoles totales vs a) DPPH• y b) FRAP de la extracción de ajenojo con microondas

7.1.6 Extracción de aranthó con microondas

7.1.6.1 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de la extracción de aranthó con microondas

Se muestra en la Tabla 26, los resultados de fenoles totales y la actividad antioxidante determinada por las metodologías DPPH•, FRAP, de la extracción de aranthó con microondas. Los compuestos antioxidantes medidos por DPPH•, oscilaron entre 518 y 1514 mg ET/100 g, obteniéndose el valor más alto a partir de 2% muestra, extraído a 30% de potencia durante 2 minutos. Por lo que respecta a la capacidad antioxidante de los extractos determinada por FRAP, se mostraron valores de 129 a 733.3 mg EFe²⁺/100 g. Mientras que para fenoles totales los valores fueron de 712.3 a 3280.4

mg EAG/ 100 g. El valor más alto para ambas determinaciones se obtuvo utilizando 2% de muestra, 30% de potencia y 1 minuto de duración.

Estos resultados coinciden con lo obtenido por Dahmoune *et al.*, (2014) en donde se generó un incremento de la extracción de compuestos antioxidantes de hojas de *Pistacia lentiscus* durante 1 minuto de exposición, teniendo una reducción significativa después de los 2 minutos. Diversos autores reportan que el tiempo óptimo de exposición en microondas va de 0.5 - 1 minuto (Ballard *et al.*, 2010; Dahmoune *et al.*, 2015; Hayat *et al.*, 2009).

Tabla 26. Valores de fenoles totales y actividad antioxidantes por DPPH•, FRAP en extractos acuosos de aranthó mediante extracción con microondas

Potencia	Tiempo (min)	Muestra g/100 g	Fenoles totales (mg EAG/100 g)		DPPH• (Trolox/100 g)		FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	
			Media	SD	Media	SD	Media	SD
30	2	2	3152.7	2.4	1514.8	9.0	631.9	1.7
20	1.5	10	693.6	5.6	519.4	0.5	134.4	1.3
20	1	6	1135.1	3.9	748.9	1.0	212.1	3.9
40	1.5	10	715.6	6.2	522.0	0.5	129.0	1.3
20	2	6	1103.0	4.7	812.5	1.3	213.8	0.7
30	2	10	712.3	3.7	520.6	0.8	130.8	1.1
40	1.5	2	2879.0	8.6	1401.6	5.2	623.1	5.8
40	2	6	1226.6	5.8	841.5	3.9	215.1	0.8
30	1.5	6	1132.8	5.8	812.6	2.6	261.0	0.6
30	1.5	6	1139.2	4.4	771.2	1.7	263.2	1.8
30	1.5	6	1134.9	0.3	812.6	2.6	261.0	0.6
30	1	2	3280.4	5.8	1354.0	1.2	733.3	3.6
20	1.5	2	3217.2	2.9	1163.2	5.5	707.8	1.8
40	1	6	1224.5	8.6	802.7	4.9	254.9	0.4
30	1	10	719.6	2.8	518.0	0.3	129.7	0.9

(n=3 ± SD: Desviación estándar)

7.1.6.2 Efecto de las condiciones de extracción sobre la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes de aranthó a partir de extracción con microondas

La Tabla 27, muestra los polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del DBB de fenoles totales y la actividad antioxidante determinada por DPPH• y FRAP, de la extracción de aranthó con microondas. Los coeficientes de relación determinados en

los polinomios, presentaron una $R^2=0.99$ para todas las metodologías utilizadas para determinar antioxidantes y fenoles totales, lo cual indica que es factible optimizar las condiciones de extracción con microondas a las cuales se debe someter el arañthó para lograr la mayor extracción de compuestos antioxidantes y fenólicos.

Tabla 27. Polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del diseño de experimentos Box-Behnken para la extracción de arañthó con microondas

Análisis	R ²	Polinomios
Fenoles totales	0.99	5727 - 1.4 A - 942 B - 968.4 C - 0.266 A*A + 253 B*B + 47.96 C*C + 1.71 A*B + 2.25 A*C + 15.0 B*C
DPPH•	0.99	1044 + 36.6 A - 245 B - 135.3 C - 0.364 A*A + 156 B*B + 8.70 C*C - 1.24 A*B - 1.474 A*C - 19.8 B*C
FRAP	0.99	868 + 13.25 A + 131 B - 221.7 C - 0.228 A*A - 59.9 B*B + 9.980 C*C - 2.07 A*B + 0.496 A*C + 12.81 B*C

Donde: A=Potencia (°C), B= Tiempo (min) y C = Concentración de muestra (g/100 g)

En la Tabla 28, se plasman el análisis de regresión de los datos experimentales, los resultados indican que el factor muestra tuvo un efecto significativamente alto en las tres determinaciones en su término lineal (β_c) y cuadrático (β_{cc}) ($p<0.0001$), teniendo el mismo comportamiento que en ajeno, donde a menor concentración de muestra, mayor liberación de compuestos (Figura 27, 28 y 29).

Tabla 28. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden, para fenoles totales, DPPH• y FRAP de la extracción de arañthó con microondas

Factor	Coeficiente de regresión		
	Fenoles totales	DPPH•	FRAP
β_0	1135.6	760.4	261.7
Lineal			
β_A	-12.9	40.5	-5.76
β_B	-20.6	32.8 ^d	-17.30 ^d
β_C	-1211 ^a	-419.6 ^a	-271.50 ^a
Cuadrático			
β_{AA}	-26.6	-17.5	-22.8
β_{BB}	63.3	59.5	-15
β_{CC}	767.3 ^a	158.7 ^a	159.7 ^a
Interacción			
β_{AB}	8.5	-6.2	-10.4
β_{AC}	90.1	-59.0	19.8
β_{BC}	30.1	-38.8 ^d	25.6 ^d

Nivel de significancia: ^a $p<0.0001$, ^b $p<0.001$, ^c $p<0.01$, ^d $p<0.05$

La actividad antioxidante determinada por DPPH• y FRAP, tuvieron una influencia significativa por parte del factor tiempo (β_B) a $p < 0.05$, así como al interactuar el tiempo con la concentración de muestra (β_{BC}) genera un efecto en dichas determinaciones, lo cual se puede observar en las Figuras 28c y 29c. En el caso de DPPH•, al exponer durante 1.8 a 2 minutos los extractos utilizando 2% de concentración se tiene la mayor liberación de compuestos (Figura 28c), mientras que para FRAP en tiempos de 1 a 1.2 minutos con la misma concentración (Figuras 29c). En este caso, según Camel, (2001) cuando el microondas se usa para extracción, el agua es un parámetro clave ya que las microondas interactúan con las moléculas de agua presentes en las glándulas celulares y vasculares de la matriz biológica de la planta, lo que lleva a un rápido calentamiento y aumento de la temperatura en un corto periodo de tiempo.

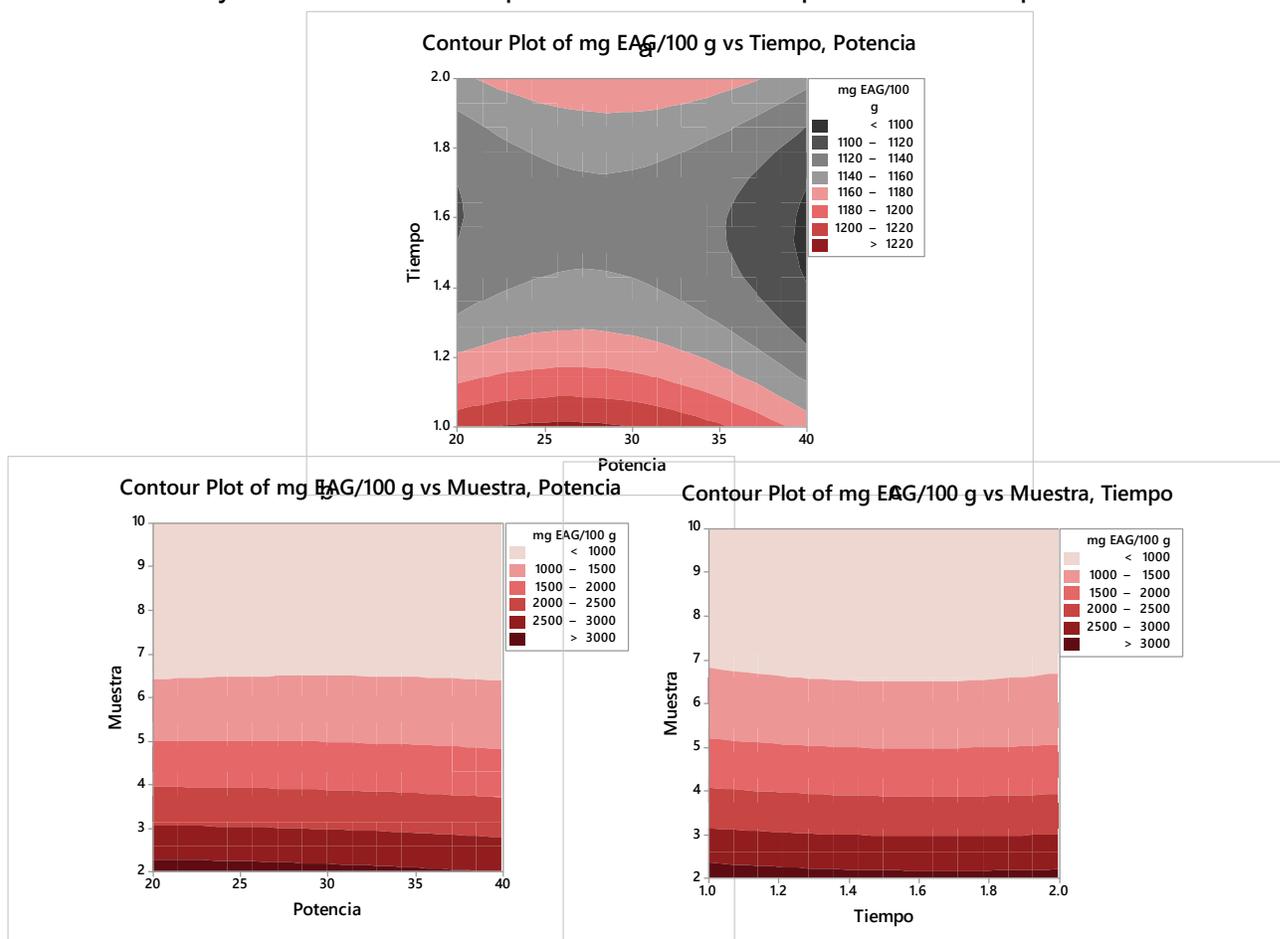


Figura 27. Gráficos de contorno del efecto de a) Potencia*Tiempo, b) Potencia*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre el contenido de fenoles totales, obtenido de la extracción de aranthó con microondas

A pesar que la potencia no influyó significativamente en la liberación de fenoles y en compuestos antioxidantes en la extracción asistida por microondas, la potencia de microondas es una de las variables clave que afecta la liberación de fenoles de diferentes matrices mediante la ruptura de la celda de la pared, así como también tiene la capacidad de modificar el equilibrio y las condiciones de transferencia de masa durante la extracción (Dahmoune, Nayak, Moussi, Remimi y Madani, 2015).

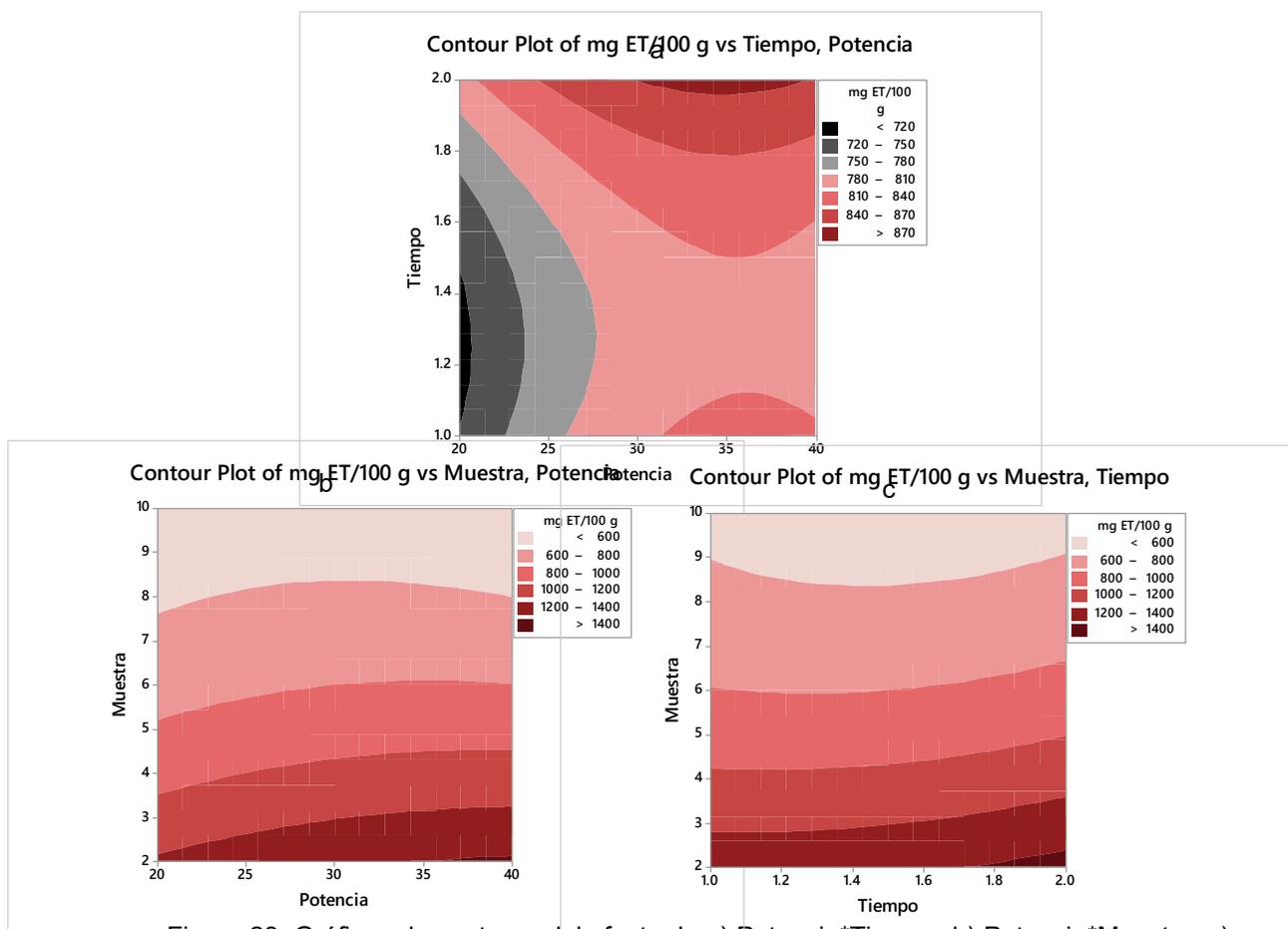


Figura 28. Gráficos de contorno del efecto de a) Potencia*Tiempo, b) Potencia*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por DPPH•, obtenida de la extracción de aranthó con microondas

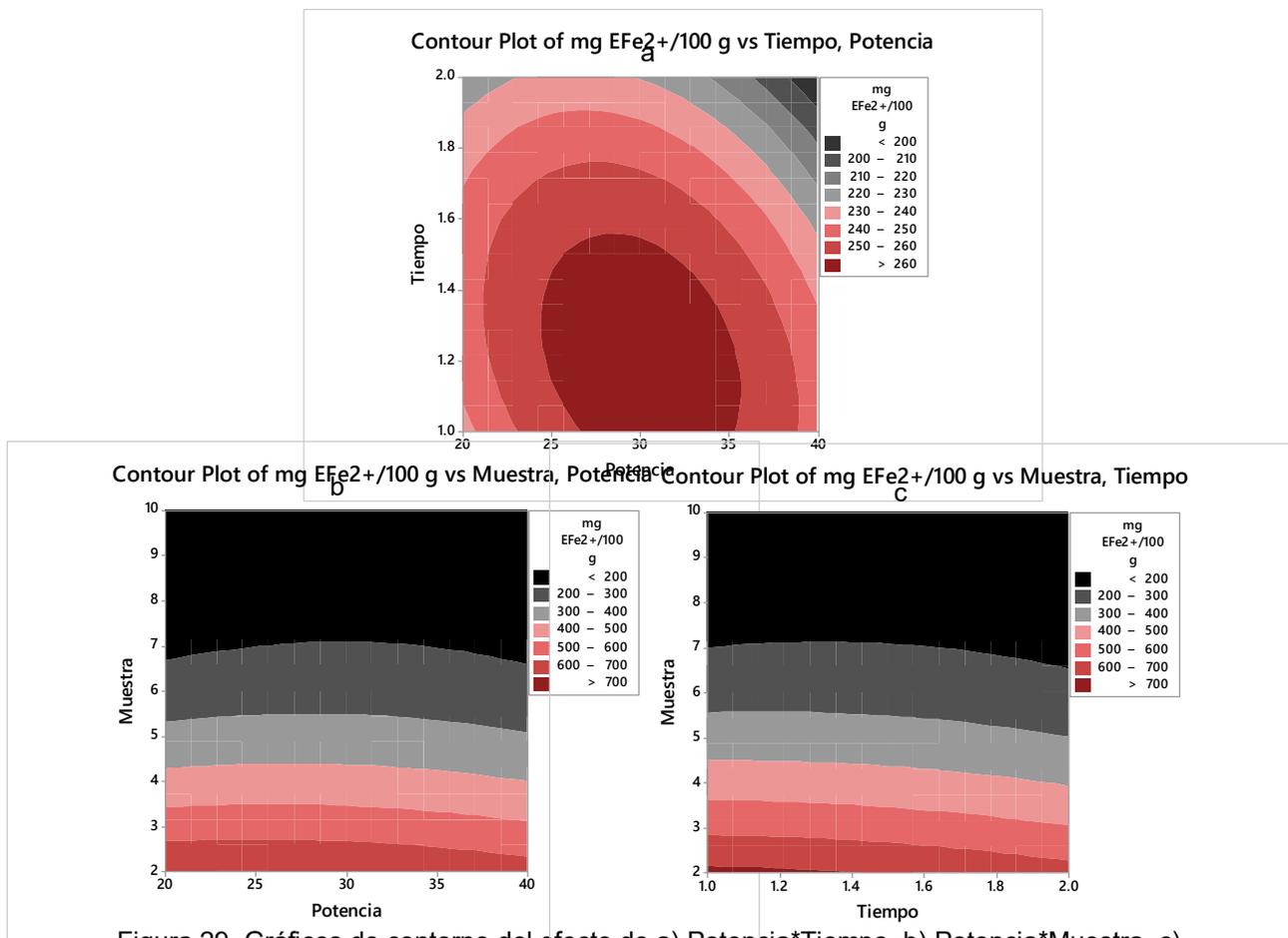


Figura 29. Gráficos de contorno del efecto de a) Potencia*Tiempo, b) Potencia*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por FRAP, obtenida de la extracción de aranthó con microondas

7.1.6.3 Optimización de las condiciones de extracción de aranthó con microondas y validación del modelo

El modelo obtenido a partir de los resultados del DBB para la extracción de aranthó con microondas, se sometió a un procedimiento de optimización. Las condiciones óptimas propuestas para la extracción fueron: 30% de potencia; 2 minuto; 2% de concentración de muestra. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los valores predichos y experimentales de compuestos fenólicos y antioxidantes (Tabla 29), lo que permite validar el modelo y ser adecuado para obtener los mejores valores de temperatura, tiempo y muestra para la extracción de aranthó con microondas

Tabla 29. Valores óptimos predichos y experimentales, de la extracción de aranthó con microondas

Análisis	Valor predicho	Valor experimental
Fenoles totales (mg EAG/100 g)	3282.3	3280.4±5.8
DPPH• (mg ET/100 g)	1516.2	1514.8±9.0
FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	730.9	733.3±3.6

7.1.6.4 Correlación entre fenoles totales y la actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP de la extracción de aranthó con microondas

Para conocer si la actividad antioxidante (vía radicalaria y óxido-reducción) de la extracción de aranthó con microondas, provenía de compuestos fenólicos, se determinó la correlación existente entre ambos (Figura 30). Para la capacidad antioxidante medida por DPPH•, se obtuvo una $R^2=0.9066$ (Figura 30a), lo cual expresa que el 90.66% de la capacidad antioxidante de los extractos podría ser debido a la presencia de fenoles. La actividad antioxidante obtenida vía óxido-reducción y el contenido de fenoles totales, dio un valor de $R^2=0.9887$ (Figura 30b). Lo cual podría significar que la extracción de microondas genera una mayor liberación de compuestos fenólicos con propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores, donadores de hidrógenos y estabilizadores de radicales oxigenados (Rice-Evans, Miller, Bolwell, Bramley y Pridham, 1995; Pardo *et al.*, 2005; Sokmen *et al.*, 2005).

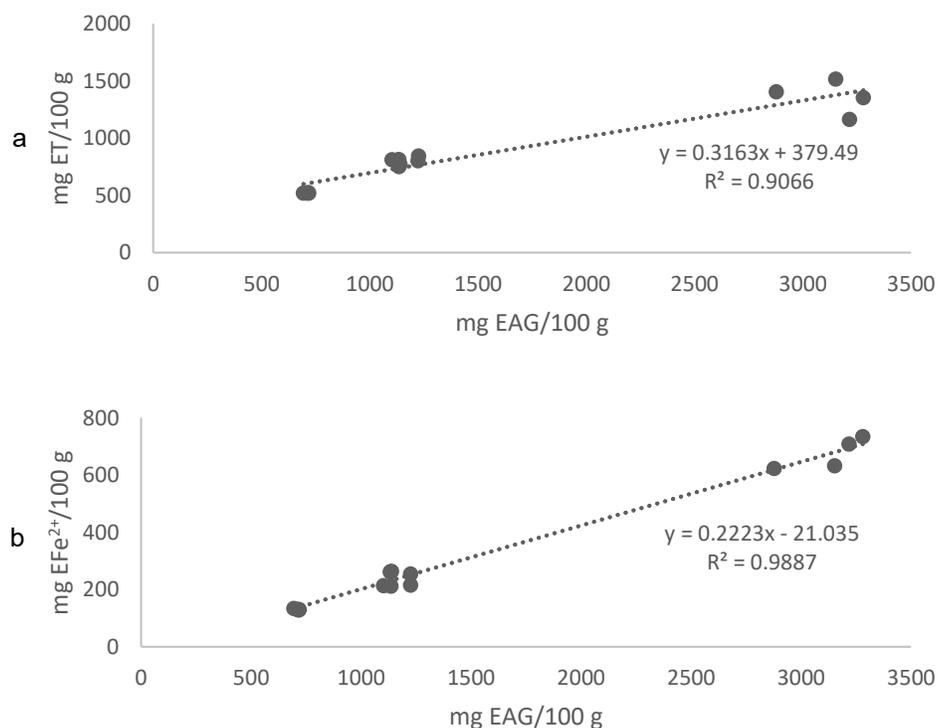


Figura 30. Correlación entre fenoles totales vs a) DPPH• y b) FRAP de la extracción de aranthó con microondas

7.2 Obtención de extractos acuosos de ajeno y aranthó por medio de un diseño de experimentos compuesto centrado

7.2.1 Extracción de ajeno con prensa francesa

7.2.1.1 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de la extracción de ajeno con prensa francesa

A partir del diseño de experimentos compuestos centrado se obtuvieron 13 experimentos, de los cuales se cuantificaron compuestos fenólicos y antioxidantes (DPPH• y FRAP) presentes en los extractos de ajeno al utilizar la prensa francesa como método de extracción, tales resultados se presentan en la Tabla 30. Los extractos acuosos analizados mediante la determinación de fenoles totales se

presentaron desde 732.5 a 12119.3 mg EAG/ 100 g. En cuanto a DPPH• oscilaron entre 398.2 y 4338.1 mg ET/100 g. Así mismo la actividad antioxidante determinada por FRAP se obtuvieron valores de 129.4 a 2894.2 mg EFe²⁺/100 g.

Tabla 30. Valores de fenoles totales y actividad antioxidantes por DPPH•, FRAP en extractos acuosos de ajeno mediante extracción con prensa francesa

Tiempo (min)	Muestra (g/100 g)	Fenoles totales (mg EAG/100 g)		DPPH• (mg ET/100 g)		FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD
0.75736	6	1304.4	3.4	718.8	2.5	212.1	0.2
5	11.6569	732.5	1.5	439.7	1.2	163.6	0.4
5	6	1334.8	5.7	849.0	1.4	229.7	0.7
2	2	2887.8	16.5	2150.3	3.9	665.5	4.9
5	6	1276.4	1.6	833.3	0.4	247.2	0.5
5	0.3431	12199.3	41.1	4338.1	46.3	2894.2	10.5
9.24264	6	1347.0	3.1	840.8	1.8	253.2	0.4
5	6	1389.6	3.3	835.9	0.8	211.7	1.3
8	2	2652.8	12.2	1127.5	4.2	693.3	3.6
8	10	877.8	3.5	506.9	0.7	157.1	1.0
5	6	1328.4	3.3	601.9	1.5	231.6	1.0
2	10	863.9	7.0	494.5	1.3	129.4	0.8
5	6	994.3	3.3	398.2	4.3	199.7	0.8

(n=3±SD: Desviación estándar)

Se observó que bajo condiciones de 5 minutos de exposición y 0.3431% de muestra se obtuvieron los valores más altos para las 3 determinaciones, así mismo. El tiempo de extracción coincide con lo reportado por Pérez, Caemmerer, Paz de Peña, Cid, Kroh (2010), como tiempo óptimo de la extracción de antioxidantes al utilizar la prensa francesa.

Varios grupos de investigación han estudiado hasta ahora la influencia del tiempo de preparación y la relación de agua en la extracción de los constituyentes del café mostrando que la mayoría de los compuestos se extraen en los primeros segundos del proceso de extracción aunado de la aplicación de presión a la muestra (Alves, Almeida, Casal y Oliveira, 2010; Blumberg, Frank, Hofmann y 2010; Zahm y Speer, 2010).

7.2.1.2 Efecto de las condiciones de extracción sobre la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes de ajeno a partir de extracción con prensa francesa

Los coeficientes de correlación obtenidos a partir de los polinomios (Tabla 31) del DBB de fenoles totales y la actividad antioxidante mediante extracción de ajeno con prensa francesa determinada por DPPH• y FRAP, fueron de 81, 84 y 85% para las tres metodologías respectivamente, nos indica que el modelo explica más del 80% de la variabilidad de los resultados. Se recomienda que el R² sea de al menos 75% para considerar la posibilidad de continuar la metodología, de no ser así es muy probable que el procedimiento nos lleve por un camino errado que hará desperdiciar recursos (Vásquez *et al.*, 2016; Cuesta, 2017).

Tabla 31. Polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del diseño de experimentos Box-Behnken para la extracción de ajeno con prensa francesa

Análisis	R ²	Polinomios
Fenoles totales	0.81	8540 + 505 A - 2215 B - 54.3 A*A + 130.2 B*B + 5.2 A*B
DPPH•	0.84	4337 - 64 A - 885 B - 10.0 A*A + 44.5 B*B + 21.6 A*B
FRAP	0.82	2010 + 130 A - 554 B - 12.5 A*A + 33.3 B*B - 0.0 A*B

Donde: A= Tiempo (min) y B = Concentración de muestra (g/100 g)

De acuerdo con el coeficiente de regresión (Tabla 32), el factor muestra influyó significativamente ($p < 0.05$) tanto en su término lineal (β_B) y cuadrático (β_{BB}) para las tres metodologías. En la Figura 31, se muestra los gráficos de contorno, en donde se obtiene la mayor liberación de compuestos con menor concentración de muestra (<2%). Tanto el tiempo como la interacción tiempo-muestra no mostraron un efecto significativo en la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes.

Tabla 32. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden, para fenoles totales, DPPH• y FRAP de la extracción de ajeno con prensa francesa

Factor	Coeficiente de regresión		
	Fenoles totales	DPPH•	FRAP
β_0	1265	704	224
Lineal			
β_A	-20	-105	14
β_B	-2504 ^c	-972 ^c	-615 ^c
Cuadrático			
β_{AA}	-489	-90	-112
β_{BB}	2084 ^d	713 ^c	533 ^c
Interacción			
β_{AB}	62	259	-0

Nivel de significancia: ^ap<0.0001, ^bp<0.001, ^cp<0.01, ^dp<0.05

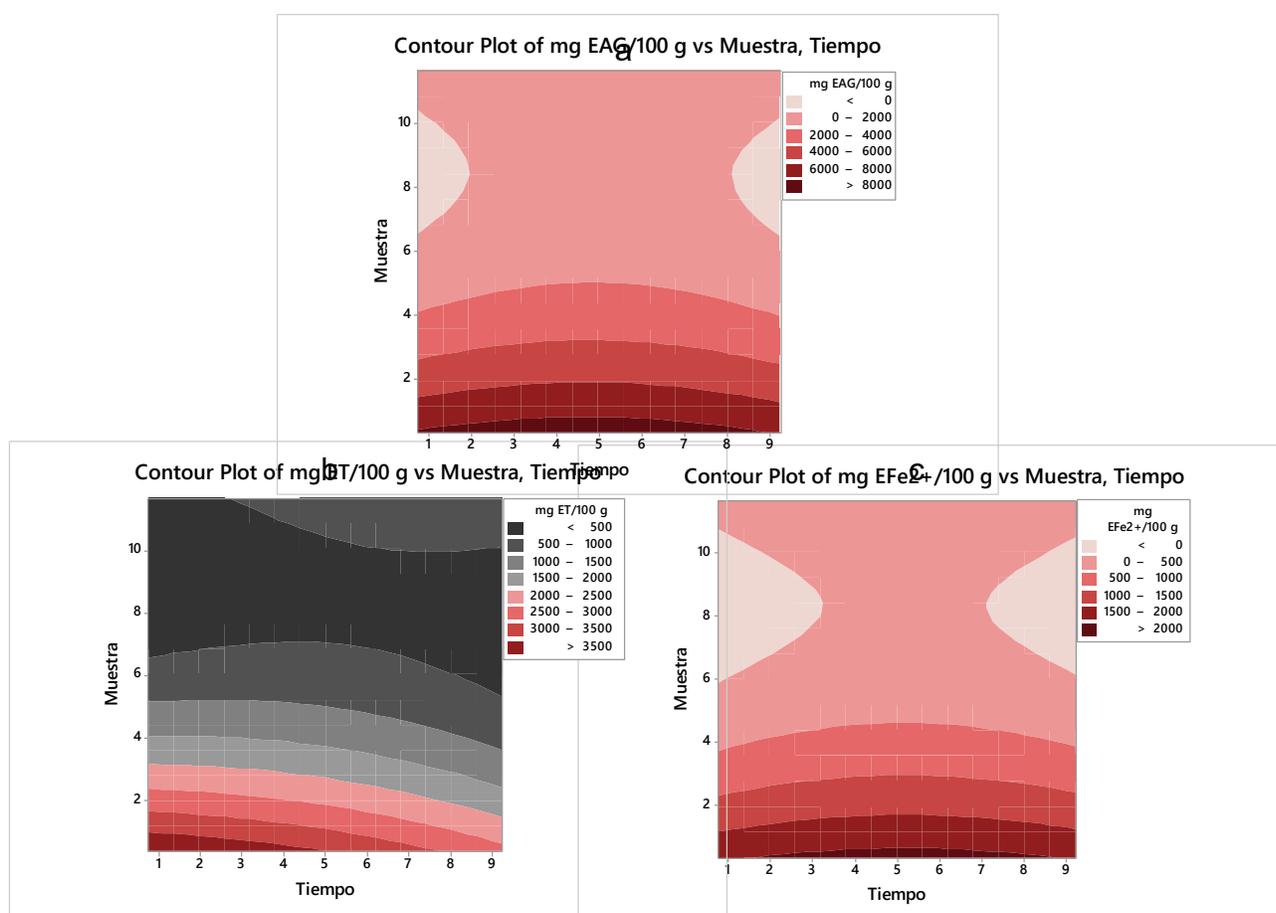


Figura 31. Gráficos de contorno del efecto de Tiempo*Muestra, sobre el contenido de a) fenoles totales y la actividad antioxidante por a) DPPH• y c) FRAP, obtenida de la extracción de ajeno con prensa francesa

7.2.1.3 Optimización de las condiciones de extracción con prensa francesa de ajeno y validación del modelo

Las condiciones óptimas para la extracción de ajeno con prensa francesa resultantes del DCC fueron de 3.414 minutos a una concentración de muestra de 0.3431%. Se realizó la validación experimental del modelo (Tabla 33) y se encontró que de las muestras de ajeno sometidas a las condiciones óptimas del proceso de extracción con prensa francesa se logra obtener una concentración que comparado con el predicho por el modelo representan valores similares, sin diferencias significativas ($p>0.05$).

Tabla 33. Valores óptimos predichos y experimentales, de la extracción de ajeno con prensa francesa

Análisis	Valor predicho	Valor experimental
Fenoles totales (mg EAG/100 g)	12210.9	12209.5±41.1
DPPH• (mg ET/100 g)	4332.4	4330.7±46.3
FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	2886.1	2884.6±10.5

7.2.1.4 Correlación entre la actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP y fenoles totales

Los extractos mostraron una adecuada correlación entre el contenido de fenoles y su capacidad antioxidante. Las respuestas obtenidas muestran que los compuestos extraídos de ajeno con prensa francesa, responsables de la actividad antioxidante son principalmente de tipo fenólico, siendo el 93.45% por DPPH• (Figura 32a) y el 99.63% por FRAP (Figura 32b).

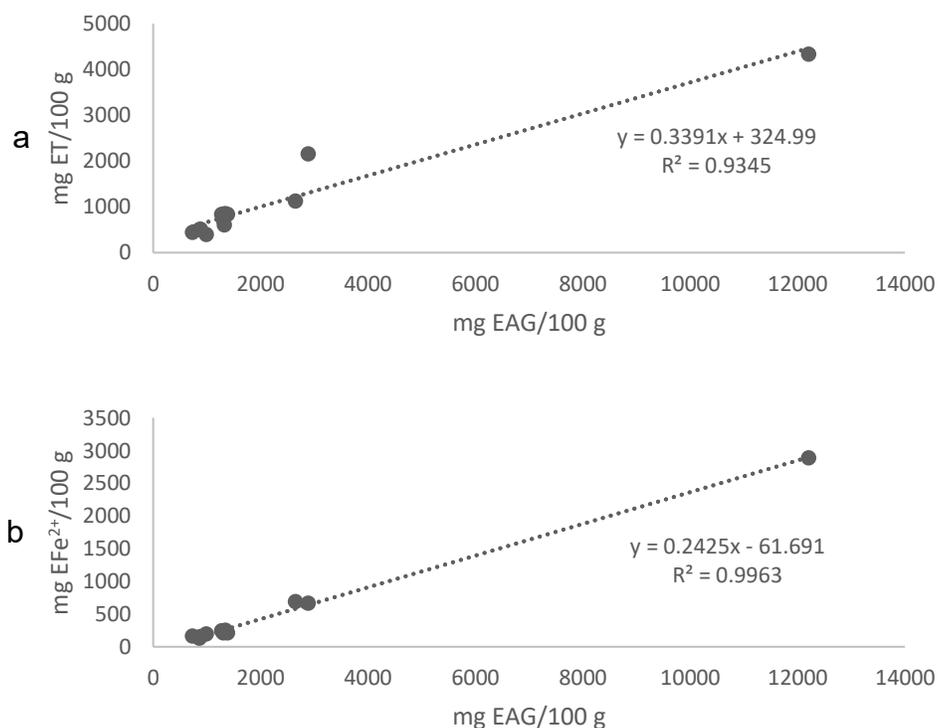


Figura 32. Correlación entre fenoles totales vs a) DPPH• y b) FRAP de la extracción de ajeno con prensa francesa

7.2.2 Extracción de aranthó con prensa francesa

7.2.2.1 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de la extracción de aranthó con prensa francesa

Los resultados de fenoles totales y la actividad antioxidante de compuestos de vía radical y redox, de la extracción de aranthó con prensa francesa, se muestran en la Tabla 34. Los valores obtenidos de compuestos antioxidantes medidos por DPPH• y FRAP oscilaron entre 434.9 a 2128.2 mg ET/100 g y 110.8 – 1920.4 mg EFe²⁺/ 100g, respectivamente. Mientras que los valores de fenoles totales estuvieron entre 652.3 – 9929.1 mg EAG/100 g.

Se obtuvo la mayor liberación tanto de antioxidantes por vía radicalaria como de óxido-reducción, así como de fenoles totales a partir de 0.3431% de muestra, durante 5 minutos.

Tabla 34. Valores de fenoles totales y actividad antioxidantes por DPPH•, FRAP en extractos acuosos de aranthó mediante extracción con prensa francesa

Tiempo (min)	Muestra g/100g	Fenoles totales (mg EAG/100 g)		DPPH• (mg ET/100 g)		FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD
0.75736	6	1166.8	2.4	557.4	2.8	208.9	2.9
5	11.6569	652.3	5.5	434.9	1.4	110.8	1.0
5	6	1153.7	3.4	629.0	1.4	218.3	1.8
2	2	2724.8	10.3	861.8	6.5	601.7	3.6
5	6	1112.5	4.1	590.7	2.3	211.7	1.6
5	0.3431	9929.1	41.1	2128.2	12.0	1920.4	4.8
9.24264	6	1111.6	2.8	682.8	2.2	213.5	0.5
5	6	1127.9	2.8	679.0	2.2	220.5	0.8
8	2	2647.4	9.4	1033.8	7.0	550.1	4.9
8	10	715.3	4.6	519.1	0.6	128.2	0.5
5	6	1141.0	4.1	663.7	3.5	219.4	2.0
2	10	684.6	2.4	461.2	1.4	130.3	0.4
5	6	1191.3	3.8	639.9	1.8	217.9	1.1

(n=3 ± SD: Desviación estándar)

7.2.2.2 Efecto de las condiciones de extracción sobre la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes de aranthó a partir de extracción con prensa francesa

La Tabla 35, muestra los coeficientes de correlación y polinomios obtenidos del diseño de experimentos compuesto centrado para el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante (DPPH• y FRAP). Los coeficientes de correlación determinados fueron mayores al 85% para las tres metodologías empleadas, de manera que este diseño de experimentos resulta útil al optimizar las condiciones de extracción de compuestos con actividad antioxidantes y fenoles totales.

Tabla 35. Polinomios y coeficientes de correlación obtenidos del diseño de experimentos compuesto centrado para la extracción de aranthó con prensa francesa

Análisis	R ²	Polinomios
Fenoles totales	0.86	7186 + 407 A - 1815 B - 42.6 A*A + 105.8 B*B + 2.3 A*B
DPPH•	0.88	1506 + 107 A - 288.5 B - 7.57 A*A + 16.41 B*B - 2.38 A*B
FRAP	0.88	1467 + 68 A - 363.4 B - 7.6 A*A + 20.86 B*B + 1.0 A*B

Donde: A= Tiempo (min) y B = Concentración de muestra (g/100g)

Los coeficientes de regresión y diferencias significativas para cada factor se plasman en la Tabla 36, al igual que en ajenjo el factor muestra en términos lineales y cuadráticos generó un efecto significativo ($p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente), para las tres determinaciones.

Tabla 36. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden, para fenoles totales, DPPH• y FRAP de la extracción de aranthó con prensa francesa

Factor	Coeficiente de regresión		
	Fenoles totales	DPPH•	FRAP
β_0	1145	640	218
Lineal			
β_A	-16	50.9	-5.9
β_B	-2136 ^c	-413.7 ^c	-431.6 ^c
Cuadrático			
β_{AA}	-384	.68.1	-68.4
β_{BB}	1692 ^d	262.6 ^d	333.8 ^d
Interacción			
β_{AB}	27	-29	12

Nivel de significancia: ^a $p < 0.0001$, ^b $p < 0.001$, ^c $p < 0.01$, ^d $p < 0.05$

En la Figura 33, se muestran los gráficos de contorno, por lo ya mencionado la muestra influyó significativamente, teniendo los valores más altos, con menos de 2% de concentración de muestra. El tiempo no mostró influir significativamente.

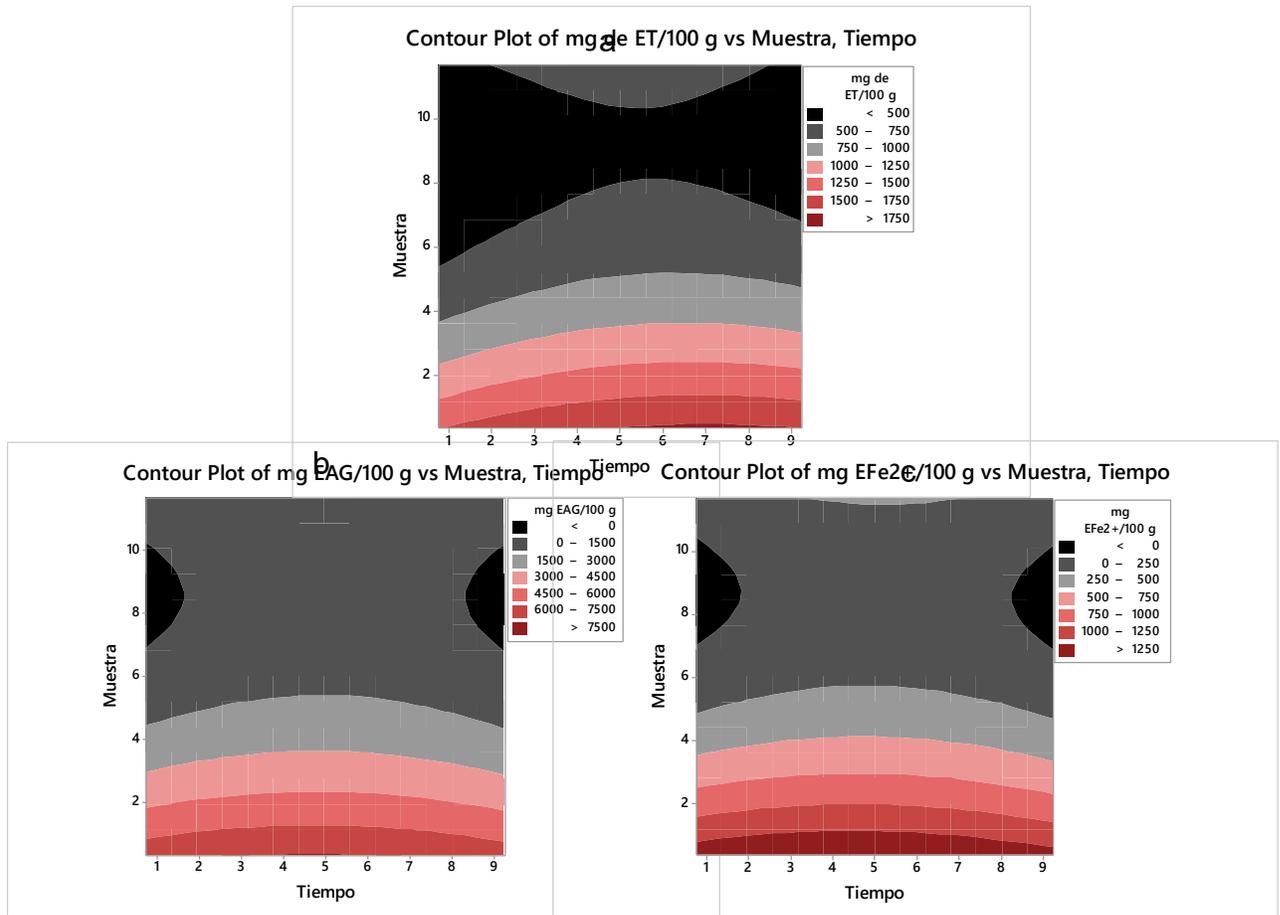


Figura 33. Gráficos de contorno del efecto de Tiempo*Muestra, sobre el contenido de a) fenoles totales y la actividad antioxidante por a) DPPH• y c) FRAP, obtenida de la extracción de aranthó con prensa francesa

7.2.2.3 Optimización de las condiciones de extracción de aranthó con prensa francesa y validación del modelo

Para obtener los valores óptimos en las tres técnicas empleadas, (fenoles totales, DPPH• y FRAP), de la extracción de aranthó con prensa francesa, se deben exponer los extractos de ajeno durante 5 minutos con una concentración de muestra de 0.3431%.

Para confirmar la validez de la optimización se realizaron tres extracciones bajo las condiciones antes señaladas, y se compararon los valores predichos y experimentales

(Tabla 37), en ninguno de los tres casos se observan diferencias significativas ($p>0.05$) entre el valor predicho y el valor experimental, lo cual indica que el modelo es adecuado y que los valores experimentales sean reproducibles.

Tabla 37. Valores óptimos predichos y experimentales, de la extracción de aranthó con prensa francesa

Análisis	Valor predicho	Valor experimental
Fenoles totales (mg EAG/100 g)	9932.3	9929.1±41.1
DPPH• (mg ET/100 g)	2126.9	2128.1±12.0
FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	1923.1	1920.4±4.8

7.2.2.4 Correlación entre fenoles totales y la actividad antioxidante medida por DPPH• y FRAP y de la extracción de aranthó con prensa francesa

Se encontró una relación directa entre la actividad antioxidantes y la concentración de fenoles, ya que la relación entre fenoles totales y la capacidad captadora de radicales DPPH•, fue de $R^2=0.9756$ (Figura 34a), mientras que para la actividad antioxidante determinada por el método FRAP fue de $R^2=0.9974$ (Figura 34b), lo que significa que entre 97 y 99% de la actividad evaluada para la extracción de aranthó con prensa francesa, resulta de la contribución de los compuestos fenólicos.

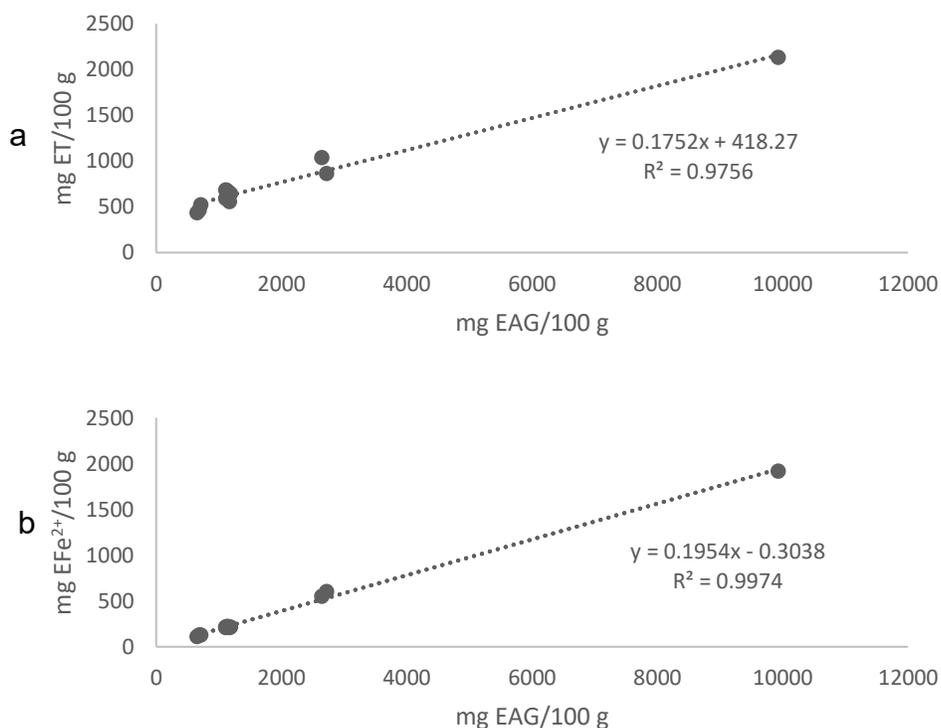


Figura 34. Correlación entre fenoles totales vs a) DPPH• y b) FRAP de la extracción de aranthó con prensa francesa

7.3 Comparación de los métodos de extracción

En la Tabla 38, se muestran las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos y antioxidantes (DPPH• y FRAP) resultantes de la optimización de los diseños de experimentos para los distintos métodos de extracción (convencional, ultrasonido, microondas y prensa francesa) de los extractos acuosos de ajeno y aranthó. A partir de las condiciones óptimas de extracción se compararon los métodos de extracción, y se realizaron las determinaciones de bioaccesibilidad *in vitro*.

Tabla 38. Condiciones óptimas de extracción

Método de extracción	Muestra					
	Aranthó			Ajenjo		
Convencional	90°C	10 min	2 g/ 100 g	90°C	17 min	2 g/100 g
Ultrasonido	70°C	15 min	2 g/ 100 g	70°C	15 min	2 g/100 g
Microondas	40% pot	2 min	2 g/ 100 g	30% Pot.	2 min	2 g/100 g
Prensa francesa	90°C	3.41 min	0.34 g/100 g	90°C	5 min	0.34 g/100 g

Temperatura: °C, Tiempo: minutos (min), Muestra: g/100 g, Potencia: % pot

7.3.1. Comparación de los métodos de extracción de ajeno

Se realizaron las determinaciones de fenoles totales y actividad antioxidante mediante DPPH• y FRAP por triplicado, para cada método de extracción, los resultados se compararon entre sí, mediante un ANOVA seguido del test de Tukey (Tabla 39). Los resultados de la actividad antioxidante obtenida de la extracción de ajeno utilizando los 4 métodos de extracción fueron estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), a excepción para fenoles totales, donde no se encontraron diferencias significativas entre la extracción convencional y con microondas.

Tabla 39. Fenoles totales y actividad antioxidante de extractos de ajeno con los métodos de extracción optimizados

	Convencional	Ultrasonido	Microondas	Prensa francesa
Fenoles totales (mg EAG/100 g)	2486.6±2.9 ^b	2299.3±8.6 ^c	2467.4±2.9 ^b	12209.5±41.1 ^a
DPPH• (mg ET/ 100 g)	2452.5±1.6 ^b	818.2±4.8 ^d	930.7±4.3 ^c	4330.7±46.3 ^a
FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	731.16±2.9 ^b	551.6±3.8 ^d	671.8±4.8 ^c	2884.6±10.5 ^a

a, b, c, d Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los métodos de extracción en la misma determinación

En general se observa que al utilizar la prensa francesa como método de extracción se obtienen los valores más altos, lo cual se podría deber a que el émbolo de la prensa al ser deslizado hacia abajo genera una presión de 0.5 bar lo cual ayuda a la extracción impulsando al contenido intracelular a salir de la matriz sólida más rápidamente (Gil-

Chávez *et al.*, 2013; López *et al.*, 2007). De esta manera, este método aumenta la velocidad de extracción y proporciona mejores resultados. Así como al no aplicar temperatura constante, los antioxidantes termolábiles se preservan (Miron, Plaza, Bahrim, Ibáñez y Herrero, 2010). Cabe destacar que la prensa francesa también disminuyó el tiempo de extracción en comparación a los otros métodos (Tabla 22).

Por el contrario, al usar el ultrasonido se obtuvieron los valores más bajos, siendo opuesto a lo reportado por Vinatoru (2001) quien publicó una visión general de la extracción de principios bioactivos de hierbas asistida por ultrasonido, mostrando que el ultrasonido mejoró los rendimientos comparados con los métodos clásicos. Tal efecto podría atribuirse al efecto la temperatura en conjunto con la cavitación del baño de ultrasonido, lo que resulta en una disminución de la viscosidad y la tensión superficial, e induce un aumento en la presión de vapor lo que hace que entren más vapores de solvente en la cavidad de la burbuja y numerosas burbujas de cavitación, que colapsarán con menos violencia y reducirán los efectos de sonicación (Xu *et al.*, 2017). En contraste con la extracción convencional donde la temperatura contribuye a la eficiencia de extracción (Chemat *et al.*, 2016).

En contraste, la extracción convencional consiguió un mayor rendimiento en la obtención de compuestos antioxidantes y fenoles totales en comparación del ultrasonido y microondas; estos resultados se relacionan con lo obtenido por Espert, Periche, Heredia y Castelló (2012) y Pingret, Fabiano-Tixier y Chemat (2013) en donde la aplicación de ultrasonido, así como la energía del microondas degradaron los compuestos antioxidantes presentes en los extractos acuosos.

Los resultados obtenidos mediante la extracción con microondas fueron significativamente mayores que el ultrasonido, lo cual se evidencia por los estudios realizados por Gao y Liu, (2005) donde obtuvieron mejores resultados utilizando el microondas, que con la técnica de ultrasonido en la extracción de flavonoides en *Saussurea meduda*, pues hubo una eficiencia 5.86 veces mayor.

7.3.2 Comparación de los métodos de extracción de aranthó

De igual manera que para los extractos de ajeno, se compararon los valores resultantes de la optimización de la extracción compuestos antioxidantes y fenólicos obtenidos a través de los distintos métodos de extracción (convencional, ultrasonido, microondas y prensa francesa) ensayados (Tabla 40). El ANOVA realizado para comparar los resultados obtenidos de cada determinación (DPPH•, FRAP y fenoles totales) con respecto a cada método de extracción demostró diferencias significativas entre ellos ($p < 0.05$).

Tabla 40. Comparación de fenoles totales y actividad antioxidante de extractos de aranthó utilizando distintos métodos de extracción.

	Método de extracción			
	Convencional	Ultrasonido	Microondas	Prensa francesa
Fenoles totales (mg EAG/100 g)	2242.7±2.9 ^d	2971.0±2.3 ^c	3280.4±5.8 ^b	9929.1±41.1 ^a
DPPH• (mg ET/ 100 g)	1,521.2±5.7 ^b	1215.8±9.6 ^c	1514.8±9.0 ^b	2128.1±12.0 ^a
FRAP (mg EFe ²⁺ /100 g)	697.9±11.1 ^c	553.2±2.4 ^d	733.3±3.6 ^b	1920.4±4.8 ^a

Temperatura: °C, Tiempo: minutos (min.), Concentración de muestra: %/100 g, Potencia: % pot.

^{a, b, c, d} Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los métodos de extracción en la misma determinación

Nuevamente se obtuvieron los valores más altos utilizando la prensa francesa para extraer los compuestos antioxidantes presentes en aranthó. La transmisión instantánea de presión a través del embolo hacia la muestra representa una gran ventaja sobre el procesamiento térmico convencional, en adicción a que la presión se puede aplicar a temperatura ambiente, lo que reduce la cantidad de energía térmica necesaria para los productos alimenticios durante el procesamiento convencional. Así mismo se ha visto que la presión aplicada se transmite de manera uniforme y casi instantánea a todos los puntos del alimento, independientemente de su composición, tamaño y forma geométrica (Knorr, Ade-Omowaye y Heinz, 2002). En un estudio realizado para comparar la extracción de compuestos totales de café, la prensa

francesa permitió la mayor extracción de ácidos grasos, en comparación a la extracción convencional (Gloess *et al.*, 2013; Oey, Lille, Van Loey y Hendrickx, 2008).

La extracción con microondas generó valores menores que la extracción con prensa francesa, pero significativamente mayores que la extracción con ultrasonido tanto para compuestos antioxidantes (vía redox y vía óxido-reducción) y fenoles totales, así como para la extracción convencional para compuestos antioxidantes determinados por FRAP y fenoles totales. Este comportamiento fue similar al reportado por Dahmoune *et al.*, (2014) y Karabegovic *et al.*, (2014) al comparar el microondas, ultrasonido y la extracción convencional de hojas de *Pistacia lentiscus* y *Prunus laurocerasus* resultando un mayor contenido de compuestos fenólicos y antioxidantes con el microondas.

La menor liberación de compuestos antioxidantes determinados por DPPH• y FRAP, se obtuvo al utilizar el ultrasonido, mientras que para fenoles totales el menor valor resultó con la extracción convencional; dichos métodos podrían afectar el tipo de compuestos de aranthó. De igual manera se puede observar que la actividad antioxidante determinada por la técnica de DPPH•, mostró en general valores mayores que FRAP, con respecto al fundamento de estas técnicas, FRAP mide la capacidad de una muestra para reducir metales, mientras que el DPPH•, mide la capacidad de eliminación de radicales libres de una muestra. Desde un punto de vista mecánico, en FRAP hay una reacción de transferencia de un solo electron, mientras que en DPPH• combina esta reacción y la reacción de transferencia de átomos de hidrógeno (Foti, Dasquino y Geraci, 2004; Prior, Wu y Schain, 2005). Otro aspecto es su aplicabilidad, ya que FRAP, se utiliza generalmente para medir la capacidad antioxidante de compuestos hidrófilos, en cambio DPPH•, es el único ensayo que se ha aplicado tanto en extractos acuosos-orgánicos de alimentos vegetales como en aceites vegetales (Cheng, Ling y Hsieh, 2007; Llorach, Tomás-Barberán y Ferreres, 2014; Tuberoso, Kowalczyk, Sarritzu y cabras, 2007), tales características permiten medir una mayor capacidad antioxidante en DPPH•

La concentración de los antioxidantes presentes de manera natural en los alimentos suele disminuir en gran medida por efecto del procesamiento (Flores *et al.*, 2016). Por ello, en la actualidad, la importancia de seleccionar otras fuentes adecuadas de antioxidantes naturales como el ajeno y el aranthó, así como métodos de extracción como la prensa francesa, el cual es accesible y rápido que evite la pérdida de tales compuestos.

7.4 Bioaccesibilidad intestinal *in vitro*

La determinación de la actividad antioxidante en procesos de digestión *in vitro*, permite la evaluación de la estabilidad de los compuestos fenólicos y antioxidantes de los alimentos en sus respectivos ambientes, después de la liberación bajo condiciones fisiológicas (Chandrasekara y Shahidi, 2012). En la Tabla 41 y 42, se muestra el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante antes y después de la digestión *in vitro* de ajeno y aranthó respectivamente.

En general, las condiciones del proceso digestivo redujeron la cantidad de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, lo que podría indicar una liberación incompleta o degradación de los compuestos (Bouayed, Hoffmann y Bohn, 2011). De acuerdo a algunos estudios (Bouayed *et al.*, 2011; Cilla, González-Sarrias, Tomas-Barberan, Espin y Barbera, 2011) pudiera estar relacionado a los cambios de pH en el proceso de digestión, a la formación de compuestos macromoleculares no dializables, a la formación de metabolitos secundarios o a los cambios estructurales de los compuestos.

Tabla 41. Comparación de fenoles totales y capacidad antioxidante de extractos de ajeno antes y después del proceso de digestión *in vitro* y porcentaje de fracción dializada (%FD)

Determinación	Digestión in vitro	Convencional	Ultrasonido	Microondas	Prensa francesa
Fenoles totales (mg AG/100 g)	Antes	2486.6±2.9 ^b	2299.3±8.6 ^c	2467.4±2.9 ^b	12209.5±41.1 ^a
	Después	1667.12±15 ^d	1894.0±26.1 ^b	1838.4±16.1 ^c	5831.9±26.7 ^a
	% FD	67 ^c	82.3 ^a	74.5 ^b	47 ^d
DPPH• (mg ET/100 g)	Antes	2452.5±1.6 ^b	818.2±4.8 ^d	930.7±4.3 ^c	4330.7±46.3 ^a
	Después	138.7±0.5 ^d	148.2±4.2 ^c	298.2±1.6 ^b	775.02±10.7 ^a
	% FD	5.6 ^d	18.1 ^b	32.04 ^a	17.8 ^c
FRAP (mg EFe2+/100 g)	Antes	731.16±2.9 ^b	551.6±3.8 ^d	671.8±4.8 ^c	2884.6±10.5 ^a
	Después	26.7±0.5 ^c	18.5±0.4 ^d	27.4±1.3 ^b	52.4±3.4 ^a
	% FD	3.6 ^b	3.3 ^c	4.4 ^a	1.8 ^d

^{a, b, c, d} Superíndices en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los métodos de extracción en la misma determinación

Tabla 42. Comparación de fenoles totales y capacidad antioxidante de extractos de aranthó antes y después del proceso de digestión *in vitro* y porcentaje de fracción dializada (%FD)

Determinación	Digestión in vitro	Convencional	Ultrasonido	Microondas	Prensa francesa
Fenoles totales (mg EAG/100 g)	Antes	2242.7±2.9 ^d	2971.0±2.3 ^c	3280.4±5.8 ^b	9929.1±41.1 ^a
	Después	1574.5±22.4 ^d	1653.2±16.0 ^c	2199.5±8.0 ^b	6803.4±26.7 ^a
	% FD	70.2 ^a	55.6 ^d	67 ^c	68.5 ^b
DPPH• (mg ET/100 g)	Antes	1,521.2±5.7 ^b	1215.8±9.6 ^c	1514.8±9.0 ^b	2128.1±12.0 ^a
	Después	139.2±2.1	279.2±1.6	136.78±1.0	775.0±10.7
	% FD	9.1 ^d	22.9 ^b	10 ^c	36.4 ^a
FRAP (mg EFe2+/100 g)	Antes	697.9±11.1 ^c	553.2±2.4 ^d	733.3±3.6 ^b	1920.4±4.8 ^a
	Después	55.8±1.4 ^b	55.2±0.6 ^b	38.3±1.1 ^c	71.2±7.8 ^a
	% FD	7.9 ^b	9.9 ^a	5.2 ^c	3.7 ^d

^{a, b, c, d} Superíndices en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los métodos de extracción en la misma determinación

El proceso de digestión *in vitro* en las muestras estudiadas de ajeno y aranthó, generó entre el 47 al 82.3% de fracción dializada de fenoles totales para los 4 métodos de extracción. La extracción de ajeno con ultrasonido fue la que tuvo una mayor bioaccesibilidad con 1894 mg EAG/100 g, lo que representa un 82.3%, esto podría suponer, que el ultrasonido favorece la extracción de los fenoles, debido a la ruptura celular y la liberación del contenido intracelular haciéndolos más bioaccesibles (Vidal et al., 2016). Por su parte para aranthó la extracción convencional generó una mayor fracción dializada (70.2%).

Algunos autores han informado una bioaccesibilidad de compuestos fenólicos entre 10 al 30% FD en jugos de granada, extractos de mora seca y suplementos de bebidas de frutas con leche desnatada, que podría ser la consecuencia del proceso de digestión, así como a la inestabilidad de los compuestos al pH elevado, ocasionando por ejemplo la hidrólisis de compuestos a moléculas más pequeñas, como lo es el ácido gálico (Friedman y Jurgens, 2000; Pérez-Vicente, Gil-Izquierdo, García-Viguera, 2002; Cilla et al., 2009; Tavares et al., 2012; Stanisavljevic et al., 2015). Así mismo la cantidad de compuestos fenólicos bioaccesibles pueden diferir cuantitativa y cualitativamente de los fenoles extraídos con distintos métodos químicos y mecánicos, por lo que los más bioaccesibles no son necesariamente los que están presentes en niveles más altos de concentración en los alimentos (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini y Conte, 2010).

Basados en un estudio *in vitro* realizado por Cilla y colaboradores en el 2009, demostraron que el proceso de digestión disminuyó el contenido de fenoles totales en al menos un 47%. Por lo cual podríamos decir que los 4 métodos de extracción tanto para ajeno y aranthó tuvieron un buen % de fracción dializada.

Cabe destacar que los compuestos fenólicos liberados en la fase gástrica pueden ser absorbidos y tener algún efecto antioxidante local en el intestino delgado, manteniendo el equilibrio redox contra los oxidantes nocivos y la prevención de enfermedades del tracto gastrointestinal vinculadas a generación de radicales libres durante los procesos

de digestión (Halliwell, 1996; Halliwell *et al.*, 2005; Adam *et al.*, 2002; Konishi, Zhao y Shimizu, 2006; Lafay *et al.*, 2006; Zhao, Egashira y Sanada, 2004). Así mismo los polifenoles parecen tener un efecto prebiótico al mejorar la nutrición de las bacterias benéficas que viven en el intestino (Cardona, Andrés-Lacueva, Tulipani, Tinahones y Quiapo-Ortuño, 2013). De manera general se ha estimado que solo el 5-10% de la ingesta total de polifenoles se absorbe en el intestino delgado, los polifenoles restantes (90 a 95% de la ingesta total de polifenoles) pueden acumularse en el gran lumen intestinal hasta el rango milimolar, donde, junto con los conjugados excretados en la luz intestinal a través de la bilis, son sometidos a las actividades enzimáticas de la comunidad microbiana intestinal (Manach, Scalbert, Morad, Remesy y Jimenez, 2004; Kroon, Clifford y Crozier, 2004) Por lo tanto, la microbiota intestinal es responsable de la extensa descomposición de las estructuras polifenólicas originales en una serie de metabolitos fenólicos de bajo peso molecular que, al ser absorbibles, pueden ser realmente los responsables de los efectos en la salud, derivados de los alimentos ricos en polifenoles (Cardona *et al.*, 2013).

En cuanto al % de FD de la capacidad antioxidante tanto para ajeno y aranthó osciló entre 1.8 y 36.4. Siendo la extracción con microondas (32.04%) para los extractos de aranthó y la prensa francesa (36.4%) para ajeno las cuales presentaron una mayor bioaccesibilidad en DPPH•. En el caso del microondas tal resultado podría atribuirse a lo reportado por Kramer y Ryan en el 2011, en donde evaluaron el efecto de la extracción de microondas usando como solvente agua en la determinación de la bioaccesibilidad de pesticidas, donde el agua resultó un solvente ideal para el calentamiento con microondas, permitiendo un calentamiento más rápido sin provocar pérdidas de los componentes y generando una mayor extracción de compuestos.

En cuanto a la prensa francesa, como se observó al comparar los métodos antes del proceso digestivo, el no aplicar una temperatura constante, preserva los antioxidantes termolábiles (Miron, Plaza, Bahrim, Ibáñez y Herrero, 2010), obteniéndose una mayor capacidad antioxidante y por ende un mayor % de fracción dializada.

No se han reportado estudios que evalúen bioaccesibilidad en extractos acuosos de ajeno y aranthó, no obstante, los resultados son inferiores a los reportados por Weathers, Jorda, Lasin y Towler (2014) para la extracción sólido-líquido de *Artemisia annua*, en los cuales se obtuvo 22% de capacidad antioxidante medida por DPPH• después del proceso de digestión *in vitro*.

Algunos estudios donde se han usado diversos ensayos de capacidad antioxidante muestran incrementos significativos en la capacidad antioxidante de plasma de humano una hora después de haber consumido cantidades moderadas de algunas infusiones de diferentes especies de plantas, lo cual podría generar la reducción del daño oxidativo a biomoléculas importantes (Leenen, Roodenburg, Tijburg y Wiseman, 2000; Rietveld y Wiseman, 2003; Serafini, Ghiselli y Ferro-Luzzi, 1996).

Para evaluar si la capacidad antioxidante es dependiente sobre el contenido de fenoles totales después de la digestión *in vitro*, se calculó el coeficiente de Pearson, obteniéndose una fuerte correlación positiva entre fenoles totales y DPPH• para la extracción con ultrasonido ($r = 0.94$) y prensa francesa ($r = 0.93$) en extractos de ajeno. Mientras que en aranthó, se obtuvo una correlación significativa en la extracción convencional, con microondas y prensa francesa con respecto a DPPH• y FRAP ($r = 60$ a 85). Lo cual evidencia que para las extracciones mencionadas después del proceso de digestión la capacidad antioxidante podría ser causada en gran parte por los compuestos fenólicos.

Finalmente, los procesos térmicos, como la extracción convencional o exposición a microondas, pueden ser una espada de doble filo con respecto a la biodisponibilidad *in vitro*, si bien se ha resaltado que, la aplicación de maceración y calor puede ser beneficiosa para los compuestos antioxidantes (Unlu *et al.*, 2007; Fratianni, Cinquanta y Panfili, 2010) y la disponibilidad de polifenoles (Bohn, 2014, Bugianesi, Salucci, Leonardi, Ferracane, Catasta, Azzini y Maiani, 2004, Kamiloglu *et al.*, 2014), debido a

una mejor liberación de la matriz y la solubilidad durante la digestión, también plantea el riesgo de pérdidas por calor especialmente una vez liberados de la matriz (Fратиanni *et al.*, 2010; Jaiswal y Abu-Ghanman, 2013; Palmero, Panozzo, Simatupang, Hendrickx y Van- Loey, 2014).

8. Conclusiones

La aplicación de los diseños de experimentos Box-Behnken y el compuesto centrado permitieron identificar las condiciones físicas de liberación de compuestos antioxidantes por diferentes métodos de extracción (convencional, ultrasonido, microondas y prensa francés) de ajeno (*Artemisia absinthium*) y aranthó (*Decatropis bicolor*).

De los factores físicos analizados, la concentración de muestra fue identificada como un factor determinante en la extracción de compuestos con actividad antioxidante, principalmente de tipo fenólico; esto de acuerdo a las correlaciones observadas entre actividad antioxidante y contenido de fenoles totales,

Los resultados del presente estudio revelaron para ambas especies, la extracción con prensa francesa genera los extractos acuosos con mayor cantidad de compuestos antioxidantes, esto en relación a los otros métodos de extracción utilizados.

A pesar de la alta actividad antioxidante mostrada por los extractos de ajeno y aranthó obtenidos por extracción convencional, con ultrasonido, microondas y prensa francesa la bioaccesibilidad analizada mediante pruebas *in vitro* fue limitada.

Finalmente, tanto el ajeno y aranthó, además de su uso tradicional en la medicina popular, representan una valiosa fuente de antioxidantes, y por lo tanto pueden ser consideradas como un gran potencial para la industria alimentaria y el área de salud. Ambas plantas representarían una alternativa factible a los antioxidantes sintéticos, así como alimentos funcionales o complementos de una dieta balanceada pudiendo prevenir enfermedades crónicas.

9 Referencias

- Adam, A., Crespy, V., Levrat-Verny, M. A., Leenhardt, F., Leuillet, M., Demigne, C. y Remesy, C. (2002). The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *Journal of Nutrition*, 132, 1962-1968.
- Aguilar A., Camacho J., Chino S., Jáquez P. y López M. (1994). Herbario Medicinal del IMSS. Instituto Mexicano del Seguro Social (Ed.) México.
- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P. y Mason, T. J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(4), 261-265.
- Alves, R. C., Almeida, I. M. C., Casal, S. y Oliveira, M. B. (2010). Isoflavones in coffee: influence of species, roast degree, and brewing method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3002-3007.
- Alves, R. C., Casal, S., Oliveira, M. B. (2010). Tocopherols in coffee brews: influence of coffee species, roast degree and brewing procedure. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 802-808.
- Amanpour, A., Selli, S. (2015). Differentiation of volatile profiles and odor activity values of Turkish coffee and French press coffee. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(5), 1116-1124
- Amat, N., Upur, H., Blazekovic, B. 2010. *In vivo* hepatoprotective activity of the aqueous extract of *Artemisia absinthium* L. against chemically and immunologically induced liver injuries in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 478-484.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Royal Society of Chemistry*, 127, 183-198.
- Arballo, R. J., Goñi, M. S., Mascheroni, H. R. (2017). Modelado de la fluidodinámica y transporte de vapor en hornos microondas. *Mecánica Computacional*, 35, 789-804.

- Argueta, A., Gallardo, V. C. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, México: Instituto Nacional Indigenista
- Asami, D. K, Hong, Y. J., Barrett, D. M., Mitchell, A. E. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1237-1241.
- Avello, M., Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 494(2), 161-172.
- Aybastier, Ö. Isik, E., Sahin, S., Demir, C. (2013). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 444, 558-565.
- Azuola, R., Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistidas por ultrasonido (EUA). *Tecnología en marcha*, 20(4), 30-40.
- Bai, X. L., Yue, T. L., Yuan, Y. H., Zhang, H. W. (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from apple pomace using response surface methodology and HPLC análisis. *Journal of Separation Science*, 33, 3751–3758.
- Ballard, T. S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., O’Keefe, S. (2010). Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*, 120(4), 1185-1192.
- Balunas, M. J., Kinghorn, D. A., (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78, 431-441.
- Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Berechet, D. M., Stelescu, M. D., Craiciun, G. (2015). Chemical composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Romania. *Revista de Chimie.*, 66(11), 1814-1818.
- Blumberg. S., Frank, O., Hofmann, T. (2010). Quantitative studies on the

influence of the bean roasting parameters and hot water percolation on the concentrations of bitter compounds in coffee brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3720-3728.

- Bohn, T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72, 429-452.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., Bohn, T. (2011). Total, phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128, 14-21.
- Box, G. E. P., Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2, 455-475.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28, 25- 30.
- Bugianesi, R., Salucci, M., Leonardi, C., Ferracane, R., Catasta, G., Azzini, E., Maiani, G. (2004). Effect of domestic cooking on human bioavailability of naringenin, chlorogenic acid, lycopene and beta-carotene in cherry tomatoes. *European Journal of Nutrition*, 43, 360-366.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74, 2157-2184.
- Callejas, M. C. (2006). Flora Medicinal de San Bartolo Tutotepec, Hidalgo. Hidalgo, México, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo.
- Camel, V. (2001). Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *The Analyst*, 126(7), 1182-1193.
- Cárdenas, O. N. C., Pérez, G. C., Zavala, S. M. A., Hernández, R. A. B., Pérez, S. G., (2007). Actividad antifúngica de seis plantas sobre *Aspergillus flavus* Link. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 36(3), 21-26.
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, J. F., Quiapo-

- Ortuño., M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 1415–1422.
- Carew, L. A., Sparrow, M. A., Curtin, D. C., Close, C. D., Dambergs, G. R. (2013). Microwave Maceration of pinot noir grape must: sanitation and extraction effects and wine phenolics outcomes. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 954-963.
 - Carlsen, H. M., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bohn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I. E., Berhe, N., Willett, W. C., Phillips, K. M., Jacobs, D. R., Blomhoff, R. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, 9(3), 1-11.
 - Castillo, G. E., Martínez, S. I., Mendocilla, M., Villar M. (2016). Manual de Fitoterapia. Barcelona, España, DRK Edición.
 - Chandrasekara, A., Shahidi, F. (2012). Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated *in vitro* digestion and microbial fermentation. *Journal of functional foods*, 4, 226-237.
 - Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., Albert-Vian. (2016). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications A Review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.
 - Cheng, H. Y. Ling, Y. C., Hsieh, C. L. (2007). Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food chemistry*, 104(4), 1418-1424.
 - Chul, K. H., Yeop, L. J., Gyeong, J. M., Song, H., Kim, S. (2018). Seasonal variations in the phenolic compounds and antioxidant activity of *Sasa quelpaertensis*. *Industrial Crops & Products*, 122, 506-512.
 - Cilla, A., González-Sarrias, A., Tomas-Barberan, F. A., Espin, J. C., Barbera, R. (2009). Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 114(3), 813-

820.

- CONABIO. (2016). Especies, México: CONABIO. <http://bios.conabio.gob.mx/especies/6035108>.
- CONAFOR. (2010). Plantas Medicinales de la Farmacia viviente del CEFOFOR: usos terapéuticos, tradicionales y dosificación, México: Comisión Nacional Forestal.
- 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.
- Corona, J. E., Martínez, N. N., Ruiz, E. H., Carranza, C. J. (2016). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de semillas de chia (*Salvia hispanica L.*) y su actividad antioxidante. *Agrociencia*, 50, 4013-412.
- Cortés, C. J. (2005). Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento del cáncer e infecciones en Tepatepec, Hidalgo (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
- Cuesta, M. C. A. (2017). Metodología de Superficies de Respuesta, gran alternativa para incrementar la productividad de sus procesos. *Centro de Ingeniería de la Calidad*
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remimi, H., Madani, K. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis L.* leaves. *Food Chemistry*, 166, 585-595.
- Dahmoune, F., Spigno, G., Moussi, K., Remini, H., Cherbal, A., Madani, K. (2014). Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Industrial Crops and Products*. 61, 31-40.
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.
- Derwich, E., Benziane, Z., Boukir, A. (2009). Chemical compositions and insecticidal activity of essential oils of three plants *Artemisia sp: Artemisia herba-*

alba, *Artemisia absinthium* and *Artemisia pontica* (morocco). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food chemistry*, 8(11), 1202-1211.

- Djeridane, A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654-660.
- Domínguez, X. A., Butruile, D., Wapinsky, J. (1971). Les alcaloides principaux de *Decatropis bicolor*. *Phytochemical report*, 10, 2554-2555.
- Dorta, E., Lobo, M. G., González, M. (2012). Using drying treatments to stabilize mango peel and seed: Effect on antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 45, 261-268.
- Duan, L., Jiang, R., Shi, Y., Duan, C., Wu, G. (2016). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of higher fatty acids in grape berries (seed-free fruit sections). *Analytical Methods*, 32, 6208-6215.
- Edeoga, H. O., Okwu, D. E., Mbaebie, B. O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4(7), 685-688.
- Escamilla, P. B., Moreno, C. P. (2015). *Plantas Medicinales de La Matamba y El Piñonal, municipio de Jamapa, Veracruz, Veracruz, México: Instituto de Ecología.*
- Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*, 3, 108- 120.
- Espert, M., Periche, A., Heredia, A., Castelló, M. L. (2012). Aplicación de ultrasonidos o energía de microondas a la extracción de compuestos antioxidantes en infusiones de hoja de estevia. Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universidad Politécnica de Valencia.
- Estanislao, G. C. C., Aquino, C. A., Pérez, I D. G., San Martín, M. E., Morales, L. J. (2016). *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk essential oil induces apoptosis of the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(266), 1-11.
- Fálder, A. R. (2005). Café, té, chocolate e infusiones. *Enciclopedia de los*

alimentos, 2, 117-130.

- Farnsworth, R. N., Soejarto, D. D. (1991). *The Conservation of Medicinal Plants*. Olayiwola Akerele, NY, USA: Vernon Heywood and Hugh Syngé.
- Fernández, J. M., Da Silva-Grigoletto, M. E., Túnez-Fiñana, I. (2009). Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*, 2(1), 19-34.
- Flores, M. H., León, C. C., Estarrón, E. M., Orozco, I. A. (2016). Optimización del proceso de extracción de sustancias antioxidantes a partir del orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(3), 773-785.
- Foti, M. C., Dasquino, C., Geraci, C. (2004). Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH• radical in alcohol solutions. *Journal of Organic Chemistry*, 69, 2309-2314.
- Fratianni, A., Cinquanta, L., Panfili, G. (2010). Degradation of carotenoids in orange juice during microwave heating. *Food Science and Technology*, 43, 867-871.
- Friedman, M., Jurgens, H. S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2101- 2110.
- Fuentes, C. I., Villavicencio, N. N., Pérez, E. B. (2013). Plantas medicinales de Omitlán, Hidalgo, México. Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas, 2, 129-135.
- Fylaktakidou, C. K., Hadjipavlou, L. D., Litinas, E. K., Nicolaidis, D. N. (2004). Natural and Synthetic Coumarin Derivatives with Anti-Inflammatory/Antioxidant Activities. *Current Pharmaceutical Design*, 10, 3813-3833.
- Gádor, I. H., Almajano, M. P. (2017). Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination: A Review. *Antioxidant (Basel)*, 6(7), 1-27.
- Gao, M., Liu, C. (2005). Comparison techniques for the extraction of flavonoids from cultures cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1461-1463.

- García A. A., González, L. N., Márquez, C., Martínez, V. M. (2003). Cumarinas presentes en especies del género *Casimiroa*. *Revista de la Sociedad Química de México*, 47(2), 151-154
- García, A. A., Ramírez, A, T., Parra, D. H., Velázquez, G., Martínez, V. M. (2000). Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model. *Planta Medica*, 66(3), 279-281.
- García, C. E. M., Rodríguez, L. A. D., Mayor, L., Ballesteros, R., Conidi, C., Cassano, A. (2015). Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradise* L.) solid wastes. *LWT. Food Science and Technology*, 64, 1114-1122
- García, G. J., Ramírez, H. B., Robles, A. G., Zañudo, H. J., Salcedo, R. A., García, A. J. (2012a). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Saberes y razones*, 39, 29-44.
- García-Márquez, E., Román-Guerrero, A., Pérez-Alonso, C., Cruz-Sosa, F., Jiménez-Alvarado, R., Vernon-Carter, E. J. (2012b). Effect of solvent-temperature extraction conditions on the initial antioxidant activity and total phenolic content of muiltle extracts and their decay upon storage at different pH. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1),1-10.
- Garret, D. A., Failla, M. L., Sarama, R. J. (1999). Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4301-4309.
- Gil-Chávez, J., Villa, J., Ayala-Zavala, J., Basilio, H. J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., González-Aguilar, G. (2013). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety*, 12(1), 5-23.
- Gloess, A. N., Schonbachler, B., Klopprogge, B., D'Ambrosio, L., Chatelain, K., Bongartz, A., Strittmatter, A., Resta, M., Yeretjian, C. (2013). Comparison of nine common coffee extraction methods: instrumental and sensory analysis. *European Food Research and Technology*, 236, 607-627

- González, C. G., García, L. D. (2012). Ejercicio físico y radicales libres, ¿es necesaria una suplementación con antioxidantes?. *Revista Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y del Deporte*, 12(46), 369-388.
- González-Coloma, A., Bailen M., Díaz, E. C., Fraga, M. B., Martínez-Díaz, R., Zuñiga, E. G., Contreras, A. R., Cabrera, R., Burillo, J. (2012). Major components of Spanish cultivate *Artemisia absinthium* populaions: Antifeedant, antiparasitic, and antioxidant effects. *Industrial Crops and Products*, 37, 401-407.
- González, L. K., Quesada, P. I., Julcour, L. C., Delmas, H., Cruz, G. G., Jáuregui, H. J. (2010). El empleo del ultrasonido en el tratamiento de aguas residuales. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 41(1), 1-11.
- Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M., Dangles, O. (2003). Quantitative Kinetic Analysis of Hydrogen Transfer Reactions from Dietary Polyphenols to the DPPH• Radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 615-622.
- Granato, D., Araújo, C. V. M., Jarvis, B. (2014). Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. *Food Research International*, 55, 137-149.
- Guo, L., Zhu, W., Xu, F., Liu, M., Xie, Y., Zhang, J. (2014a). Optimized ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Cyclina sinensis* and evaluation of antioxidant activities *in vitro*. *Journal of Food*, 12(1), 32-39.
- Guo, Z. K., Jin, Q. H., Fan, G. Q., Duan, Y. P., Qin, C., Wen, M. J. (2001b). Microwave assisted extraction of effective constituents from a Chinese herbal medicine. *Radix puerariae*. *Analytica Chimica Acta*, 436, 41-47.
- Gutiérrez, M. A., Pino, B. N., Cuesta, L. J. A. (2011). Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de varios extractos etanólicos de plantas medicinales. *Investigación, Biodiversidad y Desarrollo*, 30(1), 66-73.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33 – 50.
- Halliwell, B., Rafter, J., Jenner, A. (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: Direct or indirect effects?

Antioxidant or not? *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 268S-276S.

- Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., Zhang, X., Xia, W. (2009). Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity *in vitro*. *Separation and Purification Technology*, 70, 63-70.
- Heinrich, M., Ankli, A., Frei, B., Waimann, C., Sticher, O. (1998). Medicinal plants in México: healers' consensus and cultural importance. *Social Science & Medicine*, 47(11), 1859-1871.
- Horubala, A. (1999). Antioxidant capacity and their changes in fruit and vegetables processing. *Przem. Ferm. Owoc. Warz*, 3, 30-31.
- Huang, S. J, Mau, J. L. (2006). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of γ -irradiation LWT. *Journal of Food Science and Technology*, 39, 707-716.
- Illy, E. (2002). The complexity of coffee. *Scientific American*, 286(6), 86-91.
- Jaiswal, A. K., Abu-Ghanman, N. (2013). Degradation kinetic modelling of color, texture, polyphenols and antioxidant capacity of York cabbage after microwave processing. *Food Research International*, 53, 125-133.
- Jakobek, L., Boc, M., Barron, A. R. (2015). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Apples. *Food Analytical Methods*, 8(10), 2612-2625.
- Jaramillo, J. C., Jaramillo, E. A., D'Armas, H., Troccoli, L., Rojas, A. L. (2016). Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemisia salina*. *Revista de Biología Tropical*, 64(3), 1-6.
- Julio, L., Burillo, J., Giménez, C., Cabrera, R., Díaz, C., Sanz, J., González, A. (2015). Chemical and biocidal characterization of two cultivated *Artemisia absinthium* populations with different domestication levels. *Industrial Crops and Products*, 76, 787-792.
- Juteau, F., Jerkovic, I., Masotti, V., Milos, M., Mastelic, J., Bessière, J. M., Viano,

- J. (2003). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Artemisia absinthium* from Croatia and France. *Planta Medica.*, 69, 158-161.
- Kamiloglu, S., Demirci, M., Selen, S., Tozdemir, G., Boyacioglu, D., Capanoglu, E. (2014). Home processing of tomatoes (*Solanum lycopersicum*): Effects on in-vitro bioaccessibility of total lycopene, phenolics, flavonoids and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 2225-2233.
 - Karabegovic, I. T., Stojicevic, S. S., Velickovic, D. T., Todorovic, Z. B., Nikolic, N. C., Lazic, M. L. (2014). The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. *Industrial Crops and Products*, 54, 142-148.
 - Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 21-60.
 - Knorr, D., Ade-Omowaye, B. I. O., Heinz, V. (2002). Nutritional improvement of plant foods by non-thermal processing. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61, 311-318.
 - Konishi, Y., Zhao, Z., y Shimizu, M. (2006). Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7539-7543.
 - Kovač, T., Kovač, M., Strelec, I., Nevistić, A., Molna, M. (2017). Antifungal and antiaflatoxicogenic activities of coumarinyl thiosemicarbazides against *Aspergillus flavus* NRRL 3251. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 68, 9-15.
 - Kramer, B. K., Ryan, P. B. (2011). Soxhlet and microwave extraction in determining the bioaccessibility of pesticides from soil and model solids. *Proceeding of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research*, 196-210.
 - Kroon, A. P., Clifford, N. M., Crozier, A. (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro?. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 15–21.
 - Kulkarni, V. M., Rathod, V. K. (2014). Mapping of an ultrasonic bath for ultrasound assisted extraction of mangiferin from *Mangifera Indica* leaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(2), 606-61

- Kuskoski, M. E., Aduero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726-732.
- Lafay, S., Gil-Izquierdo, A., Manach, C., Morand, C., Besson, C., Scalbert, A. (2006). Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *Journal of Nutrition*, 136, 1192-1197.
- Lee, Ye-Ji, Thiruvengadam, M., Chung, Min-Il, Nagella, P. (2013). Polyphenol composition and antioxidant activity from the vegetable plant *Artemisia absinthium* L. *Australian Journal of Crop Science*, 7(12), 1921-1926.
- Leenen, R., Roodenburg, A. J., Tijburg, L. B., Wiseman, S. A. (2000). A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54, 87-92.
- León, M. G., Osorio, F. M. del R. Martínez, U. S. R. (2015). Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(4), 742-750.
- Li, S., Li, S., Gan, R., Song, F., Kuang, L., Li, H. (2013). Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 51, 289-298.
- Li, X. M., Li, X. L., Zhou, A. G. (2007). Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from *Lycium barbarum* fruits *in vitro*. *European Polymer Journal*, 43, 488-497.
- Li. Y., Skouroumounis, G. K., Elsey, G. M., Taylor, D. K. (2011). Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chemistry*, 129(2), 570-576.
- Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93, 47-56.
- Llorach, R., Tomás-Barberán, F., Ferreres, F. (2004). Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. *Journal of Agricultural*

and Food Chemistry, 45(7), 1390-1393.

- Llorens, M. J., Castel, Z. V., Pascual, R. R. (2008). Composición del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L. procedente del término municipal de Calamocha (Teruel). Caracterización de su quimiotipo y estudio de las variaciones estacionales, *Xiloca*, 36, 61-84.
- Londoño, L. J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Corporación Universitaria Lasallista*, 129-162.
- López, G. I., De Peña, P. M., Cid, C. (2007). Correlation of selected constituents with the total antioxidant capacity of coffee beverages: influences of the brewing procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6110-6117
- Mahmoudi, M., Ebrahimzadeh, M., Ansaroudi, F., Nabavi, S. (2009). Antidepressant and antioxidant activities of *Artemisia absinthium* L. at flowering stage. *Africal Journal of Biotechnology*, 8(24), 7170-7175.
- Maldonado, S. O., Jiménez, V. E. N., Guapillo, V. M., Ceballo, R. G., Méndez, B. E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev Med UV*, 32-39.
- Mamani, A. R., Mejia, G. T. (2018). Estrés oxidativo celular y diabetes por alimentos refinados tipo snack. *Revista Médica Hospital Hipólito Unanue de Tacna*, 11(1), 15-21.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-47.
- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007). Microwave Assisted Extraction- An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 7-18.
- Martínez, R. A., Contreras, E. J. C., Belares, C. R. (2010). Extracción de polifenoles asistida por microondas a partir de *Punica granatum* L. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 2(4).
- Maslarova-Yanishlieva, N. (2001). Antioxidants in food. Unidet State of America: Woodhead Publishing.

- Mayor, O. R. (2010) Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.*, 5(2), 23-29.
- McDonald-Wicks, K. L., Wood, G. L., Garg, L. M. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 86, 2046-2056.
- Mesa, V. A. M., Zapata, U. S., Arana, L. M., Zapata, C. I., Monsakve, Z., Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(1), 1-10.
- Miller, D. D., Schricker, B. R., Rasmussen, R. R., Van Campen, D. (1981). An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34(10), 2248-2256.
- Miron, T., Plaza, M., Bahrim, G., Ibáñez, E., Herrero, M. (2010). Chemical and composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Chromatography*, 1218(30), 4918-4927.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH•) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- Msaada, K., Salem, N., Bachrouch, O., Bousselmi, S., Tammar, S., Alfaify, A., Al Sane, K., Ammar, W. B., Azeiz, S., Brahim, A. H., Hammami, M., Selmi, S., Limam, F., Marzouk, B. (2015). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oils and phenolics. *Journal of Chemistry*, 1- 12.
- Nikolic, M., Glamoclija, J., Ferreira, I., Caldheha, R., Fernandez, A., Markovic, T., Markovic, D., Giweli, A., Sokovic, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183-190.
- Nguyen, T. N. T., Phan, L. H. N., Le, V. V. M. (2014). Enzyme-assisted and ultrasound-assisted extraction of phenolics from mulberry (*Morus alba*) fruit:

Comparison of kinetic parameters and antioxidant level. *International Food Research Journal*, 21(5), 1937-1940.

- Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., Hendrickx, M. (2008). Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 320-328
- Odabasoglu, F., Aslan, A., Cakir, A., Suleyman, H., Karagoz, Y., Bayir, Y., Halici, M. (2005). Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*, 76(2), 216-219.
- Oroian, M., Escriche, I. 2015. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.
- Özgen, U., Mavi, A., Terzi, Z., Coskun, M., Yildirim, A. (2004). Antioxidant activities and total phenolic compounds amount of some asteraceae species. *Turkish Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 1(3), 203-216.
- Pabón, C. L., Rodríguez, F. M., Hernández, R. P. (2017). Plantas medicinales que se comercializan en Bogotá (Colombia) para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 16(6), 529-546.
- Palma, M., Barroso, C. G. (2002). Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analytica Chimica Acta*, 458, 119-130.
- Palmero, P., Panozzo, A., Simatupang, D., Hendrickx, M., Van-Loey, A. (2014). Lycopene and beta-carotene transfer to oil and micellar phases during *in vitro* digestion of tomato and red carrot based-fractions. *Food Research International*, 64, 831-838.
- Pardo, G., Delgado, R., Velho, J., Inada, N., Curti, C., Vercesi, A. (2005). *Mangifera indica* L. extract (Vimang) inhibits Fe²⁺-citrate-induced lipoperoxidation in isolated rat liver mitochondria. *Pharmacological Research*, 51(5), 427- 35.
- Patiño, O. A. (2000). Introducción a la ingeniería química: balances de masa y energía. Tomo I, México: Universidad Iberoamericana.

- Pérez, M. M., Caemmerer, B., Paz de Peña, M., Cid, C., Kroh, L. (2010). Influence of Brewing Method and acidity Regulators on the antioxidant capacity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2958-2965.
- Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., García-Viguera, C. (2002). *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(8), 2308-2312.
- Peuchant, E., Delmas-Beauvieux, M. C., Dubourg, L., Thomas, M. J., Perromat, A., Aparicio, M., Clerc, M., Combe, C. (1997). Antioxidant effects of a supplemented very low protein diet in chronic renal failure. *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 313-320.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., Chemat, F., (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: a review. *Food Control*, 31, 593-606.
- Pisoschi, A. M., Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97(5), 55-74.
- Podsedek, A. (2007). Natural antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT Food Science and Technology*, 40, 1-11.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11), 1142-1145.
- Prakash, M. J., Manikandan, S., Thirugnanasambandham, K., Vigna, N. C., Dinesh, R. (2013). Box–Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 92, 604-611.
- Prakash, M. J., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., Sridhar, R. (2013). Optimization of microwave assisted extraction of pecti from orange peel. *Carbohydrate Polymers*, 97, 703-709.
- Prioir, R. L., Wu. X., Schain, K. (2005). Standardized methods for determination

of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.

- Puertas-Mejía, A. M., Ríos-Yepes, Y., Alberto, R. B. (2013). Determinación de antocianinas mediante extracción asistida por radiación de microondas en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de alto consumo de Antioquia, Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 288-297.
- Qu, W., Shi, S., Li, P., Pan, Z., Venkitasamy, C. (2014). Extraction kinetics and properties of proanthocyanidins from pomegranate peel. *International Journal of Food Engineering*, 10, 683.
- Rahman, I., Biswas, S. K., Kirkham, P. A. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 72, 1439- 1452.
- Rajha, H. N., Darra, E. N., Hobaika, Z., Boussetta, N., Vorobiev, E., Mroun, R. G., Louka, N. (2014). Extraction of total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and tannins from grape by products by response Surface methodology. Influence of solid-liquid ratio, particle size, time, temperature and solvent mixtures on the optimization process. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 397-409.
- Ramírez, G. J., Jaime, O. J., Castañeda, O. A., Añorve, M. J., Salazar, P. M., González, O. G., Contreras, L. E. (2016). Optimization of Physical Conditions for the Aqueous Extraction of Antioxidant Compounds from Ginger (*Zingiber officinale*) Applying a Box-Behnken Design. *Plant Foods for Human Nutrition*. 71(3). DOI 10.1007/s11130-016-0582-1
- Real Academia Española (2017). Real Academia Española. Recuperado de [//dle.rae.es/srv/fetch?id=ZQ9rRqa](http://dle.rae.es/srv/fetch?id=ZQ9rRqa).
- Ramírez-Moreno, E., Marques, C. D., Sánchez-Mata, M. C., Goñi, I. (2011). *In vitro* calcium bioaccessibility in raw and cooked cladodes of prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* L. Miller). *LWT-Food Science and Technology*, 44(7), 1611-1615.
- Restrepo, S. D. C., Narváez, C. C. E., Restrepo, S. L. P. (2009). Extracción de

compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia. *Química Nova*, 32(6), 1517-1522.

- Reza, T., Heidarizadi, E., Benvidi, A. (2012). Optimization of ultrasonic- assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 98, 16-23.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Bolwell, P., Bramley, P., Pridham, J. (1995). The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-83.
- Rietveld, A., Wiseman, S. (2003). Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *The Journal of Nutrition*, 133, 3285-3292.
- Ríos, Y. M., Ramírez, C. A., León, R. I., Estrada, S. S., Navarrete, V. G., Aguilar, G. B. (2011). Complete NMR assignment of 3, 4-seco-lup-20 (29)-en- 3-oic acid from *Decatropis bicolor*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 50, 329 – 331.
- Rocha, S., Maeztu, L., Barros, A., Cid, C., Coimbra, A. M. (2003). Screening and distinction of coffee brews based on headspace solid phase microextraction/gas chromatography/principal component analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 43-51.
- Rodríguez, A., I., Franco, D., Sánchez, M., Zapata, C., Vázquez, J. A. (2014). Optimization of antioxidant extraction from *Solanum tuberosum* potato peel waste by surface response methodology. *Food Chemistry*, 165, 290-299.
- Rodríguez, R. Z., Robaina, M. M., Jáuregui, H. U., Blanco, G. G., Rodriguez, C. J. (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 45(1), 189-147.
- Romero-Alvira, D., Villalba, M. P., Mur, M., Cabeza, F., Guerrero, L., Simail E *et al.* (1990). Importancia de los antioxidantes en la alimentación humana. *Med Clin (Bar)*, 94, 69-75.
- Routray, W., Orsat, V. (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 409-424.
- Sahin, E. S., Soysal, C. (2013). Use of ultrasound in food preservation. *Natural*

Science, 5(8), 5-13.

- Sahin, S., Aybastier, Ö., Isik, E. (2013). Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology. *Food Chemistry*, 141, 1361-1368.
- Sahin, S., Samli, R., (2013). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 595-602.
- Salomón, I. S., Bermello, C. A., Marquez, C. T., Lopez, H. O., Gonzales, S. M., Llópiz, Y. J. (2013). Extracción asistida por microondas de lípidos de las semillas de Cucurbita pepo L. (calabaza). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1), 17-26.
- Sánchez, F. J. A., Ramírez, M. E., Cansino, C. N. S., Manríquez, T. J. J., Ayala, N. A. (2015). Compuestos fenólicos, actividad antioxidante y bioaccesibilidad intestinal in vitro de un jugo de zarzamora termoultrasonificado. *Educación y Salud, Boletín Científico de Ciencias de la Salud ICESA*, 4(7), <https://doi.org/10.29057/icsa.v4i7>
- Sánchez, G. A., Álvarez, Z. E., López, M. L. (2016). Diversity and distribution patterns of ferns and lycophytes in a cloud forest in Mexico. *Revista Chapingo*, 22(3), 234-253.
- Sánchez-Valle, V., Méndez, S. N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Revista de Investigación Médica Sur*, 20(3), 161-168.
- Sepúlveda, R. T. C., Ciro, G. G. L., Zapata, M. J. E. (2016). Extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de hojas de Bixa Orellana L. (achiote). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2), 133-144.
- Serafini, M., Ghiselli, A. & Ferro-Luzzi, A. (1996) *In vivo* antioxidant effect of green and black tea in man. *European Journal of Clinical Nutrition*, 50, 28–32.
- Shahidi, F., Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.
- Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations. A review of current

status. *Chemical Engineering and Processing*, 53(25), 10-23.

- Shuntaro, T., Hiroyuki, I., Masahiro, S., Jun-ichi, A. (2008). Microwave heating of tea residue yields polysaccharides, polyphenols, and plant biopolyester. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11293-11299.
- Singh, B. K., Sharma, A. (2011). Evaluation of antioxidant and free-radical scavenging potential of *Artemisia absinthium*. *Pharmaceutical Biology*, 49(12), 1216-1223.
- Singh, R., Kumar, P., Sigh, G. 2012. Total phenolic, flavonoids and tannin contents in different extracts of *Artemisia absinthium*. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 1(2), 101-104.
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., Tarantilis, P. A. (2013). Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 53, 46-54.
- Sokmen, M., Angelova, M., Krumova, E., Pashova, S., Ivancheva, S., Sokmen, A., Serkedjieva, J. (2005). *In vitro* antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. *Life Sciences*, 76(25), 2981-2993.
- Spigno, G., De Faveri, D. M., (2009). Microwave-assisted extraction of tea phenols: a phenomenological study. *Journal of Food Engineering*, 93, 210-217.
- 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 Food Engineering*, 81, 200-208.
- Stanisavljevic, N., Samardzic, J., Jankovic, T., Savikin, K., Mojsin, M., Topalovic, V., Stevanovic, M. (2015). Antioxidant and antiproliferative activity of chokeberry juice phenolics during *in vitro* simulated digestion in the presence of food matrix. *Food Chemistry*, 175, 516-522.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., Conte, A. (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120, 599-606.

- Tariq, K. A., Chishti, M. Z., Ahmad, F., Shawl, A. S. (2009). Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematode. *Veterinary Parasitology*, 160, 83-88.
- Tomás, B. F., Espín, G. J. (2009). Alimentos saludables y de diseño específico, Madrid, España: Instituto Tomas Pascual Sanz
- Torres, A. G. A., Muñoz, B. O. A., Parrilla, A. E., Nuñez, G. J. A., Medrano, W. A., Sáyago, A. S. G., De la Rosa, L. A. (2018). Optimización de la extracción e identificación de compuestos polifenólicos en anís (*Pimpinella anisum*), clavo, (*Syzygium aromaticum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(2), 103-115.
- Trinidad, T. P., Wolever, T. M., & Thompson, L. U. (1996). Availability of calcium for absorption in the small intestine and colon from diets containing available and unavailable carbohydrates: an in vitro assessment. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 47(1), 83-88.
- Tuberoso, C. I. G., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., Cabras, P. (2007). Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chemistry*, 103(4), 1494-1501.
- Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, Y. S. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*. 99, 835-841.
- Unlu, N. Z., Bohn, T., Francis, D. M., Nagaraja, H. N., Clinton, S. K., Schwartz, S.J. (2007). Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from alltrans-rich tomato sauce in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 98, 140-146.
- Uribe, E., Delgadillo, A., Giovagnoli, V. C., Quispe, F., I., Zura, B. L. (2015). Extraction Techniques for Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity Determination of Chilean Papaya (*Vasconcellea pubescens*) Fruit. *Journal of Chemistry*, 1-8.

- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B. D. (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113-4117.
- Vidal, F. T., Ferreira, L. A. K., Araújo, S. A. R., Góes, C. A. P., De Castro, M. E., Sousa, C. B., Narciso, F. F. A., Rodrigues, S. (2016). Ultrasound processing to enhance drying of cashew apple bagasse puree: Influence on antioxidant properties and in vitro bioaccessibility of bioactive compounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31,237–249.
- Villavicencio, M., Pérez, B., Ramírez, A. (1998). Lista florística del Estado de Hidalgo. Recopilación bibliográfica, Pachuca, Hidalgo U.A.E.H. (Ed.).
- Villavicencio, M. A., Pérez, E. B. E. (2002). Plantas útiles del Estado de Hidalgo. Tomo II. Pachuca, Hgo., México: UAEH.
- Villavicencio, M. A. (1990). Actividad antimicrobiana de *Decatropis bicolor*. En: Tiempo nuestro, investigación científica y tecnológica. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, 139-147.
- Villavicencio, R. M. B. (2014). Estudios de los recursos fitoterapéuticos ancestrales para su conservación y aprovechamiento sostenible. Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie *Artemisia absinthium*. Tesis. Loja, Ecuador, Universidad Técnica Particula de Loja.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303-313.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X. (2007). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry* 106, 804-810.
- Wang, J., Zhang, J., Wang, X., Zhao, B., Wu, Y., Yao, J. (2009). A comparison study on microwave-assisted extraction of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides with conventional method: Molecule structure and antioxidant activities evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 483-492.
- Weathers, J. P., Jordan, J. N., Lasin, P., Towler, J. M. (2014). Simulated

digestion of dried leaves of *Artemisia annua* consumed as a treatment (pACT) for malaria. *Journal of Ethnopharmacology*, 151, 858-863.

- Wiart, C. (2007). *Ethnopharmacology of medicinal plants: Asia and the Pacific*, Totowa, New Jersey: Ed. Humana Press Inc.
- Xianzhe, Z., Fangping, Y., Chenghai, L., Xiangwen, X. (2011). Effect of process parameters of microwave assisted extraction (MAE) on polysaccharides yield from Pumpkin. *Journal of Northeast Agricultural University*, 8(2), 79-86.
- Xu, D. P., Zheng, J., Zhou, Y., Li, Y., Li, S., Li, H. B. (2017). Ultrasound- assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. *Food Chemistry*, 217, 552-559.
- Yang, L., Jiang, J. G., Li, W. F., Chen, J., Wang, D. Y., Zhu, L. (2009). Optimum extraction process of polyphenols from the bark of *Phyllanthus emblica* L. based on the response surface methodology. *Journal of Separation Science*, 32(9), 1437-1444
- Yap, C. F., Ho, C. W., Wan Aida, W. M., Chan, S. W., Lee, C. Y., Leong, Y. S. (2009). Optimization of extraction conditions of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoa carambola* L.) residues. *Sains Malaysiana*, 38(4), 511-520.
- Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada, P. L., López, V. E., Estrada, M. E., Aguilar, A., Reyes, C. R. (2005). Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 293-299.
- Yedhu, K. R., Neelesh, C. M., Vellingiri, V., Rajan, K. S. (2016). Insights on the influence of microwave irradiation on the extraction of flavonoids from *Terminalia chebula*. *Separation and Purification Technology*, 170, 224-233.
- Yedhu, K. R., Rajan, K. S. (2015). Microwave assisted extraction of flavonoids from *Terminalia bellerica*. *Separation and Purification Technology*, 157, 169-178.
- Ying, Z., Han, X., Li, J. (2011). Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry*, 127, 1273-1279.
- Yoeh, S., Shi, J., Langrish, T. A. G. (2008). Comparisons between different

techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. *Journal of Desalination*, 218, 229-237.

- Zahm, A., Speer, K. (2010). Coffee aroma influence of the brewing method and the used coffee. ASIC-23rd Colloque Scientifique International sur le Cafe, ASIC, Paris, 239-243.
- Zgoraka, G. (2009). Pressurized liquid extraction versus other extraction techniques in micropreparative isolation of pharmacologically active isoflavones from *Trifolium L. species*. *Talanta*, 79, 46-53.
- Zhang, Z. S., Wang, L. J., Li, D., Jiao, S. S., Chen, X. D., Mao, Z. H. (2008). Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 62, 192-198.
- Zhao, Z., Egashira, Y., Sanada, H. (2004). Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in the liver. *Journal of Nutrition*, 134, 3083-3088.

10 Anexos

Anexo A

Extracción convencional

Niveles			Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Muestra g/100 g
1	-1	0	90	5	6
0	1	1	55	25	10
1	0	1	90	15	10
0	1	-1	55	25	2
0	0	0	55	15	6
-1	1	0	20	25	6
0	0	0	55	15	6
0	-1	1	55	5	10
-1	0	-1	20	15	2
1	0	-1	90	15	2
1	1	0	90	25	6
0	-1	-1	55	5	2
0	0	0	55	15	6
-1	-1	0	20	5	6
-1	0	1	20	15	10

Extracción con ultrasonido

Niveles			Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Muestra g/100g
0	0	0	45	15	6
0	0	0	45	15	6
0	0	0	45	15	6
0	-1	1	45	5	10
1	0	-1	70	15	2
1	0	1	70	15	10
-1	0	1	20	15	10
1	-1	0	70	5	6
0	-1	-1	45	5	2
0	1	1	45	25	10
-1	-1	0	20	5	6
0	1	-1	45	25	2
1	1	0	70	25	6
-1	0	-1	20	15	2
-1	1	0	20	25	6

Extracción con microondas

Niveles			Potencia	Tiempo (min)	Muestra g/100g
0	1	-1	30	2	2
-1	0	1	20	1.5	10
-1	-1	0	20	1	6
1	0	1	40	1.5	10
-1	1	0	20	2	6
0	1	1	30	2	10
1	0	-1	40	1.5	2
1	1	0	40	2	6
0	0	0	30	1.5	6
0	0	0	30	1.5	6
0	0	0	30	1.5	6
0	-1	-1	30	1	2
-1	0	-1	20	1.5	2
1	-1	0	40	1	6
0	-1	1	30	1	10

Anexo B

Extracción con prensa francesa

Niveles		Tiempo (min)	Muestra g/100g
-1	1	0.75736	6
-1	1	5	11.6569
0	1	5	6
1	1	2	2
0	1	5	6
-1	1	5	0.3431
-1	1	9.24264	6
0	1	5	6
1	1	8	2
1	1	8	10
0	1	5	6
1	1	2	10
0	1	5	6

