



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

CAMPUS CALKINÍ

“Evaluación de la composición proximal, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de hoja y diferentes partes del fruto (cáscara, piel de semilla y semilla) de *Brosimum alicastrum*”

TESIS

Que presenta:

NITMAR ITZEL PAT MORENO

Como requisito para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

Director de tesis:

DR. JORGE CARLOS CANTO PINTO

Calkiní, Campeche, México

Enero, 2023





Instituto Tecnológico Superior de Calkiní, en el Estado de Campeche

Calkiní, Campeche a 07 de Diciembre de 2022.

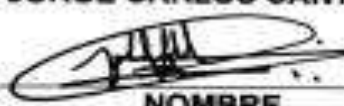
El Comité de tesis del candidato (a) a grado: Nitmar Itzel Pat Moreno, constituido por CC. Dr. Jorge Carlos Canto Pinto, Dr. Víctor Manuel Moo Huchin, Dr. Raciél Javier Estrada León y Dr. Carlos Rolando Ríos Soberanis habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: **Evaluación de la composición proximal, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de hoja y diferentes partes del fruto (cáscara, piel de semilla y semilla) de *Brosimum alicastrum***, que presenta como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Ingeniería, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.15.5, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado del Tecnológico Nacional de México, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

ATENTAMENTE



NOMBRE

DR. JORGE CARLOS CANTO PINTO



NOMBRE

DR. VICTOR MANUEL MOO HUCHIN



NOMBRE

**DR. RACIEL JAVIER ESTRADA
LEÓN**



NOMBRE

**DR. CARLOS ROLANDO RÍOS
SOBERANIS**



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



SE
SECRETARÍA DE ECONOMÍA



Instituto Tecnológico Superior de Calimá
Posgrado

Calimá, Campeche a 04 de enero de 2023

ASUNTO: Autorización de impresión de tesis

DR. DANY ALEJANDRO DZIB CAUICH
DIRECTOR ACADÉMICO
PRESENTE

Por medio del presente, nos permitimos informar, que el comité tutorial ha concluido con la revisión de la tesis: "Evaluación de la composición proximal, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de hoja y diferentes partes del fruto (cáscara, piel de semilla y semilla) de *Brosimum alicastrum*" desarrollada por estudiante **NITMAR ITZEL PAT MORENO**, con matrícula 7107 de la Maestría en Ciencias de la Ingeniería de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento Bioprocesos y Alimentos; y autorizamos la impresión de la misma, para que el estudiante continúe con el trámite de titulación.

Sin más por el momento, nos despedimos quedando a sus órdenes para cualquier comentario o aclaración.

ATENTAMENTE

Dr. Jorge Carlos Canto Pinto
Director de Tesis

Dr. Víctor Manuel Moo Huchin
Co-director de Tesis

Dr. Raciél-Javier Estrada León
Miembro comité tutorial interno

Dr. Carlos Rolando Ríos Soberanis
Miembro comité tutorial externo

Dr. Luis Alonso Cap-Herrera
Jefe de Departamento de Posgrado e Investigación

ITESCAM
INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE
CALIMÁ, EN EL ESTADO DE CAMPECHE
COORDINACIÓN DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN
CALLE 19, CAMPECHE, MÉXICO

Av. Al Camal S/N por Carretera Federal, Calimá, Campeche, C.P. 24000
Tels. 9968134370 Ext. 1001, e-mail: directoriocademitica@itescam.edu.mx, itescam.mx |
itescam.edu.mx



2022 Flores
del Año
Magón



5^{to} Congreso Internacional de
Alimentos Funcionales
o Nutraceuticos



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT



Centro de Investigación
en Alimentación y Desarrollo
CIAD



Tecnológico
de Monterrey



En el marco del 5^{to} Congreso Internacional de Alimentos Funcionales
y Nutraceuticos, el comité organizador otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

**Pat-Moreno N, Farfán-Coox A,
Canto-Pinto J, Estrada-León R,
Pérez-Pacheco E, Moo-Huchin VM**

por su valiosa participación en la presentación virtual de póster científico
con el trabajo titulado "Perfil fitoquímico y capacidad antioxidante
In vitro de extractos de diferentes tejidos de *Brosimum alicastrum*"

8-10 de junio de 2022, Guadalajara, Jalisco, México

Gustavo A.
González Aguilar

Aarón F.
González Córdova

Janet A.
Gutiérrez Uribe

Daniel A. Jacobo
Velázquez

Luis A. Mojica
Contreras

Adrián Hernández
Mendoza





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico Superior
de Calkiní, en el Estado de Campeche
Dirección General

Calkiní, Campeche, 05/enero/2023

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado:

"EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN PROXIMAL, COMPUESTOS BIOACTIVOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE HOJA Y DIFERENTES PARTES DEL FRUTO (CASCARA, PIEL DE SEMILLA Y SEMILLA DE BROSIMUM ALICASTRUM)"

Del Programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería fue llevado a cabo por NITMAR ITZEL PAT MORENO y se realizó en las instalaciones del Instituto Tecnológico Superior de Calkiní, bajo la Dirección del DR. JORGE CARLOS CANTO PINTO.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría, Fortaleza de Nuestra Cultura®

MTRO. RODOLFO ENRIQUE CARDOZO RIVERO
DIRECTOR GENERAL



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE
CALKINÍ, EN EL ESTADO DE CAMPECHE
" DIRECCIÓN GENERAL "
CLAVE: 04MSU0013P
CALKINÍ, CAMPECHE, MÉXICO



Av. Ah Canul S/N por Carretera Federal. Calkiní, Campeche, C.P. 24900
E-mail: dir_dcalkini@tecnm.mx | itescam.edu.mx



2023
Francisco
VILLA

Declaración de propiedad intelectual

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación que fueron realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en el Instituto Tecnológico Superior de Calkiní en el Estado de Campeche y en el Instituto Tecnológico de Mérida y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicha institución. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Instituto Tecnológico Superior de Calkiní en el Estado de Campeche y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Nitmar Itzel Pat Moreno



Instituto Tecnológico Superior de Calkiní, en el Estado de Campeche

Calkiní, Campeche a 04 de enero de 2023

Asunto: Carta de liberación de plagio

**NITMAR ITZEL PAT MORENO
PRESENTE**

Por este conducto me permito informarle que con base a los resultados obtenidos por el software institucional (*turnitin - similarity*) es posible afirmar que el porcentaje de similitud de la tesis es menor al máximo permitido por el consejo académico (5%). La tesis analizada corresponde a la estudiante NITMAR ITZEL PAT MORENO con número de matrícula G20137107 perteneciente al Programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería, cuyo título de tesis es **EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN PROXIMAL, COMPUESTOS BIOACTIVOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE HOJA Y DIFERENTES PARTES DEL FRUTO (CASCARA, PIEL DE SEMILLA Y SEMILLA DE BROSIMUM ALICASTRUM)**, el cual es dirigido por el DR. JORGE CARLOS CANTO PINTO.

Con base a lo descrito anteriormente, se establece la tesis como LIBERADA DE PLAGIO. Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DR. LUIS ALFONSO CAN HERRERA
JEFE DE DEPARTAMENTO DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE
CALKINÍ, EN EL ESTADO DE CAMPECHE
COORDINACIÓN DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN
CLAVE: 04MB00013P
CALKINÍ, CAMPECHE, MÉXICO

Av. Ah Canul s/n por Carretera Federal - C. P. 24900 - Calkiní, Campeche

www.itescam.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Asesores...

Gracias por confiar y permitirme trabajar con ustedes por segunda ocasión.

Dr. Jorge Carlos Canto Pinto: Mi más profunda gratitud por guiarme, aconsejarme y apoyarme de múltiples formas, por proporcionarme los reactivos necesarios para mi trabajo experimental y su invaluable cooperación en el congreso, me llevo mucho de usted

Dr. Víctor Manuel Moo Huchin: Gracias por la invitación y orientación para seguir creciendo en el área de la investigación, por apoyarme en cada etapa de este proyecto por su paciencia, tiempo y dedicación en la escritura y redacción de la tesis y el artículo, de nueva cuenta este trabajo no hubiera sido posible sin su ayuda. Mi admiración y sobre todo mi respeto a su calidad como investigador, profesional y ser humano.

Dr. Raciél Javier Estrada León: Muchas gracias por sus múltiples palabras de aliento cuando más las necesité; por ser paciente durante las clases y también por estar al pendiente en todo momento de los avances de este proyecto y sobre todo de mi persona.

Al Dr. Carlos Rolando Ríos Soberanis: Gracias Dr. Porque aún sin conocerme colaboró conmigo y mis asesores para la realización de este proyecto.

A mis grandes amigos Graciela por su apoyo incondicional y a los chicos/as del laboratorio maestrantes, doctorantes y residentes a unos por enseñarme y a otros por permitirme enseñarles, sin duda cada uno de ustedes deja aprendizajes valiosos en mí, disfruté mucho mi estancia en el laboratorio con todos ustedes, de corazón mil gracias.

A las instituciones que hicieron posible la realización de toda la parte experimental, escritura y redacción del trabajo que se presenta en esta tesis, muy especialmente **al Laboratorio de Desarrollo de Alimentos y al Laboratorio de Instrumentación Analítica** del TecNM-Mérida, por todas las facilidades, infraestructura, material y equipos proporcionados.

A la fundación Pablo García por el financiamiento otorgado que me permitió realizar los estudios de la maestría.

DEDICATORIAS

A Dios por su infinita bondad y por acompañarme en todo momento a pesar de que te he fallado Señor, nunca me has abandonado. Con toda la humildad que de mi corazón puede emanar ¡GRACIAS!

A mis padres Luis Pat y María Luisa Moreno ustedes han sido siempre ese motor que impulsa mis sueños y esperanzas; Mis mejores guías de vida, siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos y cada uno de mis objetivos personales y académicos, gracias por creer en mí siempre y nunca dejarme sola.

A mis hermanos de manera especial a mi hermana **Lucelly** quien desde que llegué a Mérida me ha cuidado y apoyado incondicionalmente muchas veces poniéndose en el papel de papá, no tengo como pagarte todo lo que has hecho por mi durante toda mi estancia contigo. Gracias, hermana por una vez más, tolerarme y comprenderme durante todo este proceso, que Dios te bendiga, multiplique y te provea siempre.

A Mi sobrina Yurley que, con su amor, su alegría y su sonrisa ha iluminado cada momento de mi vida.

INDICE

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES	3
1.1 Generalidades de <i>B. alicastrum</i>	3
1.2 Importancia del árbol.....	4
1.2.1 Valor nutricional de hojas y semillas.....	4
1.2.1 Metabolitos secundarios	9
1.2.2 Contenido de fitoquímicos y actividad antioxidante en semillas y hojas.....	20
1.3 Tamizaje fitoquímico.....	23
1.4 Extracción de compuestos con actividad biológica	24
1.5 Extracción asistida por ultrasonidos (EAU)	28
OBJETIVOS.....	35
OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
CAPITULO II.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
2.1 ESTRATEGIA GENERAL.....	36
2.2 Químicos y reactivos	38
2.3 Obtención del material vegetal y preparación de la muestra	38
2.4 Composición química proximal	38
2.5 Preparación del extracto crudo	39
2.6 Rendimiento de extracción	39
2.7 Espectro UV/Vis	39
2.8 Perfil fitoquímico	40
2.8.1 Determinación cualitativa de triterpenos y/o esteroides.....	40
2.8.2 Determinación cualitativa de esteroides	41
2.8.3 Determinación cualitativa de saponinas.....	41
2.8.4 Determinación cualitativa de taninos	41
2.8.5 Determinación cualitativa de leucoantocianidinas	41

2.8.6 Determinación cualitativa de antraquinonas	41
2.8.7 Determinación cualitativa de cumarinas.....	42
2.8.8 Determinación cualitativa de alcaloides	42
2.8.9 Determinación cualitativa de glucósidos cardiotónicos	43
2.8.10 Determinación cualitativa de azúcares reductores.....	43
2.8.11 Determinación cualitativa de aminoácidos libres	43
2.9 Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante.....	43
2.9.1 Determinación del contenido de compuestos fenólicos solubles totales.....	43
2.9.2 Determinación del contenido de flavonoides totales	44
2.9.3 Determinación de la capacidad antioxidante radical DPPH	44
2.9.4 Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo poder reductor	45
2.10 Determinación de compuestos fenólicos individuales por HPLC.....	45
2.11. Análisis estadístico.....	46
CAPITULO III.....	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
3.1 Composición química proximal.....	47
3.2 Rendimiento de extracción	48
3.3 Perfil fitoquímico	49
3.4 Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante.....	51
CAPITULO IV	56
CONCLUSIONES.....	56
ANEXOS.....	57
BIBLIOGRAFÍA	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de <i>B. alicastrum</i>	3
Figura 2. Semilla de <i>B. alicastrum</i>	5
Figura 3. Tejidos vegetales (A) Hoja, (B) fruto y (C) semilla de <i>B. alicastrum</i>	9
Figura 4. Ruta del ácido mevalónico (MEV)	10
Figura 5. Ruta del metileritritol fosfato (MEP)	10
Figura 6. Estructura química básica del isopreno	11
Figura 7. Estructura heterocíclica del esqueleto de los alcaloides	18
Figura 8. Cromatograma HPLC de los compuestos fenólicos de la nuez de Ramón extraídos con etanol acuoso	22
Figura 9. Ondas de ultrasonido en un medio líquido. Ciclos de compresión/ rarefacción y burbujas de cavitación.	29
Figura 10. Rendimiento de extracción (%) de cuatro tejidos de <i>B. alicastrum</i> usando EAU	49
Figura 11. Contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales de cuatro tejidos de <i>B. alicastrum</i>	51
Figura 12. Capacidad antioxidante in vitro de cuatro tejidos de <i>B. alicastrum</i>	52
Figura 13. Cromatograma HPLC de compuestos fenólicos del extracto de hojas de <i>B. alicastrum</i>	57
Figura 14. Cromatograma HPLC de compuestos fenólicos del extracto de cáscara de <i>B. alicastrum</i>	58
Figura 15. Cromatograma HPLC de compuestos fenólicos del extracto de cutícula de <i>B. alicastrum</i>	59
Figura 16. Cromatograma HPLC de compuestos fenólicos del extracto de semilla de <i>B. alicastrum</i>	60
Figura 17. Prueba positiva para azúcares reductores en tejidos de <i>B. alicastrum</i>	61
Figura 18. Prueba negativa para leucoantocianidinas en tejidos de <i>B. alicastrum</i>	61
Figura 19. Prueba negativa para alcaloides (Reaccion de Wagner) en tejidos de <i>B. alicastrum</i>	61
Figura 20 Prueba negativa para alcaloides (Reacción de Mayer) en tejidos de <i>B. alicastrum</i>	62
Figura 21. Prueba negativa para antraquinonas en tejidos de <i>B. alicastrum</i>	62

Figura 22. Prueba positiva para cumarinas en tejidos de <i>B. alicastrum</i>	62
Figura 23. Prueba negativa para glucósidos cardiotonicos en tejidos de <i>B. alicastrum</i>	63
Figura 24Prueba negativa para saponinas en tejidos de <i>B. alicastrum</i>	63
Figura 25Prueba positiva para aminoácidos libres en tejidos de <i>B. alicastrum</i>	63
Figura 26.Prueba positiva para Taninos en tejidos de <i>B. alicastrum</i>	64
Figura 27.Prueba positiva para esteroles en cáscara, semilla y piel de semilla de <i>B. alicastrum</i>	64
Figura 28. Prueba positiva para terpenos en tejidos de <i>B. alicastrum</i>	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Contenido nutrimental de semilla de <i>B. alicastrum</i> de diferentes lugares	5
Cuadro 1. 2. Composición química proximal de la semilla de <i>B. alicastrum</i>	6
Cuadro 1. 3. Contenido de aminoácidos en harina de semilla de <i>B. alicastrum</i>	7
Cuadro 1. 4 Contenido de vitaminas y minerales en harina de <i>B. alicastrum</i>	8
Cuadro 1.5 Análisis bromatológico de la harina de hojas de <i>B. alicastrum</i>	9
Cuadro 1. 6 Clasificación típica de los terpenos o isoprenos.	11
Cuadro 1.7 Clasificación de los compuestos fenólicos.....	17
Cuadro 1.8 Clasificación de los alcaloides con base en sus propiedades	19
Cuadro 1.9 Capacidad antioxidante de extractos de nuez maya, nuez, almendra y maní.	21
Cuadro 1.10. Contenido individual de compuestos fenólicos individuales en harina de semilla de <i>B. alicastrum</i>	23
Cuadro 1.11. Comparación de diferentes técnicas de extracción para la obtención de compuestos bioactivos.....	26
Cuadro 1.12. Condición optimizada para la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de subproductos de frutas y verduras.	33
Cuadro 3.3 Contenido de compuestos fenólicos de hoja, semilla, cáscara y piel de semilla de <i>B. alicastrum</i>	54

RESUMEN

B. alicastrum conocido como Ramón es una planta tropical considerada como un alimento del futuro porque a partir de sus frutos se pueden desarrollar alimentos saludables preservando el medio ambiente. La comparación del perfil fitoquímico y capacidad antioxidante de extractos bioactivos obtenidos de hoja, cáscara, semilla y piel de la semilla del Ramón es limitada. El objetivo de este estudio fue comparar la composición química proximal, el perfil fitoquímico y la capacidad antioxidante in vitro de hoja, cáscara, semilla y la piel de semilla de *B. alicastrum* colectado en la Península de Yucatán, México. Los tejidos se colectaron, acondicionaron y finalmente, se liofilizaron para obtener el polvo seco. De forma independiente, los tejidos se sometieron a una extracción asistida por ultrasonidos utilizando el sistema de disolvente etanol acuoso (1:1, v/v) durante 30 min a 30 °C y 100 % de amplitud a dos ciclos de extracción. Los extractos crudos fueron caracterizados a través del rendimiento de extracción, análisis cualitativo de fitoquímicos (saponinas, taninos, cumarinas, antraquinonas, terpenos, etc), contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante in vitro. Al comparar los tejidos, la hoja exhibió mayor contenido de cenizas (14.43 %), lípidos (2.69 %) y proteínas (15.43 %), mientras que la semilla y su piel resultaron con alto contenido de fibra cruda y carbohidratos, respectivamente. El rendimiento de extracción de antioxidantes fue mayor ($P \leq 0.05$) en cáscara (33.13 %) respecto a los otros tejidos. Cuando se comparan los tejidos, la piel de la semilla y la hoja fueron los que tuvieron presencia moderada a alto de terpenos y taninos. Sin embargo, solo la piel de semilla mostró abundante presencia de esteroides. La semilla y hoja mostraron el mayor contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) (19.74 mg equivalentes al ácido gálico GAE/g) y flavonoides totales (TFC) (16.62 mg equivalentes a quercetina EQ/g) ($P \leq 0.05$), respectivamente, en comparación a los demás tejidos. El valor de la capacidad antioxidante con el ensayo DPPH resultó mayor para piel de semilla, seguido de hoja, cáscara y semilla. Sin embargo, la hoja y la cáscara obtuvieron mayor poder reductor en comparación a la semilla y su piel. La concentración de compuestos fenólicos individuales varió entre los tejidos, resultando que la hoja obtuvo mayor contenido de ácido cafeico y ácido elágico. En conclusión, la composición química proximal fue diferente entre tejidos y los resultados demuestran que los tejidos *B. alicastrum* contienen una variedad de compuestos bioactivos con potencial antioxidante que se pueden aprovechar con fines industriales.

ABSTRACT

B. alicastrum also commonly known as Ramon, is a tropical plant considered as food of the future because healthy foodstuffs can be developed from its fruits while preserving the environment. The comparison of the phytochemical profile and antioxidant capacity of bioactive extracts obtained from the leaf, shell, seed and skin of the Ramon seed is limited. The objective of this study was to analyze comparatively, the proximal chemical composition, phytochemical profile, and in vitro antioxidant capacity of *B. alicastrum* leaf, peel, seed, and seed skin collected in the Yucatan Peninsula, Mexico. The tissues were collected, conditioned and finally lyophilized to obtain the dry powder. Tissues were independently subjected to ultrasound-assisted extraction using the aqueous ethanol (1:1, v/v) solvent system for 30 min at 30 °C and 100 % amplitude at two extraction cycles. The crude extracts were characterized through the extraction yield, qualitative analysis of phytochemicals (saponins, tannins, coumarins, anthraquinones, terpenes, etc.), content of phenolic compounds, and in vitro antioxidant capacity. When comparing the tissues, the leaf exhibited higher ash (14.43 %), lipid (2.69 %) and protein (15.43 %) content, while the seed and its skin were high in crude fiber and carbohydrates, respectively. The antioxidant extraction yield was higher ($P \leq 0.05$) in shell (33.13%) compared to other tissues. When comparing the tissues, the skin of the seed and the leaf exhibited from moderate to high presence of terpenes and tannins. However, only the skin revealed an abundant presence of sterols. The seed and leaf showed the highest content of total phenolic compounds (TPC) (19.74 mg equivalent to gallic acid GAE/g) and total flavonoids (TFC) (16.62 mg equivalent to quercetin EQ/g) ($P \leq 0.05$), respectively, compared to other tissues. The value of the antioxidant capacity with the DPPH evaluation was higher for seed's skin, followed by leaf, peel and the seed itself. However, the leaf and the peel displayed greater reducing power compared to the seed and its skin. The concentration of individual phenolic compounds varied among the tissues, resulting in the leaf having higher content of caffeic acid and ellagic acid. In conclusion, the proximal chemical composition was different between tissues and the results demonstrate that *B. alicastrum* tissues contain a variety of bioactive compounds with antioxidant potential that can be used for industrial purposes.

INTRODUCCIÓN

B. alicastrum tiene trascendencia histórica por su importancia económica y alimenticia en la cultura maya en el sureste de México. El árbol es considerado una especie multipropósitos, ya que todas sus partes pueden ser aprovechados en alimentación animal y humana (García-Orantes et al., 2012). El árbol produce un fruto que contiene una semilla reconocida como “nuez maya” y que su harina puede mezclarse con cereales como el maíz para complementar uno de los principales productos básicos en la dieta mexicana, la tortilla o también se puede consumir de manera directa o en subproductos que están actualmente en el mercado (sustituto de café y té). Desde hace muchos años, los antiguos mayas reconocieron el valor de las semillas como fuente de alimento para humanos, ya que utilizaron la semilla para preparación de alimentos cuando sus cultivos tradicionales (maíz, frijol, camote etc) no eran suficientes para el sustento de toda la población.

Los estudios indican que la harina obtenida de las semillas de ramón tiene un alto valor nutricional, con valores promedio de proteína, grasa y carbohidratos de 11 %, 1.5 % y 70 %, respectivamente. Cuenta con un alto contenido de fibra, vitaminas B1, B2 y ácido fólico; así como rico en minerales como Ca, Fe, Zn y Na, así como un aporte de 318 Kcal por cada 100 g de harina (Larqué-Saavedra, 2014). También se ha reportado que la harina tiene un contenido más CFT que las nueces comerciales, así como también se ha identificado la presencia de ácidos fenólicos (cafeico, sinápico, vanílico, ferúlico, transcinámico, p-hidroxibenzoico) (Moo-Huchin et al., 2019; Ozer, 2017)

Dado al valor nutricional de las hojas, su alta productividad y cantidad, este material se considera una arbórea forrajera (Ortiz et al., 1995) cuya composición nutricional es de 14 % de proteína, 3.9 % de grasa, 13% de cenizas y 39% de fibra cruda (Ayala Burgos, 2006), cabe mencionar que en este tejido González-González (2019) identificó ácido gálico y vanílico. El fruto de ramón está cubierto de una cáscara de color naranja cuando alcanza una maduración y las semillas muestran una cubierta que se considera un residuo generado tras el procesamiento. Estos últimos materiales aún no han sido estudiados desde el punto de vista nutricional y antioxidante para proponer estrategias de valorización.

B. alicastrum también se ha usado en la medicina tradicional, su principal aplicación es el uso del látex y hojas en la preparación de infusiones antitusivas y diaforéticas, también se

empelan como remedios para padecimientos como el asma, bronquitis y tuberculosis; así mismo los tónicos que son elaborados a partir de la corteza son utilizados para el tratamiento de dolores de pecho y asma (Berg, 1972; Ortiz et al., 1995).

Considerando los antecedentes expuestos sobre el uso ancestral del árbol de ramón y su creciente atención como alimento potencialmente nutritivo y como fuente promisoría de antioxidantes, existe muy poca evidencia científica sobre los nutrientes y metabolitos secundarios que puedan estar presentes en las hojas y de las partes que componen el fruto como la cáscara, semilla y piel de semilla.

El objetivo de este estudio fue comparar la composición fisicoquímica, cribado fitoquímico, capacidad antioxidante *in vitro* y el perfil cromatográfico de compuestos fenólicos en hojas y diferentes partes del fruto *B. alicastrum* para valorar el uso potencial de cada tejido vegetal.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Generalidades de *B. alicastrum*

Ramón (*B. alicastrum*), es una especie originaria de la región mesoamericana y ampliamente distribuida en la península de Yucatán (figura 1) esta planta es un componente importante del bosque tropical cálido-húmedo y subhúmedo, donde forma grupos de diferentes tamaños. Existe evidencia histórica que señala que la semilla también conocida como “nuez maya”, fue usada como alimento de subsistencia para los mayas del periodo clásico (250 a 900 D.C.)(Puleston & Puleston, 1971)

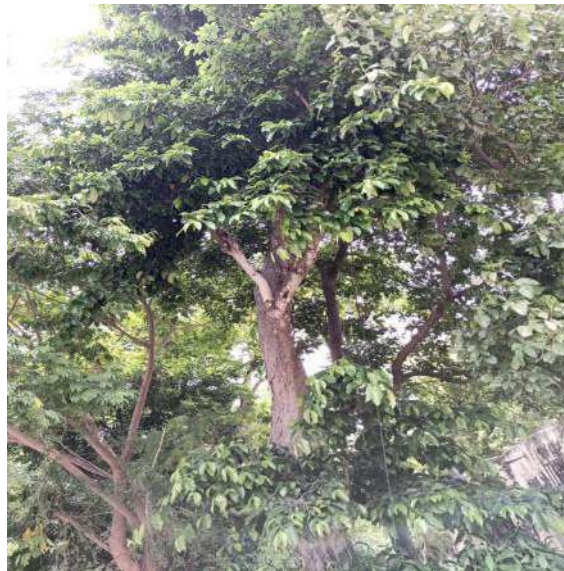


Figura 1. Árbol de *B. alicastrum*

“Los adultos mayores narran de cómo la semilla los salvó de una hambruna causada probablemente por algún desastre natural o por el ataque de plagas al maíz” (Ramírez-Sánchez et al., 2016) . La harina elaborada a base de semillas de *B. alicastrum* contiene 11 % de proteína 70 % carbohidratos y 1.5 % de grasas, cuenta con un alto contenido de fibra, vitaminas B₁, B₂ y ácido fólico; así como rico en minerales como calcio, hierro, zinc y sodio; un aporte de 318 Kcal por cada 100 g de harina (Ramírez-Sánchez et al., 2016). La semilla de *B. alicastrum* es una fuente de nutrientes poco aprovechada, los estudios reportan que es una fuente importante de proteína y también que puede ser empleada para el consumo como ingrediente en la formulación de alimentos. Por otro lado, un árbol de ramón llega a

producir alrededor de 95.5 kg de semillas al año o bien 19.1 toneladas por hectárea de 200 árboles al año (Ramírez-Sucre, 2018).

1.2 Importancia del árbol

El ramón favorece la restauración de suelos y su conservación contrarresta el efecto de vientos fuertes y recupera terrenos degradados por actividades agrícolas o pecuarias, provee protección a las cuencas hidrográficas, conserva la biodiversidad, captura carbono, da protección a los bosques y paisajes. Su importancia está reportada en el mantenimiento y conservación de la fauna; por ejemplo, 39 especies y 10 familias de aves se alimentan del fruto, asimismo venados y jabalíes. Este árbol es un indicador común para ubicar asentamientos mayas, ya que por lo general se encuentra alrededor de las ruinas de esta cultura, hecho que fue reportado por los arqueólogos desde 1935 (Cook, 1935; Lambert & Arnason, 1982)

El empleo que se da al ramón es muy variado, ya que son aprovechadas casi todas las partes del árbol. Tiene usos artesanales, comestibles, de construcción, forrajeros, maderables, medicinales y recientemente industriales (Berg, 1972; Gillespie et al., 2004). En Yucatán las hojas se emplean como forraje, ya que son un excelente alimento para el ganado principalmente en la época de sequía; y las semillas son usadas en menor proporción para producir harina comestible, la cual posee altos contenidos en triptófano (Morales Ortiz & Herrera Tuz., 2009)

1.2.1 Valor nutricional de hojas y semillas

Las semillas de *B. alicastrum* son globosas y ovoide-deprimidas, de unos 12 a 13 mm de largo por 17 a 20 mm de diámetro. Su cubierta es de color amarillo oscuro, membranáceo-reticulada, opaca, muy delgada, lisa y firmemente adherida al embrión. Carece de endospermo y lleva un embrión masivo de color verde, con 2 cotiledones curvos, desiguales, gruesos y carnosos (figura 2)(Niembro R. et al., 2010).



Figura 2. Semilla de *B. alicastrum*

En México la harina de semillas de ramón es considerado un producto orgánico y libre de gluten, cabe mencionar que su aporte en macro y micronutrientes resulta particularmente importante para la dieta por enfermedad celíaca, en general se caracteriza por tener un alto contenido de proteína (11.4-13.4 %), fibra dietética (13.0-16.0 %), minerales (4.8-4.1 %), bajo contenido de grasa (0.6-1.3 %), humedad promedio de 6.5-13.3%, carbohidratos entre 81.8-85.1% y un aporte calórico de 3.4 a 4.1 kcal/g de harina (Carter, 2015) El contenido nutricional de la harina de esta semillas puede variar dependiendo del lugar donde este árbol crece (Cuadro 1.1), particularmente en algunos estados de México y en países de Centroamérica.

Cuadro 1.1 Contenido nutrimental de semilla de *B. alicastrum* de diferentes lugares

Lugar	Referencia	Calorías (kcal)	Calorías (kcal)	Humedad (g)	Proteína (g)	Grasa (g)	Ceniza (g)	Carbohidratos (g)	Fibra dietética (g)
Yucatán	Cravioto, 1952)**	-	-		14.4	0.9	3.4	81.3	-
Veracruz	INPI, 1976)	-	-	12.2	10.2	2.0	4.7	81.5	-
Honduras	Zamorano, 2009)**	281	281	7.7	8.8	1.4	4.0	85.9	21.7
Guatemala	Arévalo & Bressani, 2013)	-	-	8.3	11.5	0.8	4.1	83.7	14.0

Nicaragua	Carter, 2015)	-	-	11.8	11.7	0.6	4.1	83.6	16.3
Yucatán	Larqué-Saavedra, 2014)	312	312	13.3	13.0	1.3	3.9	81.8	15.0

(g/100 g de harina). *Datos convertidos a base seca para comparación. **(Carter, 2015)

Dichas semillas, así como las nueces, avellanas, almendras, pistachos y leguminosas, entre otras, se consumen frescas; aunque, actualmente, las semillas de ramón también se consumen tostadas y molidas, esto último principalmente como sustituto del café para las personas que son intolerantes a la cafeína (Meiners, et al., 2009). Sin embargo, se desconoce la alteración de los compuestos nutraceuticos presentes en estas semillas ocasionada por el tostado, dado que los procesos térmicos influyen en el color, sabor y textura de los alimentos (Quintero-Hilario et al., 2019). Se ha reportado que el tostado reduce la actividad antioxidante de un alimento debido, principalmente, a la degradación de los compuestos fenólicos (Pérez-Martínez et al., 2010)

Quintero-Hilario et al, 2019 realizaron una caracterización química proximal de las semillas de ramón frescas y sometidas a dos tratamientos de tostado (tostado medio y alto a 90 °C, por 20 y 35 min. Los resultados indican que la calidad nutricional de las semillas no se vio afectada por efecto del tostado (Cuadro 1.2).

Cuadro 1. 2. Composición química proximal de la semilla de B. alicastrum

Tratamiento	Humedad (%)	Cenizas (%)	Fibra Cruda (g)	Proteína (g)	Lípidos (g)
FS ¹ /SF ¹	13.24 ± 0.32 a	3.22 ± 0.30 a	3.98 ± 0.15 b	9.94 ± 1.11 a	2.40 ± 0.14 a
SMR / STM	8.69 ± 0.43 b	3.53 ± 0.20 a	5.07 ± 1.54 ab	11.92 ± 3.23 a	1.81 ± 0.11 b
SHR / STA	8.50 ± 0.44 b	3.57 ± 0.23 a	6.70 ± 0.71 a	9.50 ± 1.30 a	1.28 ± 0.36 c
LSD / DMSH	0.67	0.42	1.66	3.55	0.39

SF¹ = semillas frescas; STM = semillas con tostado medio; STA = semillas con tostado alto. Los valores expresados en peso fresco son la media de cinco repeticiones ± desviación estándar. DMSH = diferencia mínima significativa honesta. Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

El perfil de aminoácidos de la harina de semilla de ramón indica que proporciona proteínas de alta calidad biológica como se muestra en la Cuadro 1.3 (Carter, 2015). La harina contiene lisina y triptófano, aminoácidos que se encuentran limitados en las dietas de México y Centro América (Peters & Pardo-Tejeda, 1982).

Cuadro 1. 3. Contenido de aminoácidos en harina de semilla de B. alicastrum

Aminoácidos	Contenido (g/100g de harina)
Ácido aspártico	0.951
Triptófano	0.234
Ácido glutámico	5.206
Leucina	0.935
Prolina	0.429
Arginina	0.793
Serina	0.577
Valina	0.834
Fenilalanina	0.407
Glicina	0.541
Treonina	0.335
Alanina	0.392
Isoleucina	0.488
Tirosina	0.634
Lisina	0.376
Histidina	0.132
Metionina	0.050
Cistina	0.135

Fuente: (USDA, 2016)

La harina por cada 100 g contiene importantes micronutrientes y minerales, como se muestra en la Tabla 1.4 (Carter, 2015; USDA, 2016) superior a lo proporcionado por la harina de maíz amarillo integral (USDA, 2017).

Cuadro 1. 4 Contenido de vitaminas y minerales en harina de *B. alicastrum*

Vitaminas	Contenido	Minerales	Contenido
Riboflavina (mg)	0.14	Calcio (mg)	94.00
Niacina (mg)	2.10	Cobre (mg)	2.45
Tiamina (mg)	0.03	Hierro (mg)	4.60
Vitamina a (mg)	73.93	Magnesio (mg)	115.00
Vitamina c (mg)	46.60	Potasio (mg)	2011.00
Ácido fólico (mg)	26.87	Manganeso(mg)	0.30

Por 100 g de harina (base seca). Fuente: (Flaster, 2007; USDA, 2016)

Las proteínas de las semillas están principalmente en forma de “proteína almacenada”, no tienen actividad enzimática y son solo una fuente de carbono, nitrógeno y aminoácidos para el desarrollo de las plantas. Se encuentran en forma insoluble en cuerpos proteicos, y se clasifican de acuerdo con su solubilidad además sobreviven a procesos de desecación por tiempos prolongados (Chito Trujillo et al., 2017). La estabilidad de las emulsiones se ve afectada por el origen de las proteínas, su método de extracción, el pH y la adición de otros compuestos como polisacáridos (Makri & Doxastakis, 2006). En la semilla de *B. alicastrum*, las fracciones proteicas que son más abundantes son las albuminas y globulinas. La caracterización bioquímica y funcional de estas fracciones realizada por González-González et al., 2020 reveló que las albuminas a pH de 4-9 presentan buena solubilidad; sin embargo, a un valor de pH 7 estas presentan mejor índice de actividad emulsionante. Por otro lado, las globulinas mostraron alta solubilidad a un pH de 2 mientras que los valores más altos para la actividad emulsionante de las globulinas se encontraron a pH de 4-5. En ese sentido, los autores concluyeron que debido a las propiedades bioquímicas y funcionales que las semillas de *B. alicastrum* presentan, estas pueden emplearse para el desarrollo de alimentos novedosos.

B. alicastrum es una especie de buen valor forrajero, se consume la hoja, tallo joven, fruto, y semilla (figura 3), es un alimento para ganado bovino, caprino, equino y porcino.

Es un excelente forraje en época de sequía ya que presenta cualidades altamente forrajeras con un 16 % de proteína digestible en sus hojas y 18 % en sus frutos (materia seca) y 12.5

% en sus semillas. Los caballos y los asnos prefieren las hojas secas y el ganado vacuno las comen en cualquier estado de maduración (Berg, 1972).



Figura 3. Tejidos vegetales (A) Hoja, (B) fruto y (C) semilla de *B. alicastrum*.

Román *et al.*, (2004), determinaron mediante el análisis bromatológico que la harina de hojas y de *B. alicastrum* contenía los siguientes valores (Cuadro 1.5).

Cuadro 1.5 *Análisis bromatológico de la harina de hojas de B. alicastrum*

Componente	Hoja verde	Hoja seca
Humedad	4.10	2.90
Ceniza	8.7	22.52
Proteína	17.60	8.12
Grasa	2.92	3.11
Fibra	18.30	14.90
ELN	48.41	48.44
Materia seca	95.5	97.10

ELN: Elementos libres de nitrógeno (Roman *et al.*, 2004).

1.2.1 Metabolitos secundarios

Las plantas producen una amplia variedad y alta diversidad de metabolitos secundarios (MS), que no son necesarios para el metabolismo primario o energético. Sin embargo, no son compuestos de desecho inútiles, como se suponía anteriormente, sino importantes para la aptitud ecológica de la planta que los produce. Los metabolitos secundarios aparentemente han evolucionado como un medio para que las plantas se protejan contra insectos, mamíferos y otros herbívoros, contra bacterias, hongos, virus e incluso otras

plantas competidoras. Algunas plantas usan MS para atraer animales polinizadores y dispersores de semillas o para protección UV (Schäfer & Wink, 2009).

Existen diversas clasificaciones de los MS en función del proceso en el que los compuestos simples se convierten en compuestos complejos (biosíntesis) y su estructura (Lustre Sánchez, 2022).

- *Terpenos*

La clase más grande de metabolitos secundarios son los terpenoides con más de 20,000 compuestos conocidos. Los terpenos son sintetizados por medio de las rutas del ácido mevalónico (MEV) (figura 4) y la ruta del metileritritol fosfato (MEP) (figura 5), la primera ocurre en el citosol y la segunda en los cloroplastos (Lustre Sánchez, 2022).

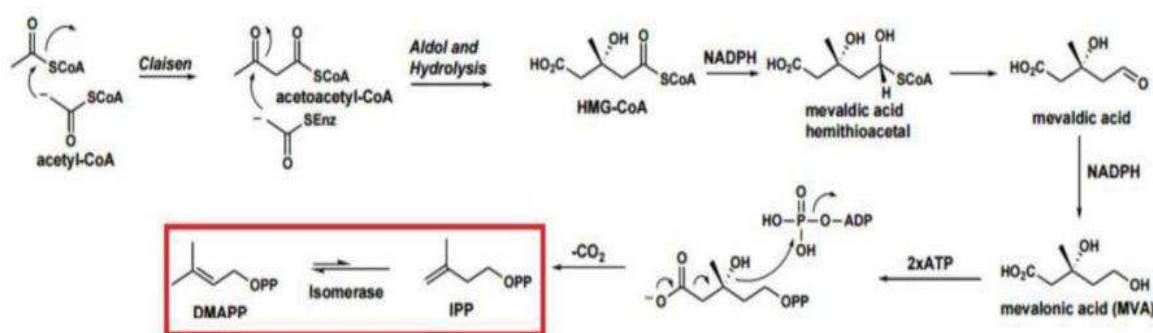


Figura 4. Ruta del ácido mevalónico (MEV)

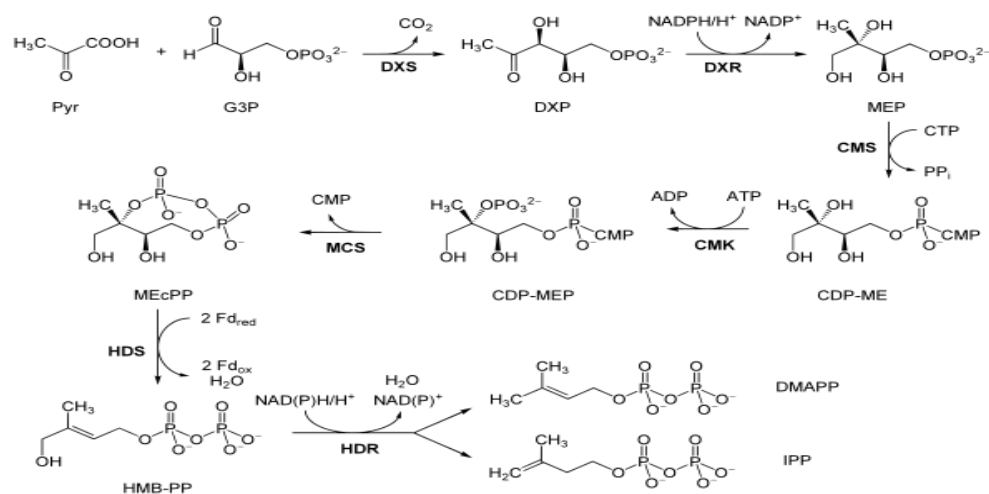


Figura 5. Ruta del metileritritol fosfato (MEP)

Los terpenos son clasificados según el número de unidades isopreno (figura 6) por el que estén conformados (Cuadro 1.6); pueden arreglarse linealmente o pueden ciclarse.

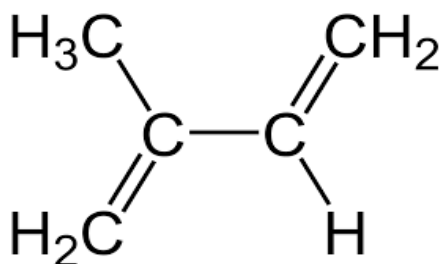


Figura 6. Estructura química básica del isopreno.

Cuadro 1. 6 Clasificación típica de los terpenos o isoprenos.

Número de unidades de isoprenos	Número de carbonos	Nombre
2	10	Monoterpeno
3	15	Sesquiterpeno
4	20	Diterpeno
6	30	Triterpeno
8	40	Tetraterpeno
>8	>40	Politerpeno

(González-López et al., 2016)

Según el número de unidades de isoprenos, el grupo número uno se divide en mono-, sesqui-, di- y triterpenos, pueden contener de dos a seis unidades de isopreno; este grupo incluye especialmente a los carotenoides (Raaman, 2006; Schmidt-Dannert, 2015). El segundo grupo incluye a los meroterpenos, los indol-diterpenos y el diverso grupo de los prenilados aromáticos (Schmidt-Dannert, 2015)

Los terpenos simples (mono- y sesquiterpenos) son constituyentes los principales de todos los aceites esenciales, también son ampliamente utilizados en la industria de la perfumería; monoterpenos hidrocarbonados como por ejemplo α - y β -pineno, limoneno, δ -3-careno, α -felandreno y mirceno se encuentran principalmente en los aceites esenciales vegetales, particularmente de aquellos que son extraídos de hojas, semillas y flores (Caputi & Aprea, 2011); mientras que los di y triterpenos son compuestos menos volátiles que los anteriores y se obtienen de las resinas vegetales. Los carotenos (tetraterpenos) conforman más de 600 estructuras conocidas (Bicas et al., 2009).

- *Glicósidos.*

Muchos metabolitos secundarios de las plantas en la naturaleza se presentan como glucósidos (Evans et al., 2009; Yu et al., 2012). En las plantas, los glucósidos se derivan principalmente de la modificación posterior de los metabolitos secundarios catalizados por enzimas vegetales, glicosiltransferasas. Otras modificaciones de los glucósidos, como oxidación, acilación y degradación, tienen lugar con frecuencia (Blanchard & Thorson, 2006; Yu et al., 2012). Si bien queda mucho por descubrir sobre las funciones fisiológicas de estos metabolitos solubles en agua en las plantas, lo que se sabe es que se almacenan y transportan dentro del tejido vegetal y pueden desempeñar un papel importante en la señalización, la regulación del crecimiento y el desarrollo, y también en una alelopatía (fenómeno biológico donde una planta inhibe el crecimiento de otra). También son importantes en el sistema de defensa de la planta contra patógenos y herbívoros. En muchos casos, los glucósidos se producen como respuesta a las condiciones ambientales, como abióticas (humedad, composición del suelo, luz solar, temperatura) o factores bióticos (por ejemplo, plantas herbívoras, plantas coexistentes) (Bruneton & Bruneton, 1995; Cutler, 1988; Evans et al., 2009)

- *Saponinas*

Las saponinas constituyen una familia de compuestos constituidos estructuralmente por un anillo terpenoide o esteroidal también conocidos como agliconas o sapogeninas, estos se pueden sustituir a través de enlaces glucosídicos por oligosacáridos, estas sustituciones le confieren a estos compuestos su carácter anfílico, la clasificación de las saponinas va de acuerdo con el número de sustituciones de los oligosacáridos pudiéndose encontrar agliconas monoglicosiladas (monodesmosídicas) tienen un oligosacárido unido al C-3, diglicosiladas (didesmosídicas) tienen dos cadenas de carbohidratos uno se encuentra unido a un enlace éter en el C-28 y el otro se encuentra unido a un enlace éster en el C-28 o triglicosiladas (tridesmosídicas) contienen tres cadenas de azúcares, las pentosas, ácidos urónicos o hexosas son los principales oligosacáridos enlazados (Ahumada et al., 2016)

Los cambios súbitos de pH sean muy básicos o ácidos provocan en las saponinas la ruptura de los enlaces O-glucosídicos, la estabilidad térmica de las saponinas oscila entre temperaturas de 150 °C, pero inferiores a 400 °C según Ahumada et al (2016).

Las saponinas se dividen en dos familias que pueden tener un esqueleto de tipo esterooidal o triterpenoide, presentan características con las que se pueden identificar rápidamente si se realiza un tamizaje fitoquímico:

1. Producen espuma en una solución acuosa
2. Reacción positiva en la prueba de Liebermann-Burchard en esta prueba se toma en cuenta lo siguiente: las saponinas de tipo esterooidal presentan una coloración que va de verde a azul, mientras que las saponinas triterpénicas manifiestan un colores rosado, rojo o violeta (Rojas Avalos & Tapia Ramírez, 2011).

- *Compuestos fenólicos o polifenoles*

Constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas (Andary & Mondolot-Cosson, 1997)

Son estructuras químicas formadas por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, incluyéndose también derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. (Crozier et al., 2009). Estos compuestos están distribuidos en todo el reino vegetal, siendo la forma más frecuente de encontrarlos en la naturaleza conjugados con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilo, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Los azúcares pueden ser tanto monosacáridos como disacáridos o incluso oligosacáridos. Los más comunes son la glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa y xilosa, así como los ácidos glucurónico y galacturónico. En ocasiones, pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos (Bravo & Saura-Calixto, 1998). Hay muchas razones para investigar a los polifenoles, desde sus estructuras más sencillas hasta las más complejas. Los polifenoles exhiben un rango muy variado de propiedades bio-fisicoquímicas que los hacen productos naturales únicos e intrigantes (Cory et al., 2018).

Según Harborne existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos

y flavonoides (Cuadro 1.7) describiéndose a continuación aquellas con un mayor interés nutricional:

A) Ácidos fenólicos:

Los ácidos fenólicos constituyen casi un tercio de los fenoles de nuestra dieta y forman parte de las preparaciones medicinales que consumimos en forma de infusiones o tizanas (Ignat et al., 2011). En las plantas se encuentran en forma libre o unidos a diferentes compuestos a través de uniones éster, éter o acetal (Zadernowski et al., 2009). Varios de los efectos en la salud están conferidos a sus propiedades antioxidantes, antimutagénicas, anticarcinogénicas, antiinflamatorias, antimicrobianas, etc (Birošová et al., 2005; Gomes et al., 2003; Merkl et al., 2010; Piazzon et al., 2012) Los ácidos fenólicos están constituidos por dos subgrupos, el ácido hidroxibenzoico y derivados, y el ácido hidroxicinámico y derivados. Los ácidos benzoicos incluyen a los ácidos p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vainillínico, siríngico y gálico. Dentro los ácidos hidroxicinámicos están los ácidos p-cumárico, cafeíco, ferúlico y sinápico. Su mecanismo de acción como antioxidantes se sugiere que es a través de atrapamiento de los radicales libres vía la donación de un átomo de hidrógeno (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Las capas externas de cereales como el trigo, maíz, arroz y cebada son ricos en ácidos fenólicos, en el café abunda el ácido clorogénico (Shahidi & Naczki, 2003).

B) Naftoquinonas.

Las naftoquinonas (derivados del naftaleno) son compuestos orgánicos de origen natural, que suelen ser aislados de fuentes vegetales, fúngicos y bacterianos, también son utilizados colorantes y pigmentos y sus tonalidades van de amarillo a rojo. La razón por la que la molécula obtiene una fuerte coloración y reactividad electrófila se debe a que los grupos carbonilos (situados en la posición 1,4 y 1,2) se encuentran conjugados con dobles enlaces. Las naftoquinonas cuyo carbonilo se encuentra situada en la posición 1,4 también llamado 1,4-naftoquinonas que pueden ser de origen natural y también sintético (Cantú-González et al., 2012). Por su mecanismo de acción han demostrado su potencial farmacológico, ya que al interactuar con los sistemas biológicos ejercen acción por medio de dos mecanismos, la primera como prooxidantes, es decir que pueden reducir el oxígeno a las EROS y otro

como electrófilo (que pueden formar enlaces covalentes con los nucleófilos)(Kumagai et al., 2012).

C) Ácidos cinámicos, cumarinas e isocumarinas:

Los ácidos cinámicos (cafeico, ferúlico, p-cumárico y sináptico) se encuentran raramente libres, ya que por regla general se hayan presentes en forma de derivados. Así, por ejemplo, el ácido cafeico se encuentra esterificado con el ácido quínico como ácido clorogénico, isoclorogénico y criptoclorogénico (Belitz et al., 2009). Las cumarinas e isocumarinas se encuentran generalmente en forma de glicósido (Bravo, 1998). Las cumarinas y sus derivados constituyen una familia de compuestos heterocíclicos que contienen el esqueleto 1-benzopirán-2-ona que se han investigado ampliamente debido a sus múltiples propiedades y aplicaciones en diferentes campos de la química, medicina e industria. El anillo de cumarina, con gran variabilidad estructural en productos naturales y la química sintética, está distribuido en diferentes plantas y legumbres. Los derivados del anillo cumarina han despertado un gran interés en diversos campos de la investigación debido a sus múltiples aplicaciones. En el ámbito de la medicina forma parte de diversos compuestos anticancerígenos, anticoagulantes, antiinflamatorios, antivirales y antibacteriales (Tato-Martínez, 2020).

D) Lignanos y neolignanos:

Los lignanos, que constituyen una clase abundante de fenilpropanoides, y se encuentran distribuidas ampliamente en las plantas vasculares, estos metabolitos se clasifican en ocho subgrupos esto según la manera en la que el oxígeno se incorpora al esqueleto y el patrón de ciclación en: furofurano, furano, dibencilbutano, dibencilbutirolactona, ariltetralina, arilnaftaleno, dibenzociclooctadieno (Whiting, 1985). Estos compuestos tienen una serie de actividades biológicas médicamente importantes, propiedades antitumorales, antimitóticas y antivirales, así como propiedades estereoquímicas únicas (Umezawa, 2003).

E) Flavonoides:

Los flavonoides son productos naturales que constituyen el grupo más importante dentro de esta clasificación, se dividen en varias subclases con más de 5000

compuestos (Harborne, 2013), pertenecen a una clase de metabolitos que presentan naturaleza polifenólica siendo los más distribuidos en las plantas, frutas y verduras (Panche et al., 2016). La estructura química básica de los flavonoides presenta o permite una multitud de sustituciones y variaciones en el anillo pirona dando lugar a flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanolles, isoflavonoides, catequinas, calconas, dihidrocalconas, antocianidinas, leucoantocianidinas o flavandiol, de todos estos grupos las flavonas (por ejemplo: apigenina, luteolina y diosmetina), los flavonoles (por ejemplo: quercetina, miricetina y kampferol) y sus glicósidos son los compuestos más abundantes en los alimentos vegetales (Hertog *et al.*, 1993). Los flavonoides se asocian a un amplio espectro de efectos biológicos que promueven la salud y son un componente indispensable en numerosas aplicaciones nutraceuticas, farmaceuticas, medicinales y cosméticas, cabe mencionar que esto se debe a las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticancerígenas, junto con su capacidad para modular funciones enzimáticas que se les atribuyen (Panche et al., 2016).

F) Taninos:

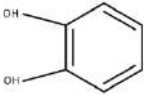
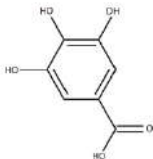
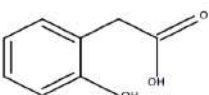
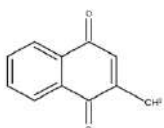
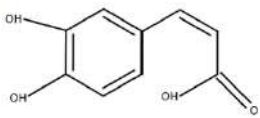
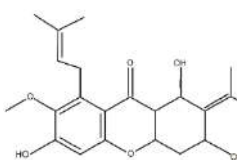
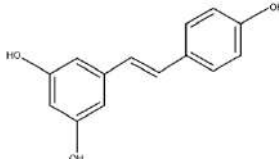
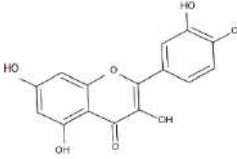
Los taninos son metabolitos polifenólicos secundarios de las plantas que se encuentran en casi todas las partes de la planta, como en la corteza, madera, hojas, frutos, raíces y semillas. Son ésteres de galao y sus derivados que se encuentran unidos a una variedad de núcleos de polioles, catequinas y triterpenoides (galotaninos, elagitaninos y taninos complejos), o son proantocianidinas oligoméricas y poliméricas que pueden poseer diferentes patrones de acoplamiento y sustitución de interflavano (taninos condensados) (Khanbabaee & van Ree, 2001).

G) Estilbenos:

Es el grupo menos común de los fenoles en las plantas, se caracterizan por la presencia de un núcleo de 1,2-difeniletileno y se pueden dividir en dos categorías: estilbenos monoméricos y oligoméricos. Generalmente estos compuestos se consideran también como fitoalexinas esto es debido principalmente a su bajo peso molecular. El resveratrol es el estilbeno mayormente conocido, debido a que su presencia se ha reportado y

estudiado en las uvas; también se ha reportado que en comparación con los compuestos fenólicos las concentraciones de estilbenos en las uvas son relativamente bajas.

Cuadro 1.7 Clasificación de los compuestos fenólicos

Clase	Estructura	Ejemplo	Clase	Estructura	Ejemplo
Fenoles simples	C ₆	Catecol 	Ácidos hidroxibenzoicos	C ₆ -C ₁	
Ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂	 Ácido 2-hidroxifenilacético	Naftoquinonas	C ₆ -C ₄	Ácido gálico Menadiona 
Ácidos hidroxicinámicos	C ₆ -C ₃	 Ácido caféico	Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆	 Mangostin
Estilbenos	C ₆ -C ₂ -C ₆	 Resveratrol	Flavonoides	(C ₆ -C ₃ -C ₆)	 Quercetina

Las plantas son las maestras en la producción de metabolitos secundarios (fundamentales para su crecimiento, reproducción, protección, etc.) tienen uno o más de estos grupos químicos en sus estructuras, los cuales usualmente derivan de rutas metabólicas como la de las pentosas fosfato, la del shiquimato y la de los fenilpropanoides. Los polifenoles son micronutrientes presentes en nuestra dieta y cumplen una función muy importante en la prevención de enfermedades degenerativas, tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedades neurodegenerativas (Cory *et al.*, 2018).

- *Alcaloides*

Los alcaloides vegetales son uno de los grupos más grandes, representan un grupo muy diverso de entidades químicas y abarcan una clase enorme de aproximadamente 12 000 productos naturales. La característica principal de los alcaloides es la presencia de un átomo de nitrógeno básico en cualquier posición de la molécula, que no incluye nitrógeno en un enlace amida o peptídico, forman un grupo de moléculas estructuralmente diversas y biogénicamente no relacionadas. Muchos de estos compuestos poseen potentes efectos farmacológicos (O'Connor & Mander, 2010). Por ejemplo, los alcaloides vegetales bien conocidos incluyen los analgésicos narcóticos, la morfina y la codeína, la apomorfina (Salminen et al., 2011). Como regla general, todos los alcaloides de una planta dada tienen un origen biogénico común, incluso si sus estructuras pueden parecer a primera vista muy diferentes. En una planta dada, la concentración de alcaloides puede variar ampliamente de una parte a otra, y algunas partes pueden no contener ninguno. La clasificación más correcta y común de los alcaloides es su distribución según la estructura principal, el esqueleto C-N principal. Los alcaloides se dividen en los siguientes grandes grupos, (Figura 7), que incluyen; pirrolidina, piperidina, piridina, pirrolicidina, quinolicidina, tetrahidroisoquinolina, tropano, quinoleína, imidazol, indol, purina, diterpénico, esteroidal y espermidina. Cada uno de estos grupos se subdivide en varios subgrupos en función de las características estructurales de sus representantes (Bribi, 2018).

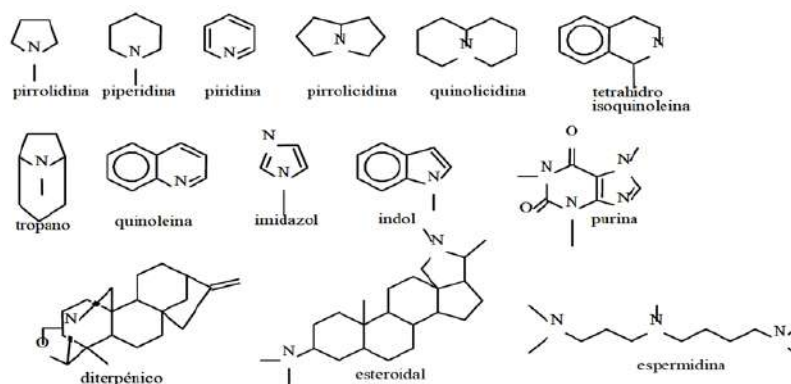
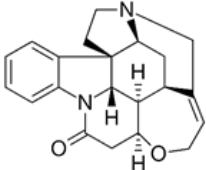
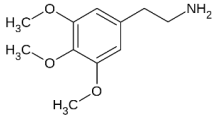
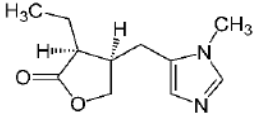
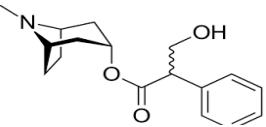
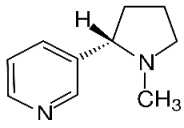
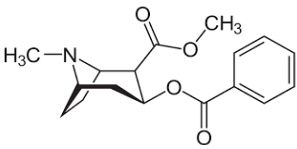


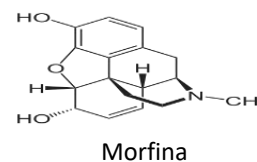
Figura 7. Estructura heterocíclica del esqueleto que constituye el grupo de los alcaloides.

En función de su estructura, los alcaloides se han logrado distinguir los heterocíclicos de los no heterocíclicos, esto ha dado pie a que en la actualidad se puedan clasificar de distintas maneras como se muestra en el Cuadro 1.8.

Cuadro 1.8 Clasificación de los alcaloides con base en sus propiedades

Propiedades farmacológicas:	Modificadores del sistema nervioso central	 Estricnina
	Alucinógenos	 Mescalina
	Parasintopatomiméticos (modificadores del sistema nervioso autónomo)	 Pilocarpina
	Parasintopatolíticos:	 Atropina
Distribución botánica:	Alcaloides del tabaco	 Nicotina
Origen biosintético:	Alcaloides derivados de aminoácidos alifáticos	 Cocaína

Alcaloides derivados de
aminoácidos aromáticos



(Arango, 2002; Gonzalez Chavarro et al., 2020; Lavault et al., 1987)

1.2.2 Contenido de fitoquímicos y actividad antioxidante en semillas y hojas

Hoy en día se han realizado diversos estudios con respecto a la composición química de las semillas de *B. alicastrum*, tales como: vitaminas, minerales y composición de los ácidos grasos (Ozer, 2017). De la misma forma, también existen investigaciones en donde se evalúa su actividad antioxidante y composición o contenido de compuestos fenólicos, haciendo posible comparar su capacidad en base a estudio de otras semillas comerciales. En un estudio publicado por (Ozer, 2017), los valores promedios de los compuestos fenólicos totales de las semillas de *B. alicastrum*, también conocido con nuez maya, oscilaron entre 2.467 ± 85 mg de GAE/100 g extracto seco (Cuadro 1.9), obteniendo una mayor concentración de contenido de compuestos fenólicos en comparación a otras semillas evaluadas: nuez, maní y almendra.

Cuadro 1.9 Capacidad antioxidante de extractos de nuez maya, nuez, almendra y maní.

	Actividad antioxidante			
	Contenido fenólico (mg GAE/100g)	Actividad de captación de DPPH (%)	FRAP (mmol Fe/100g)	Inhibición ABTS (%)
Nuez maya	2467±85 ^a	79 ± 2.7 ^a	8.08 ±0.8 ^a	92.5 ±5.2 ^a
Nuez	812±51 ^b	83±0.6 ^b	22.64±1.1 ^b	92.1 ± 3.5 ^a
Maní	430±18 ^c	45.5 ±0.6 ^c	1.61±0.3 ^c	91.1±1.5 ^a
Almendra	87.5±2 ^d	42±1.4 ^d	1.52 ±0.9 ^c	59±2.6 ^b

Los valores son la media ± desviación estándar de tres a cuatro ensayos independientes. Las medias con diferentes letras en una columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$), Ozer 2016

De igual manera se evaluó la actividad antioxidante a través de distintos métodos (Cuadro 9), obteniendo: 79 ± 2.7 % de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), 8.08 ±0.8 mmol Fe/100 g con el poder antioxidante reductor de hierro (FRAP) y 92.5 ± 5.2 en los ensayos de eliminación de radicales ABTS; los resultados demuestran que el extracto de nuez maya tiene una potente actividad antioxidante, incluso tan alta como el extracto de nuez, por lo que es una buena fuente de antioxidantes naturales (Ozer, 2017). También se ha reportado la identificación por cromatografía (Figura 8) y el contenido de compuesto fenólicos individuales de las semillas de ramón (Cuadro 1.10), tales como: ácido gálico, ácido clorogénico, catequina, ácido vanílico, ácido sinápico, ácido ferúlico, quercetina y ácido trans-cinámico, utilizando distintos disolventes (Moo-Huchin et al., 2019).

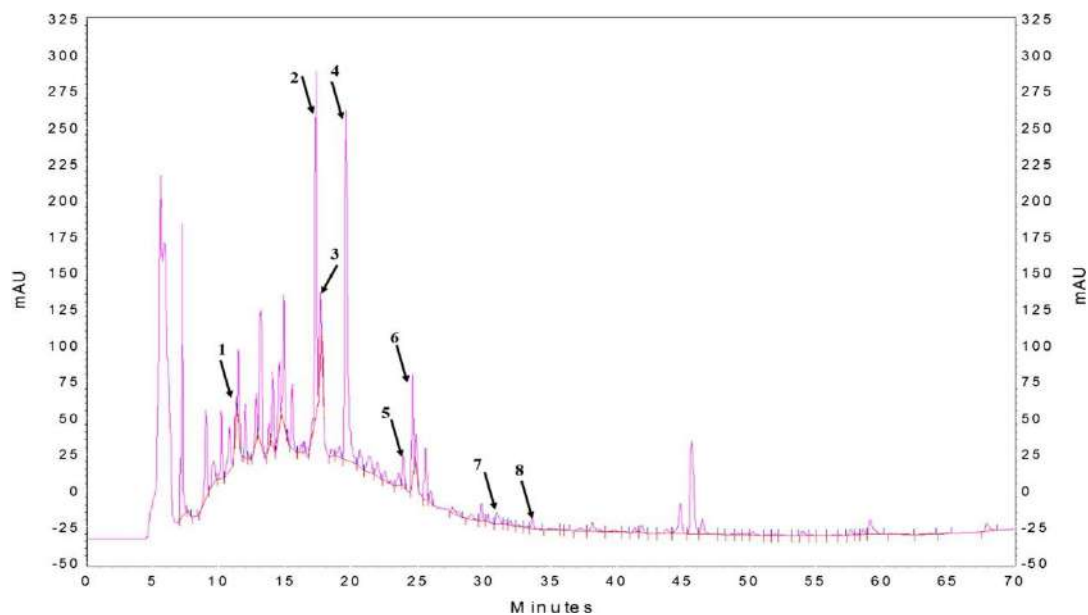


Figura 8. Cromatograma HPLC de los compuestos fenólicos de la nuez de Ramón extraídos con etanol acuoso (1:1, v/v). (1) Ácido gálico, (2) Ácido clorogénico, (3) Catequina, (4) Ácido vanílico, (5) Ácido sinápico, (6) Ácido ferúlico, (7) Quercetina, (8) Ácido transcinámico

Cuadro 1.10. Contenido individual de compuestos fenólicos individuales en harina de semilla de B. alicastrum

Compuestos fenólicos (mg / 100 g DW de harina)	Ácido gálico	Ácido clorogénico	Catequina	Ácido vanílico	Ácido sinápico	Ácido ferúlico	Quercetina	Ácido trans- cinámico
S1	1.29 ± 0.03 ^c	31.04±0.68 ^d	13.72±1.63 ^d	24.03±0.20 ^c	8.84±0.39 ^c	4.76±0.00 ^e	4.82±0.00 ^e	1.65±0.00 ^f
S2	0.31 ± 0.01 ^b	19.59±1.42 ^b	11.44±1.21 ^{bcd}	18.50±0.67 ^b	6.39±0.02 ^b	4.07±0.01 ^d	4.41±0.00 ^c	1.56±0.00 ^b
S3	1.23 ± 0.00 ^c	5.19±0.00 ^a	Nd	6.32±0.00 ^a	5.68±0.00 ^a	Nd	4.91±0.00 ^f	1.42±0.00 ^a
S4	0.09±0.00 ^a	26.20±0.75 ^c	10.93±0.00 ^{bc}	19.32±0.00 ^b	23.76±0.00 ^g	Nd	5.54±0.00 ^g	1.62±0.00 ^d
S5	0.10±0.003 ^a	30.02±0.32 ^d	9.95±1.03 ^b	24.71±0.43 ^c	15.24±0.04 ^e	3.62±0.03 ^b	4.26±0.00 ^b	1.58±0.00 ^c
S6	1.88±0.09 ^d	41.86±1.27 ^e	13.28±0.84 ^{cd}	29.57±0.36 ^d	17.52±0.20 ^f	4.06±0.02 ^d	4.51±0.00 ^d	1.64±0.01 ^e
S7	0.12±0.01 ^a	26.33±0.74 ^c	12.03±0.23 ^{bcd}	19.44±0.98 ^b	12.11±0.00 ^d	3.73±0.02 ^c	4.09±0.00 ^a	1.55±0.00 ^b

Moo-Huchín et al. (2019)

1.3 Tamizaje fitoquímico

Las propiedades medicinales de las plantas están determinadas por los constituyentes fitoquímicos (Ezeonu & Ejikeme, 2016). La fitoquímica es la ciencia que comprende el estudio de los metabolitos secundarios presentes en todas y cada una de las partes de las plantas. Dentro de los metabolitos más importantes podemos encontrar a los alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos, saponinas, esteroides, glucósidos, terpenos (Sheel et al., 2014). Dado que la madre naturaleza es una fuente que alberga una gran diversidad de estructuras fitoquímicas estos se agrupan en tres familias principales: fenoles, triterpenos o esteroides y alcaloides (Saxena et al., 2013).

Para conocer el tipo de compuestos presentes en las plantas, existen diferentes métodos. El tamizaje o cribado fitoquímico es una prueba convencional, fácil y económica cuyo objetivo permite determinar cualitativamente la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos secundarios (alcaloides, antraquinonas y naftoquinonas, esteroides y triterpenos, flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas, lactonas terpénicas y cardiotónicos) que pueden estar presentes en una matriz vegetal y partiendo de los resultados obtenido es posible orientar investigaciones para determinar la actividad biológica de las especies en cuestión y los principios activos involucrados (Carvajal-Rojas et al., 2009)

El tamizaje fitoquímico consiste en la obtención de extractos de plantas elaboradas con solventes apropiados los cuales pueden ser agua, acetona, alcohol, cloroformo, éter, etc.,

(Prashant et al., 2011). Posterior a la preparación y obtención de un extracto crudo, se llevan a cabo reacciones colorimétricas, las cuales son sensibles, reproducibles de bajo costo. La particularidad de estas pruebas es que algunas de las reacciones evalúan (1) grupos de sustancias y (2) la presencia de otros compuestos como ácidos grasos, azúcares reductores, polisacáridos y mucilagos (Sharapin, 2000)

Aunque en la actualidad existen diversas técnicas avanzadas para determinar la naturaleza química de los metabolitos secundarios de las plantas como lo son la cromatografía de gases (CG), cromatografía en capa delgada (TLC), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), espectrofotometría de masas (MS), espectrofotometría infrarroja, entre otras (De Silva et al., 2017). Cuando se investigan muchos extractos de plantas, los tamizajes o cribados siguen siendo la mejor opción para pruebas fitoquímicas preliminares. Estas técnicas constituyen diferentes ventajas ya que cada resultado permite eliminar todas aquellas especies estudiadas que no cuentan con algún potencial para ser utilizadas para algún beneficio, quedando solamente las que si lo tienen (Castillo-Olvera & Zavala-Cuevas, 2017).

Tení-Milián (2008) realizó un cribado fitoquímico al fruto, semilla y hojas de *B. alicastrum* utilizando extractos preparados con metanol y diclorometano en dicho estudio se encontraron los siguientes metabolitos secundarios: en el extracto diclorometánico de hojas se evidenció la presencia de compuestos bufadienólicos, lactonas insaturadas, esteroides, saponinas, aceites volátiles y sesquiterpenlactonas, mientras que en el extracto metanólico se encontraron flavonoides y cumarinas. En ambos extractos de pulpa y semilla solo se identificaron cumarinas, lactonas insaturadas, así mismo se descartó la presencia de antraquinonas, taninos, esteroides insaturados y alcaloides.

1.4 Extracción de compuestos con actividad biológica

Las plantas son una fuente inagotable de compuestos bioactivos, existe una gran variedad que pueden encontrarse en las frutas, verduras, cáscaras, hojas, semillas, tallos etc, y han sido utilizados por el ser humano desde la antigüedad. Hoy en día el proceso de obtención de éstos es un tema de interés y de constante innovación para la investigación científica, la industria química, alimentaria y farmacéutica debido a sus múltiples aplicaciones por sus propiedades antioxidantes (Les et al., 2021). A pesar de los beneficios de las mejoras

tecnológicas utilizadas para la extracción de polifenoles de origen natural, debe asegurarse de que su eficiencia de extracción sea una función de varios parámetros críticos como el solvente, la naturaleza del material, la luz, la duración del período de extracción, el pH, la temperatura, el tamaño del material, la relación solvente/sustrato, así como la relación líquido-líquido o sólido-líquido (Herrero et al., 2010).

Los métodos de extracción convencionales se designan principalmente mediante la utilización de un mayor volumen de solventes de extracción y procedimientos manuales que dependen principalmente del investigador y requieren mucha mano de obra; por lo tanto, las técnicas no son idealmente consistentes (Alara et al., 2021). Estos métodos que incluyen extracción sólido-líquido (SLE) o extracción soxhlet, extracción líquido-líquido (LLE) y maceración son los métodos más utilizados en esta categoría. Dado que los métodos de extracción convencionales sufren algunos inconvenientes, es importante superar estos desafíos; esto provocó el uso de métodos de extracción no convencionales que han sido generados con el propósito de llenar los vacíos faltantes de los métodos de extracción convencionales; estos métodos incluyen extracción con líquido presurizado (PLE), extracción con agua subcrítica (SWE), extracción con fluido supercrítico (SFE), extracción asistida por microondas (MAE), extracción en fase sólida (SPE) y extracción asistida por ultrasonidos (EAU) (Shams et al., 2015). Algunas de las propiedades mejoradas de las técnicas no convencionales incluyen automatización, selectividad mejorada, mayor eficiencia de extracción y menor consumo de solventes de extracción (Alara et al., 2018 a,b; Azwanida, 2015). Una comparación de algunas técnicas de extracción se muestra en el Cuadro 1.11.

Cuadro 1.11. Comparación de diferentes técnicas de extracción para la obtención de compuestos bioactivos.

Clasificación de la técnica	Técnica de extracción	Ventajas	Desventajas	Compuesto bioactivo que se puede extraer	Referencia
Método convencional	Soxhlet	Es la técnica más utilizada.	- Requiere mucho tiempo y grandes cantidades de disolvente. - Baja eficiencia. - No es adecuado para compuestos sensibles al calor.	Aceites esenciales, lípidos, compuestos fenólicos.	(Azmir et al., 2013; Garavand & Madadlou, 2014; Sagar et al., 2018)
	Hidrodestilación	- La técnica más simple y antigua. - Tiene diferentes clasificaciones: destilación por vapor, agua o hidrodifusión. - Se emplea en industrias de pequeña escala. - Utiliza agua para facilitar la extracción.	- Consume mucho tiempo. - Requiere altos niveles de energía.	Aceites esenciales y fenoles.	(Azmir et al., 2013; Soquetta et al., 2018)
	Extracción líquido-líquido	- Puede realizarse a temperatura ambiente - Método estándar, fácil y económico. - Adecuado para muestras líquidas (subproductos de muestras de bebidas).	- Laborioso. - Consumidor de tiempo. - Alta tasa de degradación. - Requiere productos químicos peligrosos.	Compuestos fenólicos.	(Sagar et al., 2018)
	Maceración	- Suele usarse en extracciones a pequeña escala. - Método económico.	Requiere mucho tiempo y grandes cantidades de disolventes.	Aceites esenciales y fenoles.	(Azmir et al., 2013; Garavand & Madadlou, 2014)

Métodos no convencionales o técnicas verdes de extracción	Fluidos supercríticos (SFE)	• Mejor transferencia de masa. • Ahorro de tiempo. • Uso de poca cantidad de muestra y solvente orgánico. • Reciclabilidad del fluido supercrítico.	• No adecuado para moléculas polares. • Sistema de alto costo.	Compuestos volátiles, azúcares, fenoles, flavonoides, carotenoides.	(Md Salim, 2017; Nerome et al., 2016; Sagar et al., 2018)
	Extracción asistida por microondas (MAE)	• Mejor calidad de extracto. • Alta selectividad. • Máximo rendimiento y menor tiempo de extracción. • Rentable en comparación con Soxhlet. • Simplemente operable en comparación con SFE. • El tiempo de extracción es menor en comparación con EAU.	• Equipo costoso. • La operación es difícil en comparación con los EAU. • Utiliza disolventes orgánicos. • No es adecuado para compuestos no polares. • Impropio para ingredientes sensibles al calor	Polifenoles: flavonoides, fenólicos, carotenoides.	(Chen & Chen, 2013; Sagar et al., 2018)
	Extracción asistida por ultrasonidos (EAU)	• Mínimo consumo de energía y potencia. • Mayor rendimiento del producto. • Corto tiempo de procesamiento y menor uso de químicos. • Apropiado para compuestos o ingredientes termosensibles.	• Optimización adecuada en la frecuencia de ultrasonidos. • Generación de radicales libres a altas potencias de sonicación. • Difícil de escalar para usos industriales.	Fenólicos, lípidos, carotenoides.	(Ameer et al., 2017; Azmir et al., 2013)
	Extracción asistida por enzimas (EAE)	• Utiliza agua como disolvente. • Adecuada para separar compuestos ligados. • Alta tasa de extracción.	• Sensibilidad enzimática. • Difícil de escalar a aplicaciones industriales. • Precio caro de la enzima para un gran volumen de muestras	Aceites esenciales y fitoquímicos ligados.	(Sagar et al., 2018)

Rodríguez & Raghavan (2022).

La necesidad para la extracción eficaz de compuestos bioactivos a partir de plantas sin ninguna pérdida de actividad y de alta pureza se ha traducido en el desarrollo de nuevos procesos de extracción que superen los inconvenientes producidos por los métodos clásicos de extracción (Palma et al., 2013; Shams et al., 2015; Shirsath et al., 2012).

En años recientes, ha cobrado un gran impulso el desarrollo de tecnologías limpias de extracción con gran eficiencia, que permiten el aislamiento efectivo de componentes biológicamente activos de productos naturales, sin la pérdida de la actividad biológica, con un alto rendimiento y una elevada pureza (Bucar et al., 2013). Entre las tecnologías limpias se encuentra la extracción asistida por ultrasonido (EAU) (Sánchez Contreras, 2016).

1.5 Extracción asistida por ultrasonidos (EAU)

Los productos alimenticios son mezclas complejas de vitaminas, azúcares, proteínas y lípidos, fibras, aromas, pigmentos, antioxidantes y otros compuestos orgánicos y minerales. Antes de que tales sustancias puedan analizarse, deben extraerse de la matriz alimentaria (Otles, 2016). Metabolitos como polifenoles (Ghasemzadeh et al., 2015), alcaloides (Bulduk et al., 2015), compuestos aromáticos (Jerman et al., 2010), isoflavonoides (Paniwnyk et al., 2009), polisacáridos (Ebringerová & Hromádková, 2010; Shi et al., 2015) saponinas, y pigmentos (Yolmeh et al., 2014) entre otros, han sido extraídos de matrices naturales por el método de ultrasonidos, con excelentes resultados. Esto se debe en gran medida al efecto de las ondas de ultrasonido sobre la cinética y el rendimiento de la extracción (Peng et al., 2010; Rodrigues et al., 2015; Rostagno & Prado, 2022).

La EAU, también llamada sonicación, utiliza una onda sonora de 20 kHz a 100 MHz, esta onda viaja a través de un medio y crea compresión y expansión, produciendo un fenómeno de cavitación (Garavand et al., 2019). El proceso de cavitación implica la generación, crecimiento y colapso de pequeñas burbujas; cuando las burbujas superan un diámetro crítico, se rompen, induciendo una gran cantidad de energía que convierte el movimiento cinético en calor (figura 9). Se estima que las burbujas tienen una temperatura de aproximadamente 4700 °C y 1000 atm de presión. Los materiales que tienen un efecto de cavitación son líquidos y sólidos que contienen líquido (Azmir et al., 2013).

El fenómeno físico de la EAU puede describirse con dos pasos: la difusión a través de la pared celular y el ascenso del material celular, tras la ruptura de la pared celular. Para estas técnicas de extracción, la humedad, el tamaño de las partículas, el disolvente, la

temperatura, el tiempo de sonicación y la presión son los principales factores para tener en cuenta para una extracción eficaz (Vernès et al., 2020). Para la extracción de compuestos bioactivos se utilizan frecuencias entre 20 y 100 kHz, y entre 80 y 200 W de potencia, por lo que la cavitación se produce cuando la presión aplicada al medio disminuye por debajo de la presión de saturación del líquido-vapor (Vernès et al., 2020).

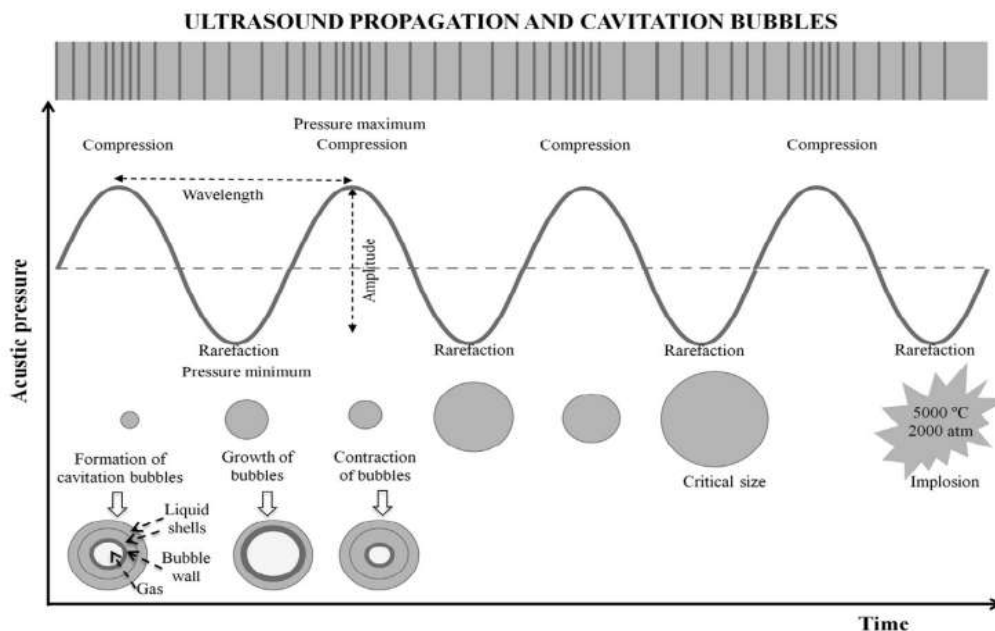


Figura 9. Ondas de ultrasonido en un medio líquido. Ciclos de compresión/ rarefacción y burbujas de cavitación. Modificado de Bendicho, C., Lavilla, I., 2013.

La rápida fragmentación conduce a la solubilización del componente bioactivo en el disolvente debido a la disminución del tamaño de las partículas, el aumento de la superficie y las altas tasas de transferencia de masa en la capa límite de la matriz sólida (Kumar et al., 2021).

El ultrasonido causa daño local a los tejidos de las plantas, lo que se denomina erosión. Esta erosión también se puede atribuir a la implosión de burbujas de cavitación en la superficie de los tejidos vegetales. La parte corroída promueve el contacto del solvente y mejora la eficiencia de extracción. La formación de poros en la membrana celular durante el proceso de cavitación se denomina "sonoporación", que da como resultado la liberación de compuestos biológicamente activos presentes en la célula. Además, la generación y ruptura de burbujas de cavitación provocará cizallamiento y turbulencia en el fluido, lo que conducirá a la ruptura de la pared celular y la liberación de compuestos biológicamente activos (Kumar et al., 2021)

El ultrasonido aumenta la absorción de agua, mejorando la accesibilidad del agua como disolvente a los compuestos bioactivos que se van a extraer junto con una mayor difusividad de los propios compuestos bioactivos, también aumenta el índice de hinchamiento de la matriz del tejido vegetal que ayuda tanto en la desorción como en la difusión de los solutos resultando en una mayor extracción (Kumar et al., 2021)

Durante la extracción deben considerarse una serie de variables que están directamente relacionadas con la eficiencia y el rendimiento del proceso, que incluyen el tiempo, temperatura, tipo de disolvente y la concentración utilizada, así como la manera en que el que se aplica a la irradiación de ultrasonido (directa o indirectamente).

1. Frecuencia:

Para obtener una mayor extracción de los compuestos bioactivos de interés en una planta frutas y subproductos vegetales debe estar entre 20 y 120 kHz en un intervalo de potencia de 100 a 800 W. El ultrasonido de alta intensidad y baja frecuencia genera un fuerte cizallamiento y una fuerza mecánica deseable en el proceso de extracción, mientras que la densidad de potencia baja de alta frecuencia produce una gran cantidad de radicales reactivos (Leong et al., 2011). A bajas frecuencias (20 kHz) prevalecen los efectos físicos del ultrasonido, que determinan la extracción efectiva de los componentes de las plantas, mediante un incremento de la transferencia de masa, sin que se produzcan fenómenos de degradación de los metabolitos presentes (Sánchez Contreras, 2016).

Las burbujas de cavitación requieren una cierta duración mínima del ciclo de rarefacción por compresión para formarse y crecer, y si este ciclo es demasiado corto, la burbuja de cavitación no se inducirá ni crecerá. La frecuencia ultrasónica y la duración de la fase de rarefacción son inversamente proporcionales entre sí; por lo tanto, a alta frecuencia, la burbuja de cavitación tarda muy poco en crecer, lo que impide su efecto de implosión. El gran número de burbujas formadas a alta frecuencia ofrece más resistencia a la transferencia de masa (Mason et al., 2011).

2. Intensidad de la radiación

Con respecto a la intensidad de la radiación, las magnitudes mayores tienden a favorecer una extracción completa de los metabolitos secundarios de interés. El desvanecimiento de la intensidad de irradiación ocurre en forma de calor y depende en gran medida de la configuración del reactor y del tamaño de la partícula del material o matriz vegetal que se estén utilizando (Toma et al., 2001) Con el aumento de la frecuencia y la potencia, los compuestos de interés pueden degradarse ya que por reacción del sustrato con los radicales libres prevalece el mecanismo sonoquímico sobre el mecanismo sonomecánico (Sánchez Contreras, 2016).

3. Ciclo de trabajo de ultrasonidos

El ciclo de trabajo es la relación entre la duración del pulso y el tiempo de ciclo de la onda ultrasónica, expresado en porcentaje. La duración del pulso es el tiempo durante el cual el transductor ultrasónico permanece "encendido", mientras que el intervalo de pulso se refiere al tiempo durante el cual el transductor ultrasónico permanece "apagado". La suma de la duración del pulso y el intervalo del pulso se conoce como "tiempo de ciclo". El efecto de la variación del ciclo de trabajo (DC) en los EAU ha sido estudiado en cáscara de granada (Pan et al., 2012) y sobre cáscara de pomelo (Xu et al., 2014). El efecto de cavitación disminuye debido al efecto de saturación y la colisión entre burbujas, como se explica en el efecto de la potencia. El ultrasonido operado en modo pulsado disminuye el número de burbujas de cavitación, pero aumenta la intensidad de la implosión de burbujas. Un aumento en el rendimiento al 80% de CC se explicó por la negación del efecto de saturación y la colisión entre burbujas por un tiempo de sonicación más largo (48 s)(Kumar et al., 2021).

4. Disolvente usado para la extracción

En cualquier proceso o sistema de extracción de metabolitos, la selección del disolvente es un punto importante para considerar. Se ha empleado el uso de disolventes selectivos, de baja toxicidad y fácil evaporación como etanol, metanol, acetona, agua o agua acidificada, sin embargo; es importante mencionar que la polaridad del disolvente es otro factor que también influye en el proceso de extracción de los compuestos de interés. El disolvente más utilizado por ser amigable con el medio ambiente y por su bajo costo es el agua, generalmente es usado para la extracción de compuestos polares como proteínas,

glucósidos y carbohidratos (Sivakumar et al., 2007). La acidificación del agua se ha hecho a través de ácido mineral o ácido cítrico solo para cambiar el pH del agua. Los alcoholes y la acetona, con diferentes niveles de agua, se han utilizado ampliamente para extraer la mayor cantidad de compuestos fenólicos de materiales vegetales (Kumar et al., 2021). El éter dietílico permite el aislamiento de compuestos de baja polaridad como los aromáticos. En ocasiones, también se utilizan disoluciones inorgánicas básicas como hidróxido de sodio y potasio.

En la extracción por ultrasonidos la eficiencia del proceso está determinada por la capacidad de absorción y transmisión de energía de la onda ultrasónica, así como también las propiedades físicas del disolvente también pueden influir en el fenómeno de cavitación ultrasónica. Cuando se utilizan disolventes de baja tensión superficial, presión de vapor y viscosidad generalmente la intensidad de la cavitación aumenta (Azuola & Vargas, 2007; Xu et al., 2014). Cabe mencionar que otro factor importante en la EAU es la estructura de la pared celular de la matriz vegetal, por lo que el disolvente seleccionado debe de ser capaz de penetrar en las paredes para poder liberar los compuestos de interés (Sánchez Contreras, 2016).

Existen aspectos importantes que se deben de considerar (las propiedades químicas del disolvente, concentración y relación soluto- solvente) para lograr una extracción eficiente de los metabolitos de interés (Slater et al., 2010).

Cuadro 1.12. Condición optimizada para la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de subproductos de frutas y verduras.

Compuesto bioactivo	Tejido	Condiciones y disolvente utilizado	Variables de extracción	Condición óptima para la EAU/principales hallazgos
Fenoles/ flavonoides/Antioxidantes	Cáscara de mango	T:30; t:20; LSR: 25:1; F-20; S: etanol	P:165.87 W.cm ⁻² ; Etanol %: 25–70	El ultrasonido no afectó a la extracción de los fenoles totales
	Café molido usado	F:20; S: etanol	P:100–300 W; T:30–50; t: 05–45; LSR: 5:1–30:1	P:244 W; T:40; t: 40; LSR: 17:1
	Orujo de uva	T:17 ± 3; LSR: 5:1; S: agua	P:50–150; t:5–25; F:40–120	P:150; t:25; F:40
	Semillas de uva	F:40; P:250 W; S: etanol	T:40–60; t: 20–34; EC:40–60 %	T:56,03; t: 29; EC:53,15 para el máximo de TPC
	Residuos sólidos de toronja	F:40; P:100 W; S: etanol	T:34–61; t:15–48; EC:20–80 (g/100 g)	T:25; t: 55; EC:40 g/100 g
	Semillas de espino	F:45; P:40 W; S: etanol	T:82–98; t: 30–50; EC:55–85%; LSR: 14:1–22:1	T:91; t: 37; EC:72%; LSR: 18:1
	Subproductos de la mora negra de la fábrica de té	F:40; S: etanol	P:72–216 W; T:30–70; t: 30–90	T:70; t:80; P:206 para los fenólicos totales T:70; t:75; P: 210 para los flavonoides

Donde, T = Temperatura (°C), t = Tiempo de sonicación (min), P = Potencia (W)/Intensidad de potencia (W.cm⁻²) Amplitud (%), F = Frecuencia (kHz), LSR = Relación líquido-sólido (mL.g⁻¹), DC = Ciclo de trabajo (%), EC = Concentración de etanol (%), S = Disolvente).

JUSTIFICACIÓN

La península de Yucatán, ubicada en el sureste de México representa una extensa variedad de recursos genéticos vegetales de clima tropical que pueden ser usadas como fuente de moléculas bioactivas con propósitos alimentarios y no alimentarios. *B. alicastrum* es un árbol milenario de Mesoamérica y el caribe considerado como una alternativa social, económica y ambiental para la producción de alimentos con valor nutricional. El árbol de ramón abunda en traspatios de las familias mayas y existe una empresa (Kishur) en Yucatán que se dedica a la siembra y transformación de las semillas de ramón. Actualmente existe un interés en el valor nutricional y en el potencial de industrialización de las semillas para el desarrollo de alimentos funcionales. En este sentido, se han establecido algunas otras empresas en comunidades rurales como centros de acopio, procesamiento y obtención de distintos productos derivados de la semilla de Ramón para su comercialización en el mercado nacional e internacional. Después de aprovechar las semillas quedan residuos que son considerados desechos sin valor, constituido por la cáscara del fruto y la piel de la semilla, a los cuales no se les ha tomado importancia como fuente de posibles moléculas activas con beneficios a la salud humana. Prácticamente todas las partes del árbol pueden utilizarse, las hojas y semillas se han utilizado como alimento en seres humanos y en animales como cerdos, bovinos, ovinos etc; de igual manera las hojas en infusión también tienen usos medicinales y farmacéuticos para tratar asma, bronquitis y dolores de pecho. Recientemente, hay un creciente interés de aprovechamiento del árbol *B. alicastrum* desde el punto de vista nutricional, de contenido de compuestos bioactivos y comercial. Considerando el uso ancestral del árbol de ramón como alimento para los mayas y la falta de estudios de los tejidos de la planta como fuente de compuestos bioactivos; en la presente investigación se tuvo como objetivo comparar la composición proximal, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante *in vitro* de cuatro tejidos de *B. alicastrum*, para valorizar sus productos para promover nuevas líneas de investigación de sus propiedades útiles a la salud en el desarrollo de alimentos funcionales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

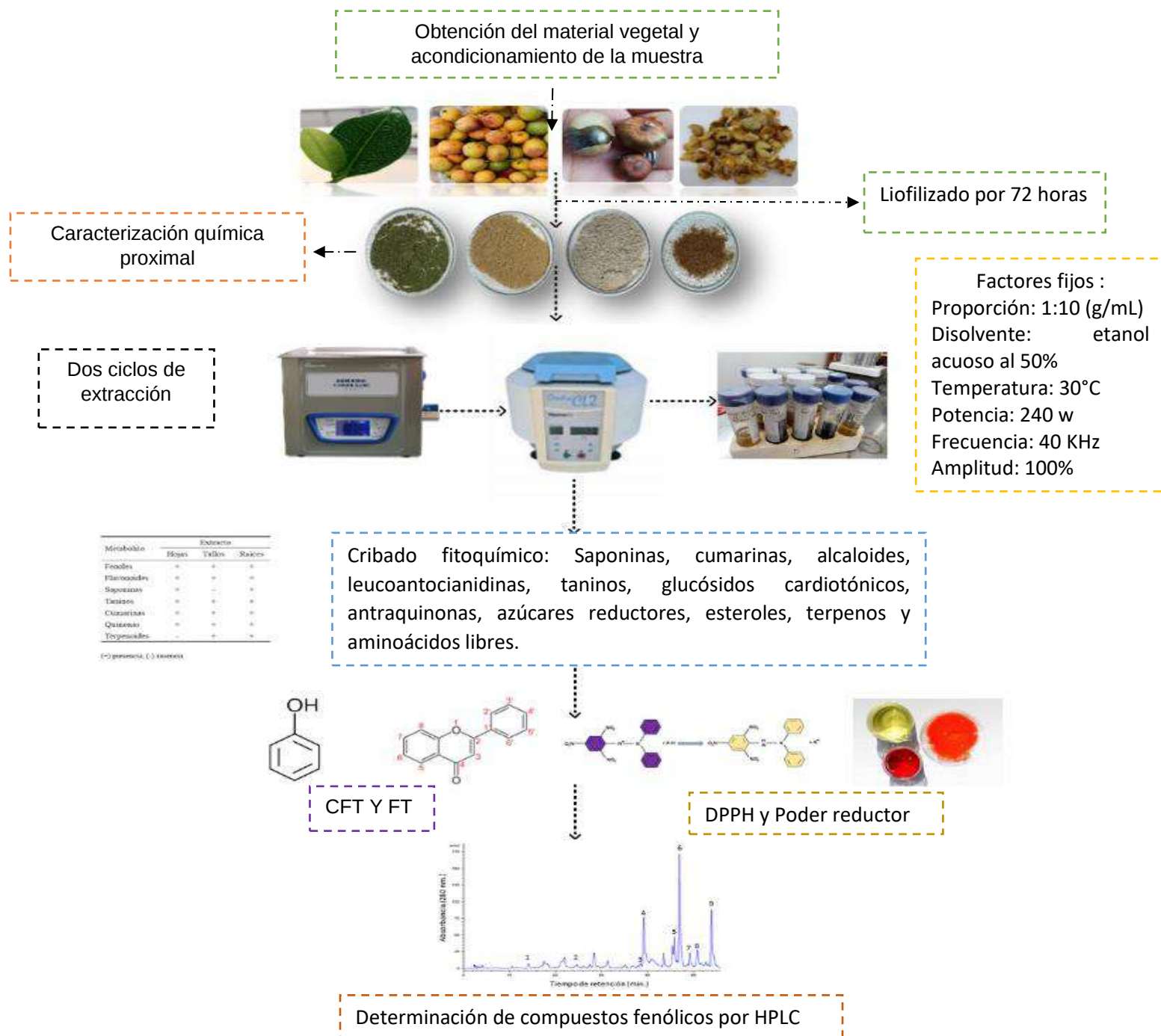
Evaluar la composición química proximal, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante *in vitro* en hoja y en diferentes partes del fruto (semilla, cáscara y piel de semilla) de *B. alicastrum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar la composición química proximal de la hoja y de diferentes partes del fruto (semilla, cáscara y piel de semilla) de *B. alicastrum*.
2. Determinar el perfil fitoquímico de diferentes tejidos de *B. alicastrum* a través de pruebas cualitativas.
3. Determinar el contenido de compuestos fenólicos (totales e individuales), flavonoides totales y la capacidad antioxidante *in vitro* a través de los ensayos DPPH y poder reductor de extractos de diferentes tejidos de *B. alicastrum*.

CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ESTRATEGIA GENERAL



En función de los objetivos de este trabajo los tejidos de *B. alicastrum* fueron colectados, acondicionados, liofilizados y triturados para obtener un polvo fino, el cual fue almacenado a – 20 °C para su caracterización química proximal. La extracción de compuestos bioactivos se llevó a cabo utilizando un baño de ultrasonidos con los factores fijos extracción que se indican en el apartado 2.4.

En cada extracto de tejido vegetal se determinó el perfil fitoquímico, rendimiento, el contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales además de la capacidad antioxidante *in vitro* a través de los ensayos DPPH y poder reductor. Finalmente, se realizó un perfil de compuestos fenólicos de cada extracto por cromatografía de líquidos (HPLC).

2.2 Químicos y reactivos

Reactivo de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio, nitrito de sodio, cloruro de aluminio ferricianuro de potasio, ácido tricloroacético, cloruro férrico, anhídrido acético, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, yoduro de potasio, yodato de potasio, cloruro de mercurio, ácido acético, sulfato de cobre, tartrato de sodio y potasio, radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH); los disolventes agua, metanol y acetonitrilo fueron grado HPLC. Los estándares de compuestos fenólicos se compraron a Sigma–Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO) con una pureza >98 %

2.3 Obtención del material vegetal y preparación de la muestra

Las hojas y diferentes partes del fruto (cáscara, piel de semilla y semilla) de *B. alicastrum* fueron colectados a partir de diez árboles al azar en un jardín del Instituto Tecnológico de Mérida, México en el mes de agosto del 2020. La semilla, cáscara y la piel de semillas fueron retiradas del fruto maduro (coloración amarillo-naranja) de manera manual; mientras que las hojas se colectaron verdes, sin evidencia de daño físico aparente. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con agua potable, secadas y cortadas en trozos pequeños. Los tejidos fueron almacenados por separado en bolsas con cierre hermético y congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Seguidamente se liofilizaron en un FreezeDryer Edwards Modulyo EF4 1044 por 72 horas, los tejidos liofilizados se molieron en un procesador de alimentos (NutriBullet, Los Ángeles, EE. UU.) en intervalos de 45 segundos hasta alcanzar un tamaño de partícula pequeño que atravesase la malla No. 40. Finalmente, los polvos fueron almacenados en bolsas de polietileno con cierre hermético a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para los análisis posteriores.

2.4 Composición química proximal

La determinación de la composición química de las hojas y diferentes partes del fruto (cáscara, piel de semilla y semilla) de *B. alicastrum* se realizó siguiendo la metodología descrita por la AOAC para humedad (925.10), cenizas (923.03), proteína (920.87) fibra cruda (7.070) y lípidos (920.39) (AOAC, 1997). Para determinar el ELN (extracto libre de nitrógeno) se empleó el método por diferencia, la suma total del contenido de humedad, grasa, proteína, fibra y ceniza de cada parte de las muestras se restó de 100 de la siguiente manera: Contenido de carbohidratos (%) = $100 - [\text{proteína (\%)} + \text{grasa (\%)} + \text{humedad (\%)} + \text{ceniza (\%)}]$.

2.5 Preparación del extracto crudo

El polvo de cada tejido vegetal (1 g) fue homogeneizado con 10 mL de etanol 50 % (v/v, en agua destilada) y posteriormente, cada mezcla se sometió a extracción por 30 min a 30 °C utilizando un baño de ultrasonidos (CScientific CS-UB100) con una potencia de 240 W, frecuencia de 40 KHz y amplitud de potencia de 100 %. Los extractos crudos fueron centrifugados por 10 min a 3,500 rpm, recuperando el sobrenadante. El pellet fue sometido a un segundo ciclo de extracción siguiendo el mismo procedimiento. Los sobrenadantes de ambas extracciones fueron combinados hasta completar un volumen final de 20 mL con el mismo disolvente de extracción y se almacenaron a –20 °C protegidos de la luz.

2.6 Rendimiento de extracción

De cada extracto se tomó una alícuota de 10 mL que fueron evaporados hasta sequedad utilizando un evaporador a vacío a 40 °C. El rendimiento se calculó con base en el peso del extracto seco (g) obtenido a partir de 100 g de tejido vegetal seco (Moo-Huchin et al., 2019)

El cálculo del rendimiento fue el siguiente:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{peso del extracto seco} \times \text{volumen total del extracto}}{\text{peso de la muestra} \times \text{volumen de la alícuota}} \times 100 \quad (1)$$

2.7 Espectro UV/Vis

El espectro de absorción de los extractos se evaluó dentro de un rango de 280 a 800 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis Agilet Technologies Cary 60. En el cuadro 13 se muestra las distintas diluciones de los extractos para realizar el barrido en el espectrofotómetro:

Cuadro 2.1 Preparación y dilución de extractos para el barrido espectrofotométrico

Extracto	Factor de dilución	Preparación
Hoja	50	100 µL de extracto + 4500 µL de disolvente.
Cáscara	16	(1) 500 µL de extracto + 3500 µL de disolvente (2) 2 mL extracto diluido + 2 mL de disolvente
Semilla	16	(1) 500 µL de extracto + 3500 µL de disolvente (2) 2 mL extracto diluido + 2 mL de disolvente

Piel de semilla

4

3 mL de extracto + 1 mL de disolvente

2.8 Perfil fitoquímico

Se realizaron diferentes pruebas cualitativas para la identificación de triterpenos, esteroides, saponinas, taninos, aminoácidos libres, alcaloides, cumarinas, glucósidos cardiotónicos, azúcares reductores, antraquinonas y leucoantocianidinas, cada reacción se caracterizó por la formación de espuma, cambio de color, o aparición de precipitados al momento de añadir el reactivo correspondiente a cada metabolito secundario. Se utilizó una escala de cruces para indicar la (-) ausencia, (+) contenido bajo (++) contenido medio y (+++) contenido alto (Gutiérrez-Pineda & Herrera, 2022).

2.8.1 Determinación cualitativa de triterpenos y/o esteroides

La determinación cualitativa de terpenos se llevó a cabo utilizando la reacción de Lieberman Buchard con algunas modificaciones. Se tomó una porción del extracto seco (5 mg evaporado previamente en estufa a 50 °C) y se le adicionó 1 mL de cloroformo, se adicionó 1 mL de anhídrido acético y se mezclaron en un baño de hielo por 5 min; posteriormente, por la pared del tubo se dejaron resbalar de dos a tres gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado sin agitar. La reacción se consideró positiva si la coloración fue de rosado a azul (Miranda & Cuellar, 2002)

Un ensayo positivo se tiene por un cambio de coloración:

1. Rosado-azul, muy rápido (triterpenos)
2. Verde intenso, visible, aunque rápido (fitoesteroides)
3. Verde oscuro-negro, final de la reacción (fitoesteroides)

En este ensayo se pueden apreciar tres cambios de coloración: 1) la fase de color “Rosado-azul” ocurre muy rápido que dificulta su observación; 2) la segunda fase, “verde a verde intenso”, asociada a que la solución contiene fitoesteroides ocurre a alta velocidad, sin embargo, esta es parcialmente visible; 3) la tercera fase “verde intenso - negro” únicamente se aprecia cuando la muestra contiene altas cantidades de fitoesteroides. Cuando el cambio de coloración sea de rosa-azul se indica la presencia de triterpenos.

2.8.2 Determinación cualitativa de esteroides

La determinación de esteroides se llevó a cabo utilizando la reacción de Salkowski con algunas modificaciones. El extracto de 20 mL fue evaporado a 50 °C, en donde, 5 mg de extracto seco se disolvieron en 1 mL de cloroformo, la muestra fue colocada en un baño de hielo y seguidamente se adiciono cuidadosamente por las paredes del tubo 1 mL (18 gotas aproximadamente) de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Como resultado positivo se consideró la aparición de una coloración roja o amarilla intensa en la fase clorofórmica (capa inferior). Si en la interfase se forma un color azul, verde o violeta característica de los carotenoides, sirve para distinguirlos de otros pigmentos naturales como las antocianinas.

2.8.3 Determinación cualitativa de saponinas

El extracto de (20 mL) fue evaporado a la mitad de su volumen. Se tomo 1 mL de extracto etanólico concentrado en un tubo de ensayo y posteriormente se le añadió 4 mL de agua destilada. La mezcla fue agitada vigorosamente por 30 segundos, el ensayo se consideró positivo a saponinas de tipo esteroideal y triterpénicas al aparecer espuma en la parte superior del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 min.

2.8.4 Determinación cualitativa de taninos

A una alícuota de 1 mL de extracto concentrado (de un volumen de extracto de 10 mL) se le añadieron 2 gotas de cloruro de sodio (NaCl) al 1 % y 3 gotas de cloruro férrico al 1 %. Una coloración negra azulada indica la presencia de taninos pertenecientes a los derivados del ácido pirogálico (hidrolizables) por otro lado si la reacción da una coloración verde, azul o negro verdosos, son taninos derivados de la catequina (condensados).

2.8.5 Determinación cualitativa de leucoantocianidinas

Una alícuota de 6 mL de extracto (a partir de un volumen de 20 mL), fue evaporado (concentrado) a 3 mL y se le adicionó 1 mL de ácido clorhídrico 2N (en 1- propanol), sin agitar ni mezclar por las paredes del tubo, luego se calentó a 45 °C durante 30 segundos; si la parte alcohólica se torna de color rojo carmesí indica la prueba de leucoantocianidinas.

2.8.6 Determinación cualitativa de antraquinonas

El extracto (de 20 mL) fue evaporado a 50 °C hasta sequedad, el residuo seco fue disuelto en 1 mL de cloroformo. A la muestra se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio (NaOH) al 5

%. La mezcla fue agitada para mezclar las fases y se dejó en reposo hasta su separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado a rojo el ensayo se considera positivo.

2.8.7 Determinación cualitativa de cumarinas

El extracto (de 20 mL) fue evaporado a la mitad de su volumen en una estufa a 50 °C. A una alícuota de 2 mL de extracto concentrado se le adicionaron 3 mL de hidróxido de sodio (NaOH) al 10 %, el cambio a color amarillo indica la presencia de cumarinas (Ismail et al., 2017)

2.8.8 Determinación cualitativa de alcaloides

El extracto de 20 mL fue evaporado a 50 °C, en donde, 50 mg de extracto seco se homogeneizaron con 6 mL de ácido clorhídrico (37 %), la muestra fue calentada en un baño de agua caliente a 90 °C por 10 min. Transcurrido el tiempo, la muestra se enfrió y filtró con papel filtro Whatman No 4, posteriormente el filtrado se dividió en dos tubos de ensayo para realizar las siguientes reacciones:

1. Se agregaron dos gotas del reactivo Wagner, la prueba se consideró positiva si en la muestra apareció un precipitado de color marrón (Miranda & Cuellar, 2002).

El reactivo de Wagner se preparó de la siguiente manera: En un vaso de precipitado se disolvieron 1.27 g de Yodo (re-sublimado) en 20 mL de agua utilizando un homogeneizador IKA ULTRA-TURRAX®, por separado se disolvieron 2 g de yoduro de potasio (KI) en 20 mL de agua, ambos reactivos se mezclaron y se dejaron agitar durante 20 min, transcurrido el tiempo de agitación, la solución se aforó a 100 mL con agua destilada.

2. Reacción de Mayer: Se agregaron de 2 a 3 gotas de reactivo Mayer, la prueba se consideró positiva si en la muestra se forma un precipitado color blanco o crema (Miranda, 2002).

El reactivo Mayer se preparó disolviendo 1.36 g de Cloruro de mercurio (HgCl_2) en 60 mL de agua destilada y por separado también se disolvieron 5 g de yoduro de potasio (KI) en 10 mL de agua destilada y entonces, en un matraz aforado se combinaron/mezclaron ambas soluciones y se aforó a 100 mL con agua destilada.

2.8.9 Determinación cualitativa de glucósidos cardiotónicos

La determinación de glucósidos cardiotónicos se llevó a cabo utilizando el ensayo de Keller-Killiani con algunas modificaciones. El extracto de 20 mL fue evaporado a la mitad de su volumen. A una alícuota de 1 mL de extracto se añadieron 0.5 mL de una mezcla (3 gotas de cloruro férrico (FeCl_3) al 5 % y 3 mL de ácido acético glacial), posteriormente se adicionaron dos gotas de ácido sulfúrico concentrado por las paredes del tubo. El ensayo se consideró positivo para la presencia de los desoxiazúcares característicos de este grupo, cuando al reaccionar con sales férricas en medio ácido se formó un anillo pardo en la interfase junto a un anillo púrpura por debajo produjeron una coloración azul (en la capa del ácido acético).

2.8.10 Determinación cualitativa de azúcares reductores

Los azúcares reductores fueron determinados mediante el ensayo de Fehling.

Volúmenes iguales 2.5 mL de la solución "A" (3.5 g de sulfato de cobre aforado a 50 mL de agua destilada) y 2.5 mL de la solución "B" (3.5 g de tartrato de sodio y potasio más 1 g de NaOH aforado a 10 mL con agua destilada) se mezclaron en un tubo de ensayo para preparar la solución de Fehling's (A+B). A una alícuota de 1 mL de extracto se añadió 1 mL del reactivo Fehling (A+B), la mezcla fue homogeneizada y se calentó en un baño de agua a 90 °C durante 10 min. El ensayo se consideró positivo si la solución tomó una coloración roja o apareció un precipitado rojo ladrillo.

2.8.11 Determinación cualitativa de aminoácidos libres

Los aminoácidos libres fueron determinados mediante el ensayo con ninhidrina, el extracto de 20 mL fue evaporado a la mitad de su volumen; en un tubo de ensayo se añadieron 2 mL del extracto concentrado y se mezclaron con 1 mL de solución de ninhidrina al 1 % (0.5 g de ninhidrina aforado en 50 mL de acetona). La mezcla fue calentada durante 15 min en un baño de agua a 80 °C y el ensayo se consideró positivo si se desarrolló un color violáceo.

2.9 Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante

2.9.1 Determinación del contenido de compuestos fenólicos solubles totales

El contenido de fenoles solubles totales fue determinado siguiendo la metodología de Singleton y Rossi modificado por (González-Aguilar et al., 2007) 50 μL del extracto se diluyó

en 3 mL de agua destilada y 250 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N en agua destilada) dejando reposar 5 min. Posterior al tiempo de equilibrio, 750 μL de Na_2CO_3 (20 % v/v H_2O) y 950 μL de agua destilada fueron añadidos a los extractos, las muestras se incubaron por 30 min a oscuridad a 35 °C. Las muestras se midieron a una absorbancia de 765 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Angilet Technologies Cary 60. La curva de calibración se realizó con concentraciones entre 100 y 1000 ppm de ácido gálico. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de polvo seco (CS).

2.9.2 Determinación del contenido de flavonoides totales

En un tubo de ensayo, una alícuota de 1 mL del extracto fue mezclado con 4 mL de agua destilada con un vórtex por 30 s y luego adicionaron 300 μL de nitrito de sodio NaNO_2 (5 % v/v , H_2O) la mezcla se homogenizó en un vórtex y se dejó reposar por 5 min. Tras el reposo, al tubo se agregaron 300 μL de la disolución de cloruro de aluminio AlCl_3 (10 % v/v , metanol), y se agitó por 30 s en vórtex y se dejó reposar por 1 min. Después de 1 min, se adicionaron 2 mL de hidróxido de sodio NaOH 1M y 2.4 mL de agua destilada, la mezcla se agitó en vórtex por 30 s y se leyó a una absorbancia de 415 nm con un espectrofotómetro UV-Vis. La concentración de flavonoides totales se expresó como mg equivalentes de Quercetina (EQ)/g de polvo liofilizado utilizando una curva de calibración con el estándar de Quercetina con concentraciones de 25-300 ppm.

2.9.3 Determinación de la capacidad antioxidante radical DPPH

Para el ensayo DPPH, la solución stock se preparó mezclando 2.5 mg de radical DPPH diluido con 100 mL de metanol absoluto. La solución fue ajustada a una absorbancia de 0.7 ± 0.02 con el mismo disolvente utilizando un espectrofotómetro a 515 nm. La reacción fue realizada con 3900 μL de la solución ajustada de DPPH más una alícuota de 100 μL del extracto. La mezcla se homogeneizó y se midió la absorbancia a 515 nm tras dejar reaccionar por 60 min. El porcentaje de inhibición fue calculado como:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \frac{\text{Absorbancia de DPPH inicial} - \text{Absorbancia de DPPH con extracto después de 60 min}}{\text{Absorbancia de DPPH inicial}} \times 100 \quad (2)$$

La capacidad antioxidante fue reportada como mM de Trolox/100 g peso seco, utilizando una curva de calibración con diferentes concentraciones de Trolox (100-100 μM).

2.9.4 Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo poder reductor

La evaluación del poder reductor del ion férrico (Fe^{3+}) se determinó mediante la metodología de (Oyaizu, 1986). El extracto se diluyó 10 veces utilizando el mismo disolvente de extracción. 2.5 mL de extracto fue mezclado con 2.5 mL de buffer de fosfato (0.2M, pH 6.6) más 2.5 mL de Ferricianuro de potasio (1 % v/v, en agua) en un tubo de ensayo, las muestras fueron incubadas a 50 °C durante 20 min utilizando un baño de agua con control de temperatura (Thermo Scientific 2870). Tras el período de incubación, las muestras se mezclaron con 2.5 mL de ácido tricloroacético (10 % p/v, en agua). De la mezcla anterior, se tomó una alícuota de 5 mL y fue diluido con 5 mL de agua destilada. Posteriormente, se agregó 1 ml de cloruro férrico (0.1 % p/v, en agua) y se mantuvo en reposo por 10 min a 35 °C para completar la reacción. Se midió la absorbancia a 700 nm con un espectrofotómetro. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes a vitamina C/100 g peso seco, usando una curva de calibración con diferentes concentraciones de vitamina C (5-40 ppm).

2.10 Determinación de compuestos fenólicos individuales por HPLC

Los análisis de las muestras se realizaron inyectando una alícuota de 50 µl de cada extracto en un sistema HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) equipado con un inyector manual y un detector UV-Vis de longitud de onda variable acoplado a un sistema de control mediante el software Dionex Chromeleon®. Los extractos se prepararon como se mencionó en la sección (2.3) y se evaporaron a 50 °C en un evaporador rotatorio (Buchi R-205, Labortechnik, Suiza). Los extractos secos fueron reconstituidos con metanol-agua 1:1 grado HPLC, en el Cuadro 2.2 se muestra las distintas preparaciones de los extractos para realizar el perfil cromatográfico, luego cada extracto se filtró con una membrana Millipore PVDF (fluoruro de polivinilideno) con un tamaño de poro de 0.45 µm (Millex-HV). Los extractos se analizaron con las siguientes condiciones cromatográficas: La separación de los compuestos se llevó a cabo utilizando una columna XDBC18 eclipse (250 mm × 4.9 mm i.d., 5 µm) a 25 °C; longitud de onda de detección, 280 nm; velocidad de 0.5 mL/ min; volumen de inyección de 20 µl; la fase móvil fue agua / ácido fórmico (99: 1, v / v; disolvente A) y acetonitrilo grado HPLC (disolvente B); la fase móvil se filtró bajo vacío sobre filtros de membrana de 0.45 µm; el gradiente lineal fue 2-100 % (B) de 0 a 70 min (Yahia, Gutiérrez-Orozco, y Arvizu-de León, 2011). Después de cada corrida, la columna se equilibró durante 10 min bajo las condiciones iniciales. Se preparó una mezcla estándar añadiendo con precisión la cantidad de cada compuesto (2 mg) (Ácido gálico, ácido clorogénico,

epicatequina, 3-hidroxitirosol, tirosol, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido transcinámico) a un matraz aforado de 25 mL y se diluyó hasta la marca con metanol HPLC (90:10, v / v). Se obtuvo una curva de calibración por estándar (diferentes concentraciones). Todas las soluciones se filtraron y se inyectaron en el HPLC para determinar sus tiempos de retención. Las curvas de calibración fueron calculadas usando un análisis de regresión lineal utilizando el valor r^2 ($r^2 > 0.98$) para todas las muestras. Los compuestos fenólicos en las muestras se identificaron de acuerdo con su orden de elución y comparando sus tiempos de retención con estándares auténticos. La concentración de compuestos fenólicos fue expresada como mg / 100 g peso seco.

Cuadro 2.2 Preparación de los extractos para realizar el perfil cromatográfico

Tejido	Volumen para re-suspender extracto seco
Hoja	2 mL (primera dilución) 500 µL de extracto + 500 µL de disolvente (segunda dilución)
Semilla	1.5 mL
Cáscara	2.5 mL
Piel de semilla	2.5 mL

2.11. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados bajo un diseño completamente al azar con medidas repetidas con arreglo unifactorial correspondiente a la variable tejidos con cuatro tratamientos y se realizó una comparación de medias mediante una prueba de Tukey a un nivel de significancia de $P \leq 0.05$ con el paquete estadístico Statgraphics CENTURION XVI.II

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Composición química proximal

La composición química de un alimento proporciona información sobre su valor nutricional (Sarmiento *et al.*, 2022). El cuadro 3.1 muestra que la composición química es diferente entre los tejidos analizados. Se sabe que el contenido de humedad de un alimento proporciona información de su estabilidad durante el almacenamiento. La cáscara del fruto maduro resultó con un mayor contenido de humedad con un valor promedio de 12.42 % y por debajo de ella se encuentra la piel de semilla con 9.91 % y las de menor contenido fueron la semilla y hoja (4.86 y 2.65 % respectivamente). Las cenizas son un indicador del contenido total de minerales presentes en un alimento, al respecto los resultados indican que la semilla obtuvo un menor porcentaje y la hoja exhibió el mayor contenido (14.43 %), este último tejido también demostró tener 2.69 % de extracto etéreo (grasa) mientras que, en el resto de los tejidos, el valor de la grasa cruda fue inferior. Las proteínas son un componente esencial para la supervivencia de todo ser humano, su papel fundamental es proporcionar las cantidades suficientes de aminoácidos en la alimentación (Pugalenthi *et al.*, 2004). La hoja obtuvo el mayor contenido de proteína con 15.43 % seguido de la semilla, cáscara y piel de semilla con 12.96 %, 12.6 % y 11.36 %, respectivamente. La fibra cruda es el residuo orgánico (descontando los elementos minerales) que queda libre de componentes solubles como proteínas, azúcares, almidones, etc y dicha fibra está compuesta principalmente por lignina y celulosa. Al comparar los tejidos, la piel de semilla obtuvo un 28.01 % de fibra cruda. El extracto libre de nitrógeno fue significativamente mayor en la semilla (72.40 %) que de todos los tejidos. Los resultados encontrados en este estudio específicamente proteína, grasa, cenizas y fibra cruda en la semilla de *B. alicastrum* coinciden con lo reportado por (Subiria-Cueto *et al.*, 2019).

Cuadro 3.1 Composición química proximal de las diferentes partes de *B. alicastrum*

Tejido	Humedad (%)	Cenizas (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Fibra (%)	ELN (%)
Hoja	2.65±0.05 ^a	14.43±0.51 ^d	2.69±0.05 ^d	15.43±0.50 ^c	13.93±0.91 ^c	50.5±2.01 ^b
Cáscara	12.42±0.94 ^d	6.12±0.06 ^b	1.75±0.98 ^c	12.6±0.00 ^b	9.75±0.63 ^b	57.27±0.76 ^c
Semilla	4.86±0.09 ^b	3.44±0.00 ^a	1.16±0.08 ^a	12.96±0.25 ^b	4.83±0.05 ^a	72.40±0.40 ^d
Piel de semilla	9.91±0.05 ^c	6.79±0.04 ^c	1.43±0.00 ^b	11.36±0.75 ^a	28.01±0.06 ^d	42.47±0.94 ^a

Los datos están expresados en base seca. Letras diferentes en la misma fila indican valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$)

3.2 Rendimiento de extracción

El rendimiento de extraíbles depende de la selección de un método de extracción y de las condiciones como tiempo, temperatura, tamaño de partícula, el sistema de disolvente elegido, además de la composición del tejido vegetal (Oliveira et al., 2022). El contenido de sólidos solubles totales se constituye de un 80 a 95 % de azúcares que se encuentran en el caldo o jugo celular del fruto mismo, la cantidad total de los azúcares en un fruto dependen de factores importantes, por ejemplo: del rendimiento asimilatorio de las hojas, la variedad, de la relación hoja/fruto, condiciones climáticas durante el desarrollo de los frutos, del estado de desarrollo, madurez y almacenamiento (Osterloh et al., 1997; Pinzón et al., 2007). El rendimiento de extracción de los cuatro tejidos evaluados (cáscara, piel de semilla y semilla) de *B. alicastrum* se presenta en la figura 10. Los resultados revelan que el mayor rendimiento de extraíbles se obtuvo en el extracto de la cáscara con un valor promedio de 33.13±0.74 %. Este resultado puede ser explicado por que la cáscara del fruto maduro tuvo también mayor presencia de azúcares reductores; además, la mezcla de disolventes usado para la preparación del extracto (etanol: agua) favorece la extracción de compuestos como los carbohidratos (azúcares) y proteínas. La hoja obtuvo un 19.7 %, mientras que la semilla presentó un rendimiento de 15.03 %. Moo-Huchin et al. (2019) reportaron un rendimiento del 11 % en un extracto de semilla de ramón preparado con el mismo sistema de disolventes usado en este trabajo; sin embargo, esta diferencia se puede atribuir al procedimiento y/o tratamiento dado a la muestra (las semillas se secaron en un horno a 50 °C), también al método y condiciones del sistema de extracción elegido

(agitación mecánica) y finalmente, la piel de semilla obtuvo 4.8 % de extraíbles (de este tejido no hay reportes para realizar comparación alguna).

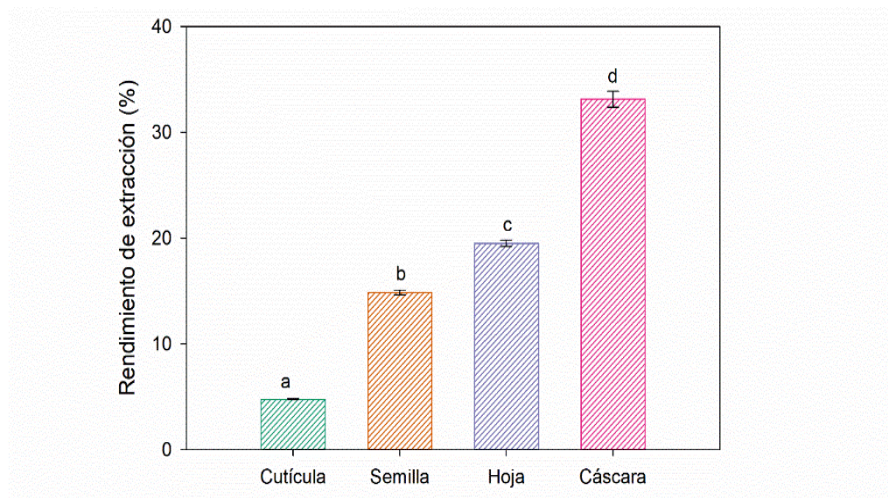


Figura 10. Rendimiento de extracción (%) de cuatro tejidos de *B. alicastrum* usando EAU

3.3 Perfil fitoquímico

Los fitoquímicos pueden ser definidos como metabolitos secundarios de bajo peso molecular que no presentan ningún valor nutricional esencial en las plantas, pero se encuentran directamente relacionados con los mecanismos de protección y adaptación de la planta a su medio ambiente, a diferencia de los metabolitos primarios estos se hallan en pequeñas concentraciones y se les atribuyen diversas actividades biológicas que benefician a la salud humana (Nawaz et al., 2022).

Estos metabolitos han despertado un gran interés, no solo por su actividad biológica, además tienen importancia comercial en la industria de los alimentos, farmacéutica, agronómica entre otras (Oliveira et al., 2022). Los terpenos y esteroides presentan actividad antioxidante, antitumoral, antiinflamatoria, antifúngica y antibacteriana (Tholl, 2015); los taninos se unen a las proteínas, muestran adherencia a las células de la mucosa y evitan el crecimiento de microorganismos (Haslam, 1996), mientras que las cumarinas poseen actividad antibacteriana, antituberculosa, antifúngica, antiviral y antioxidante (Stefanachi et al., 2018). La presencia de estos fitoquímicos en los tejidos de *B. alicastrum* destacan su importancia medicinal. Este estudio amplía la información fitoquímica de los diferentes tejidos de *B. alicastrum*. De acuerdo con los resultados (cuadro 3.2) y a partir de esta caracterización se lograron identificar diferentes grupos de metabolitos secundarios; en donde, se encontró la presencia abundante de aminoácidos en los extractos de los cuatro

tejidos estudiados, por otro lado, en la cáscara se encontraron terpenos y esteroides al igual que en la piel de semilla, sin embargo, en este último tejido también se encontraron taninos y cumarinas, mientras que los azúcares reductores solo estuvieron presentes en la cáscara y la hoja. En ninguno de los cuatro tejidos estudiados se detectó la presencia de alcaloides saponinas, leucoantocianidinas, glucósidos cardiotónicos y antraquinonas. El contenido y el tipo de metabolito pueden variar según los diferentes tejidos de la planta, probablemente porque la biosíntesis de los metabolitos secundarios se puede regular de forma específica por tejido (Gutiérrez-Pineda & Herrera, 2022).

Los metabolitos secundarios (esteroides y taninos) encontrados en la hoja *B. alicastrum* coinciden con lo reportado por Galindo-Contreras (2022),

Cuadro 3.2. Perfil fitoquímico de las diferentes partes de *B. alicastrum*

Ensayo	Metabolito	Tejido vegetal			
		Cáscara	Piel de semilla	Hoja	Semilla
Lieberman Burchard	Terpenos	+	++	+++	-
Reacción de Salkowski	Esteroides	+	+++	-	+
Espuma	Saponinas	-	-	-	-
Cloruro férrico	Taninos	-	++	+++	-
Ácido sulfúrico	Antraquinonas	-	-	-	-
Hidróxido de sodio	Cumarinas	+	+	-	-
Reacción de Wagner	Alcaloides	-	-	-	-
Reacción de Mayer	Alcaloides	-	-	-	-
Keller Kiliani	Glucósidos cardiotónicos	-	-	-	-
Aminoácidos libres con ninhidrina	Aminoácidos libres	+++	+++	+++	+++
Fehling	Azúcares reductores	++	-	+	-
Rosenheim	Leucoantocianidinas	-	-	-	-

(-) ausencia, (+) contenido bajo (++) contenido medio y (+++) contenido alto

3.4 Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante

Los compuestos fenólicos son metabolitos bien conocidos por su actividad biológica relacionada con su propiedad antioxidante y los efectos benéficos en la salud humana previniendo diversas enfermedades cardiovasculares. En las plantas la concentración de estos metabolitos varía dependiendo de la etapa del desarrollo en la que la planta se encuentre (Maliński et al., 2021). La determinación del contenido de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu, permite realizar una evaluación comparativa del contenido de estos compuestos presentes en los cuatro tejidos. Se encontró alta variación en el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales en los cuatro tejidos investigados (Figura 11). La semilla (19.73 mg AG/100 g) y la hoja (15.54±0.49 mg AG/100 g) fueron los tejidos que presentaron los valores más altos de compuestos fenólicos totales, mientras que la piel de semilla presentó el valor más bajo (7.19 mg AG/100 g).

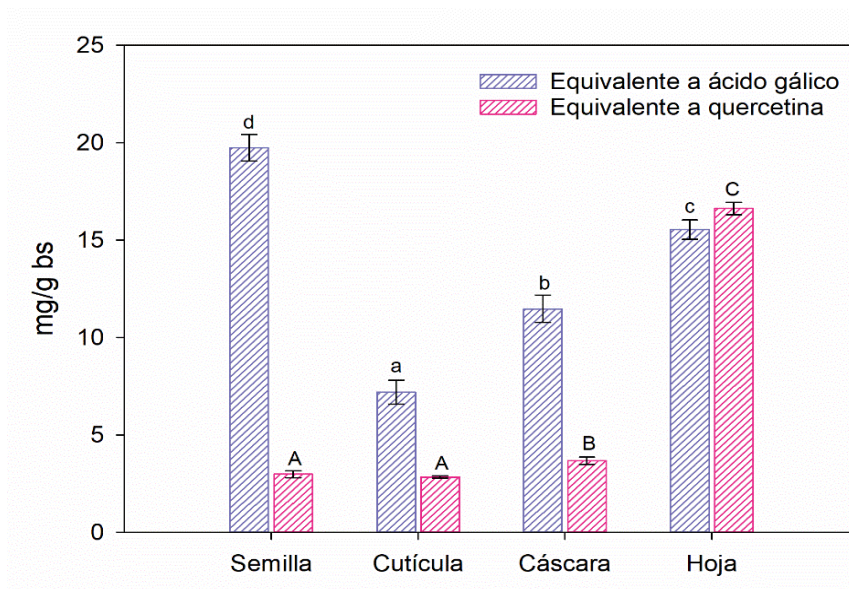


Figura 11. Contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales de cuatro tejidos de *B. alicastrum*

Los flavonoides son compuestos fenólicos con reconocida propiedad antioxidante ya que tienen capacidad para secuestrar radicales libres y quelación de metales. Sin embargo, la abundancia de estos compuestos en la planta y en sus tejidos, depende en gran medida de diferentes factores abióticos de los entornos en donde se desarrollan, por ejemplo, el clima tropical húmedo del sureste mexicano (Naikoo et al., 2019). Como consecuencia, la abundancia de los flavonoides en plantas como el árbol *B. alicastrum* puede variar debido a la respuesta adaptativa a las condiciones tropicales del sureste de México (alta intensidad

del sol, inundación, salinidad de suelo etc). En este estudio el contenido de flavonoides totales fue significativamente mayor en la hoja (16.62 ± 0.32 mg EQ/g), seguido de la cáscara del fruto maduro (3.68 ± 0.19 mg EQ/g). Finalmente, la semilla y la piel de semilla fueron los tejidos que presentaron los valores más bajos. El alto contenido de FT de la cáscara de fruto maduro (cuando el fruto cambia de color de verde a naranja) se puede explicar debido a que, durante la maduración, los cambios de coloración que se producen en la superficie de las cáscaras de los frutos se deben a la disminución del color verde (degradación de ciertos pigmentos como la clorofila) y aumento del color amarillo (síntesis de carotenos, o asociados a un tipo de flavonoide) (Andrade-Cuvi et al., 2021).

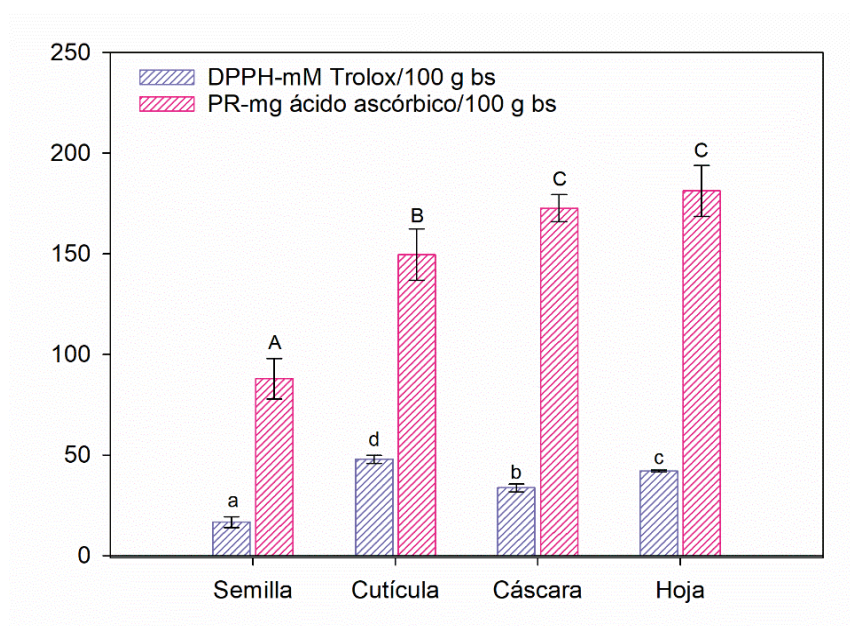


Figura 12. Capacidad antioxidante in vitro de cuatro tejidos de *B. alicastrum*

La capacidad antioxidante (CA) de una matriz alimentaria se determina por un conjunto de entidades moleculares como los compuestos fenólicos que interactúan entre sí de forma sinérgica o antagónica para inhibir los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno EROs que provocan el deterioro oxidativo (Moo-Huchin et al., 2019) entonces la CA se define como el potencial de una sustancia o compuesto para inhibir o dificultar la oxidación de un sustrato hasta en cantidades muy pequeñas (López-Alarcón & Denicola, 2013; Swallah et al., 2020).

El ensayo de capacidad antioxidante medido con DPPH se basa en la donación o transferencia de un átomo de hidrogeno por parte del extracto antioxidante hacia el radical, provocando un cambio de color del radical de violeta al amarillo. Otro ensayo utilizado es el

poder reductor que se basa en la capacidad de reducir el ion férrico (Fe^{3+}) a ion ferroso (Fe^{2+}) resultando una coloración azul/verde al final de la reacción. En este trabajo el valor de la capacidad antioxidante medido con el ensayo DPPH resultó mayor para piel de semilla (47.88 ± 1.97 mM/Trolox), seguido de hoja (42.05 ± 0.47 mM/Trolox), cáscara (3.70 ± 1.91 mM/Trolox) y semilla (16.70 ± 2.73 mM/Trolox); sin embargo, la hoja y la cáscara obtuvieron mayor poder reductor en comparación a la semilla y la piel de semilla.

En los últimos tres años algunos investigadores han realizado estudios con respecto al contenido fenólico y capacidad antioxidante de *B. alicastum*. Ozer (2016) realizó un estudio en el que compara el contenido fenólico y la actividad antioxidante de las semillas tostadas de *B. alicastrum* con respecto a las nueces comerciales (nuez, maní y almendra); encontrando que el extracto etanólico de *B. alicastrum* presentó los niveles más altos de polifenoles totales (2,467 mg AG/100 g), así como la mayor capacidad antioxidante medida con DPPH (79 % a 400 $\mu\text{g/mL}$).

De igual manera en otra investigación realizada por Moo-Huchin et al. (2019) se evaluó la influencia de los disolventes puros y sus mezclas con agua destilada sobre el contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante de la semilla cruda de *B. alicastrum*. De todos los sistemas de disolventes usados, el extracto etanol-agua (1:1) mostró los valores más altos en TPC y capacidad antioxidante medida con DPPH y poder reductor con valores promedios de 1230.12 ± 10.61 mg AG/100 g, 872.75 ± 26.95 mM/Trolox y 348.21 ± 12.51 mg de ácido ascórbico /100 g, respectivamente. Los autores también reportan que el extracto preparado con acetona-agua presentó el mayor contenido de flavonoides totales (170.39 ± 2.37 mg QE / 100 g) comparado con los otros sistemas evaluados.

A pesar de que en las investigaciones antes mencionadas los autores acondicionaron y trataron sus muestras de diferentes maneras ambos estudios demuestran que la semilla de *B. alicastrum* contiene niveles considerables de polifenoles, así como también una excelente capacidad antioxidante.

3.5 Compuestos fenólicos individuales

La distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos de una misma planta es diferente y dentro de estos compuestos de interés se encuentran quercetina, catequina, ácido clorogénico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido sinápico, ácido ferúlico, entre otros que muestran alta capacidad antioxidante (Kähkönen et al., 1999). El contenido de compuestos fenólicos vario ampliamente en los cuatro tejidos de acuerdo con el Cuadro 3.3.

Cuadro 13 Contenido de compuestos fenólicos de hoja, semilla, cáscara y piel de semilla de *B. alicastrum*

Compuesto fenólico (mg/100 g PS)	Tejido			
	Hoja	Semilla	Piel de semilla	Cáscara
Ácido clorogénico	Nd	Nd	26.14±0.02 ^b	7.5±0.42 ^a
Ácido gálico	Nd	10.72±0.24 ^b	0.35 ±0.04 ^a	0.79 ±0.03 ^a
3-hidroxitirosol	0.51±0.00 ^a	7.93±0.00 ^b	Nd	28.94±0.35 ^c
Ácido 4 hidroxibenzoico	3.32±0.00 ^b	0.79±0.00 ^a	Nd	Nd
Ácido vanílico	9.8±0.00 ^c	1.31±0.00 ^a	Nd	1.70±0.06 ^b
Ácido cafeico	50.18±0.38 ^b	Nd	Nd	1.29±0.00 ^a
Ácido elágico	3.02±0.78 ^b	Nd	0.65±0.00 ^a	Nd
Ácido ferúlico	Nd	0.7±0.00 ^b	0.13 ±0.00 ^a	Nd
Epicatequina	Nd	Nd	0.42±0.03	Nd
Tirosol	Nd	2.92±0.14	Nd	Nd
Ácido p-cumárico	0.83±0.07	Nd	Nd	Nd
Ácido sinápico	Nd	0.15±0.00	Nd	Nd
Ácido transcinámico	Nd	0.24±0.00	Nd	Nd

Se identificaron y cuantificaron 13 compuestos fenólicos por HPLC en extractos etanol-agua de los tejidos *B. alicastrum* incluidos: Tirosol, 3-hidroxitirosol, seis ácidos hidroxicinámicos (Ácido clorogénico, ferúlico, sinápico, p-cumárico, transcinámico, cafeico), tres ácidos hidroxibenzoicos (Acido gálico, vanílico y 4-hidroxibenzoico), un flavonoide (epicatequina) y un ácido carboxílico (ácido elágico)

El ácido clorogénico fue el compuesto que se encontró en mayor concentración en la piel de las semillas (26.14±0.02 mg/100 g PS), mientras que la hoja obtuvo mayor contenido de ácido cafeico (50.18±0.38 mg/100 g PS) finalmente, el 3-hidroxitirosol se encontró en mayor concentración en la cáscara con un valor promedio de (28.94±0.35 mg/100 g PS).

En otro resultado se reporta que en la semilla se determinaron ocho compuestos fenólicos siendo el ácido gálico el más abundante con un valor promedio de (10.72±0.24 mg/100 g PS).

La semilla también contiene tirosol y 3-hidroxitirosol, este último compuesto ha sido objeto de numerosos estudios, ya que se ha demostrado que tiene una importante propiedad antioxidante, anticancerígena, antiinflamatoria, antimicrobiana, antidiabetogénica, y actividad neuroprotectora (Filik & Ozyilkan, 2003).

Los compuestos como el ácido cafeico, ácido vanílico, ácido ferúlico, sinápico, ácido transcinámico y quercetina, ya han sido reportados en semillas por, Ozer (2016) y Moo-Huchin *et al.* (2019). Por otra parte, González-González *et al.* (2019) reportaron la presencia de dos ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico y ácido vanílico) y un ácido hidroxicinámico (ácido cafeico) en las hojas de *B. alicastrum*.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

- Los cuatro tejidos de *B. alicastrum* mostraron diferencias significativas en su composición química proximal, en la presencia y contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante invitro.
- Se encontraron diferencias en el rendimiento de la extracción (que varío entre 4.07 y 33 %).
- Los hallazgos demuestran que la hoja y la cáscara se caracterizaron por su alto contenido de TFC y mayor poder reductor, mientras que la semilla y piel de semilla tuvieron mayor TPC y capacidad antioxidante DPPH respectivamente.
- Las hoja, cáscara, semilla y piel de semilla son fuente importante de ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogénico, 3-hidroxitirosol respectivamente.
- Se proporciona por primera vez información de piel de semilla y cáscara de *B. alicastrum* como una importante fuente natural de antioxidantes.
- La información de este trabajo contribuye en la posibilidad de seleccionar algún tejido con potencial antioxidante en aplicaciones alimentarias y no alimentarias.

ANEXOS

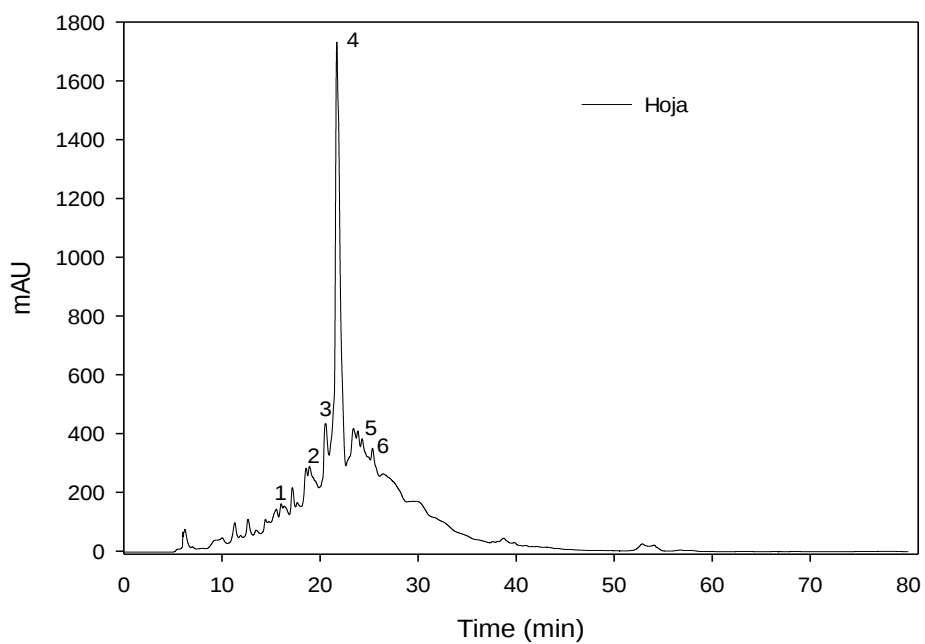


Figura 13. Cromatograma HPLC de compuestos fenólicos del extracto de hojas de *B. alicastrum* (1) 3- Hidroxitirosol, (2) Ácido 4-hidroxibenzoico, (3) Ácido vanílico, (4) Ácido cafeico, (5) Ácido p-cumárico, (6) Ácido elágico.

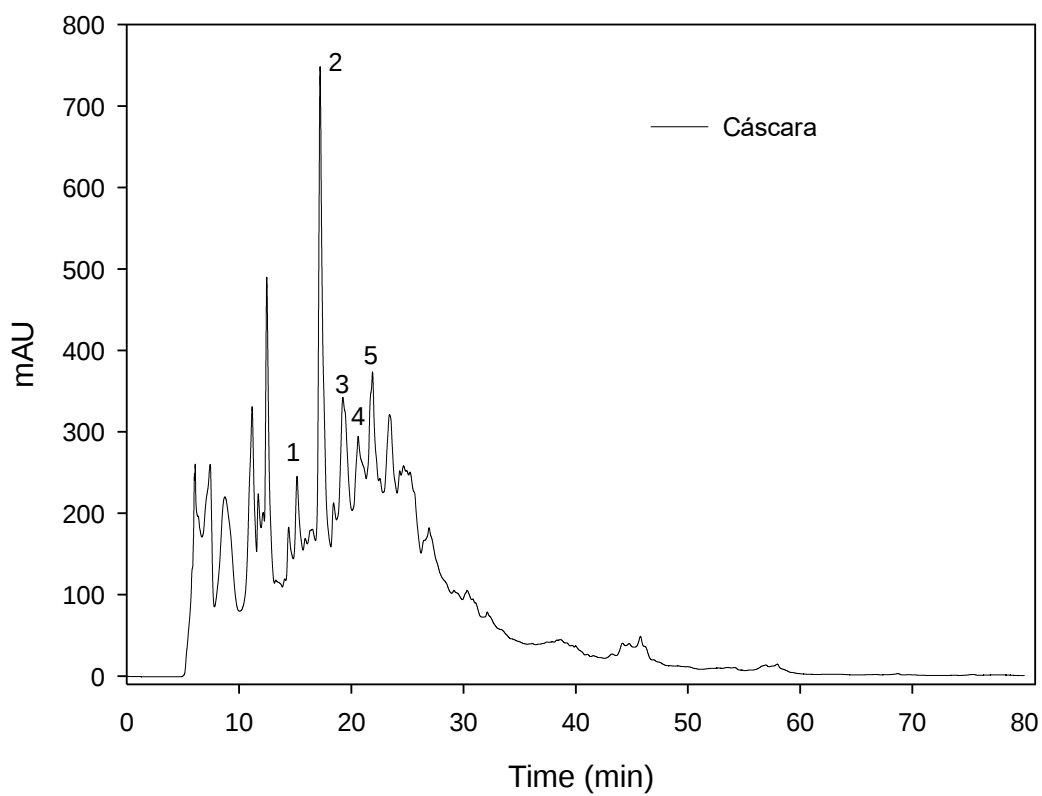


Figura 14. Cromatograma HPLC de compuestos fenólicos del extracto de cáscara de *B. alicastrum* (1) Ácido gálico, (2) 3-hidroxitirosol, (3) Ácido clorogénico, (4) Ácido vanílico, (5) Ácido cafeico

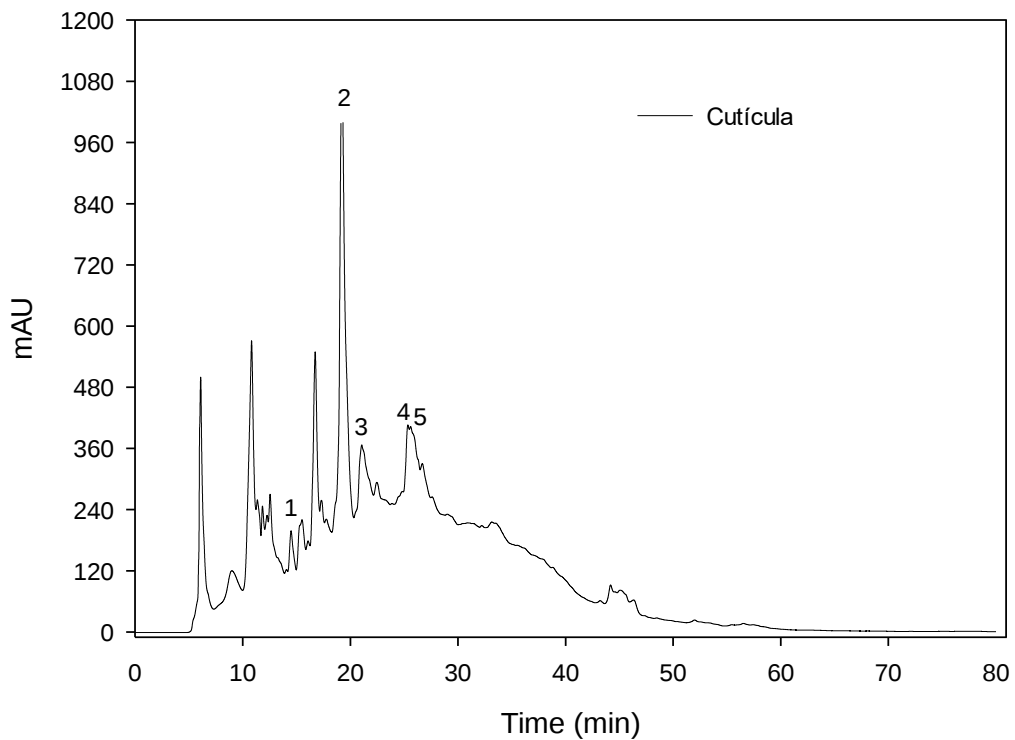


Figura 15. Cromatograma HPLC de compuestos fenólicos del extracto de cutícula de *B. alicastrum* (1) Ácido gálico, (2) Ácido clorogénico, (3) Epicatequina, (4) Ácido elágico, (5) Ácido ferúlico.

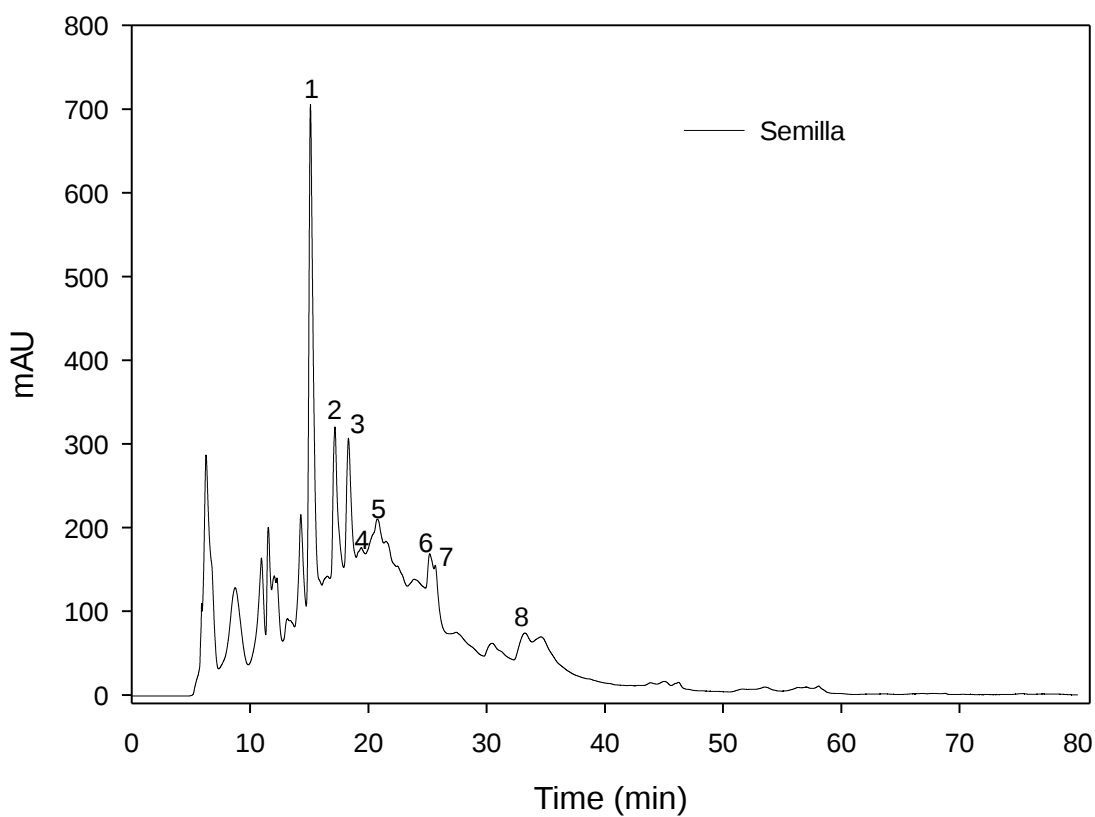


Figura 16. Cromatograma HPLC de compuestos fenólicos del extracto de semilla de *B. alicastrum* (1) Ácido glico, (2) 3-hidroxitirosol, (3) Tirosol, (4) Ácido 4-hidroxicinámico, (5) Vanílico, (6) Ácido sinápico, (7) Ácido ferúlico, (8) Ácido transcinámico.



Figura 17. Prueba positiva para azúcares reductores en tejidos de *B. alicastrum*



Figura 18. Prueba negativa para leucoantocianidinas en tejidos de *B. alicastrum*

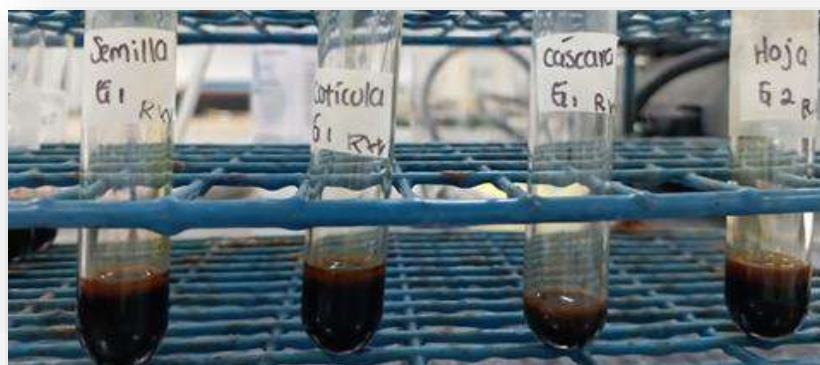


Figura 19. Prueba negativa para alcaloides (Reacción de Wagner) en tejidos de *B. alicastrum*



Figura 20 Prueba negativa para alcaloides (Reacción de Mayer) en tejidos de *B. alicastrum*

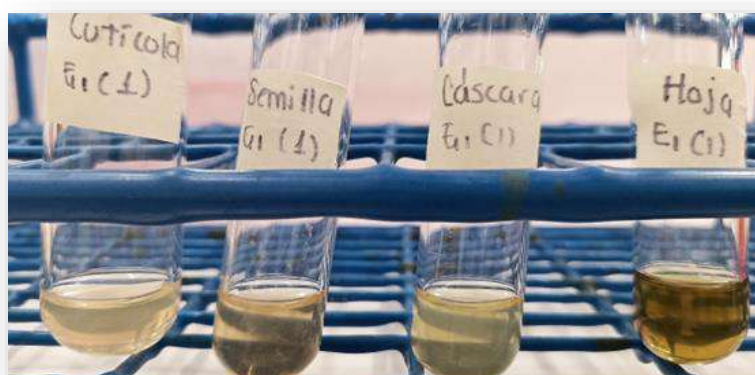


Figura 21. Prueba negativa para antraquinonas en tejidos de *B. alicastrum*



Figura 22. Prueba positiva para cumarinas en tejidos de *B. alicastrum*



Figura 23. Prueba negativa para glucósidos cardiotónicos en tejidos de *B. alicastrum*



Figura 24 Prueba positiva para aminoácidos libres en tejidos de *B. alicastrum*

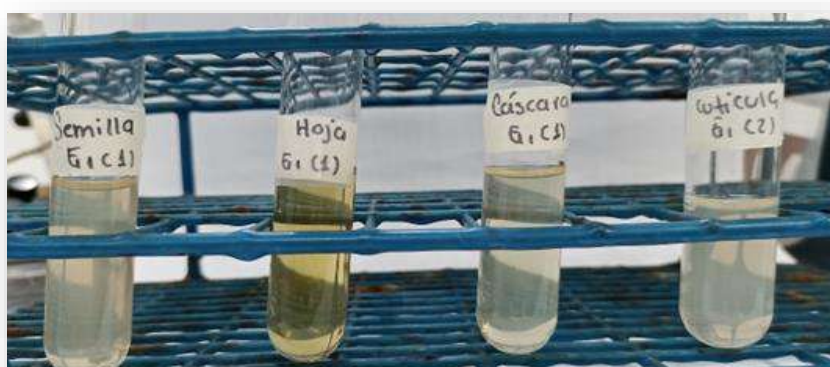


Figura 25 Prueba negativa para saponinas en tejidos de *B. alicastrum*



Figura 26. Prueba positiva para Taninos en tejidos de *B. alicastrum*



Figura 27. Prueba positiva para esteroides en cáscara, semilla y piel de semilla de *B. alicastrum*.



Figura 28. Prueba positiva para terpenos en tejidos de *B. alicastrum*

BIBLIOGRAFÍA

- Ahumada, A., Ortega, A., Chito, D., & Benítez, R. (2016). Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): Un subproducto con alto potencial biológico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 45(3), 438-469. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n3.62043>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200-214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Ameer, K., Shahbaz, H. M., & Kwon, J.-H. (2017). Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review: Polyphenols extraction by green methods . . . *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 295-315. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12253>
- Andary, C., & Mondolot-Cosson, L. (1997). *Histolocalization of plant polyphenols in tissues and cell walls. Some applications* (pp. 41-44). Polyphenols in foods; Proceedings of a European COST concerted action scientific workshop.
- Andrade-Cuvi, M. J., Guijarro-Fuertes, M., & Luzcando Figueroa, J. (2021). Evaluación fisicoquímica y antioxidante de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) durante la maduración. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 22(2), 146-164.
- Arango, A. (2002). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquía.
- Ayala Burgos, A. J. (2006). *Composición química-nutricional de árboles forrajeros*. Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Cuerpo Académico de Producción Animal en Agroecosistemas Tropicales: CONACYT : SAGARPA : COFUPRO.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Azuola, R., & Vargas, P. (2007). *Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA)*. 20(4), 1-11.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry* (4th rev. and extended ed). Springer.
- Berg, C. C. (1972). Olmedieae Brosimeae (Moraceae). *Flora Neotropica*, 7, 1-228. JSTOR.

- Bicas, J. L., Dionísio, A. P., & Pastore, G. M. (2009). Bio-oxidation of Terpenes: An Approach for the Flavor Industry. *Chemical Reviews*, 109(9), 4518-4531. <https://doi.org/10.1021/cr800190y>
- Birošová, L., Mikulášová, M., & Vaverková, Š. (2005). Antimutagenic effect of phenolic acids. *Biomedical Papers*, 149(2), 489-491.
- Blanchard, S., & Thorson, J. (2006). Enzymatic tools for engineering natural product glycosylation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(3), 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.04.001>
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (1998). Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(2), 135-141.
- Bribi, N. (2018). Pharmacological activity of Alkaloids: A Review. *Asian Journal of Botany*, 1, 1-6.
- Bruneton, J., & Bruneton, J. (1995). *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. Lavoisier Tec & Doc [u.a.].
- Bucar, F., Wube, A., & Schmid, M. (2013). Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds. *Natural Product Reports*, 30(4), 525. <https://doi.org/10.1039/c3np20106f>
- Bulduk, I., Gezer, B., & Cengiz, M. (2015). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Morphine from Capsules of *Papaver somniferum* by Response Surface Methodology. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/796349>
- Cantú-González, R. N., Palomo Ligas, L., Sendar Daniel, N. F., López López, L. I., & Barajas Bermúdez, L. (2012). Naftoquinonas: De simples pigmentos a moléculas terapéuticas. *Biológicas*, 14(2), 48-56.
- Caputi, L., & Aprea, E. (2011). Use of Terpenoids as Natural Flavouring Compounds in Food Industry. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 3(1), 9-16. <https://doi.org/10.2174/2212798411103010009>
- Carter, C. T. (2015). *Chemical and functional properties of Brosimum alicastrum seed powder (Maya Nut, Ramón Nut)*. Clemson University.

- Carvajal-Rojas, L., Hata-Urbe, Y., Sierra Martínez, N., & Rueda Niño, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Colombia forestal*, 12(1), 161-171.
- Castillo-Olvera, G., & Zavala-Cuevas, D. (2017). ANÁLISIS FITOQUÍMICO: UNA HERRAMIENTA PARA DEVELAR EL POTENCIAL BIOLÓGICO Y FARMACOLÓGICO DE LAS PLANTAS. *TLATEMOANI*, 8(24), 71-86.
- Chen, A. Y., & Chen, Y. C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*, 138(4), 2099-2107. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.139>
- Chito Trujillo, D. M., Ortega Bonilla, R. A., Ahumada Mamián, A. F., & Rosero López, B. (2017). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) versus soja (*Glycine max* [L.] Merr.) en la nutrición humana: Revisión sobre las características agroecológicas, de composición y tecnológicas. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 21(2), 184-198. <https://doi.org/10.14306/renhyd.21.2.256>
- Cook, O. F. (1935). The Maya Breadnut in Southern Florida. *Science*, 82(2139), 615-616. <https://doi.org/10.1126/science.82.2139.615>
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, 5, 87. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001. <https://doi.org/10.1039/b802662a>
- Cutler, H. G. (Ed.). (1988). *Biologically Active Natural Products: Potential Use in Agriculture* (Vol. 380). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-1988-0380>
- De Silva, G. O., Abeysundara, A. T., & Weroshana Aponso, M. M. (2017). Extraction methods, qualitative and quantitative techniques for screening of phytochemicals from plants. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 5(2), 29-32.
- Ebringerová, A., & Hromádková, Z. (2010). An overview on the application of ultrasound in extraction, separation and purification of plant polysaccharides. *Open Chemistry*, 8(2), 243-257. <https://doi.org/10.2478/s11532-010-0006-2>
- Evans, J. J., Pasnik, D. J., Yildirim-Aksoy, M., Lim, C., & Klesius, P. H. (2009). Histologic changes in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, fed diets containing graded levels of gossypol-acetic acid: Histology of catfish fed gossypol. *Aquaculture Nutrition*, 16(4), 385-391. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00676.x>

- Ezeonu, C. S., & Ejikeme, C. M. (2016). Qualitative and Quantitative Determination of Phytochemical Contents of Indigenous Nigerian Softwoods. *New Journal of Science*, 2016, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2016/5601327>
- Filik, L., & Ozyilkan, O. (2003). Olive-oil consumption and cancer risk. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(1), 191-191. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601497>
- Galindo-Contreras. (2022). *Obtención, caracterización fitoquímica de los extractos vegetales de Illicium verum y Brosimum alicastrum y su evaluación hemolítica* [Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/24010/1/1080328578.pdf>
- Garavand, F., & Madadlou, A. (2014). Recovery of phenolic compounds from effluents by a microemulsion liquid membrane (MLM) extractor. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 443, 303-310. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.11.035>
- Garavand, F., Rahaei, S., Vahedikia, N., & Jafari, S. M. (2019). Different techniques for extraction and micro/nanoencapsulation of saffron bioactive ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 89, 26-44. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.005>
- García-Orantes, C., Caballero-Roque, A., & Velázquez-Mendez, M. A. (2012). Aprovechamiento del árbol nativo Brosimum alicastrum Swartz (Moraceae) en la Selva Zoque Chiapas, México. *Lacandonia*, 6(1), 71-82.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., Rahmat, A., & Ashkani, S. (2015). Secondary metabolites constituents and antioxidant, anticancer and antibacterial activities of Etlingera elatior (Jack) R.M.Sm grown in different locations of Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 335. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0838-6>
- Gillespie, A. R., Bocanegra-Ferguson, D. M., & Jimenez-Osornio, J. J. (2004). The propagation of Ramón (Brosimum alicastrum Sw.; Moraceae) in Mayan homegardens of the Yucatan peninsula of Mexico. *New Forests*, 27(1), 25-38. <https://doi.org/10.1023/A:1025081224852>
- Gomes, C. A., Girão da Cruz, T., Andrade, J. L., Milhazes, N., Borges, F., & Marques, M. P. M. (2003). Anticancer Activity of Phenolic Acids of Natural or Synthetic Origin: A Structure–Activity Study. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(25), 5395-5401. <https://doi.org/10.1021/jm030956v>
- Gonzalez Chavarro, C. F., Cabezas Gutiérrez, M., Pulido Blanco, V. C., & Celis Ruiz, X. M. (2020). Amaryllidaceae: Fuente potencial de alcaloides. *Actividades biológicas y*

- farmacológicas. *Ciencia y Agricultura*, 17(3), 78-94.
<https://doi.org/10.19053/01228420.v17.n3.2020.11379>
- González-Aguilar, G. A., Villegas-Ochoa, M. A., Martínez-Téllez, M. A., Gardea, A. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2007). Improving Antioxidant Capacity of Fresh-Cut Mangoes Treated with UV-C. *Journal of Food Science*, 72(3), S197-S202.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00295.x>
- González-López, Á. M., Quiñones-Aguilar, E. E., & Rincón-Enríquez, G. (2016). *ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS TERPENOS EN EL ÁREA AGROALIMENTARIA* (Primera Edición).
- Gutiérrez-Pineda, K. M., & Herrera, M. (2022). Caracterización fitoquímica preliminar de los extractos etanólicos de hoja, fruto verde y maduro de *Terminalia catappa* L. (Almendro) en Panamá. *La Granja*, 36(2). <https://doi.org/10.17163/lgr.n36.2022.01>
- Haslam, E. (1996). Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. *Journal of Natural Products*, 59(2), 205-215.
<https://doi.org/10.1021/np960040+>
- Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2010). Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2495-2511. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.019>
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
- Ismail, H. I., Chan, K. W., Mariod, A. A., & Ismail, M. (2017). Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (cucumis melo) methanolic extracts. *Food Chemistry*, 119(2), 643-647. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.023>
- Jerman, T., Trebše, P., & Mozetič Vodopivec, B. (2010). Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chemistry*, 123(1), 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.006>
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954-3962.
<https://doi.org/10.1021/jf990146l>
- Khanbabaee, K., & van Ree, T. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Natural Product Reports*, 18(6), 641-649. <https://doi.org/10.1039/b101061l>

- Kumagai, Y., Shinkai, Y., Miura, T., & Cho, A. K. (2012). The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52(1), 221-247. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134517>
- Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- Lambert, J. D. H., & Arnason, J. T. (1982). Ramón and Maya Ruins: An Ecological, Not an Economic, Relation. *Science*, 216(4543), 298-299. <https://doi.org/10.1126/science.216.4543.298>
- Larqué-Saavedra, A. (2014). Brosimum alicastrum. Ramón. *CIENCIA ergo-sum, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva*, 49, 6-33.
- Lavault, M., Bruneton, J., Cav , A., Chan, K. C., Deverre, J. R., Sevenet, T., & Guinaudeau, H. (1987). Alcalo ides bisbenzylisoquinol iques de *Albertisia* cf. *A. Papuana*. *Canadian Journal of Chemistry*, 65(2), 343-347. <https://doi.org/10.1139/v87-058>
- Leong, T., Muthupandian, A., & Kentish, S. (2011, agosto). THE FUNDAMENTALS OF POWER ULTRASOUND– A REVIEW. *ACOUSTICS AUSTRALIA*, 39(2), 54-63.
- Les, F., C sedas, G., & López, V. (2021). Bioactivity of Medicinal Plants and Extracts. *Biology*, 10(7), 634. <https://doi.org/10.3390/biology10070634>
- López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>
- Lustre Sánchez, H. (2022). Los superpoderes de las plantas: Los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Revista Digital Universitaria*, 23(2). <https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2022.23.2.10>
- Makri, E. A., & Doxastakis, G. I. (2006). Emulsifying and foaming properties of Phaseolus vulgaris and coccineus proteins. *Food Chemistry*, 98(3), 558-568. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.027>
- Mali ski, M. P., Kikowska, M. A., Soluch, A., Kowalczyk, M., Stochmal, A., & Thiem, B. (2021). Phytochemical Screening, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Biomass from *Lychnis flos-cuculi* L. In Vitro Cultures and Intact Plants. *Plants*, 10(2), 206. <https://doi.org/10.3390/plants10020206>

- Mason, T. J., Cobley, A. J., Graves, J. E., & Morgan, D. (2011). New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1), 226-230. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.05.008>
- Md Salim, N. S. (2017). Potential Utilization of Fruit and Vegetable Wastes for Food through Drying or Extraction Techniques. *Novel Techniques in Nutrition & Food Science*, 1(2). <https://doi.org/10.31031/NTNF.2017.01.000506>
- Meiners, M., Sánchez-Garduño, C., & de Blois, S. (2009). *El ramón: Fruto de nuestra cultura y raíz para la conservación*. 87, 7-10.
- Merkl, R., HRádkoVá, I., Flllp, V., & ŠMldRkal, J. (2010). Antimicrobial and Antioxidant Properties of Phenolic Acids Alkyl Esters. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(4), 257-279.
- Miranda, M., & Cuellar, A. (2002). *Manual de prácticas de laboratorio: Farmacognosia y productos naturales*.
- Moo-Huchin, V. M., Canto-Pinto, J. C., Cuevas-Glory, L. F., Sauri-Duch, E., Pérez-Pacheco, E., & Betancur-Ancona, D. (2019). Effect of extraction solvent on the phenolic compounds content and antioxidant activity of Ramon nut (*Brosimum alicastrum*). *Chemical Papers*, 73(7), 1647-1657. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00716-x>
- Morales Ortiz, E. R., & Herrera Tuz., L. G. (2009). *RAMON (Brosimum alicastrum Swartz.) Protocolo para su Colecta, Beneficio y Almacenaje* (pp. 1-17). Comisión Nacional Forestal. Región XII Península de Yucatán.
- Naikoo, M. I., Dar, M. I., Raghib, F., Jaleel, H., Ahmad, B., Raina, A., Khan, F. A., & Naushin, F. (2019). Role and Regulation of Plants Phenolics in Abiotic Stress Tolerance. En *Plant Signaling Molecules* (pp. 157-168). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00009-5>
- Nawaz, H., Aslam, M., Aslam, H., Mehboob, F., Waheed, R., Jabeen, R., Nawaz, M., & Ahmed, M. Z. (2022). COMPARATIVE EVALUATION OF PHYTOCHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF SOME MEDICINALLY-IMPORTANT EUPHORBIACEOUS PLANTS. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 6. <https://doi.org/10.36899/JAPS.2022.6.0578>
- Nerome, H., Ito, M., Machmudah, S., Wahyudiono, Kanda, H., & Goto, M. (2016). Extraction of phytochemicals from saffron by supercritical carbon dioxide with water and methanol as entrainer. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.10.007>

- Niembro R., A., Vázquez Torres, M., & Sánchez Sánchez, O. (2010). *Árboles de Veracruz: 100 especies para la reforestación estratégica* (1. ed). Gobierno del Estado de Veracruz: Comisión del Estado de Veracruz para la Conmemoración del Bicentenario de la Independencia Nacional y del Centenario de la Revolución Mexicana: Universidad Veracruzana.
- O'Connor, S., & Mander, L. (Eds.). (2010). *Comprehensive natural products II: Chemistry and biology*. Elsevier.
- Oliveira, M. S. de, Oliveira, É. S., Santos, J. V. dos, Costa, N. B. da, Cardoso, D. T., Saboia, C. da S., Ferreira, M. B. C., Teles, A. M., & Mouchrek, A. N. (2022). Estudo do perfil fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante do extrato vegetal de *Syzygium cumini*. *Research, Society and Development*, 11(9), e37911931808. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i9.31808>
- Ortiz, M., Azañón, V., Melgar, M., & Elias, L. (1995). The Corn Tree (*Brosimum alicastrum*): A Food Source for the Tropics. *Plants in Human Nutrition*, 77, 135-146. <https://doi.org/10.1159/000424469>
- Osterloh, A., Ebert, G., Held, W.-H., Schulz, H., & Urban, E. (1997). Handbuch der Lebensmitteltechnologie. Lagerung von Obst und Südfrüchten. 253 Seiten, 83 Farbfotos auf Tafeln, 58 Abbildungen und 55 Tabellen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart 1996. Preis: 128,- DM. *Food / Nahrung*, 41(3), 181-181. <https://doi.org/10.1002/food.19970410315>
- Otles, S. (Ed.). (2016). *Handbook of Food Analysis Instruments* (0 ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420045673>
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Ozer, H. K. (2017). Phenolic compositions and antioxidant activities of Maya nut (*Brosimum alicastrum*): Comparison with commercial nuts. *International Journal of Food Properties*, 20(11), 2772-2781. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1252389>
- Palma, M., Barbero, G., Piñeiro, Z., Liazid, A., Barroso, C., & Rostagno, M. (Eds.). (2013). *Extraction of natural products: Principles and fundamental aspects*. In: Rostagno MA, Prado JM, editors. *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. RSC.

- Pan, G., Yu, G., Zhu, C., & Qiao, J. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS). *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 486-490. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.11.006>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Paniwnyk, L., Cai, H., Albu, S., Mason, T. J., & Cole, R. (2009). The enhancement and scale up of the extraction of anti-oxidants from *Rosmarinus officinalis* using ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(2), 287-292. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2008.06.007>
- Peng, L., Jia, X., Wang, Y., Zhu, H., & Chen, Q. (2010). Ultrasonically Assisted Extraction of Rutin from *Artemisia selengensis* Turcz: Comparison with Conventional Extraction Techniques. *Food Analytical Methods*, 3(3), 261-268. <https://doi.org/10.1007/s12161-009-9113-0>
- Pérez-Martínez, M., Caemmerer, B., De Peña, M. P., Cid, C., & Kroh, L. W. (2010). Influence of Brewing Method and Acidity Regulators on the Antioxidant Capacity of Coffee Brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 2958-2965. <https://doi.org/10.1021/jf9037375>
- Peters, C. M., & Pardo-Tejeda, E. (1982). *Brosimum alicastrum* (Moraceae): Uses and potential in Mexico. *Economic Botany*, 36(2), 166-175. <https://doi.org/10.1007/BF02858712>
- Piazzon, A., Vrhovsek, U., Masuero, D., Mattivi, F., Mandoj, F., & Nardini, M. (2012). Antioxidant Activity of Phenolic Acids and Their Metabolites: Synthesis and Antioxidant Properties of the Sulfate Derivatives of Ferulic and Caffeic Acids and of the Acyl Glucuronide of Ferulic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(50), 12312-12323. <https://doi.org/10.1021/jf304076z>
- Pinzón, ngrid M. del P., Fischer, G., & Corredor, G. (2007). Determination of the maturity stages of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.). *Agronomía Colombiana*, 25(1), 83-95.
- Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K., & Harleen, K. (2011). Phytochemical screening and extraction: A review. *nternationale pharmaceutica sciencia*, 1(1), 98-106.
- Pugalthi, M., Vadive, V., Gurumoorthi, P., & Janardhanan, K. (2004). Comparative nutritional evaluation of little known legumes, *tamarindus indica*, *erythrina indica* and *sesbania bispinosa*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 4(3), 107-123.

- Puleston, D. E., & Puleston, O. (1971). *An Ecological Approach to the Origins of Maya Civilization*. 24(4), 330-337.
- Quintero-Hilario, C. del C., Esparza-Torres, F., Universidad Autónoma Chapingo, García-Mateos, Ma. del R., Universidad Autónoma Chapingo, Ybarra-Moncada, Ma. C., Universidad Autónoma Chapingo, Hernández-Ramos, L., & Universidad Autónoma Chapingo. (2019). Effect of roasting on the nutritional value and antioxidant components of Maya nut (*Brosimum alicastrum*: Moraceae). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 25(3), 199-212. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2019.03.007>
- Raaman, N. (2006). *Phytochemical techniques*. New India Publ. Agency.
- Ramírez-Sánchez, S., Ibáñez-Vázquez, D., Gutiérrez-Peña, M., Ortega-Fuentes, M. S., García-Ponce, L. L., & Larqué-Saavedra, A. (2016). *ALTERNATIVA PARA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA EN MÉXICO*. 10(1), 4.
- Rodrigues, S., Fernandes, F. A. N., de Brito, E. S., Sousa, A. D., & Narain, N. (2015). Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jabuticaba peel. *Industrial Crops and Products*, 69, 400-407. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.059>
- Rojas Avalos, A. S., & Tapia Ramírez, W. E. (2011). "CUANTIFICACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS DE LAS SAPONINAS CONTENIDAS EN EL EPISPERMA DE LA ESPECIE *Chenopodium quinoa* willd «QUINUA» PROCEDENTE DE LA PROVINCIA DE SANTIAGO DE CHUCO - LA LIBERTAD" [UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA]. <https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4689/Rojas%20Avalos%20Ana%20Susana.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rostagno, M., & Prado, J. M. (Eds.). (2022). *Natural product extraction: Principles and applications* (2nd edition). Royal Society of Chemistry.
- Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., & Lobo, M. G. (2018). Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization: Fruit and vegetable waste.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 512-531. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12330>
- Salminen, K. A., Meyer, A., Jerabkova, L., Korhonen, L. E., Rahnasto, M., Juvonen, R. O., Imming, P., & Raunio, H. (2011). Inhibition of human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes by plant isoquinoline alkaloids. *Phytomedicine*, 18(6), 533-538. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.08.012>

- Sánchez Contreras, Ma. D. los Á. (2016). *LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS Y TECNOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN- CAVITACIÓN* (Primera).
- Saura-Calixto, F., & Prez-Jimnez, J. (2009). Tannins: Bioavailability and Mechanisms of Action. En S. Knasmüller, D. M. DeMarini, I. Johnson, & C. Gerhuser (Eds.), *Chemoprevention of Cancer and DNA Damage by Dietary Factors* (pp. 499-508). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527626588.ch29>
- Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., & Gupta, A. (2013). Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 1(6).
- Schäfer, H., & Wink, M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: Progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology Journal*, 4(12), 1684-1703. <https://doi.org/10.1002/biot.200900229>
- Schmidt-Dannert, C. (2015). Biosynthesis of Terpenoid Natural Products in Fungi. En J. Schrader & J. Bohlmann (Eds.), *Biotechnology of Isoprenoids* (Vol. 148, pp. 19-61). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/10_2014_283
- Shahidi, F., & Naczki, M. (2003). *Phenolics in Food and Nutraceuticals* (0 ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203508732>
- Shams, K. A., Abdel-Azim, N., S., Saleh, I. A., Hegazy, M. F., El-Missiry, M. M., Hammouda, F. M., & Tahrir, E. (2015). Green technology: Economically and environmentally innovative methods for extraction of medicinal & aromatic plants (MAP) in Egypt. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(5), 1050-1074.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (Santafé de Bogotá, Colombia : Convenio Andrés Bello : CYTED).
- Sheel, R., Nisha, K., & Kumar, J. (2014). Preliminary Phytochemical Screening of Methanolic Extract Of Clerodendron infortunatum. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 7(1), 10-13.
- Shi, Y.-N., Shi, Y.-M., Yang, L., Li, X.-C., Zhao, J.-H., Qu, Y., Zhu, H.-T., Wang, D., Cheng, R.-R., Yang, C.-R., Xu, M., & Zhang, Y.-J. (2015). Lignans and aromatic glycosides from Piper wallichii and their antithrombotic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 162, 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.038>
- 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: Process Intensification*, 53, 10-23. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.003>

- Sivakumar, V., Ravi Verma, V., Rao, P. G., & Swaminathan, G. (2007). Studies on the use of power ultrasound in solid–liquid myrobalan extraction process. *Journal of Cleaner Production*, 15(18), 1813-1818. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2006.06.006>
- Slater, S., Savelski, Mariano J., Carole, W. A., & Constable, D. J. C. (2010). Solvent Use and Waste Issues. En *Green Chemistry in the Pharmaceutical Industry* (pp. 49-82).
- Soquetta, M. B., Terra, L. de M., & Bastos, C. P. (2018). Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 400-412. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1411978>
- Stefanachi, A., Leonetti, F., Pisani, L., Catto, M., & Carotti, A. (2018). Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. *Molecules*, 23(2), 250. <https://doi.org/10.3390/molecules23020250>
- Subiria-Cueto, R., Larqué-Saavedra, A., Reyes-Vega, M. L., de la Rosa, L. A., Santana-Contreras, L. E., Gaytán-Martínez, M., Vázquez-Flores, A. A., Rodrigo-García, J., Corral-Avitia, A. Y., Núñez-Gastélum, J. A., & Martínez-Ruiz, N. R. (2019). Brosimum alicastrum Sw. (Ramón): An Alternative to Improve the Nutritional Properties and Functional Potential of the Wheat Flour Tortilla. *Foods*, 8(12), 613. <https://doi.org/10.3390/foods8120613>
- Swallah, M. S., Sun, H., Affoh, R., Fu, H., & Yu, H. (2020). Antioxidant Potential Overviews of Secondary Metabolites (Polyphenols) in Fruits. *International Journal of Food Science*, 2020, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2020/9081686>
- Tato- Martínez, M. (2020). *Síntesis de cumarinas sustituidas mediante reacciones de acoplamiento cruzado con organometálicos de indio(III)*. Universidad da Coruña.
- Tholl, D. (2015). Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. En J. Schrader & J. Bohlmann (Eds.), *Biotechnology of Isoprenoids* (Vol. 148, pp. 63-106). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/10_2014_295
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., & Mason, T. J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 137-142. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(00\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00033-X)
- Umezawa, T. (2003). Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, 2(3), 371-390. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000045487.02836.32>
- USDA. (2016). *USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Legacy Release*.
- USDA. (2017). *USDA database for the Proanthocyanidins Content of Selected foods*. <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/80400525/Data/PA/PA.pdf>

- Vernès, L., Vian, M., & Chemat, F. (2020). Ultrasound and Microwave as Green Tools for Solid-Liquid Extraction. En *Liquid-Phase Extraction* (pp. 355-374). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00012-8>
- Xu, Y., Zhang, L., Bailina, Y., Ge, Z., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2014). Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel. *Journal of Food Engineering*, 126, 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.11.004>
- Yolmeh, M., Habibi Najafi, M. B., & Farhoosh, R. (2014). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 155, 319-324. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.059>
- Yu, B., Sun, J., & Yang, X. (2012). Assembly of Naturally Occurring Glycosides, Evolved Tactics, and Glycosylation Methods. *Accounts of Chemical Research*, 45(8), 1227-1236. <https://doi.org/10.1021/ar200296m>
- Zadernowski, R., Czaplicki, S., & Naczek, M. (2009). Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry*, 112(3), 685-689. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.030>