BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN BELLOTA (*Quercus rugosa*)

Tesis que para obtener el título de:

Licenciado en Biotecnología

Presenta:

Erick Odín González Helguera

Director de tesis:

Dra. Ma. Guadalupe Hernández Linares

Codirector:

Dra. Maricela Rodríguez Acosta

Agosto de 2021

ÍNDICE

RESUMEN **1**

INDICE DE FIGURAS **2**

INDICE DE TABLAS **1**

INTRODUCCIÓN **2**

MARCO TEÓRICO **6**

ESPECIE DE ENCINO: *QUERCUS RUGOSA* 6

BELLOTA: QUERCUS RUGOSA 9

MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE REACCIÓN A RADICALES LIBRES 12

COMPUESTOS FENÓLICOS 16

CLASIFICACIÓN DE FLAVONOIDES 19

CAROTENOIDES. 20

ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ORGANISMO HUMANO 21

ESPECIES RADICALARIAS: FUNCIÓN Y DIVERSIDAD 24

DAÑOS INTRACELULARES DEL ESTRÉS OXIDATIVO 25

ESTRÉS OXIDATIVO Y LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES 28

ESTRÉS OXIDATIVO Y LA DIABETES TIPO 2: 29

ESTRÉS OXIDATIVO Y EL CANCER: 29

ANTIOXIDANTES: ENZIMAS Y METABOLITOS 31

TECNOLOGÍAS RECURRENTES EN LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS DE INTERÉS 33

EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO. 33

EXTRACCIÓN POR MICROONDAS (MW). 37

TECNICAS RECURRENTES PARA AISLAMIENTO DE SUSTANCIAS FITOQUÍMICAS. 39

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA 39

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (CCF) 41

JUSTIFICACIÓN **46**

OBJETIVOS **47**

DESARROLLO EXPERIMENTAL 48

EQUIPOS 48

MATERIALES Y REACTIVOS 50

METODOLOGIA Y PROCEDIMIENTO GENERAL 51

RECOLECCIÓN DE MATERIA PRIMA VEGETAL 51

RECUPERACIÓN DE COTILEDONES EN RELACIÓN CON EL PESO FRESCO 51

ALMACENAMIENTO DE MATERIAL VEGETAL 52

PESADO Y TRITURADO 52

PRUEBAS DE SOLUBILIDAD 54

SELECCIÓN DE SISTEMA PARA PURIFICAR POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA 55

EMPACAMIENTO PARA EXTRACCIÓN CON METODOLOGÍA SOXHLET 56

EXTRACCIÓN MÉTODO SOXHLET 56

PURIFICACIÓN DE SUSTANCIAS POR COLUMNA CROMATOGRÁFICA TIPO FLASH 58

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PREPARATIVA 61

EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL POR MICROONDAS 62

DETERMINACIÓN DE DENSIDAD Y PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN 63

RELACIÓN DE CONSTANTE DIELÉCTRICA Y PORCENTAJE DE EXTRACTO EN EQUIPO SOXHLET 64

METODOLOGÍAS ESPECTROSCÓPICAS: CUALITATIVAS Y CUANTITATIVAS. 65

ELUCIDACION ESPECTROSCOPICA POR RMN 65

DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES POR REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU 66

CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA DPPH 67

DETERMINACIÓN DE GRUPOS FLAVONOIDES POR REACCION DE SHINODA Y H_2SO_4 72

DISCUSION DE RESULTADOS 74

RECUPERACIÓN DE SUSTRATO (INTERIOR) EN RELACIÓN CON EL PESO FRESCO 74

PRUEBAS DE SOLUBILIDAD 75

SELECCIÓN DEL SISTEMA PARA PURIFICAR POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA 77

EXTRACCIÓN EN SOXHLET (ALCOHOL ETÍLICO) 77

PURIFICACIÓN DE SUSTANCIAS POR COLUMNA CROMATOGRÁFICA 78

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PREPARATIVA 79

RELACIÓN DE CONSTANTE DIELÉCTRICA Y PORCENTAJE DE EXTRACTO EN EQUIPO SOXHLET 81

IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS POR RMN. 82
DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES POR REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU 92
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR METODOLOGÍA DE DPPH 96
DETERMINACIÓN DE GRUPOS FLAVANOIDES POR SHINODA Y H_2SO_4 100

CONCLUSIONES 102

GLOSARIO 103

RESUMEN

La investigación y uso de plantas con principios bioactivos constituye para la industria farmacológica, alternativas sostenibles y efectivas para tratar múltiples enfermedades como el cáncer. Actualmente los diferentes tratamientos que se emplean para esta enfermedad son poco efectivos y altamente citotóxicos. Durante un largo tiempo, el Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla ha realizado esfuerzos para investigar cientos de especies nativas vegetales en la región del valle de Puebla, con el fin de reportar sus usos etnobotánicos, compuestos activos químicos predominantes y elucidar los mecanismos bioquímicos por los cuales interactúan directa e indirectamente sobre el organismo humano, de manera que se cuente con un catálogo especifico y confiable acerca de cada una de las especies vegetales. Lo anterior con el propósito de generar información confiable útil para los investigadores en este campo de la biotecnología y para la sociedad en general.

Dentro de estas especies se encuentra *Quercus rugosa,* un árbol perteneciente a los bosques de encinos que constituyen una parte importante de la flora del valle de Puebla. Esta especie contiene características particulares en la pigmentación de sus bellotas lo que lo diferencia de las otras especies de encinos. Dentro de los usos etnobotánicos generales de los encinos se encuentran la preparación de infusiones y la creación de ungüentos con propiedades desinflamatorias; en la literatura dichas características junto con las propiedades organolépticas observadas, clasifican dentro de las biomoléculas llamadas “flavonoides” las responsables de la actividad antiinflamatoria. A lo largo de este trabajo se presenta un amplio marco teórico que abarca desde los recursos maderables, los compuestos antioxidantes presentes en plantas, estrés oxidativo, su relación con los procesos bioquímicos en el organismo humano enfocado a distintos padecimientos. Se discuten los resultados obtenidos en la extracción y purificación de fitoquímicos presentes en las bellotas, su análisis cualitativo por CCF y su elucidación espectroscópica. Finalmente se reporta la determinación de su potencial antioxidante que es posible relacionar a la actividad antiinflamatoria.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Hojas de Quercus rugosa. 2

Figura 2 Flavonoides, a) Con sacáridos, b) libres. 5

Figura 3 Espécimen de Quercus rugosa. .....

Figura 4 Corteza de encino Quercus rugosa. .....

Figura 5 Bellotas del encino Quercus rugosa .....

Figura 6 Partes de la bellota para este estudio, 1) Pericarpio, 2) Tegumento, 3) Endospermo 10

Figura 7 Bellotas de Quercus rugosa .....

Figura 8 Especies químicas donadoras de sustituyentes (antioxidantes) 13

Figura 9 Sitios de unión para metales de transición en flavonoides. .....

Figura 10 Radicalización de lípidos membranales polinsaturados. .....

Figura 11 Reacción antioxidante del polifenol Alpha-Tocoferol .....

Figura 12 Estructura química de los flavonoides. 16

Figura 13 Estructura química de las flavonas, isoflavonas flavonoles, flavanoles, flavanonas y antocioanidinas. 18

Figura 14 Estructura química de los principales carotenoides encontrados en una dieta común. 21

Figura 15 Esquema de Homeostasis redox. 22

Figura 16 Ejemplo de activación de una vía de trascripción por condiciones de oxido-reducción. 23

Figura 17 Algunas especies de oxígeno presentes en diversas funciones propias del organismo humano. . 24

Figura 18 Sistema de los deshechos y subproductos de algunas reacciones enzimáticas . .....

Figura 19 Esquema del equilibro de la homeostasis oxido reductiva del organismo. 27

Figura 20 Procesos enzimáticos y antioxidantes en una célula humana. .....

Figura 21 Mecanismos de transferencia energética por microondas (Gaviria Pérez, 2019) 37

Figura 22 Diferencia entre calentamiento por convección y por MW. 38

Figura 23 Elución de los componentes de una mezcla. 40

Figura 24 Columna Cromatográfica. 40

Figura 25 Aplicación de la muestra y desarrollo de la placa de CCF. 42

Figura 26 Determinación de Rf de dos compuestos A y B. 43

Figura 27 Separación de dos componentes A y B de una mezcla. 44

Figura 28 Comprobación de la no igualdad de dos compuestos A y B. 44

Figura 29 Evolución de una reacción entre dos compuestos A y B (reactivos) 45

Figura 30 Análisis de las fracciones (1, 2,3...8) de una Cromatografía en Columna 45

Figura 31 Diagrama de flujo experimental. 48

Figura 32 Representación gráfica del espectrofotómetro.
Figura 33 Resonancia Magnética Nuclear Bruker de 500 MHz. 49
Figura 34 Representación gráfica del microondas focalizado. 49
Figura 35 Muestra representativa de las bellotas recolectadas.
Figura 36 Bellotas sin cascara. 52
Figura 38 Mortero con material vegetal de las bellotas triturado. 53
Figura 39 Se realizaron las pruebas de solubilidad en una gradilla con tubos de ensayo. 54
Figura 40 sistema de extracción por método soxhlet.
Figura 41 Sistema rotavapor
Figura 42 Diagrama de flujo del proceso de adición del extracto del soxhlet al gel de sílice.
Figura 43 Evaporación del disolvente restante y secado del gel de sílice por medio de un equipo rotavapor.
Figura 44 A la columna se le hace pasar hexano (disolvente no polar) para ayudar a eluír la muestra. 59
Figura 45 Gradilla donde se recolectó las fracciones de la cromatografía en columna. 60
Figura 46 Placa de cromatografía dentro de la cuba cromatográfica.
Figura 47 Diagrama del proceso realizado con cada uno de los analitos obtenidos.
Figura 48 Equipo de extracción asistida por microondas Microwave Síntesis Reactor – Monowave 300 63
Figura 49 Dilución de los extractos. 64
Figura 50 Pesos indispensables para conocer el peso del extracto. 64
Figura 51 mecanismo de la reacción de Folin-Ciocalteu. 66
Figura 52 Preparación de gradilla para Folin-Ciocalteu. 67
Figura 53 Radical libre DPPH 68
Figura 54 reacción principal donde AH es un antioxidante que dona los átomos de hidrógeno lo que da como resultados radicales con estructuras moleculares relativamente estables 68
Figura 55 vemos los 3 tipos de reacciones llevada a cabo en esta metodología. 68
Figura 56 disposición para el ensayo en la placa de 96 pozos 69
Figura 57 procedimiento de dilución de las columnas 70
Figura 58 volúmenes estimados en la placa de 96 pozos, expresados en uL 70
Figura 59 sombrado en azul los pozos a los cuales se les añade 100 uL del reactivo DPPH 71
Figura 60 volúmenes totales de cada pozo. 71
Figura 61 Tubos de ensaye de pruebas de solubilidad.
Figura 62 Tubos de ensaye de las pruebas de solubilidad.
Figura 63 resultados de la CCF
Figura 64 Las placas se revelaban siempre a luz UV.
Figura 65 extracto total de la columna.
Figura 66 Placa de CCF de compuestos “aislados” que se foto-degradan.

Figura 67 El resultado de la cromatografía en capa fina preparativa .....
Figura 68 recuperación de todos los analitos separados.....
Figura 69 Analitos puros.....
Figura 70 Como se puede observar en la placa se muestra como algunas muestras se descompusieron.....
Figura 71 Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en $CDCl_3$ del extracto de éter etílico. .....
Figura 72 Espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ del extracto de éter etílico. .....
Figura 73 Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en $CDCl_3$ del extracto de hexano. .....
Figura 74 Espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ del extracto de hexano. .....
Figura 75 Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en $CDCl_3$ del extracto de acetato de etilo. .....
Figura 76 Espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ del extracto de acetato de etilo. .....
Figura 77 Espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ del extracto de etanol.....
Figura 78 Espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ del extracto de metanol.....
Figura 79 Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en $CDCl_3$ del extracto de metanol.....85
Figura 80 Espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ del extracto de H_2O.....
Figura 81 Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en $CDCl_3$ del extracto de H_2O.....
Figura 82 vial del equipo de extracción por microondas con la muestra en sólido al fondo.....88
Figura 83 . Gráfica de microondas en la obtención del extracto de las bellotas de Q. rugosa 90
Figura 84 resultados absorbancias de curva de calibración 92
Figura 85 Curva de calibración logarítmica de ácido gálico.....92
Figura 86 Polifenoles totales equivalentes a miligramo de ácido gálico. 95
Figura 87 Placa de 96 pozos donde se realizó el ensayo de capacidad antioxidante por radical DPPH.....96
Figura 88 resultados de las absorbancias del experimento a 515 nm. 96
Figura 89 Promedios de las absorbancias y concentración de extracto 2.....97
Figura 90 Gráfica de absorbancia del "ruido". 97
Figura 91 Absorbancia neta del experimento. 98
Figura 92 Curva de inhibición del radical DPPH 99
Figura 93 Resultado del ensayo de Shinoda .....
Figura 94 Resultado del ensayo de H_2SO_4.....

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Contenido de componentes bioquímicos y minerales en las bellotas de la familia "Fagaceae"..... 11
Tabla 2 Extracciones para material vegetal y sus características. 35
Tabla 3 Extracciones para material vegetal y sus características. 36
Tabla 4 promedio de dimensiones de las bellotas 74
Tabla 5 Pesos de bellotas 74
Tabla 6 Relación peso de extracto-constante dieléctrica del disolvente. 81
Tabla 7 Densidad de Extractos y porcentaje de extracción. 91
Tabla 8 correlación concentración/Absorbancia de extracto 1. 93
Tabla 9 correlación concentración/Absorbancia de extracto 2. 93
Tabla 10 Resultados de folin-ciocalteu 94
Tabla 11 Tabla donde se sustrajo absorbancia del ruido de la absorbancia total..... 99
Tabla 13 Resultados del ensayo de H_2SO_4. 101
Tabla 12 Resultados de ensayo de Shinoda. 101

INTRODUCCIÓN

Dentro de las especies vegetales nativas de México y de la región poblana, surgen diversos exponentes en el ámbito de la fitoquímica como sustancias con uso tanto medicinal como alimenticio; varios reportes de investigaciones del Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla señalaron puntualmente diversas particularidades en algunas especies de Quercus, entre las cuales el encino *Quercus rugosa*, presenta en el interior de su bellota un color rojo violeta, pigmento generado principalmente por la presencia de antocianinas, pigmentos de naturaleza flavonoide.

*Figura 1 Hojas de **Quercus rugosa**. Árbol del Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.*

El enriquecimiento del conocimiento general de los recursos naturales que existen en nuestro país es una labor con gran valor cultural, la implicación de algunas propiedades puede resultar interesante para diversos ámbitos en el desarrollo de ciencia y tecnología. Un ejemplo destacable es la mundialmente famosa piel de nopal, elaborada con proteína de nopal en nuestro país, esta piel de uso textil fue galardonada a nivel mundial por LVMH, MONTE-CARLO FASHION WEEK y Material ConeXion por representar un producto que no solo posee alta calidad textil, sino también representa una alternativa ecológica y amigable con especies animales, obteniendo certificados de organismos como DAkkS, OEKO-TEX, PETA, USDA ORGANIC. Para su elaboración los productores solo han destacado lo más indispensable por cuestiones comerciales, la cual consta de principalmente un triturado del nopal, el procesamiento de las mezclas de extractos proteínicos junto con algodón y la tinción de la mezcla, posteriormente se realizan los acabados a los rollos de piel, tratamiento químico y secado, esto por obvias razones comerciales no está detallado y solo se puede encontrar en su sitio de internet: https://desserto.com.mx/desserto.

Existe una fuerte demanda para desarrollar nuevos productos de origen natural que contengan propiedades terapéuticas destacables, que apoyen en el tratamiento de diversos padecimientos y sus complicaciones; en muchos de los fármacos convencionales aplicados hasta la actualidad comienza a desarrollarse tolerancia por parte de los patógenos, esto ocasiona que se requieran dosis cada vez más altas para alcanzar el efecto farmacológico y controlar padecimientos comunes, así se promueve la resistencia microbiana y la toxicidad medicamentosa como efecto secundario en el organismo sobremedicado. (Gamboa-Gómez, 2017)

En la actualidad tenemos una extensa selección de plantas mexicanas señaladas por diversos proyectos de investigación que resumen las propiedades químicas, farmacológicas y antropológicas. Entre estos se pueden mencionar efectos antiespasmódicos, antisecretores, inhibidores selectivos de factores como el nf-kb implicado en los procesos celulares inflamatorios, entre otros. (Heinrich, 2005)

Las plantas y los hongos han desarrollado la capacidad de producir sustancias que no le son esenciales para sobrevivir llamados metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios son compuestos los cuales se derivan del metabolismo primario, no obstante, son de limitada distribución en el reino de las plantas que se restringe a un grupo taxonómico particular, las plantas superiores. (Anaya Lang & Espinosa García, 2006)

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular con diferente bioactividad, se producen como una defensa química ante las heridas y ataque de microorganismos patógenos o depredadores, dichos metabolitos actúan matando o restringiendo la invasión al resto de la planta. (Sepúlveda-Jiménez, 2005). Los análisis para la determinación de presencia de estas sustancias en organismos vegetales son el objetivo de la fitoquímica. (Martinez, 2005)

En los últimos años más del 25% de los medicamentos utilizados provienen de las plantas y otro 25% son derivados de productos naturales que posteriormente son químicamente modificados (Amin, 2009). Existe un gran interés en la investigación y el uso de plantas como posibles tratamientos, ya que sólo se ha realizado bioprospección de compuestos bioactivos en 5% al 15% de las 250,000 plantas de uso medicinal registradas (Amin, 2009). En los últimos años, esta bioprospección ha crecido y ha favorecido la demanda de farmacéuticos que provengan de plantas, a partir de la obtención de sustancias bioactivas de origen natural y/o por procesos de síntesis química. En la actualidad Estados Unidos de América cuenta con un registro de 175 medicamentos, los cuales son utilizados en contra del cáncer y de estos el 75% son de origen natural (Cheuka, 2017). Además del uso terapéutico de estas sustancias, también hay una búsqueda por sustancias que puedan ser útiles como conservadores de origen natural, que gracias a sus propiedades ayuden a retrasar la descomposición de alimentos empacados ya sea retrasando su oxidación o la proliferación de bacterias. (Ramos, 2019)

La literatura e investigación que está disponible acerca de los flavonoides es muy amplia, este grupo se caracteriza por tener cada vez más específicas funciones, por lo cual el simple hecho de comprobar su presencia despliega una amplia serie de posibilidades de aplicaciones e investigación. (Gamboa-Gómez, 2017)

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que se encuentran comúnmente en frutas,

vegetales, nueces y granos; se pueden encontrar en forma libre o unidos a azúcares formando heterósidos; poseen diversas propiedades benéficas para la salud del ser humano, tales como actividad anticancerígena, antiinflamatoria, antiviral, antialérgica, protección contra enfermedades del corazón, además de propiedades antioxidantes (Martínez-Valverde, 2000). (Ortega Ramírez, 2017)

Incluso algunos investigadores reportaron el rol que desempeñan los flavonoides en algunos receptores de células gliales para facilitar la diferenciación celular, esto con la esperanza de ser efectores positivos en algunas enfermedades neuronales, por ejemplo, Alzheimer. (Espargaró, 2017)

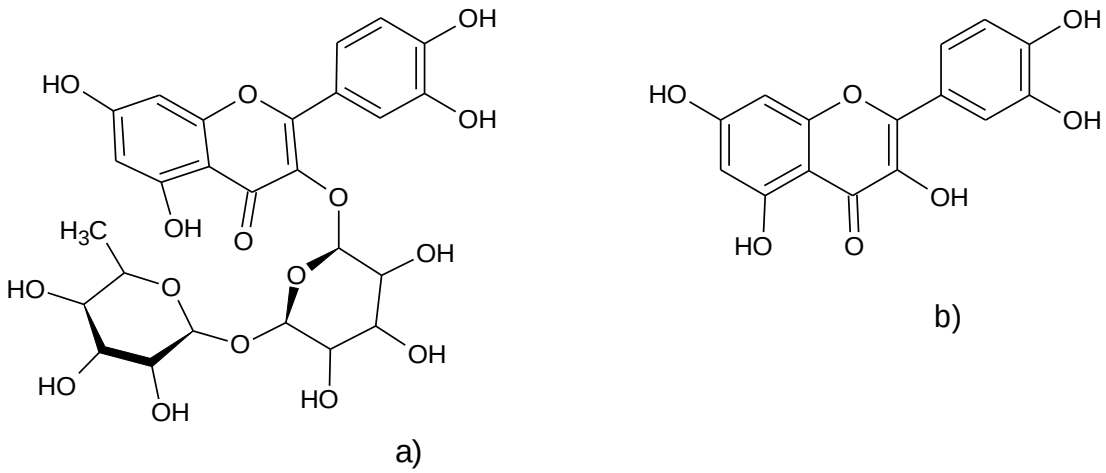


Figura 2 Flavonoides, a) Con sacáridos, b) libres.

Los flavonoides también tienen un gran interés en la industria alimenticia por sus características antioxidantes que sirven de conservadores, comúnmente se les obtienen de cítricos, principalmente de la cáscara de estos frutos, los tres tipos de flavonoides presentes son: flavanonas, flavonas y flavonoles. Al ser compuestos que se consumen como alimentos, continuamente se buscan fuentes naturales alternativas de estos compuestos antioxidantes; en base a los antecedentes y el potencial evaluado, estudiar la Bellota de la especie *Quercus rugosa* y sus propiedades permitirá conocer de manera más precisa su campo de oportunidad como agente alimenticio y/o antioxidante, que puede desempeñar un rol en diversas áreas.

MARCO TEÓRICO

ESPECIE DE ENCINO: *Quercus rugosa*

Ésta especie pertenece al subgénero Leucobalanus o encinos blancos y es muy abundante en} los bosques de encino en México. La forma del árbol es perennifolio o caducifolio de 3 a 25 m de altura, diámetro de 10 a 80 cm, sus hojas son ovadas a elíptico-obovadas o casi suborbicular, de 4 a 15cm de largo, por 3 a 8cm de ancho, al madurar suavemente engrosadas y rígidas, notablemente cóncavas por el envés, muy rugosas; haz lustroso y glabro, envés de color ámbar o rojizo (Bonfil C. , 2006). (Bonfil C. , 1998)

Poseen amentos masculinos de 3 a 7 cm de largo con muchas flores, tomentosos, periantos sésiles; flores femeninas de 5 a 30, distribuidas a lo largo de un pedúnculo largo, delgado y pubescente. (Bonfil C. , 1998)

La corteza escamosa de color café grisáceo, la semilla es una bellota ovoide de 3 a 5cm de largo por 1 a 2cm de diámetro, angosta y puntiaguda, se encuentra envuelta por una cubierta rígida lisa. El embrión está formado en su mayor parte por los cotiledones que se mantienen turgentes dentro del pericarpio y constituye una alta proporción del total del peso seco de la semilla (53 a 75 %) (Chávez, 1998) (Pérez Mojica, 2017) (Bonfil C. , 1998)

*Figura 3 Espécimen de **Quercus rugosa**. Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.*

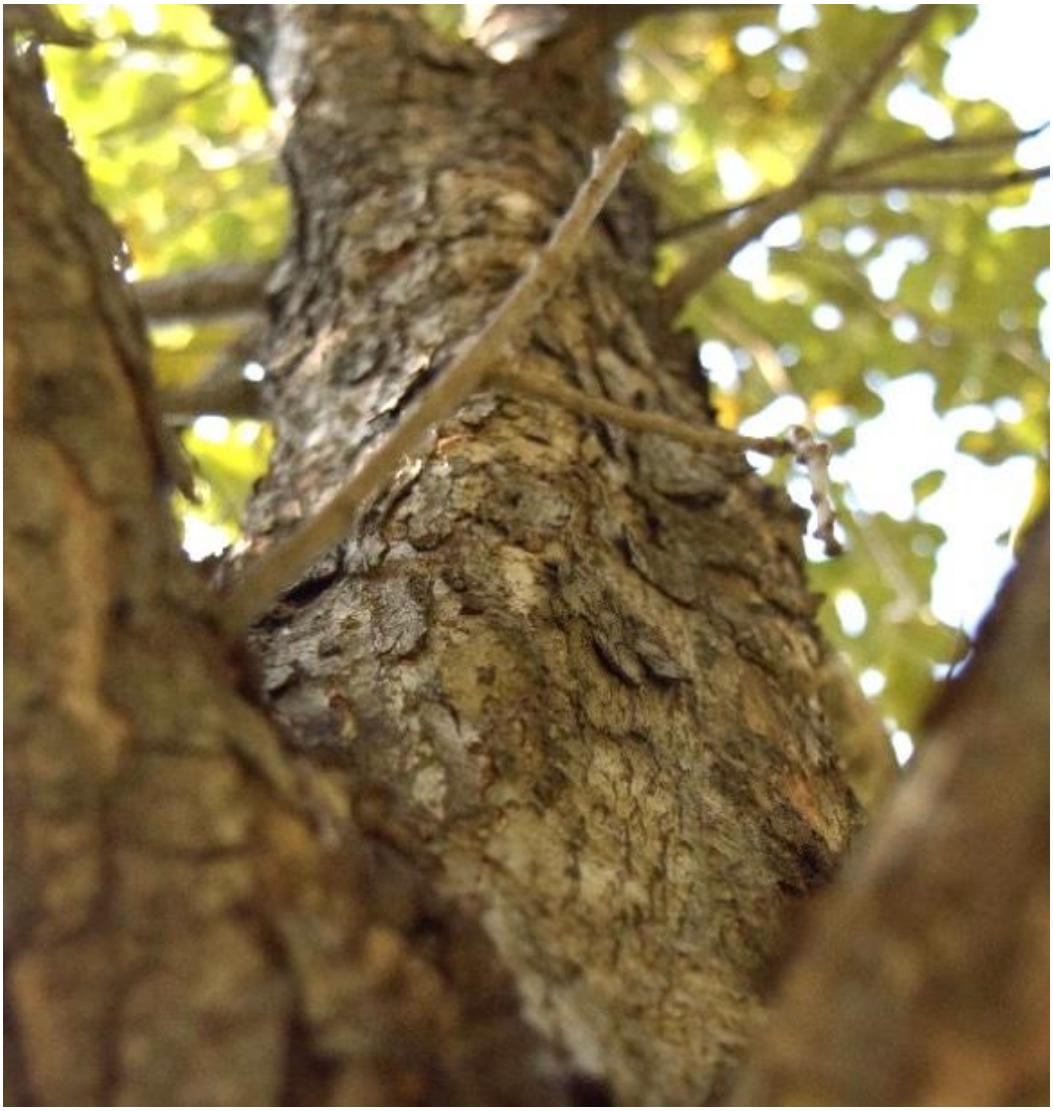


Figura 4 Corteza de encino ***Quercus rugosa.*** *Árbol en el Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.*

BELLOTA: Quercus rugosa

Figura 5 Bellotas del encino Quercus rugosa, espécimen de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Es el fruto característico de las especies del género *Quercus* son principal alimento para ardillas y algunos animales montañeses como las cabras; su morfología cambia según su especie, presentan distintas formas y colores. El uso que se le ha dado es en la elaboración de harinas para la producción de pan, algunos asentamientos montañeses en la península Ibérica se alimentaban de ellas durante dos tercios del año.

Nutrimentalmente las bellotas son comparadas con los cereales, con una extensa fuente de carbohidratos, grasas y fibra, las bellotas pueden contener cantidades importantes de proteínas, aminoácidos y vitaminas, la mayoría A y C; se ha comprobado las propiedades antioxidantes de las bellotas, atribuyendo concentraciones de ácido tánico.

A pesar de que las bellotas que producen los encinos no son nutricionalmente tan ricas como lo son algunas otras nueces comunes, su aceite presenta algunas características bastante remarcables e interesante para el ámbito industrial, conformado por un alto contenido de ácidos oleicos y linoleicos primordialmente, con una media entre el 35 - 65% y 24 – 50% respectivamente (Özcan, 2007), que, en conjunto con su estabilidad oxidativa principalmente dada por la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides y taninos presenta propiedades similares que el aceite de oliva. (Rakić, 2007)

Entender la anatomía vegetal de las bellotas nos acercará al reconocimiento de las partes más importantes al realizar la determinación y el origen de sus metabolitos. (Vinha, 2016)

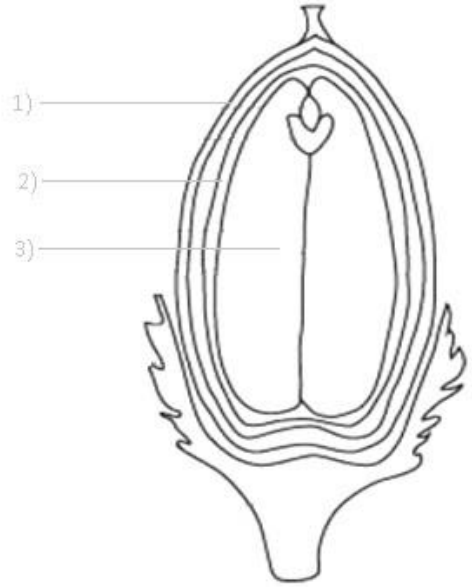


Figura 6 Partes elementales de la bellota para este estudio, 1) Pericarpio, 2) Tegumento, 3) Endospermo

Los niveles de compuestos bioactivos varían según la parte de la bellota; cómo se ha demostrado en diversas investigaciones, los compuestos bioactivos de las avellanas se concentran en mayor medida en su cáscara y no en el endospermo, esto claramente repercute en su capacidad antioxidante debido a los taninos que se contienen. (Vinha, 2016)

Componente	contenido	Componente	Contenido
Vitamina A	39 IU	Vitamina C	0 mg
Calcio	41 mg	Hierro	0.8 mg
Vitamina B6	0.5 mg	Vitamina B sub-12	0 µg
Magnesio	62 mg	Proteína	6 g
Calorías	387	Lípido	24 g
Sodio	0 mg	Colesterol	0 mg
Glúcido	41 g	Potasio	539 mg
Ácido graso saturado	3.1 g	Ácido graso poliinsaturado	4.6 g
Ácido graso monoinsaturado	15 g		

Tabla 1 Contenido de componentes bioquímicos y minerales en 100 g de las bellotas de la familia "Fagaceae". (USDA-2019)

Figura 7 Bellotas de Quercus rugosa en el Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

En base a las características generales de la bellota y su disposición en las especies del género Quercus, *Quercus rugosa*, se puede considerar como una fuente natural de antioxidantes disponibles sin la necesidad de ser procesada, no existe un antecedente que advierta sobre su consumo o algún metabolito secundario que participe en efectos secundarios al ser consumida en humanos en cantidades considerablemente moderadas.

Esto es una ventana de oportunidad muy interesante que vale la pena resaltar y explorar, en otras palabras, puede integrarse en cualquier proceso alimenticio e incluso de salud, higiene y mantenimiento corporal sin ser nocivo para el organismo humano.

MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE REACCIÓN A RADICALES LIBRES

Como su nombre lo indica, los compuestos antioxidantes se generan para combatir la oxidación, la cual es causada por factores ambientales, Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido (Finkel, 2000)

Sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye las células. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones, los que son captados por los radicales libres. (Abeysinghe, 2007) (Finkel, 2000)

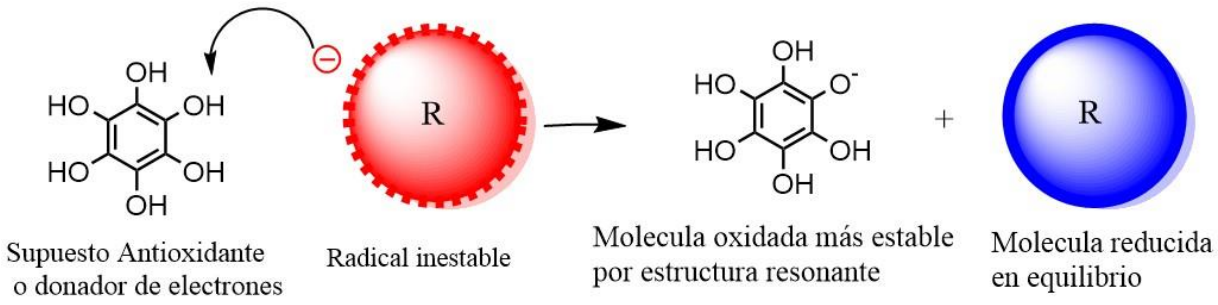


Figura 8 Especies químicas donadoras de sustituyentes (antioxidantes) ceden un grupo, electrón o protón al radical libre para formar una molécula con mayor estabilidad.

De manera natural en la mitocondria de las células vegetales se producen especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno que son subproductos derivados de las reacciones que se llevan a cabo por la fotosíntesis y la respiración celular, así como también las producen en condiciones de estrés; sin embargo, como respuesta a la acumulación excesiva de los radicales se activan proteínas reguladoras que pueden inducir una muerte celular programada, a grandes rasgos, uno de los mecanismos para producir cierta resistencia a los ambientes moderadamente estresantes las plantas poseen su propio sistema de defensa antioxidante. (Al-Gubory, 2018)

Los sistemas de defensa de los organismos vegetales cubren un amplio espectro de amenazas y está constituido por diversos mecanismos moleculares que desembocan en la producción de metabolitos secundarios, son fitoquímicos con bajo peso molecular no enzimáticos, entre ellos las vitaminas como el tocoferol y el ascorbato (vitamina E y C respectivamente), beta-carotenoides, compuestos polifenólicos y glutatión. (Madhujith, 2007)

Los metabolitos secundarios entran en función contra amenazas que estresan a los organismos vegetales, la radiación ultravioleta, temperatura, salinidad del suelo y sequía, por otro lado, factores como el clima, las estaciones del año, calidad de sustrato, el grado de madurez del organismo y las prácticas de agricultura tienen una gran influencia en la calidad de los antioxidantes generados por los organismos vegetales. (Al-Gubory, 2018)

Estos operan a través de mecanismos como: unión a metales pesados, captación del oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de UV, etc. (Alessandra Bocco, 1998)

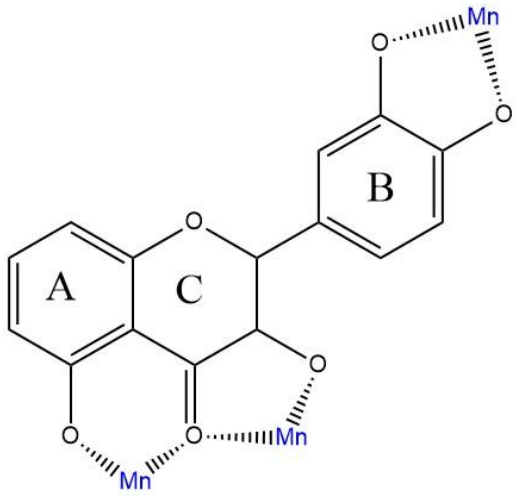


Figura 9 Sitios de unión para metales de transición en flavonoides.

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades REDOX de sus grupos hidroxilo y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química, constando así cada polifenol con actividad antioxidante específica, sin embargo, en su estado nativo en frutas, la capacidad antioxidante no está dada simplemente por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, sino también por la interacción entre ellos, lo que puede producir efectos sinérgicos o antagónicos. (Abeysinghe, 2007)

Estos antirradicales actúan principalmente en reacciones de terminación de cadenas de radicales libres. Impidiendo la oxidación de lípidos y otras moléculas cediendo átomos de hidrógeno de forma que se neutralizan los radicales libres. Como se observa en la siguiente figura, un carbono de la cadena de un ácido graso poliinsaturado es atacado por una especie reactiva de oxígeno, formándose un radical peroxi. La propagación del radical peroxi (ROO•) ataca a otras moléculas de lípidos. Las reacciones en cadena de los radicales libres son interrumpidas por la interacción de estos con otros radicales que al conjugarse adquieren una gran estabilidad que los vuelve poco reactivos, estos se conocen

como antioxidantes, el compuesto es α-tocoferol, originando productos poco reactivos. Cabe mencionar que las reacciones de las especies reactivas de oxígeno son catalizadas por metales pesados y que algunos otros antioxidantes actúan como agentes quelantes que inhiben estas reacciones.

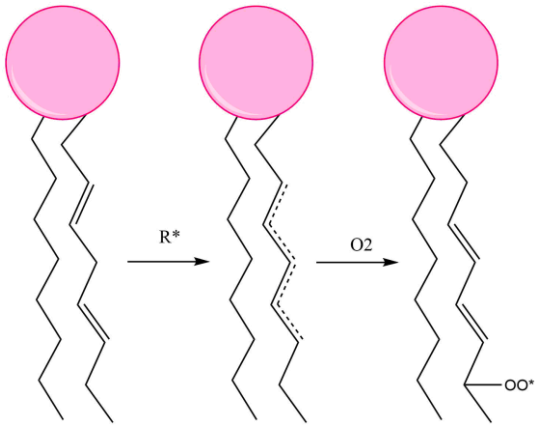


Figura 10 Radicalización de lípidos membranales polinsaturados.

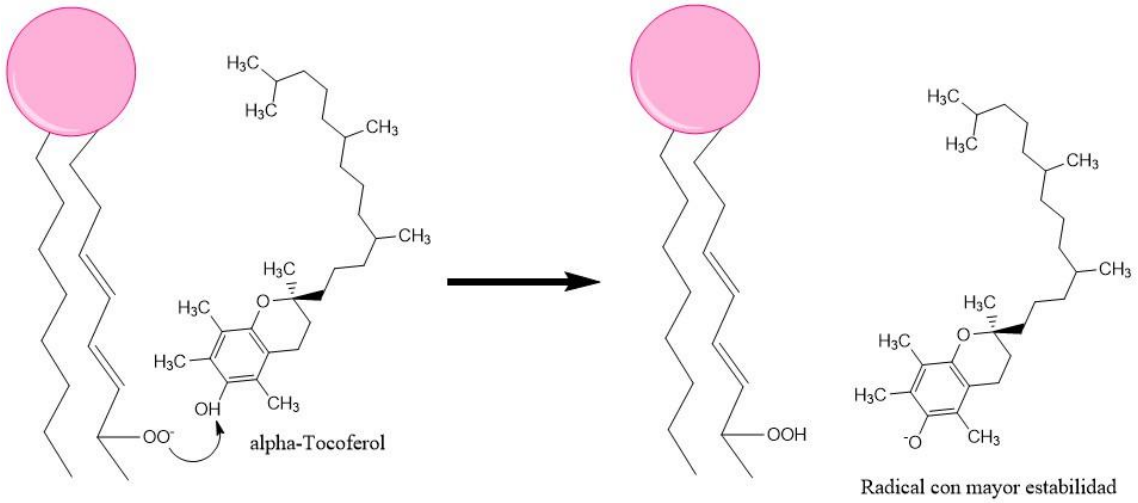


Figura 11 Reacción antioxidante del polifenol Alpha-Tocoferol en la oxidación de los lípidos membranales poliinsaturados.

COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son sustancias que poseen por lo menos un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, incluyendo derivados funcionales (ésteres, glucósidos) (M. St-Onge, 2005). Éstos son en su mayoría metabolitos secundarios de las plantas que les confieren cualidades tanto deseables como indeseables, efectúan un papel importante en el color, cualidades sensoriales y nutricias, así como en las propiedades antioxidantes de los alimentos, no están presentes en alimentos provenientes de animales. Estos compuestos consisten en dos grupos: flavonoides y ácidos cinámicos, de los cuales, los flavonoides son el grupo más importante. (M. St-Onge, 2005)

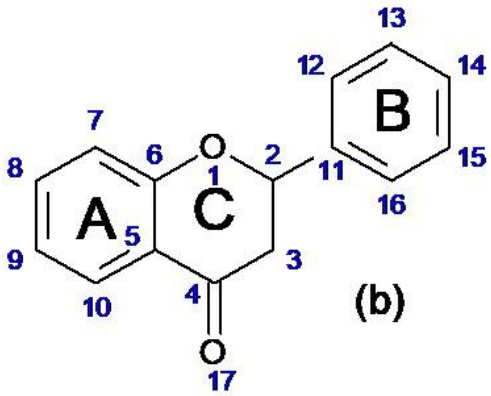


Figura 12 Estructura química de los flavonoides.

Algunos de los efectos de los polifenoles en la calidad de los alimentos son los siguientes:

1) Causan astringencia indeseable en algunas frutas y deseables astringencias en sidras y vinos.
2) En el desarrollo del color final, sabor y aroma en productos como cocoa, en donde la condensación de los productos de las catequinas juega un papel importante.
3) La formación de precipitados en jugos de manzana, cervezas y vinos se atribuye a la interacción de proteínas y polímeros fenólicos.
4) El desarrollo de decoloración café debido a la oxidación de sustancias fenólicas mediante enzimas polifenol-oxidasas.
5) La formación de compuestos oscuros con el hierro debido a la acción secuestrante

de los fenoles dihidroxílicos y trihidroxílicos, lo que resulta en una apariencia indeseable en alimentos enlatados. (M. St-Onge, 2005)

La naturaleza química de los flavonoides depende de la clase estructural, del grado de hidroxilación, de los sustituyentes que contenga, y del grado de polimerización (Martínez-Valverde, 2000) (Danila Di Majo, 2005), estos son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranosa (C6-C3-C6), formando por quince carbonos distribuidos en tres anillos: dos anillos bencénicos de 6 carbonos (a y B), conectados mediante un anillo heterocíclico C que puede ser pirano o pirona (si tiene un doble enlace en la posición 4). La identificación, cuantificación y extracción de los flavonoides ha despertado un gran interés debido a que se ha encontrado que poseen propiedades benéficas para la salud del ser humano, tales como actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antivirales, antialérgicas, protección contra enfermedades del corazón y propiedades antioxidantes que retardan los cambios oxidativos en los alimentos, mejorando así la calidad y el valor nutricional de estos. Todos estos efectos en la salud los hacen idóneos para incorporarlos a productos alimenticios (internacional Patente nº 9916167, 1999). (Benavente-García, 1997)

En plantas se han descrito más de 5000 flavonoides naturales y en función de su estructura química se han clasificado en 6 grupos. Se incluyen: antocianinas, pigmentos responsables de los colores rojos y azules de las frutas, jugos de frutos, vinos y flores; las catequinas, las flavanonas y flavanonas glucosídicas encontradas en cítricos y en la miel; y las flavanonas, flavonoles y flavonol glucósidos encontrados en té, frutas, vegetales y miel. (Alessandra Bocco, 1998)

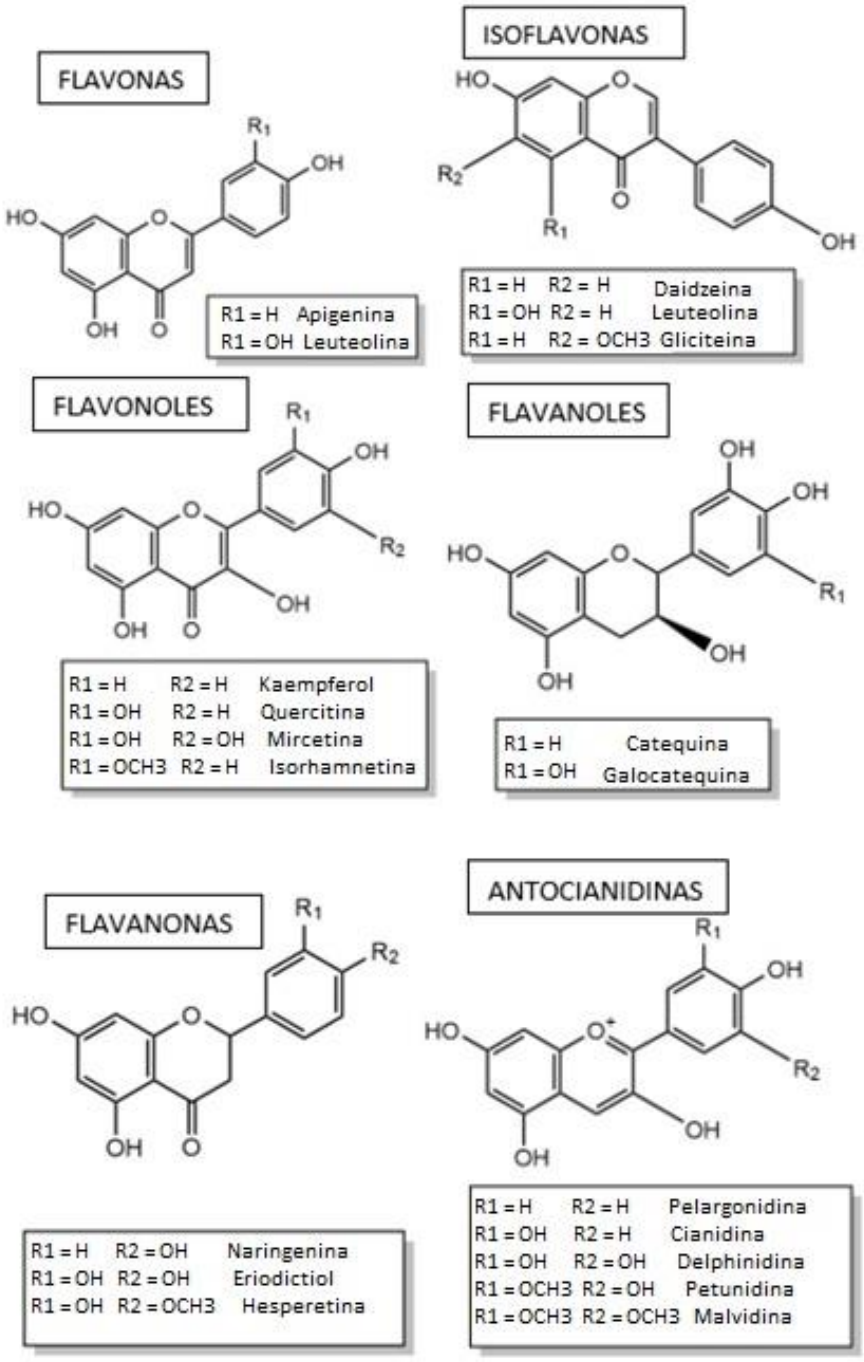


Figura 13 Estructura química de las flavonas, isoflavonas flavonoles, flavanoles, flavanonas y antocioanidinas.

CLASIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

- Flavonas: Se caracterizan por tener un radical en el carbono 13.

- Isoflavonas: Se caracterizan por tener radicales en los carbonos 9 y 10 y también por la posición del enlace de los anillos C y B que cambia del carbono 2 al 3.

- Flavonoles: Se caracteriza por tener un grupo hidroxilo en el carbono 3 y tener radicales en los carbonos 13 y 15.

- Flavanoles: Se caracteriza por tener grupos hidroxilo en los carbonos 3 y 13 y tener un radical en el carbono 15.

- Flavanonas: Se caracteriza por tener radicales en los carbonos 13 y 14.

- Antocianinas: Se caracteriza por haber perdido el grupo ceto en el carbono 4 y contener una carga parcial positiva en el oxígeno de la posición 1.

En los alimentos, los compuestos fenólicos están conjugados con azúcares, como la glucosa, galactosa, arabinosa, ramosa, xilosa o los ácidos glucurónicos y galacturónicos. También pueden unirse con ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminoácidos y lípidos. (Almajano, 2009)

Este grupo de compuestos presenta un gran interés nutricional, diversas organizaciones recomiendan su ingesta diaria por su carácter antioxidante y así prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. (Almajano, 2009)

Los compuestos fenólicos pueden actuar como donantes de hidrógeno o electrones a las reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres, actuando como captadores de radicales, el radical fenoxil generado es menos reactivo, porque se estabiliza por resonancia con los electrones ω del anillo aromático. (Almajano, 2009)

Los flavonoides pueden inhibir muchas de las quinasas, involucradas en la transducción de señales celulares, su reactividad está directamente relacionada a la posición y número de grupos hidroxilo en alguno de sus anillos y la saturación de sus enlaces, y el sitio activo se define por la disposición de los grupos. (Wölle, 1996) (Heim, 2002)

CAROTENOIDES.

Los carotenos son un grupo de pigmentos color amarillo, naranja y naranja-rojo, tienen una estructura básica poligénica de 40 átomos de carbono, formadas por ocho unidades de isoprenos ($C_{40}H_{56}$). Se tienen identificados más de 600 carotenoides diferentes presentes en la naturaleza, siendo el *β*-caroteno el más representativo de estos compuestos. Estos compuestos son importantes en la nutrición por ser precursores de la síntesis de la vitamina A en el cuerpo, una molécula de *β*-caroteno se convierte en dos moléculas de vitamina A mediante reacciones de hidrólisis. (Delia B. Rodriguez-Amaya, 2008)

Han sido estudiados por su papel en la protección de diversas enfermedades como ciertos tipos de cáncer, enfermedades del corazón y la degeneración macular relacionada con la edad. Evidencia experimental sugiere que estos compuestos son importantes en la protección de macromoléculas biológicas contra el daño oxidativo.

La búsqueda de nuevos y más eficientes antioxidantes al parecer va dirigida a los carotenoides, que han demostrado que a través de su consumo puede disminuir la incidencia de ciertas enfermedades. Además, representan una fuente de provitamina A, y presentan una actividad antioxidante al actuar en la neutralización de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno producidas como parte del metabolismo celular. (Hu, 1995) Se han aislado y caracterizado más de 600 carotenoides, pero solo se sintetizan 20 especies en nuestro organismo. (Wölle, 1996)

El mecanismo de acción de los carotenoides en la salud humana no se ha definido claramente. Una posible hipótesis es que los carotenoides, no limitándose al β-caroteno, sirven como un supresor superóxido $O^{2-}\bullet$ (forma altamente reactiva). Los carotenoides no actúan solos en este proceso. Un mejor termino para cualquier efecto benéfico o adverso,

que se puede establecer a partir de los estudios epidemiológicos es como “modulador fisiológico. (Abeysinghe, 2007) (Cano, 2004)

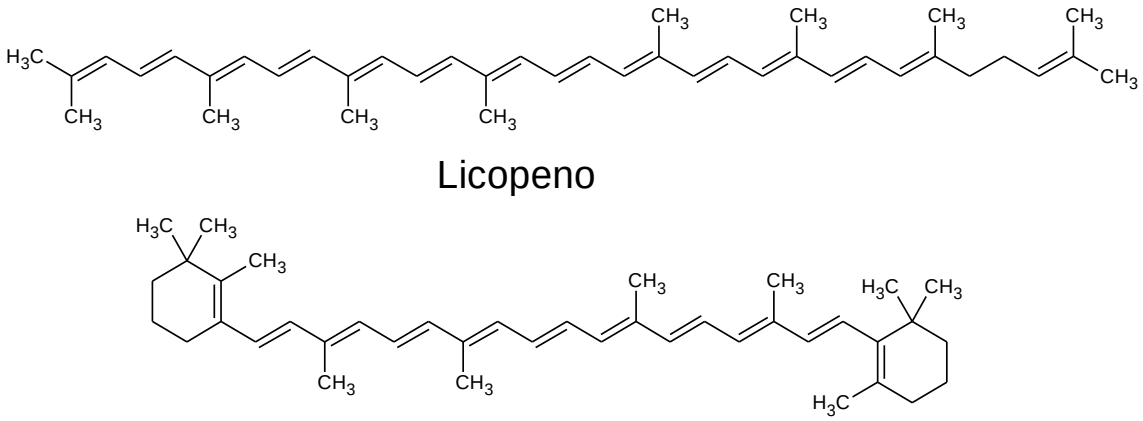
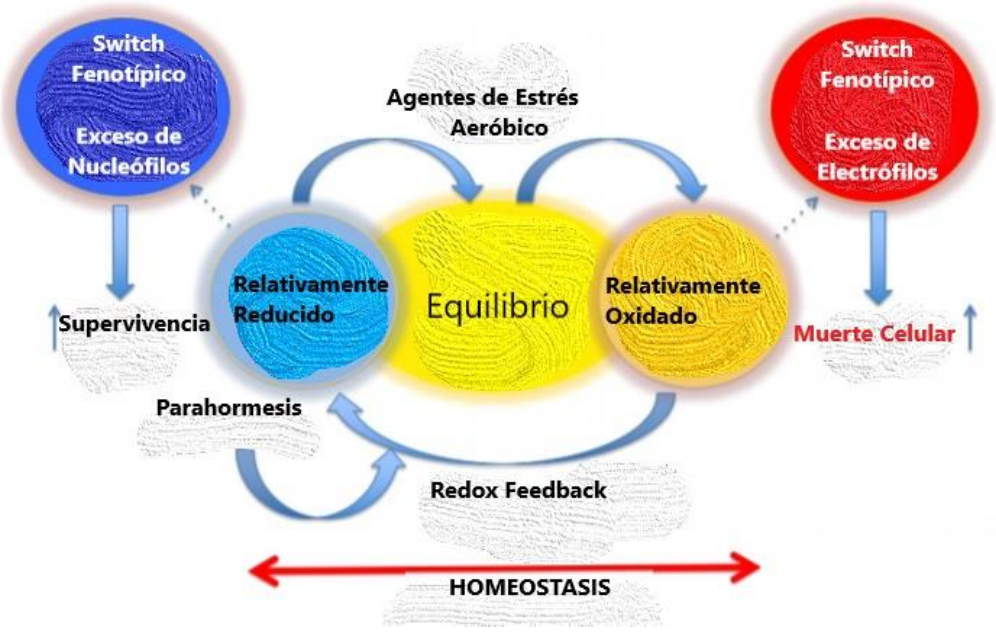


Figura 14 Estructura química de los principales carotenoides encontrados en una dieta común.

ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ORGANISMO HUMANO

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de decodificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Este entorno reductor es preservado por las enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Desbalances en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. (Pal, 2020) (Finkel, 2000)



.

Figura 15 Esquema de Homeostasis redox.

Debe existir una respuesta reductora para las actividades que implican oxidación en el cuerpo, como pueden ser de muerte celular para células que no son viables o que tienen defectos entre otras funciones.

En el ser humano, el estrés oxidativo y por ende las denominadas especies reactivas del oxígeno (ERO) participan en los mecanismos etiopatogénicos primarios o en sus consecuencias en más de cien enfermedades de gran importancia clínica y social, como la aterosclerosis, la enfermedad de Parkinson, encefalopatía miálgica, sensibilidad química múltiple, periodontitis, varicocele y la enfermedad de Alzheimer y también puede ser importante en el envejecimiento.

Sin embargo, las especies reactivas de oxígeno pueden resultar beneficiosas ya que son utilizadas por el sistema inmunitario como un medio para atacar y matar a los patógenos. Las especies reactivas del oxígeno son también utilizadas en la señalización celular. Esta es denominada señalización redox. (Gutteridge, 2018) (Cano, 2004) (Moris, 2017) (Ursini, 2016)

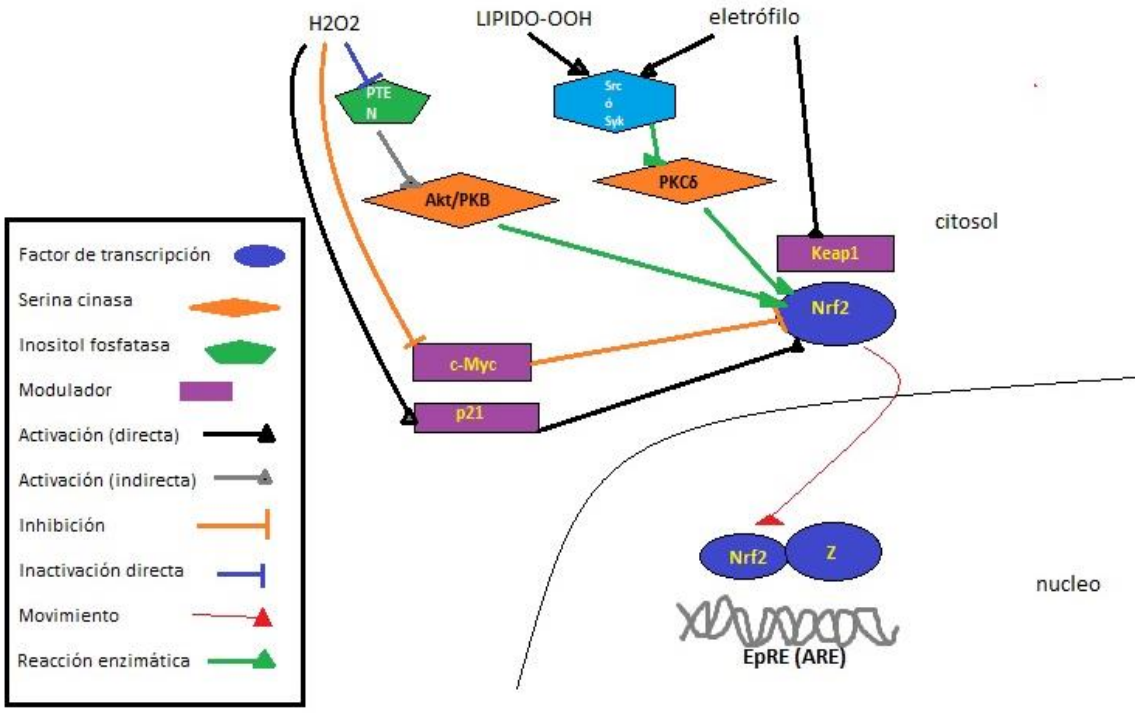


Figura 16 Ejemplo de activación de una vía de trascripción por condiciones de oxido-reducción.

Una cinasa (Keap1) que es modificada por un electrófilo ayuda a que Nrf2 sea ubiquitinada preparándola así para ingresar al núcleo, participan PKCδ y Akt mediante una fosforilación a Nrf2 asistiéndole en su transporte al interior del núcleo, la vía finaliza con Nrf2 realizando el acoplamiento al elemento EpRE. PKCδ, Akt y los moduladores p21 que también son activados por hidroperóxidos y electrófilos, en el caso del modulador negativo c-Myc se reprime por la presencia de estos,. (Ursini, 2016)

ESPECIES RADICALARIAS: FUNCIÓN Y DIVERSIDAD

El oxígeno representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y vialidad celular al mismo tiempo que involucra un peligro potencial debido a las características electroquímicas de este átomo, los responsables de la formación de intermediarios parcialmente reducidos y dotados de una alta reactividad conocida como especies reactivas de oxígeno. (Aggarwal, 2019)

La presencia de niveles basales de especies radicalarias en cierta medida ayuda a la célula a regular una enorme diversidad de señales, como cualquier sustancia se requiere su presencia en niveles controlados para mantener el balance y la homeostasis de cualquier organismo. Entre las principales moléculas que son producidas en los procesos celulares de las células vegetales se diferencian en derivados de Oxígeno y Nitrógeno. Los radicales libres son altamente inestables y generan reacciones en cadena (Cano, 2004). Algunos ejemplos de tipos de radicales libres que se encuentran en la base de esas reacciones en cadena son los siguientes:

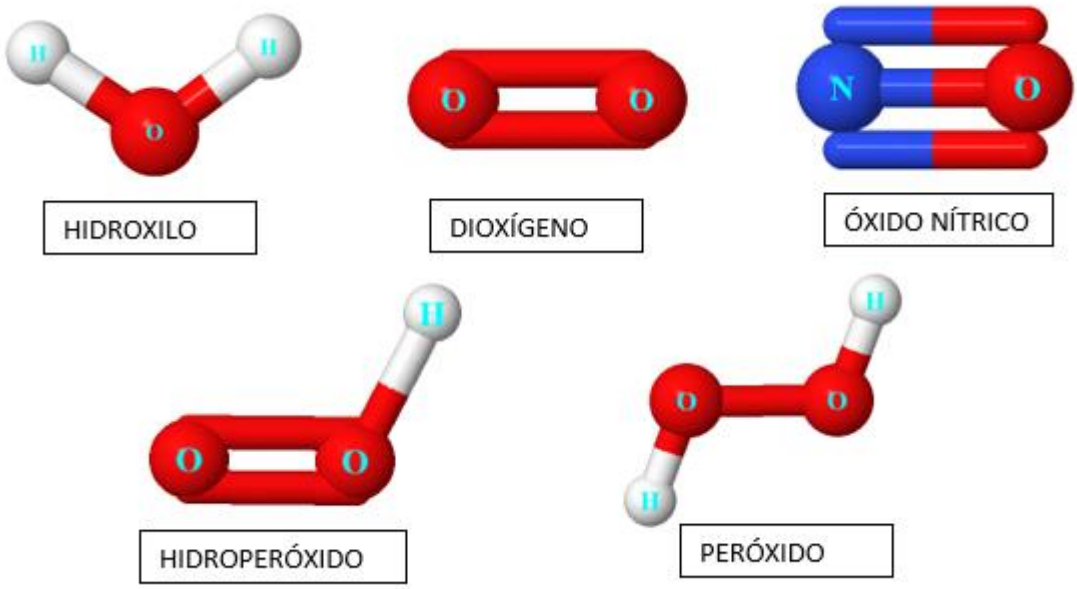


Figura 17 Algunas especies de oxígeno presentes en diversas funciones propias del organismo humano.

Hidroxilo presente en los procesos enzimáticos más comunes. el Dioxígeno; es captado por el sistema respiratorio para llevarlo a las mitocondrias donde se utiliza para generar ATP en la fosforilación oxidativa. el Óxido Nítrico; subproducto de la conversión de L-Arginina a L- Citrulina, modula la relajación del músculo liso, neurotransmisión, la citotoxicidad celular inmune, entre diversas funciones de señalización intra e intercelular.

Hidroperóxido, Radical altamente reactivo, se encuentra en el aire que respiramos, y es subproducto de algunas reacciones enzimáticas. Peróxido, agente muy reactivo generalmente producida en fagosomas y se utiliza como agentes para atacar patógenos.

DAÑOS INTRACELULARES DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Las especies de reactivas de oxígeno y nitrógeno están implicadas en distintas vías de señalización mediadas por receptores, así como también algunas activadoras transcripcionales, el estrés oxidativo supone una amenaza celular puede provocar peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, daño en ácidos nucleicos, inhibición enzimática e inducción de muerte celular programada, a pesar de tener una vida media in vivo de algunos segundos todas las especies mostradas anteriormente son muy reactivas causando estragos a nivel celular en prácticamente todas las macromoléculas. (Al-Gubory, 2018)

El agua intracelular en presencia de iones de transición metálicos puede convertirse en un sistema de hidroxilos que ataca la producción de energía en la célula. El hidróxido de cloro es considerado un potente clorante que forma complejos de colesterol-clorohidrinas dentro de la célula y a su vez estas destruyen la membrana celular dirigiendo una lisis y muerte celular. Este compuesto por si solo destruye principalmente a las aminas primarias y grupos sulfhídricos de grupos de proteínas y bases púricas del ADN. (Al-Gubory, 2018)

El óxido nítrico es producido en cantidades basales en diversidad de células, generalmente desempeña un papel fundamental en el colapso vascular asociado con un shock séptico, cuando la producción es crónica se puede relacionar con distintos tipos de carcinomas y condiciones de inflamación incluyendo la diabetes, esclerosis múltiple, artritis y colitis, cuando las especies de dióxido y óxido nítrico reaccionan forman una especie más tóxica conocida como ácido peroxinítrico el cuál atraviesa membranas con gran facilidad, su principal blanco son los ácidos nucleicos que sufren modificaciones oxidativas en las bases nitrogenadas y azúcares por igual, así como afecta gran parte de las enzimas, tiene una afinidad especial por los clúster de fierro-sulfuro en proteínas esenciales en procesos críticos intracelulares, al mismo tiempo que son inactivadas se dispara la peroxidación de lípidos a nivel de las membranas en los liposomas de la célula. (Al-Gubory, 2018)

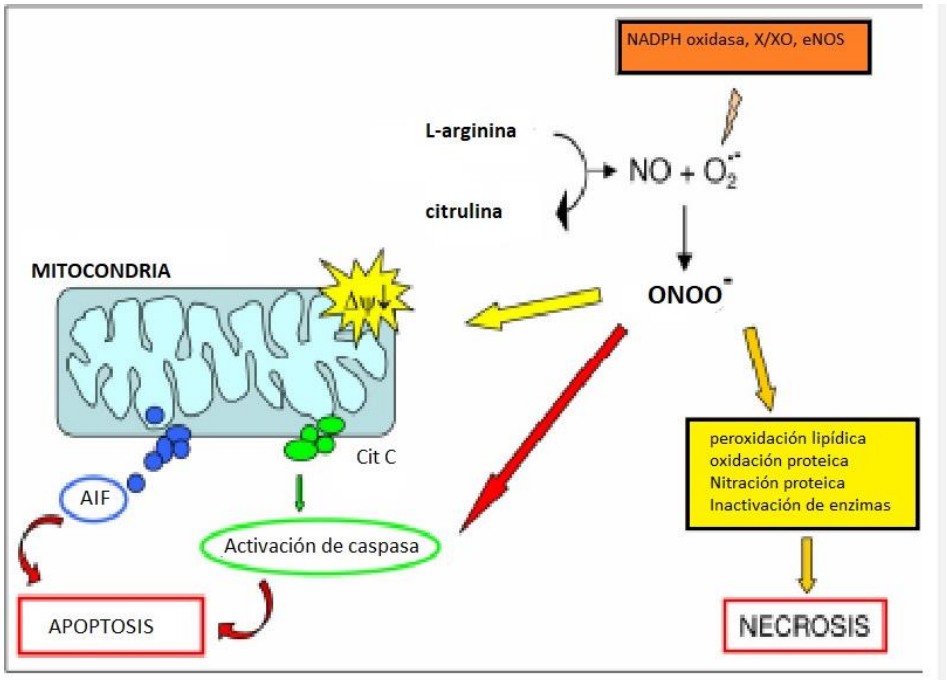


Figura 18 Sistema de los deshechos y subproductos de algunas reacciones enzimáticas

.

Se involucran nitrógeno y oxígeno impactan en los procesos mitocondriales y en la oxidación de macromoléculas dentro de la célula generando daños descontrolados dentro del organismo hasta inducir la muerte celular (Novo, 2008)

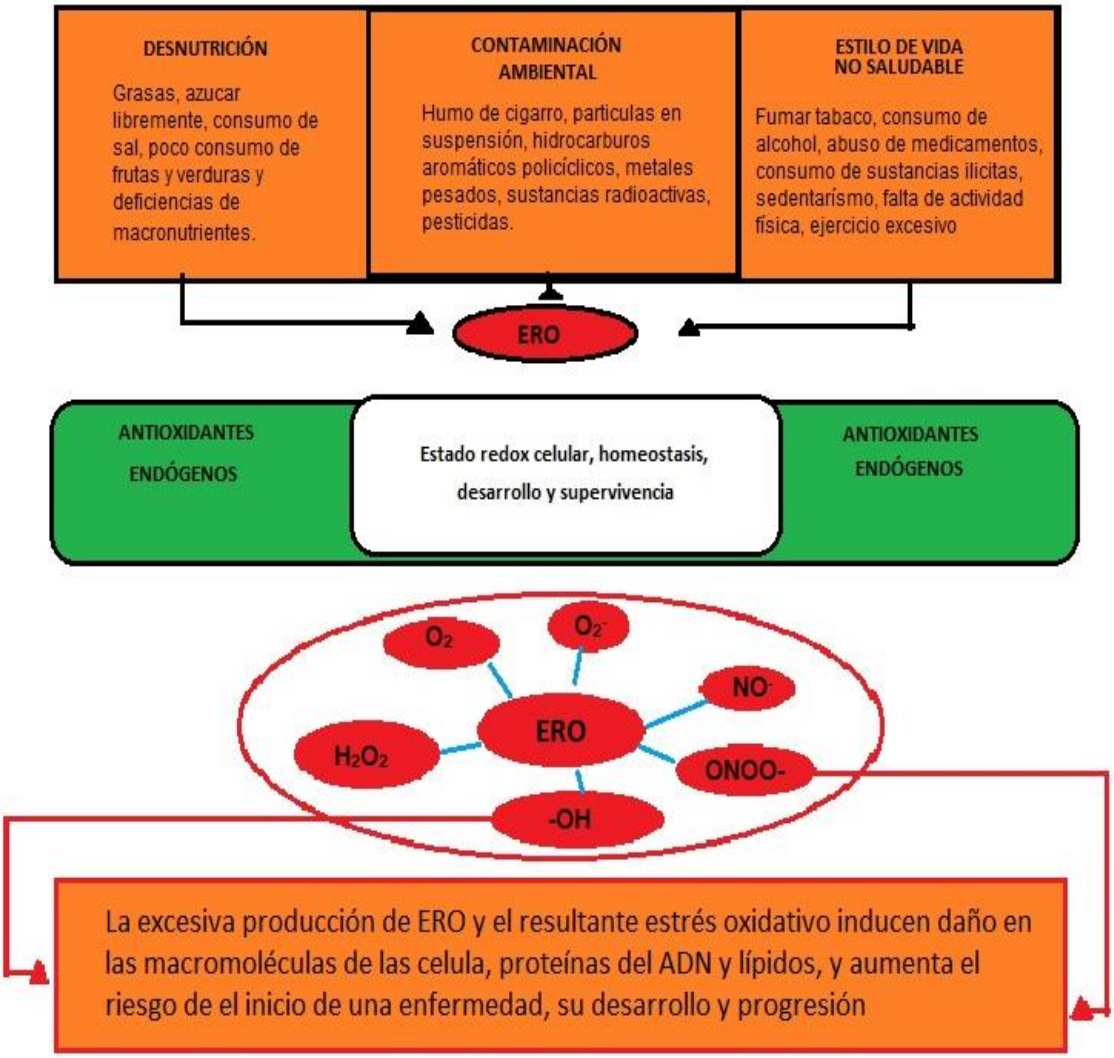


Figura 19 Esquema del equilibro de la homeostasis oxido reductiva del organismo.

Se destacan 3 principales razones para la generación de especies reactivas exógenas, la malnutrición (Consumo de grasas, azúcar, sal en exceso, poco consumo de macro y micronutrientes esenciales), los contaminantes ambientales (humo de cigarro, metales pesados, partículas en suspensión, sustancias radioactivas y pesticidas) y un estilo de vida no saludable (Abuso de medicamentos y drogas como son el tabaco, alcohol, vida sedentaria y falta de actividad física. (Kozłowska A., 2017)

Se requiere un fino equilibro entre los niveles de especies reactivas endógenas y antioxidantes liberados de forma exógena para mantener viable la homeostasis oxido-reductivo de la célula, cuando existe un desequilibro se genera un daño cellar de todas las macromoléculas presentes incluyendo el ADN, las proteínas, lípidos e incluso repercute en el funcionamiento de las mitocondrias. (Al-Gubory, 2018)

ESTRÉS OXIDATIVO Y LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las enfermedades cardiovasculares son un grupo de desórdenes con relación al corazón y arterias, incluyendo ataques al corazón, derrame cerebrovascular, hipertensión, enfermedad de arteria periférica, etc. (Al-Gubory, 2018)Las causas más frecuentes de estas enfermedades son los malos hábitos alimenticios y un estilo de vida con vicios como adicción al cigarro, alcoholismo, falta de actividad física. Las muertes por causas de enfermedades cardiovasculares encabezan a lista de las causas de muertes más comunes a nivel global, fueron 17.5 millones de personas las que murieron por enfermedades cardiovasculares en 2012, que representan el 31% de las muertes a nivel global, ¾ de las muertes tomaron lugar en países de mediano y bajo ingreso. (Al-Gubory, 2018)). Una dieta saludable y bien balanceada es la forma más eficiente de prevenir las enfermedades cardiovasculares, productos derivados de plantas con fuentes importantes de polifenoles que promuevan la salud cardiovascular, los flavonoles tienen un rango de propiedades de protección cardiovascular modulando la producción de citocinas durante el proceso inflamatorio. (Al-Gubory, 2018) (Tektonidis, 2015) . Los efectos benéficos de los flavonoles sen las enfermedades cardiovasculares se pueden explicar parcialmente como facilitadores de la vasodilatación, mejorando la actividad de plaquetas y leucocitos.

ESTRÉS OXIDATIVO Y LA DIABETES TIPO 2:

Durante las últimas tres décadas la epidemia de diabetes se ha vuelto de las mayores preocupaciones de salud pública a nivel mundial, la Diabesidad es una combinación de dos grandes enfermedades, la Obesidad y la Diabetes, y se encuentra al frente de las enfermedades no trasmisibles, se le denomina un síndrome metabólico donde se pierde la capacidad de metabolizar la glucosa debido a la ausencia de insulina, esta patología se ve drásticamente incrementado por los hábitos del estilo de vida, la falta de ejercicio y la vida sedentaria y los hábitos alimenticios afectan directamente. En el año de 1980 el número de personas en el mundo superaba los 108 millones, la cifra casi se ha cuadriplicado para 2014 con 422 millones de casos diagnosticados, la prevalencia de la enfermedad en adultos de alrededor de 18 años de edad de creció de 4.7% a 8.5% desde 1980 a 2014. La Diabetes Tipo 2 está relacionada con reacciones de oxidación catalizadas por de metales de transición (Wolff, 1993), los mecanismos que puede contribuir al aumento de dicho estrés en pacientes diabéticos son diferentes en particular aquellos sujetos con un bajo control de glicemia, esto crea una sinergia donde la glucosa en sangre produce el ambiente electroquímico perfecto para la prevalencia de radicales libres que a su vez favorecen la glucosilación no enzimática (Rodríguez Perón, 2001) (Ibarra, 2006)

ESTRÉS OXIDATIVO Y EL CANCER:

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud se le denomina Cáncer al proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células en cualquier parte del cuerpo, estás células proliferan, se multiplican y crean un tejido llamado tumor que suele invadir al tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Regularmente el control del crecimiento celular se pierde al momento que se afectan los procesos apoptóticos de las células sanas a nivel genético, perdiendo por daños a su ADN la capacidad de inducir su muerte natural programada. (Kozłowska A., 2017)

A nivel mundial se proyecta para 2030 que el número de personas con Cáncer será el doble, con mayor prevalencia a aparecer en países con ingresos medios/bajos, cerca del 95% de los casos diagnosticados de Cáncer tienen como causa principal la exposición a

contaminantes ambientales, en su diversidad se encuentran los metales pesados, partículas en suspensión, ozono, oxido de sulfuro, monóxido de carbono y óxido de nitrógeno, etc. (Kozłowska A., 2017)

Está fuertemente relacionado a los hábitos del estilo de vida, con dietas altas en grasas, azúcares libres, sal, comida procesada, carne roja, tabaquismo, alcoholismo e inactividad física. El costo económico para 2010 fue de 1.16 trillones de dólares, donde la principal fuente de prevención además de un constante chequeo médico es la dieta, principalmente se promueve a dieta balanceada y con contenido de antioxidantes, una de las dietas más seguidas en Europa es la dieta mediterránea por su alto contenido de agentes quimiopreventivos como los son los polifenoles y carotenoides. (Kozłowska A., 2017)

Entre la extensa diversidad de los agentes quimiopreventivos se encuentran los flavonoides que afectan en algunas etapas de la carcinogénesis, inhibición de la proliferación celular, mejoramiento de los procesos de reparación del ADN y la evidente reducción del estrés oxidativo. Durante la fase de progresión los flavonoides inhiben la angiogénesis e inducen la apoptosis y las acciones citotóxicas contra las células cancerígenas, sin embargo, uno de los mecanismos más importantes en los cuales los flavonoides interactúan es con las enzimas responsables de metabolizar los sustratos que propician la activación de la carcinogénesis (específicamente CYP1A1 y CyP1A2) con esto se protege contra el daño celular, también inducen la expresión de enzimas como glutatión s-transferasa (GST) y UDP-glucoroniltransferasa (UDP-GT) las cuales detoxifican y eliminan carcinógenos del cuerpo. Los efectos anticancerígenos inhibitorios de los flavonoides son explicados al inhibir la expresión de genes dependientes de ciclinas o cinasas las cuales se sobre expresan en células con cáncer (Kozłowska A., 2017).

ANTIOXIDANTES: ENZIMAS Y METABOLITOS

En las células humanas, la producción de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se llevan a cabo tanto por respuestas a lesiones como por procesos naturales del mantenimiento celular, a su vez existe un mecanismo que se inicia con la presencia de los enzimas que se encargan de biotransformar las especies reactivas en especies con mayor estabilidad bioquímica, también entran en juego metabolitos secundarios que de alguna forma contribuyen a detener el daño provocado por los radicales.

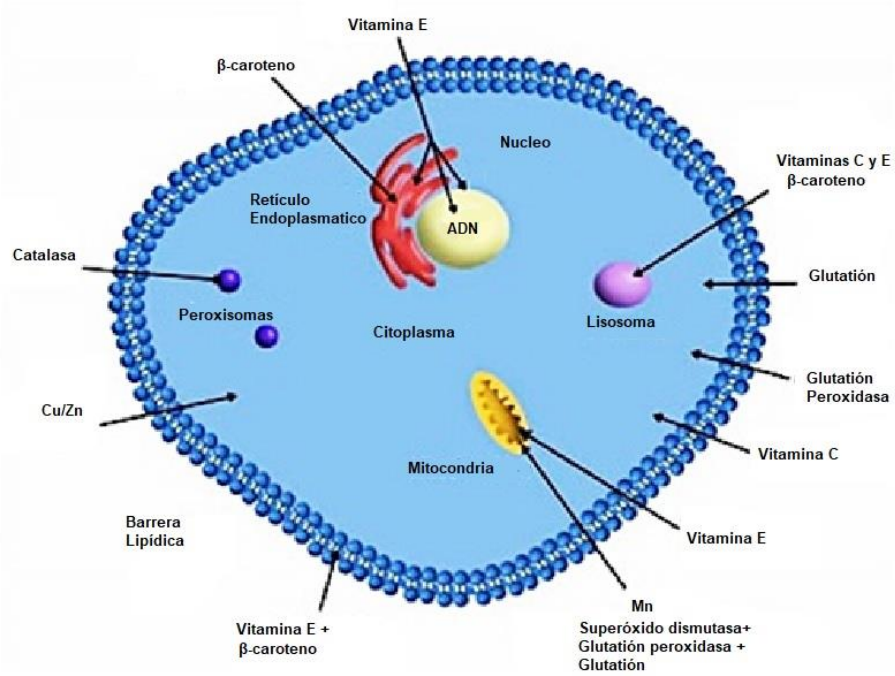


Figura 20 Procesos enzimáticos y antioxidantes en una célula humana.

Se muestra una célula con todo su abanico de agentes antioxidantes, vitaminas, complejos de proteínas hasta organelos celulares que captan estos radicales las flechas señalan donde estos actúan principalmente. (Caballero, (2015).)Los antioxidantes pueden ser definidos como cualquier sustancia que es capaz de aplazar, retardar o prevenir el desarrollo de la oxidación de los compuestos orgánicos (lípidos). Estos pueden inhibir o

retardar la oxidación de dos formas: captando radicales libres, en cuyo caso se denominan antioxidantes primarios; y secundarios cuando utilizan mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres. (Al-Gubory, 2018) Para evitar de manera natural las de diversas enfermedades degenerativas como cáncer, enfermedades cardiacas, inflamación, artritis, disfunción cerebral (Praticò, 2000), aceleración del envejecimiento, etc. (Finkel, 2000).se utilizan los antirradicales (antioxidantes) que inducen la inhibición de la actividad de las especies reactivas oxigenadas. (Penny M Kris-Etherton, 2002)

Más del 25% de los medicamentos utilizados durante los últimos 20 años se derivan directamente de las plantas, mientras que otro 25% son derivados de productos naturales, químicamente modificados (Amin, 2009). Cabe mencionar que tan sólo entre el 5% al 15% de las aproximadamente 250,000 plantas de uso medicinal, han sido investigadas para compuestos bioactivos. Esto subraya el gran potencial de las plantas en la búsqueda de nuevos medicamentos. (Amin, 2009)

Dentro del estudio de las plantas, resalta la importancia de la fitoquímica, las técnicas de colecta, identificación y preparación del material vegetal, las técnicas de extracción, así como los análisis preliminares de los extractos, que permitirá determinar su actividad biológica al encontrar la concentración mínima del extracto activo y determinar la estructura del o de los compuestos activos, mediante pruebas químicas y espectroscopía. Una información muy importante es la que proporciona la herbolaria tradicional, pues describe los usos terapéuticos que a nivel empírico se atribuye a las plantas. El estudio de las plantas en las últimas décadas ha permitido encontrar nuevas moléculas con posibilidad de actuar como nuevos fármacos. (Amin, 2009)

A nivel popular basta muchas veces con extraer los principios activos de: raíz, hojas, flores, tallos, de acuerdo con los antecedentes encontrados, de la manera más sencilla, como puede ser por medio de una infusión o decocción. En cambio, para analizar las propiedades medicinales de una droga vegetal, en muchos casos se recurrirá a métodos de extracción más complejos, que permitan obtener métodos reproducibles, con cuantificación de principios activos en lo posible. (Amin, 2009)

TECNOLOGÍAS RECURRENTES EN LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS DE INTERÉS

Es vital la importancia de extraer los compuestos activos de una muestra vegetal para tener una muestra con la que se pueda trabajar para determinar sus propiedades antioxidantes, de manera tal que al asilarlo en un vehículo líquido como puede ser el etanol se pueda preservar sus propiedades de manera más eficaz, se utilizan técnicas de extracción solido-líquido debido a que el material se presenta en forma de tejido vegetal sólido, se utiliza un vehículo con afinidad electroquímica a las moléculas de interés y que al mismo tiempo tenga el menor impacto sobre la estructura de los compuestos, de esta manera podemos determinar de manera efectiva la capacidad antioxidante esto es porque la disponibilidad de los moléculas cambia cuando están dentro de los tejidos y células vegetales.

EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO.

Muchas sustancias biológicas, así como compuestos inorgánicos y orgánicos, se encuentran como mezclas de diferentes componentes en un sólido. Para separar el soluto deseado, o eliminar un soluto indeseable de la fase sólida, ésta se pone en contacto con una fase líquida. Ambas fases entran en contacto íntimo y el sustrato se difunde desde sólido a fase liquida, lo que permite una separación de los componentes originales del sólido. Este proceso se llama lixiviación líquido-sólido, o simplemente lixiviación. La operación unitaria se puede considerar como una extracción. Cuando la lixiviación tiene por objeto eliminar con agua un componente indeseable de un sólido, el proceso recibe el nombre de lavado. En la industria de procesos biológicos y alimenticios, muchos productos se separan de su estructura natural original por medio de una lixiviación líquido-sólido. (Geankoplis, 1998)En la lixiviación de materiales solubles del interior de una partícula por acción de un disolvente, el proceso general consiste en los siguientes pasos: el disolvente se trasfiere del volumen de solución a la superficie del sólido para penetrarlo, el sustrato se difunde en el disolvente desde dentro hasta la superficie de la partícula y por último se dispersa por toda la solución. Los numerosos fenómenos que se presenta en este proceso hacen poco práctico y casi imposible aplicar una teoría definida a la acción de lixiviación. En general, la velocidad de transferencia de componentes del sólido hacia la solución es

bastante rápida y la velocidad hacia el interior del sólido puede ser rápida o lenta. (Geankoplis, 1998) La velocidad de difusión del soluto a través del sólido hacía la solución suelen ser la resistencia que controla el proceso global de lixiviación y dependen de diversos factores, tales como el tamaño de partícula del sólido, la concentración del disolvente, la temperatura del medio, el tiempo de contacto, el número de extracciones, polaridad de disolvente y compuestos y la proporción sólido-disolvente. (Geankoplis, 1998).La extracción sólido-líquido tiene gran importancia en un gran número de procesos industriales. El azúcar se separa por lixiviación de la remolacha con agua caliente; los aceites vegetales se recuperan a partir de semillas, como las de soya y algodón mediante lixiviación con disolventes orgánicos; el tanino se disuelve a partir de raíces y hojas de plantas. El té y el café se preparan mediante técnicas y equipo muy similares a los utilizados en las verdaderas operaciones de lixiviación. (Geankoplis, 1998) Las técnicas de extracción convencionales incluyen solventes orgánicos como el metanol, etanol, acetona, isopropanol, éter etílico, acetato de etilo en una enorme variedad de proporciones acuosas, dos de las extracciones más usadas son extracción tipo soxhlet y maceración, durante la extracción soxhlet es común altas temperaturas en lo solventes orgánicos (alrededor de su punto de ebullición) para reducir los tiempos de extracción (4-12hrs), lo que ya representa ciertas ventajas sin embargo las altas temperaturas tienden a generar una degradación de los fitoquímicos, la maceración por otro lado usa solventes orgánicos a temperaturas bajas o ambientales (4-25°C) pero el periodo de extracción se prolonga de 4-7 días, también se juega un papel importante en el pH para preservar los fitoquímicos estables. (Hoda, 2019) Una alternativa novedosa de extracción de compuestos antioxidantes es el uso de irradiación de microondas, lo que abre el abanico de posibilidades para la obtención de compuestos de interés y las ventajas de esta tecnología para incrementar el rendimiento, vida de anaquel y aprovechamiento de subproductos. Las nuevas técnicas de extracción superan con creces las antiguas, debido a que los tiempos de extracción son muy cortos y la utilización de solventes es mínima o nula, los cortos periodos de extracción minimizan la oxidación extracelular y la degradación de los compuestos fenólicos, algunas de las más utilizadas actualmente incluyen asistencia con ultrasonido durante la extracción, asistencia de microondas, extracción con fluidos supercríticos, extracción con fluidos presurizados o extracción con agua subcrítica y extracción con alta presión hidrostática. (Hoda, 2019)

EXTRACCIÓN	CARACTERISTICAS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Método Soxhlet	Reflujo de solventes orgánicos contra muestras de plantas a punto de ebullición	Proceso con Instrumentación básica y costes efectivos	Degradación de los compuestos termolábiles y toxicidad del solvente
Maceración	Larga incubación de muestras de plantas en solventes orgánicos a temperaturas controladas (4-25°C)	Extracción de compuestos termolábiles e instrumentación básica con costos efectivos	Baja concentración de extractos, periodos de tiempo largos y toxicidad del solvente
Extracción de fluidos supercríticos	Alto poder de penetración del gas y fuerte densidad del líquido permiten la extracción a través de los tejidos con gran efectividad	Toxicidad del solvente al mínimo, asentamiento del tejido vegetal y tiempo de extracción	No se pueden extraer compuestos apolares y alto costo de mantenimiento de los equipos
Extracción con agua subcrítica	Polaridad del agua similar a solventes orgánicos en condiciones subcríticas, permite la extracción de compuestos polares	Sin toxicidad del solvente, tiempo de incubación corto, especial para extracciones de compuestos polares	No se pueden extraer compuestos apolares

Tabla 2 Extracciones para material vegetal y sus características.

EXTRACCIÓN	CARACTERÍSTICAS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Extracción con alta presión hidrostática	Usando alta presión hidráulica no térmica mejora la permeabilidad celular y mejora la extracción del solvente	Toxicidad de solvente mínima, periodo corto de incubación, se puede variar la polaridad del solvente	Alto costo de mantenimiento del equipo, bajo rendimiento fitoquímico
Extracción asistida con ultrasonido	Las frecuencias provocan que las células imploten permitiendo que el solvente penetre y se dispare la extracción de los compuestos	Toxicidad de solvente mínima, corto periodo de incubación, bajo costo de mantenimiento del equipo	Proceso que carece de homogeneidad y reproducibilidad
Extracción asistida con microondas	Se induce una vibración molecular que genera calor, que genera la evaporación del agua y la explosión de la pared celular	Extracción selectiva en base a polaridad, para compuestos fotolábiles, bajo tiempo de incubación	Degradación de compuestos termolábiles.
HPLC/FPLC/UPLC	Basadas en el diferencial de afinidad entre varias moléculas	Aislamiento en tiempo real de moléculas individuales, alta resolución, cuantificable, corto tiempo de separación	Baja cantidad del compuesto aislado carga de muestra muy pequeña

Tabla 3 Extracciones para material vegetal y sus características.

EXTRACCIÓN POR MICROONDAS (MW).

Éste tipo de calentamiento utiliza las propiedades electromagnéticas de las moléculas, al inducir un campo eléctrico en el medio redirige las moléculas hacia su polo correspondiente, es decir, el dipolo en la molécula se orienta de acuerdo a su carga, por ejemplo cuando tenemos una molécula como el agua que posee dos polos muy marcados, la parte de la molécula con carga negativa que sería el oxígeno se orientaría hacia su carga complementaria en el campo eléctrico inducido por el microondas, es decir el lado más "positivo" y viceversa, esta rotación se dará de manera más selectiva en cuanto las moléculas posean características dipolares bien definidas en su estructura molecular, esto se le conoce como rotación molecular dipolar.

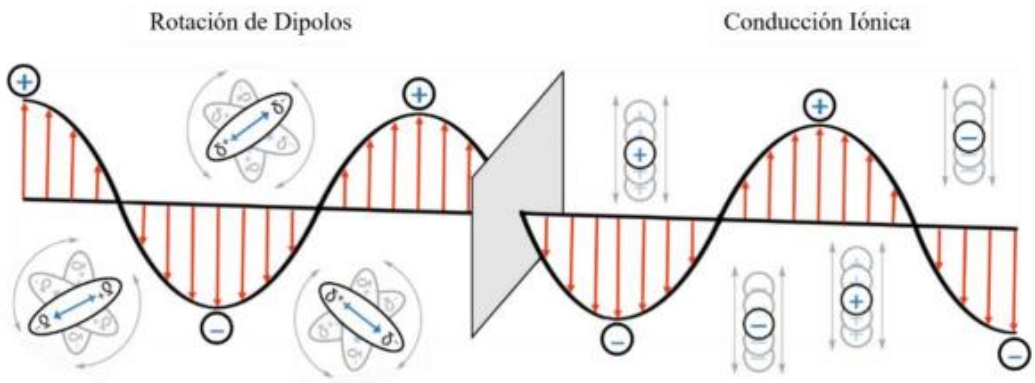


Figura 21 Mecanismos de transferencia energética por microondas (Gaviria Pérez, 2019)

La frecuencia de onda utilizada en microondas convencional es de 2,45 GHz y el campo intercambia de lugar sus cargas 5,000'000,000 de veces por segundo, lo que quiere decir que a pesar de que las moléculas "alineen" sus cargas con el campo eléctrico inducido rápidamente no les dará tiempo para hacerlo por completo por lo cual oscilaran entre una y otra posición en ese intervalo de veces por segundo, a su vez las moléculas pequeñas como lo son cationes y aniones tienden a moverse por todo el campo eléctrico, de forma que los iones positivos o cationes se desplazan hacia el lado más negativo del campo y viceversa, creando fricción por su desplazamiento entre las demás moléculas, la intensidad

y especificidad de esta característica depende del tamaño, carga, conductividad y su interacción con el disolvente.

Las principales diferencias entre el calentamiento convencional y el calentamiento por microondas es también su uniformidad de la transferencia de energía, debido a que el campo electromagnético es radiado uniformemente por todo el espacio de la sustancia, mientras que el calentamiento por conducción se realiza principalmente en la superficie de contacto, la cual al ser modificada su temperatura distribuye la energía por convección en toda la sustancia. También otra diferencia es la especificidad de transferir energía a las moléculas, mientras que por microondas es alta su especificidad en moléculas con cargas y dipolos, no es de la misma forma efectiva con materiales cristalizados o con una distribución de cargas más equilibrada, por otro lado, el calentamiento por conducción y convección tiene baja especificidad transfiriendo así la energía uniformemente entre moléculas de diferentes características electromagnéticas.

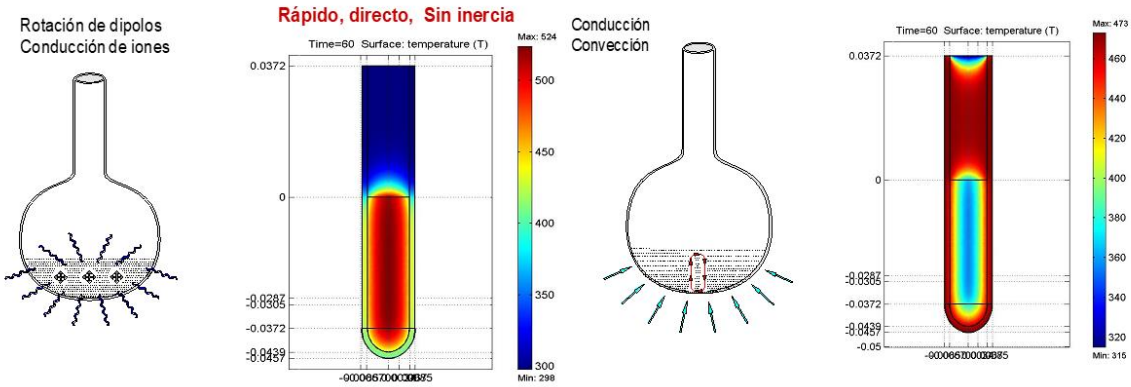


Figura 22 Diferencia entre calentamiento por convección y por MW.

Este mecanismo resulta interesante debido a que al trabajar con sustancias altamente reactivas el tiempo de extracción es un factor vital, la extracción por microondas es una alternativa que reduce significativamente el tiempo, con tiempos de extracción de alrededor de 5-10 minutos, comparado con las 4-8 horas de las extracciones convencionales, el

contacto e interacción del extracto con las condiciones ambientales prácticamente se descarta, manteniendo sus propiedades y mejorando la precisión del resultado.

TECNICAS RECURRENTES PARA AISLAMIENTO DE SUSTANCIAS FITOQUÍMICAS.

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

La cromatografía es una técnica que permite separar los componentes de una mezcla. Esta separación se logra utilizando un sistema de dos fases: una fase estacionaria donde se retienen los compuestos a separar y una fase móvil que desplaza de forma diferencial los compuestos a través de la fase estacionaria. En función de la naturaleza de las fases, se pueden distinguir distintos tipos de cromatografía:

- Cromatografía sólido-líquido: la fase estacionaria es un sólido y la móvil un líquido.
- Cromatografía líquido-líquido: ambas fases son líquidos y en la estacionaria el líquido se ancla a un soporte sólido.
- Cromatografía líquido-gas: la fase estacionaria es un líquido no volátil sobre soporte sólido y la fase móvil un gas.
- Cromatografía sólido-gas: la fase estacionaria es un sólido y la móvil un gas.

Para la separación de compuestos orgánicos la cromatografía solido-líquido es las más utilizada debido a la gran diversidad de solventes existentes y las mezclas que se pueden generar entre estos permite seleccionar las condiciones adecuadas para la elución de un compuesto en particular. Para llevar a cabo esta técnica de separación la mezcla se deposita sobre la fase estacionaria y la fase móvil atraviesa el sistema desplazando los componentes de la mezcla a distintas velocidades que dependen de la afinidad de estos por cada una de las fases. Se denomina elución a la migración de los componentes de la mezcla a lo largo de la fase estacionaria impulsados por la móvil

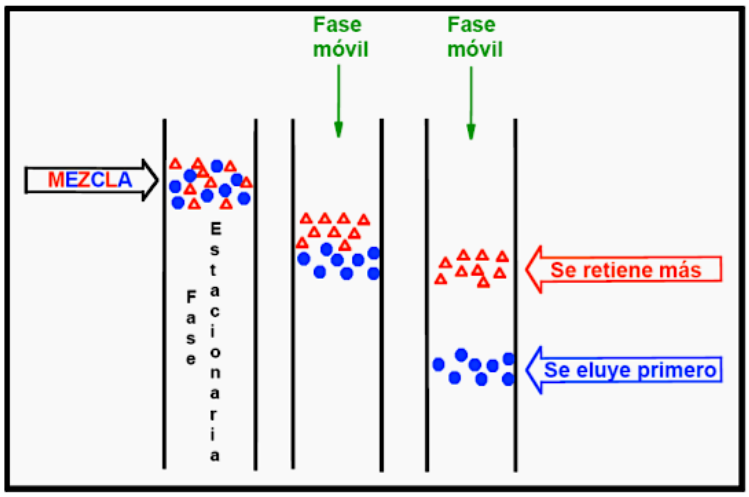


Figura 23 Elución de los componentes de una mezcla.

Se utiliza una fase estacionaria, generalmente gel de sílice o alúmina neutra, en la cual se soporta la mezcla de componentes a separar, en una columna de tipo bureta con un filtro poroso en la parte inferior antes de la llave de paso, que tiene la función de impedir que partículas de la fase estacionaria obstruyan el paso de la llave, después del filtro poroso se añade la fase sólida, en la parte inferior una capa del adsorbente limpio y después de esta capa se añade la fase solida que contiene la mezcla a separar, y en la parte superior se añade una capa de algodón de forma que se impida la perturbación de la fase solida por la adición de la fase móvil.

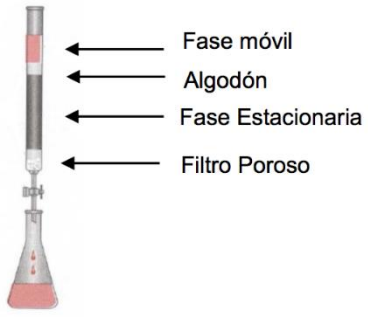


Figura 24 Columna Cromatográfica.

Una vez montado el sistema de separación en columna cromatográfica se agrega la fase móvil, o eluyente, y se permite que fluya hacia el fondo por efecto de la gravedad o por efecto de alguna fuerza móvil, como es el caso de una bomba de aire. Los componentes que se adhieren con menor fuerza a la fase solida descienden por la columna más rápido y requieren un volumen menor del eluyente para alcanzar el fondo y viceversa. Así a medida que el proceso de separación avanza se forma una serie de bandas y la mezcla de los compuestos se separa en sus componentes

La selección de la fase sólida normalmente se elige entre alúmina y gel de sílice, que son óxidos metálicos polares que permiten la adherencia de la mezcla a separar, generando una mayor adherencia de las sustancias más polares, lo que en consecuencia hará más difícil su separación de la fase sólida y viceversa con los componentes más polares.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)

La fase estacionaria (adsorbente) se encuentra depositada, formando una capa fina de un espesor uniforme sobre una placa de vidrio, plástico o una lámina metálica. La mezcla para analizar se deposita con un capilar a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cuba donde está la fase móvil (eluyente), que ascenderá a lo largo de la capa por capilaridad fluyendo a los componentes de la mezcla a distintas velocidades, lo que provoca su separación. Cuando el frente del disolvente se encuentra aproximadamente a 0.5 cm del borde superior, se saca la placa de la cuba, se marca hasta donde ha llegado el eluyente y se deja secar para, a continuación, proceder a la visualización de las manchas correspondientes a los productos separados.

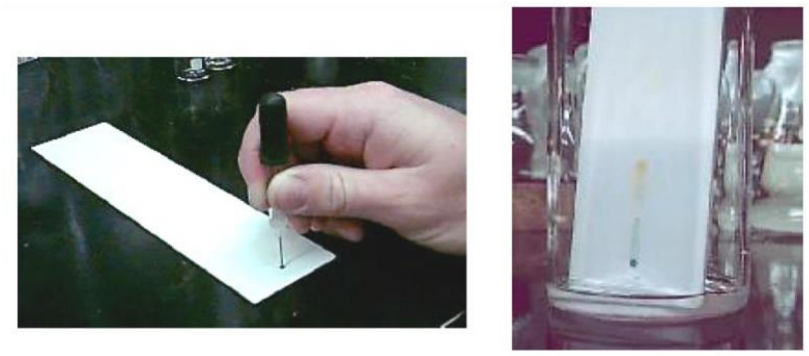


Figura 25 Aplicación de la muestra y desarrollo de la placa de CCF.

Una vez terminada la CCF es necesario poder observar los resultados, en el caso de compuestos con colores característicos y notorios estos se observan con facilidad, pero en el caso de los compuestos que no tienen estos colores se necesita de un medio de revelación, existen diversos métodos para visualizar las machas correspondientes a cada uno de los componentes de la mezcla, los métodos más comunes son:

Con luz UV (ultravioleta): Las placas suelen llevar incorporado un indicador fluorescente que adsorbe luz UV y emite luz visible. Cuando se cromatografía sustancias que absorben en el UV donde se encuentran el compuesto no absorbe el indicador y como resultado se puede observar una mancha que indica su presencia.

Con un agente revelador: se emplea cuando las sustancias no absorben radiación UV. El revelador reacciona con los productos absorbidos dando lugar a compuestos coloreados, algunos ejemplos son el ácido sulfúrico en etanol para azucares y esteroides, ninhidrina para aminoácidos y yodo para compuestos insaturados y aromáticos.

Durante el desarrollo de esta técnica, se puede obtener el valor de una propiedad característica de cada uno de los compuestos, la cual se denomina Rf (factor de retención), que representa la relación entre las distancias recorridas por un compuesto y por el

disolvente desde el origen del cromatograma, como podemos observar en la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{Distancia\ recorrida\ por\ el\ compuesto}{Distancia\ recorrida\ por\ el\ disolvente} \quad -----(1)$$

Cada compuesto con las siguientes condiciones cromatográficas: adsorbente, disolvente, temperatura, entre otros, tiene un valor constante y característico de R_f. sin embargo, solo se pueden establecer comparaciones entre los de Rf dos compuestos cuando los dos se efluyan juntos en la misma placa. La distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha y se calcula el valor del Rf.

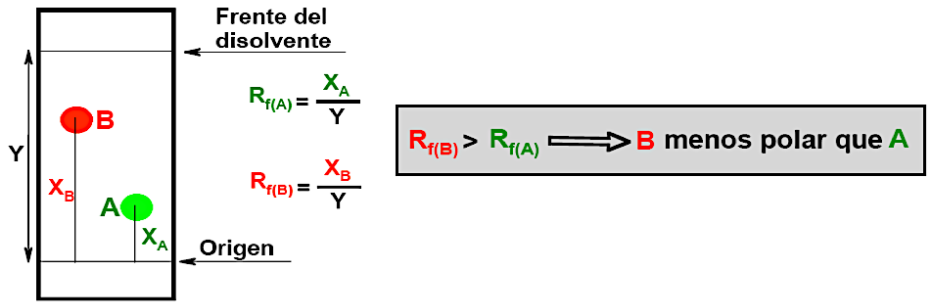


Figura 26 Determinación de Rf de dos compuestos A y B.

El empleo de esta técnica tiene una gran variedad de aplicaciones dentro de las cuales se pueden destacar:

- Determinar el número de componentes de una muestra: en base al número de manchas observadas, esto se debe realizar con diversos eluyentes.

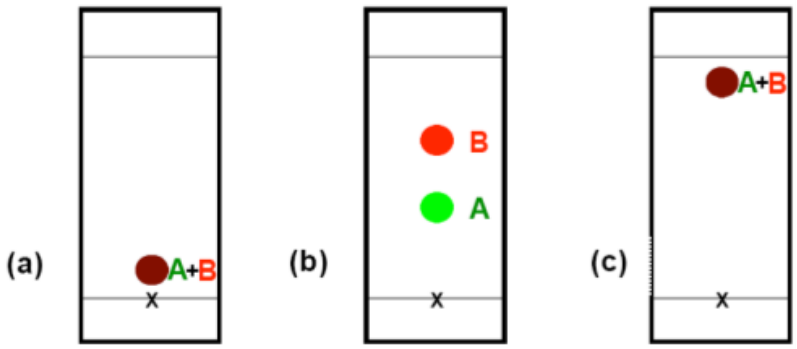


Figura 27 Separación de dos componentes A y B de una mezcla. (a) Eluyente poco polar (b) Eluyente de polaridad adecuada (c) Eluyente muy polar.

- Comprobar la pureza de un compuesto: se observará una sola mancha, se debe comprobar que solo hay una mancha utilizando distintos eluyentes.

- Determinar la identidad de dos compuestos: mediante el cálculo del R_f se puede determinar si dos manchas corresponden al mismo compuesto, pero se debe tener precaución, dado que el valor de Rf iguales o prácticamente iguales para dos manchas en una misma placa no garantizan inequívocamente su identidad, para resolver esto en la misma placa hay que realizar una CCF de una mezcla de los compuestos cuya identidad se quiera comprobar.

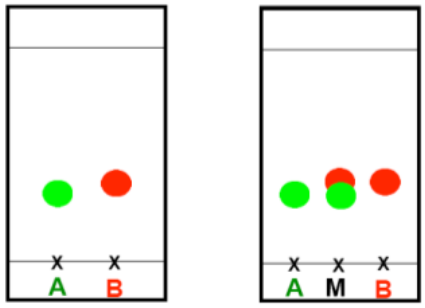


Figura 28 Comprobación de la no igualdad de dos compuestos A y B.

- Seguir la evolución de una reacción: se puede monitorear el avance de una reacción en función del tiempo, realizando CCF en una misma placa, los reactivos y la mezcla de reacción.

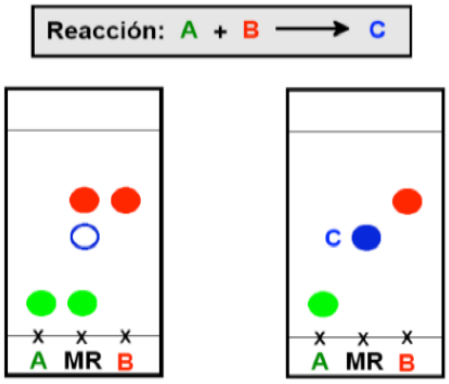


Figura 29 Evolución de una reacción entre dos compuestos A y B (reactivos) para dar lugar a un compuesto C. MR: Mezcla de reacción.

- Se prueban diversos eluyentes hasta observar cual permite una mejor separación de los componentes de la mezcla.

- Monitorear en función a la cantidad de eluyente que ha pasado por el soporte sólido, esto es los compuestos que han sido eluídos.

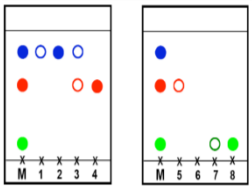


Figura 30 Análisis de las fracciones (1, 2,3...8) de una Cromatografía en Columna. M: mezcla antes de llevar a cabo la cromatografía en columna.

Nota: Los eluyentes a utilizar en cromatografía en columna se seleccionarán de aquellos con mejor resolución en cromatografía de capa fina.

JUSTIFICACIÓN

La necesidad de contar con mayores opciones de sustancias antioxidantes de origen natural para su uso en la prevención de padecimientos degenerativos (envejecimiento, daño celular por estrés oxidativo, cáncer, etc.) incentivó la búsqueda de sustancias presentes en especies poco estudiadas como lo son los encinos. La especie de encino *Quercus rugosa* nos interesó debido a que se existe poca información en la literatura, y debido a su característica pigmentación puede ser una posible fuente de compuestos antioxidantes. Se conoce que frutas con la misma pigmentación poseen polifenoles, y se estima que la concentración de estos en esta bellota es elevada. La determinación del perfil fitoquímico de la bellota de *Q. rugosa*, así como la identificación de los compuestos presentes permitirá evaluar su potencial medicinal.

OBJETIVOS

Generales:

Aislar e identificar los compuestos presentes en la pigmentación de la bellota de *Quercus rugosa* implicados en la actividad antioxidante.

Particulares:

- Determinar la presencia de compuestos fenólicos en la bellota del encino *Quercus rugosa* mediante el análisis del perfil fitoquímico.
- Aislar los componentes o metabolitos presentes en la bellota del encino *Quercus rugosa,* por medio de cromatografía en CF y columna tipo flash.
- Cuantificar los compuestos fenólicos totales por metodología Folin-Ciocalteu
- Analizar su capacidad antioxidante por metodología DPPH y cuantificarla.
- Identificar por RMN los metabolitos presentes en los extractos de los diferentes disolventes.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

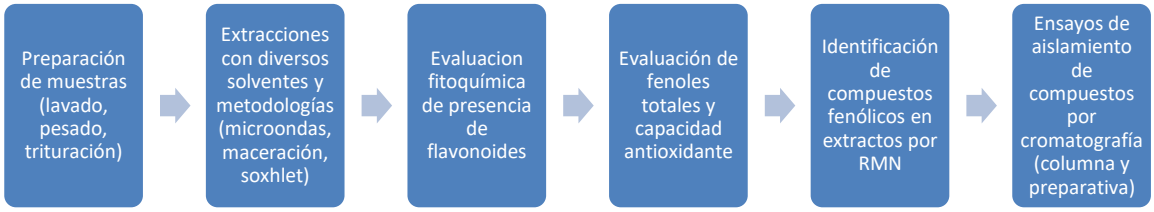


Figura 31 Diagrama de flujo experimental.

EQUIPOS

Espectrofotómetro

Los resultados de las absorbancias fueron medidos por el espectrofotómetro Beckman Coutler DU 720 del laboratorio de la Dra. Maura Cárdenas en la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Figura 32 Representación gráfica del espectrofotómetro.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se obtuvieron en un equipo Bruker de 500 MHz para la obtención de experimentos de 1D (^{1}H, ^{13}C), utilizando cloroformo deuterado ($CDCl_3$) conteniendo tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ), las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertz (Hz).

Figura 33 Resonancia Magnética Nuclear Bruker de 500 MHz.

Microondas Focalizado.

Para las extracciones asistidas por microondas, se utilizó un reactor de microondas focalizado Anton Paar MonoWave 300 utilizando viales con sellado a presión. La temperatura y presión de las reacciones que se llevaron a cabo se midieron únicamente con los instrumentos de medición internos del equipo (termómetro infrarrojo).

Figura 34 Representación gráfica del microondas focalizado.

MATERIALES Y REACTIVOS

Muestra vegetal de bellotas de *Quercus rugosa*.
Placas comerciales de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor ALUGRAM Xtra SIL G/UV Macherey-Nagel
Columna cromatográfica
Soportes universales
Estufa de inducción
Equipo de extracción soxhlet
Sistema rotavapor
Cámara de revelado uv
Sistema de revelado para CCF
Espectrofotómetro
Equipo de laboratorio: gradillas, pinzas, matraces
Parafilm
Sistema de vacío: bomba de vacío de diafragma V-700 marca Büchi
Mortero
Placas de cromatografía preparativa
Picnómetro
Papel filtro

REACTIVOS

H_2SO_4 al 50% con H_2O
Hexano
Acetato de Etilo
Etanol
Acetona
Metanol
Isopropanol
Cloruro de Metileno
Agua
Reactivo de Folin-Ciocalteu Sigma Aldrich F9252
Reactivo DPPH Sigma Aldrich D9132
Cloroformo deuterado ($CDCl_3$)
Gel de sílice de 230-400 mallas MN Kieselgel 60 de Macherey-Nagel, Alemania

METODOLOGIA Y PROCEDIMIENTO GENERAL

RECOLECCIÓN DE MATERIA PRIMA VEGETAL

La recolección de las bellotas fue hecha en el JARDIN BOTÁNICO UNIVERSITARIO, de la Benemérita Universidad de Puebla en las coordenadas 19°00'02.4"N 98°11'51.9"W de dos especímenes de 5 y 7 metros de altura sanos, con números de acceso U19980032A y U19980032D, en cuatro fechas: 5 de octubre, 6 de octubre y el 8 de octubre del 2015 y la última recolección en noviembre del 2019 (para los estudios de Folin y DPPH). Se debe seguir un protocolo de manejo para la muestra recolectada, principalmente para evitar que se contamine con agentes externos al ambiente de recolección y que se pueda a maltratar los tejidos por mecanismos físicos. Se realizó una recolección de las bellotas *in situ*, recogiendo las bellotas en buen estado, es decir que no se encontraban dañadas o en estado de descomposición, también se hizo una recolección directamente desde la cúpula de las muestras que estaban a un nivel donde se pueden recoger por una persona, se realizaron en plena luz del día y en días donde no hubo lluvias.

Figura 35 Muestra representativa de las bellotas recolectadas.

RECUPERACIÓN DE COTILEDONES EN RELACIÓN CON EL PESO FRESCO

Al momento de obtener las bellotas se limpiaron muy bien en seco con un pedazo de tela absorbente, para quitar suciedad como tierra, insectos y ramas que pudiesen estar presentes al momento de recolección, mediante un equipo vernier se procede a hacer las

mediciones de largo de bellotas, de diámetro de estas, y con una balanza analítica se pesaron individualmente para obtener el peso total, y posteriormente se les retiró la cáscara, debido a que se requiere conocer el rendimiento en peso descontando la cáscara.

Figura 36 Bellotas sin cascara.

ALMACENAMIENTO DE MATERIAL VEGETAL

Las muestras se aislaron de luz mediante papel aluminio y del viento mediante una bolsa plástica para ser resguardadas en un equipo de refrigeración, permitiendo que mediante la temperatura conserve el producto vegetal en estado de latencia, la bolsa plástica es para aislarlo de la humedad que se pueda generar en el sistema refrigerante.

PESADO Y TRITURADO

Se trituraron las bellotas para disminuir el tamaño de partícula y aumentar la superficie de contacto y nos permita extraer sus compuestos de manera más eficaz. Se evaluaron dos maneras de preparación para el material vegetal triturado en mortero: la primera solo considerando la parte interna de la bellota, sin pericarpo; la segunda preparación se realizó triturando la bellota completa, la cual únicamente se usó en los ensayos de solubilidad iniciales presentados a continuación, sin embargo, se conservó la primera forma de

preparación descartando el pericarpo (cáscara) de la bellota para todos los siguientes ensayos. Solo en la prueba de Shinoda se usaron cortes histológicos específicos para determinar la concentración de flavonoides en cada corte.

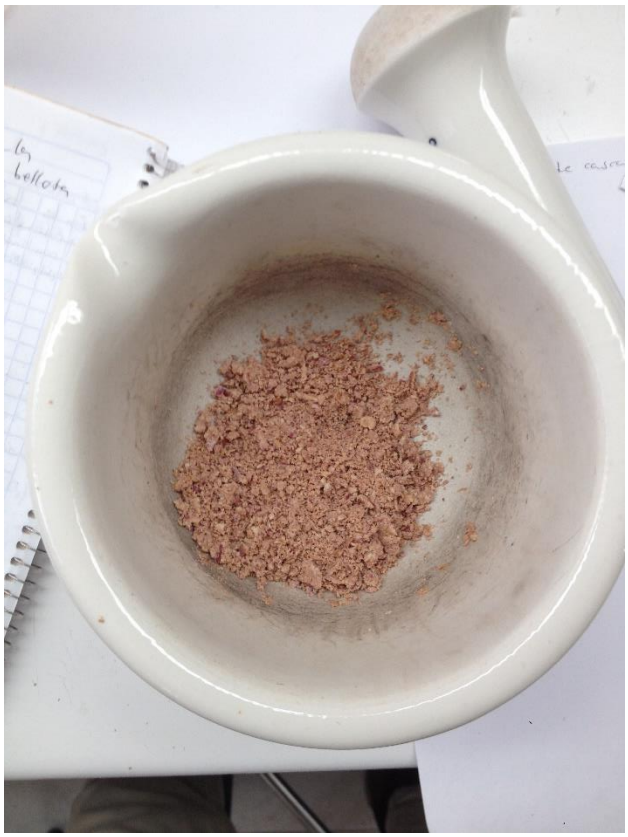


Figura 37 Mortero con material vegetal de las bellotas triturado.

PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Figura 38 Se realizaron las pruebas de solubilidad en una gradilla con tubos de ensayo.

Se realizaron pruebas para evaluar la solubilidad del contenido de las muestras de bellotas en diferentes concentraciones de disolvente a distintas temperaturas, como se describe a continuación:

Se utilizó el material vegetal triturado del mortero, se pesó por cada tubo un 1gr de muestra triturada, que estaba conformada por todas las partes de la bellota, posteriormente se agregaron 10 mL de cada disolvente en el orden siguiente:

DISOLVENTES:

1. Metanol
2. Etanol
3. Isopropanol
4. Cloruro de Metileno
5. Cloruro de Metileno + Acetona
6. Agua
7. Acetato de Etilo
8. Hexano
9. Acetona

Se dejaron en reposo (maceración) las muestras con el disolvente para realizar la extracción a temperatura ambiente (25°C) durante un par de días, y consistió únicamente del disolvente en contacto con el material vegetal triturado; para evitar las interferencias, se cubrió con papel parafilm la parte superior de cada tubo para evitar la contaminación de la muestra y la evaporación del disolvente.

SELECCIÓN DE SISTEMA PARA PURIFICAR POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

De acuerdo a las características del extracto seleccionado respecto al contenido de metabolitos transferidos al disolventes, se buscó un sistema por el cual se pudieran eluír y desplazar de manera diferencial sus componentes, es decir, no nos funcionaría un sistema que sea tan fuerte en su constante dieléctrica como lo es el agua y que al momento de desplazar los grupos de moléculas a través del soporte de gel de sílice los arrastre por igual, por el contrario se requiere un sistema el cual esté en una medianía ideal para poder aprovechar las diferencias de afinidad de estas sustancias con la fase estacionaria y separarlas de manera más precisa. A continuación, siguiendo los procedimientos generales descritos por las líneas de investigación desarrolladas en el Laboratorio de Investigación del Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, se propusieron dos mezclas, una de solventes con bajas polaridades como lo son el hexano y acetato de etilo y otra con solventes con alta polaridad como lo son el cloruro de metileno y el etanol, en las siguientes proporciones:

SOLUCIONES UTILIZADAS:

- Sistema 5:5 Acetato de Etilo: Hexano
- Sistema 8:2 Cloruro de Metileno: Etanol

Una vez establecidas estas mezclas como la fase móvil de la CCF se procedió a realizar las cromatografías correspondientes en capa fina, comparando su afinidad con todos y cada uno de los extractos obtenidos en la extracción por maceración.

EMPACAMIENTO PARA EXTRACCIÓN CON METODOLOGÍA SOXHLET

Posteriormente al triturado de las bellotas se pesaron en una balanza analítica hasta tener la muestra de 30 gramos; utilizando papel filtro se “empacó” el sustrato en una especie de caja bien apretada, se sujetó con aguja e hilo cosiendo los bordes para evitar que el material solido escapara, se utilizó aproximadamente 400 cm^2 de papel filtro para cada paquete envolviéndolo en un cuadrado de 5cm X 10cm las dimensiones especiales para poder entrar dentro de la cámara destinada a tener el sustrato en el equipo soxhlet.

EXTRACCIÓN MÉTODO SOXHLET

Se montó el sistema en un soporte universal con pinzas de 3 dedos, se colocando la parrilla de inducción para alimentar con energía térmica a un matraz con solvente, este a su vez está conectado a un refrigerante con recirculación de un equipo enfriador-recirculador (que contiene anticongelante y agua para ayudar a la condensación del disolvente). El material vegetal de la bellota seca y molida se colocó en un cartucho de papel filtro en el reservorio del equipo Soxhlet con disolvente, durante el tiempo suficiente para observar el punto de quiebre. Se realizan los “quiebres” que sean necesarios (cada vez que se vacía el contenido del sifón, es un “quiebre”), a una temperatura de 40º- 60º C. Al término de este tiempo, se recuperó y guardó el disolvente con el extracto. Los extractos que se obtienen respectivamente se concentraron en el rotavapor para la recuperación del disolvente que puede volver a ser utilizado, y obtención del extracto del material vegetal.

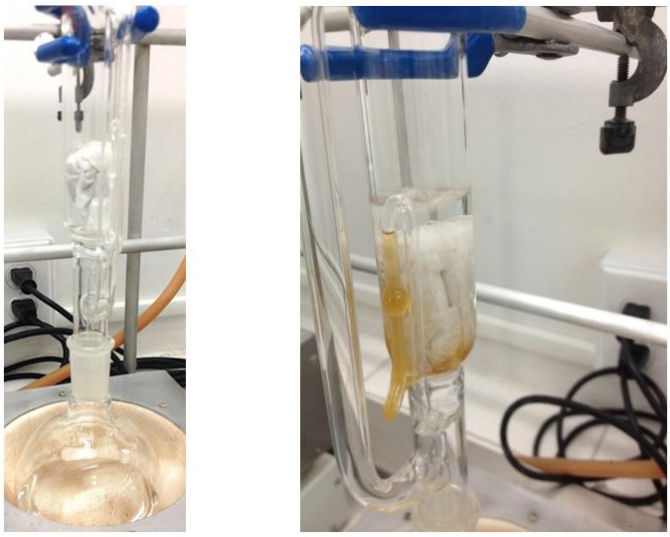


Figura 39 sistema de extracción por método soxhlet.

Vemos a la izquierda el sistema montado y a la derecha un acercamiento a la cámara donde contiene el empaque del sustrato y también su mecanismo de punto de quiebre, que le permite recolectar la extracción y regresarla al matraz de calentamiento.

Figura 40 Sistema rotavapor

Aquí se coloca el matraz sin bala de agitación y se procede a secar el solvente mediante temperatura y presión baja, para poder conservar el extracto sin solvente.

PURIFICACIÓN DE SUSTANCIAS POR COLUMNA CROMATOGRÁFICA TIPO FLASH

Se juntaron los extractos de las anteriores extracciones en un solo matraz, diluyendo el extracto en MeOH por ser un solvente muy polar, ya que queremos diluir nuestro extracto en el menor volumen posible. Se agregó gel de sílice al matraz hasta el nivel del volumen de la solución. Se concentró el matraz en un equipo rotavapor, quedando el extracto adsorbido en el gel de sílice seco.

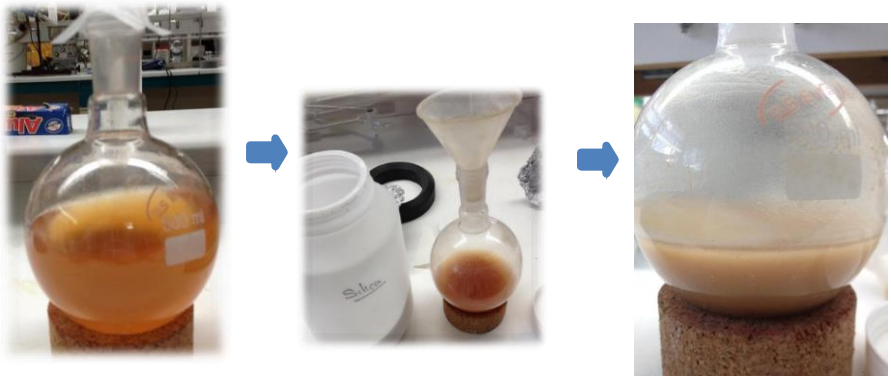


Figura 41 Diagrama de flujo del proceso de adición del extracto del soxhlet al gel de sílice.

Figura 42 Evaporación del disolvente restante y secado del gel de sílice por medio de un equipo rotavapor.

El gel de sílice se sacó del matraz y se colocó en una columna de vidrio, dejando debajo de esta una capa de sílice limpia de aproximadamente 12 cm.

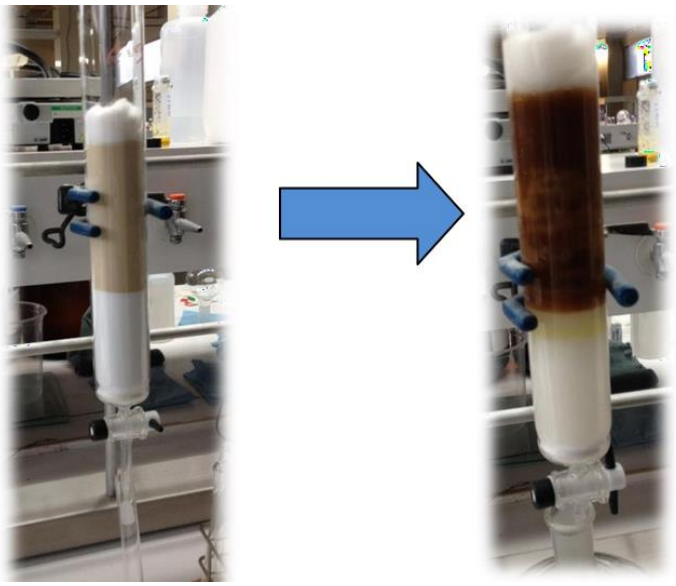


Figura 43 A la columna se le hace pasar hexano (disolvente no polar) para ayudar a eluír la muestra.

Al sistema de cromatografía en columna tipo flash se incorporó una bomba de aire al sistema para generar presión y así separar más rápido los compuestos. Se fue agregando el sistema de disolventes para eluír la muestra a través de la fase estacionaria (gel de sílice) según se vean retenidos los compuestos presentes. Se recolectó cada fracción de sistema que atravesaba la columna en una gradilla de tubos de ensayo y se realizó el monitoreo de dichas fracciones por CCF para verificar su pureza y que la separación se llevó a cabo; las fracciones que contenían el mismo compuesto puro se recolectaron en un matraz para llevarlo a evaporar en el rotavapor. Se utilizó un sistema polar conformado por 8 partes de CH_2Cl_2 y 2 de EtOH.

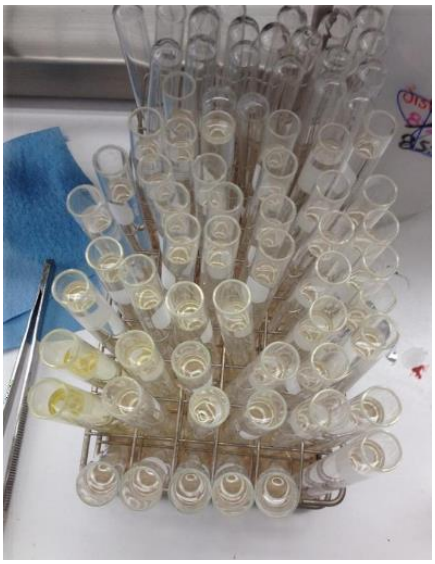


Figura 44 Gradilla donde se recolectó las fracciones de la cromatografía en columna.

Durante la recolección de las fracciones del sistema eluyente, se observaron muchas sustancias juntas –lo cual es frecuente que ocurra- indicativo de que no se logró una buena separación, hecho que dificultaba su purificación. Algunas fracciones que lograron separarse puras, al identificarse después de un tiempo se descomponían, lo que nos llevó a concluir que los factores externos afectan los compuestos de manera directa: luz, aire. Los compuestos presentes en nuestras muestras vegetales son sensibles a la luz y el aire, por lo que cuidamos y controlamos dichos factores (condiciones) en las extracciones posteriores para poder determinar sus condiciones ideales y facilitar su identificación.

Los compuestos puros se identificaron por medio de cromatografía en capa fina y se concentraron en un equipo rotavapor a sequedad. Para realizar la verificación del contenido de compuestos en cada muestra concentrada, se agregó un poco de disolvente polar (MeOH) para confirmar las muestras, sin embargo, pero se observaba en casi todos los casos excepto uno, en el cual se descomponen las muestras en más compuestos.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PREPARATIVA

Por las dificultades que representa lograr la separación por cromatografía en columna sin que las fracciones recolectadas se descompongan, se decidió utilizar un método de separación alternativo para aislar los productos en un menor tiempo mediante cromatografía en capa fina preparativa. Se utilizó como muestra la extracción de la columna con Acetato de Etilo, y esta se aplicó a una placa de cromatografía preparativa soportada en vidrio (20 cm X 20cm), la cual cuenta con la misma fase estacionaria de gel de sílice, pero con un grosor mayor a las soportadas en aluminio de las placas de CCF, lo cual permite que esta.

El procedimiento es similar al que se realiza con las pequeñas tiras cromatográficas: se trazó una línea de partida por encima del nivel del solvente y ahí se aplicó la muestra; se utiliza una cuba especial para hacer correr la placa, se realizan dos con el mismo extracto, y utilizando como fase móvil sistema 7:3 Acetato de Etilo/ Hexano.

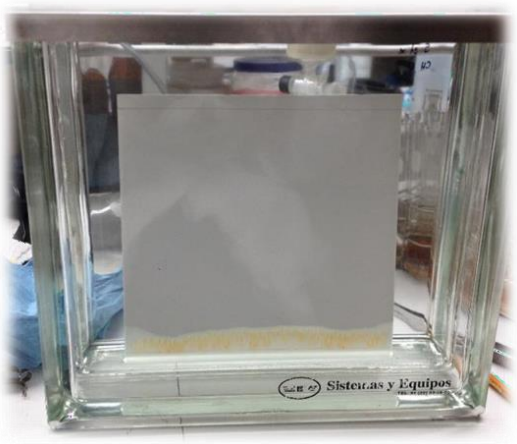


Figura 45 Placa de cromatografía dentro de la cuba cromatográfica.

Al finalizar la cromatografía se utilizó una lámpara de luz ultravioleta para revelar las zonas donde se encontraban analitos puros y proceder a la recuperación mediante raspado de esas zonas. El gel de sílice con la muestra pura fue filtrado por medio de un embudo con una cama de gel de sílice limpia y cloruro de metileno para eluír el contenido, después se evaporó el solvente en un evaporador rotatorio.

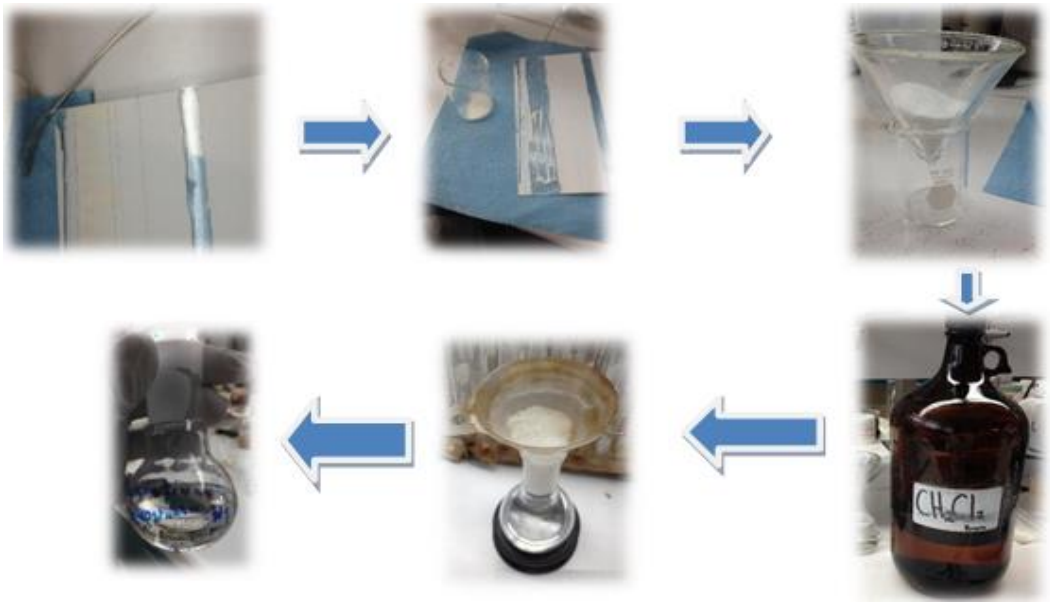


Figura 46 Diagrama del proceso realizado con cada uno de los analitos obtenidos.

EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL POR MICROONDAS

Este procedimiento de extracción aprovecha que el calentamiento con microondas no es un proceso de convección o conducción, es un calentamiento dieléctrico. La metodología de extracción no convencional fue desarrollada en un microondas focalizado marca Anton Paar, modelo Monowave 300, donde las extracciones fueron llevadas a cabo en un vial cerrado neumáticamente a presión, y monitoreada la presión y la potencia de salida entregada; la temperatura fue monitoreada por un sensor infrarrojo.

El enfriamiento del vial fue realizado con aire seco comprimido. Se utilizaron viales de 10 mL de vidrio borosilicato con septa. Se examinó y diseño el experimento a manera de preservar los antioxidantes contenidos en las muestras, ya que era imperativo utilizar una metodología de mayor rapidez para evitar la descomposición o formación de subproductos por la interacción de los analitos.

El procedimiento general consistió en colocar 1.85gr y 2.61 de triturado sin corteza de las

bellotas de la especie *Quercus rugosa* en 5 mL del disolvente en este caso Metanol. Las condiciones del ensayo fueron 170°C y agitación a 600rpm, tiempo de 3 minutos. Al finalizar este tiempo se obtuvo el extracto asistido por microondas.

Figura 47 Equipo de extracción asistida por microondas Microwave Síntesis Reactor – Monowave 300. Laboratorio del Jardín Botánico del Instituto de Ciencias BUAP.

Después de concluida la extracción se colocaron los viales en el rotavapor para evaporar el Metanol durante aproximadamente 20 minutos cada uno, asegurándonos la evaporación de todo el disolvente.

DETERMINACIÓN DE DENSIDAD Y PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN

Se utilizó un picnómetro de 10ml a temperatura ambiente (25°C) para poder usar esta medida se tuvo que diluir el extracto en proporción 1:5, todo se pesó en una balanza analítica por triplicado mínimamente.

Consistió básicamente en obtener las densidades del solvente sin extracto y el solvente con extracto, para conocer la diferencia en densidades y así determinar el peso del total de los componentes extraídos en cada extracto. Para concretarlo se tomaron los pesos de un picnómetro de 10 ml vacío, lleno con Etanol y lleno con el extracto diluido, se tomó el valor empírico del Etanol ya que éste se encontraba al 78% con 22% de agua.

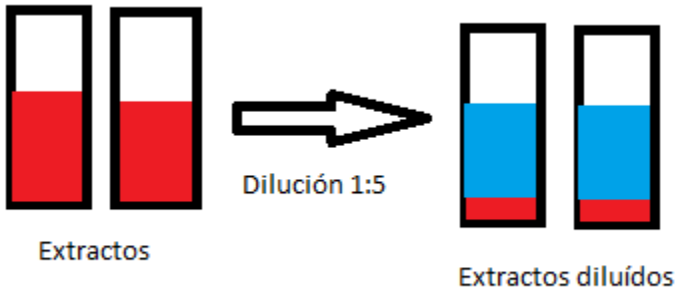


Figura 48 Dilución de los extractos.

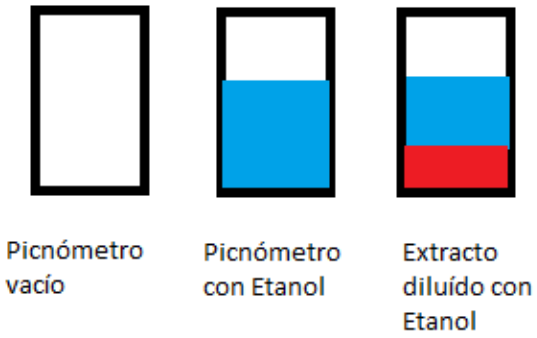


Figura 49 Pesos indispensables para conocer el peso del extracto.

RELACIÓN DE CONSTANTE DIELÉCTRICA Y PORCENTAJE DE EXTRACTO EN EQUIPO SOXHLET

Se hizo un estudio para relacionar la cantidad de peso del extracto final con diferentes disolventes utilizando la misma cantidad de sustrato, esto se realizó principalmente para seleccionar de manera preliminar el disolvente más conveniente para extraer flavonoides

mediante el sistema soxhlet y al mismo tiempo para caracterizar por medio de resonancia magnética nuclear los extractos para conocer la proporción de los grupos que contienen, es decir; las moléculas más polares como carbohidratos son altamente solubles en disolventes como el agua, y en un ejemplo inverso los compuestos menos polares como lo son los aceites esenciales son más afines a ser disueltos por solventes menos polares como el hexano, así se creó una correlación del peso del extracto con la constante dieléctrica del disolvente (Masschelein-Kleiner, 2004) , con la cual podemos también grosso modo crear un espectro de la proporción de moléculas que están contenidas en el sustrato.

Se utilizaron los siguientes disolventes: hexano, éter etílico, acetato de etilo, cloruro de metileno, acetona, etanol, metanol y agua. La extracción se hizo con un equipo Soxhlet durante 6 horas con 20 gr de Muestra y protegiendo el equipo soxhlet con un recubrimiento de aluminio para evitar la degradación. Se evaporó el disolvente en el sistema rotavapor y al tener una muestra lo más seca posible se pesó el contenido, todo esto se realizó por triplicado.

METODOLOGÍAS ESPECTROSCÓPICAS: CUALITATIVAS Y CUANTITATIVAS.

ELUCIDACION ESPECTROSCOPICA POR RMN

La técnica de resonancia magnética nuclear se realizó con los extractos obtenidos anteriormente con hexano, éter etílico, acetato de etilo, cloruro de metileno, acetona, etanol, metanol y agua; tomando una pequeña muestra con una espátula y diluyéndolo en cloroformo deuterado ($CDCl_3$) y filtrándolo para evitar que partículas sólidas quedaran suspendidas. Todas las muestras se llevaron en tubos especiales para RMN, los cuales son de cuarzo de con un diámetro de 5 mm, y los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por medio de un equipo Bruker de 500MHz y se realizó un estudio de Protón (^{1}H) para cada extracto y también uno de Carbono (^{13}C).

DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES POR REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles.

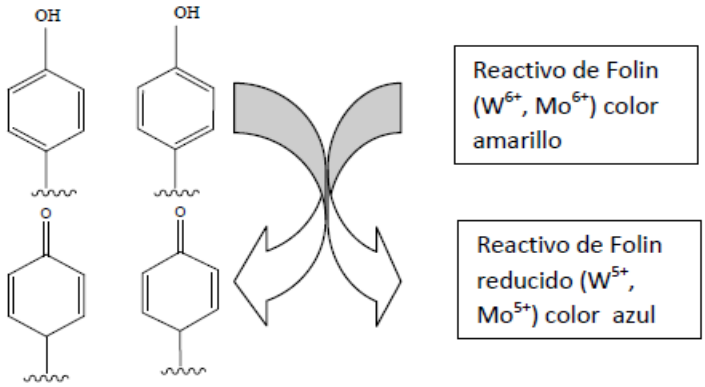


Figura 50 mecanismo de la reacción de Folin-Ciocalteu.

El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total.

La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico (Figura 3). Se trata de un método preciso y sensible, que puede padecer numerosas variaciones, fundamentalmente

en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción. (García Martínez, 2015)

- Se añadió a cada tubo 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu después se preparó un gradiente de concentración de Ácido Gálico 6 mg/ml donde la concentración se ordenó desde 0.6 ug/uL hasta 2.7 ug/uL por duplicado como se muestra en la tabla

- Se prepararon las muestras de los extractos diluidos 1:5 por duplicado y con distintas concentraciones, se introdujeron 20, 50 y 100 uL de los respectivos extractos

- Se incubó por 2 horas en condiciones sin luz

- Se mide la absorción de las disoluciones a 760 nm en el espectrofotómetro.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	100uL:100uL	20uL:80uL:100uL	30uL:70uL:100uL	40uL:60uL:100uL	50uL:50uL:100uL	60uL:40uL:100uL	70uL:30uL:100uL	80uL:20uL:100uL
B	100uL:100uL	20uL:80uL:100uL	30uL:70uL:100uL	40uL:60uL:100uL	50uL:50uL:100uL	60uL:40uL:100uL	70uL:30uL:100uL	80uL:20uL:100uL
C								
D	20uL:80uL:100uL	50uL:50uL:100uL	100uL:100uL		20uL:80uL:100uL	50uL:50uL:100uL	100uL:100uL	
E	20uL:80uL:100uL	50uL:50uL:100uL	100uL:100uL		20uL:80uL:100uL	50uL:50uL:100uL	100uL:100uL	
F								
G								
H								

Figura 51 Preparación de gradilla para Folin-Ciocalteu, en gris el control negativo, en azul la curva de calibración con ácido gálico, en naranja el extracto 1 y en verde el extracto 2.

CAPACIDAD ANTIRRADICALARIA DPPH

La medición de la capacidad antirradicalaria por DPPH consiste en una interacción del analito y el radical libre DPPH, el cual por diferentes mecanismos descritos a continuación se reduce en forma de la molécula DPPHH, en un espectrofotómetro se mide la absorbancia de la molécula DPPH a la longitud de onda (515nm) y se va observando un cambio en la absorbancia al grado en el cual la molécula de DPPH haya sido reducida, lo cual se mide a diferentes concentraciones del analito para poder recolectar los datos en curva de inhibición que relacione la concentración de analito y la reducción del radical libre.

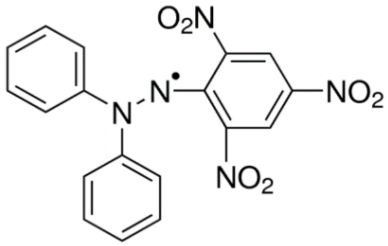


Figura 52 Radical libre DPPH

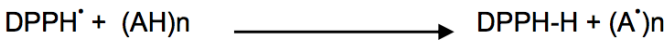


Figura 53 reacción principal donde AH es un antioxidante que dona los átomos de hidrógeno lo que da como resultados radicales con estructuras moleculares relativamente estables. (Skowyra, 2014)

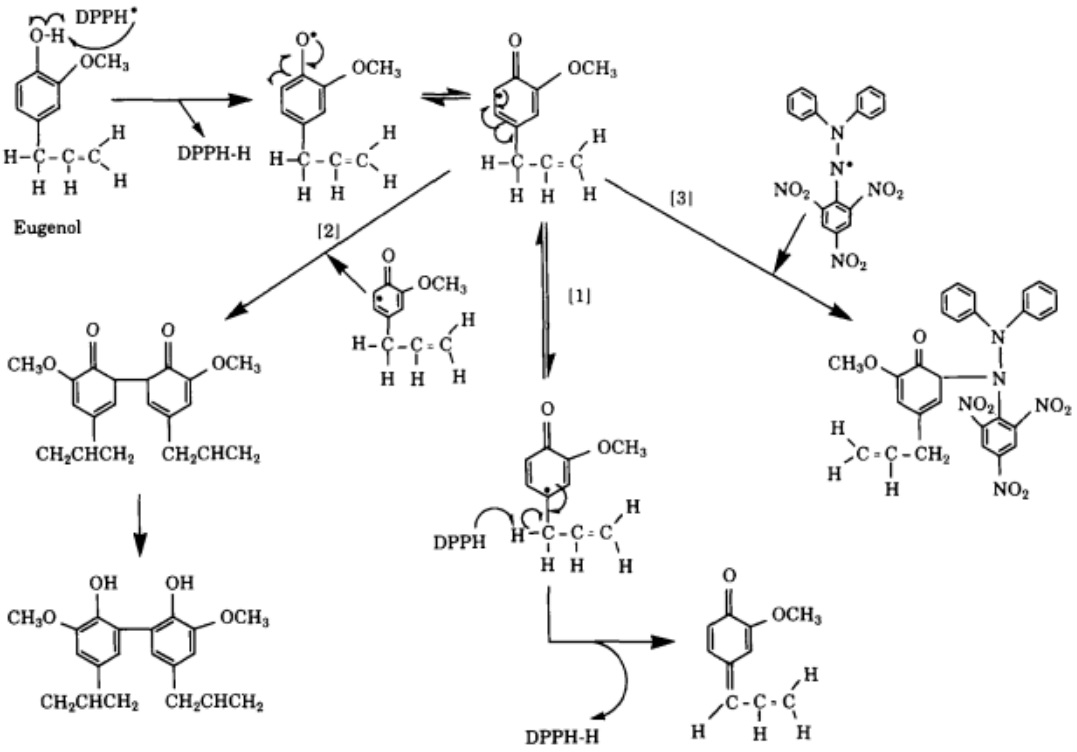


Figura 54 vemos los 3 tipos de reacciones llevada a cabo en esta metodología.

En la figura anterior tenemos la molécula de Eugenol, un compuesto con características antioxidantes, el cual al entrar en contacto con la molécula de DPPH le dona un protón, a continuación vemos que del resultado se deriva (1) la donación de un segundo protón, (2) la dimerización de los radicales fenoxilos (3) una molécula de DPPH se acompleja con el radical fenilo , cabe remarcar que el mecanismo 2 y 3 son solo posibles en moléculas con la posición orto o para libres. (Brand-Williams, 1995)

En esta ocasión se hizo por triplicado del extracto #2 ya que era el más optimo en cuanto a las condiciones del cuidado que se le dio en el almacenado y extracción.

1. Se monta la placa de trabajo (ELISA) con 100uL de Metanol en cada pozo a utilizar, solo en la fila (a) del pozo 3 al 8 se colocaron 200 uL de extracto 2 diluido 1:10, es decir con una concentración de 0.06371 ug/uL

	1	2	3	4	5	6	7	8
a	100 metanol	100 metanol	200 ext 2	200 ext 2	200 ext 2	200 ext 2	200 ext 2	200 ext 2
b	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol
c	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol
d	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol
e	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol
f	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol
g	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol
h	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol	100 metanol

Figura 55 disposición para el ensayo en la placa de 96 pozos

2. Se realiza dilución de la siguiente forma en todas las columnas, tomando 100uL del pozo en la fila (a) y resuspendiendo el contenido en el pozo (b), después se repite el procedimiento tomando 100uL de la fila (b) y se resuspenden en el pozo (c) así consecutivamente hasta llegar a la fila (h), se realiza ordenadamente y por cada columna, es decir (a1 - b1 - c1 - d1 - e1 - f1 - g1 – h1) separado del orden (a2 - b2 - c2 – d2 – e2 - f2 – g2 -h2) hasta llegar a la columna numero 8

X								
100 metanol	tomar 100							
100 metanol	pasar los 100	tomar 100						
100 metanol		pasar 100	tomar 100					
100 metanol			pasar 100	tomar 100				
100 metanol				pasar los 100	tomar 100			
100 metanol					pasar 100	tomar 100		
100 metanol						pasar 100	tomar 100	
final 100							pasar los 100	quitar 100

Figura 56 procedimiento de dilución de las columnas

3. Al final nos quedamos con estos volúmenes expresados en uL para cada pozo.

	1	2	3	4	5	6	7	8
a	100 metanol	100 metanol	100 ext 2	100 ext 2	100 ext 2	100 ext 2	100 ext 2	100 ext 2
b	100 metanol	100 metanol	50 metanol + 50 ext 2	50 metanol + 50 ext 2	50 metanol + 50 ext 2	50 metanol + 50 ext 2	50 metanol + 50 ext 2	50 metanol + 50 ext 2
c	100 metanol	100 metanol	75 metanol + 25 ext 2	75 metanol + 25 ext 2	75 metanol + 25 ext 2	75 metanol + 25 ext 2	75 metanol + 25 ext 2	75 metanol + 25 ext 2
d	100 metanol	100 metanol	87.5 metanol + 12.5 ext 2	87.5 metanol + 12.5 ext 2	87.5 metanol + 12.5 ext 2	87.5 metanol + 12.5 ext 2	87.5 metanol + 12.5 ext 2	87.5 metanol + 12.5 ext 2
e	100 metanol	100 metanol	93.75 metanol + 6.25 ext 2	93.75 metanol + 6.25 ext 2	93.75 metanol + 6.25 ext 2	93.75 metanol + 6.25 ext 2	93.75 metanol + 6.25 ext 2	93.75 metanol + 6.25 ext 2
f	100 metanol	100 metanol	96.875 metanol + 3.125 ext 2	96.875 metanol + 3.125 ext 2	96.875 metanol + 3.125 ext 2	96.875 metanol + 3.125 ext 2	96.875 metanol + 3.125 ext 2	96.875 metanol + 3.125 ext 2
g	100 metanol	100 metanol	98.43 metanol + 1.5625 ext 2	98.43 metanol + 1.5625 ext 2	98.43 metanol + 1.5625 ext 2	98.43 metanol + 1.5625 ext 2	98.43 metanol + 1.5625 ext 2	98.43 metanol + 1.5625 ext 2
h	100 metanol	100 metanol	99.21 metanol + 0.78 ext 2	99.21 metanol + 0.78 ext 2	99.21 metanol + 0.78 ext 2	99.21 metanol + 0.78 ext 2	99.21 metanol + 0.78 ext 2	99.21 metanol + 0.78 ext 2

Figura 57 volúmenes estimados en la placa de 96 pozos, expresados en uL

4. Se agregan 100uL de DPPH a cada uno de los pozos sombreados en azul en la siguiente figura

	1	2	3	4	5	6	7	8
a	100 metanol	100 metanol	100 ext 2	100 ext 2	100 ext 2	100 ext 2	100 ext 2	100 ext 2
b	100 metanol	100 metanol	50 metanol + 50 ext 2	50 metanol + 50 ext 2	50 metanol + 50 ext 2	50 metanol + 50 ext 2	50 metanol + 50 ext 2	50 metanol + 50 ext 2
c	100 metanol	100 metanol	75 metanol + 25 ext 2	75 metanol + 25 ext 2	75 metanol + 25 ext 2	75 metanol + 25 ext 2	75 metanol + 25 ext 2	75 metanol + 25 ext 2
d	100 metanol	100 metanol	87.5 metanol + 12.5 ext 2	87.5 metanol + 12.5 ext 2	87.5 metanol + 12.5 ext 2	87.5 metanol + 12.5 ext 2	87.5 metanol + 12.5 ext 2	87.5 metanol + 12.5 ext 2
e	100 metanol	100 metanol	93.75 metanol + 6.25 ext 2	93.75 metanol + 6.25 ext 2	93.75 metanol + 6.25 ext 2	93.75 metanol + 6.25 ext 2	93.75 metanol + 6.25 ext 2	93.75 metanol + 6.25 ext 2
f	100 metanol	100 metanol	96.875 metanol + 3.125 ext 2	96.875 metanol + 3.125 ext 2	96.875 metanol + 3.125 ext 2	96.875 metanol + 3.125 ext 2	96.875 metanol + 3.125 ext 2	96.875 metanol + 3.125 ext 2
g	100 metanol	100 metanol	98.43 metanol + 1.5625 ext 2	98.43 metanol + 1.5625 ext 2	98.43 metanol + 1.5625 ext 2	98.43 metanol + 1.5625 ext 2	98.43 metanol + 1.5625 ext 2	98.43 metanol + 1.5625 ext 2
h	100 metanol	100 metanol	99.21 metanol + 0.78 ext 2	99.21 metanol + 0.78 ext 2	99.21 metanol + 0.78 ext 2	99.21 metanol + 0.78 ext 2	99.21 metanol + 0.78 ext 2	99.21 metanol + 0.78 ext 2

Figura 58 sombrado en azul los pozos a los cuales se les añade 100 uL del reactivo DPPH

5. Se consideran los nuevos volúmenes totales para considerar las nuevas concentraciones en los tubos que contienen 100uL de DPPH

	1	2	3	4	5	6	7	8
a	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL
b	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL
c	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL
d	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL
e	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL
f	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL
g	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL
h	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL	100 uL	200 uL

Figura 59 volúmenes totales de cada pozo.

En la figura anterior necesitamos saber los volúmenes totales para tomar en cuenta las nuevas concentraciones, ya que al agregar 100 uL quedarían diluidas 1:2, es decir, en los

pozos sin DPPH el gradiente de uL de extracto 2 partía de 100uL en los pozos (a) hasta llegar a 0.7812 uL en los pozos (h), ahora con los pozos donde fueron añadidos 100uL de DPPH el gradiente parte desde 50 uL de extracto 2 en los pozos (a) hasta 0.39 uL en los pozos (h).

6. Se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente, cubriéndolo de luz con una película de aluminio y se lee a 515 nm con espectrofotómetro Beckman Coutler

7. Los resultados tienen que procesarse, a los valores de absorbancia de los pozos con metanol y Extracto 2 deben restarse a los valores de absorbancia de los pozos que contengan DPPH.

Pozo de reacción (DPPH+ Extracto 2+Metanol) – Pozo de blanco (Extracto 2 + Metanol)

Eso nos daría como resultado la medición exclusiva de la concentración de DPPH, la cual estará relacionada con el valor respectivo de concentración de Extracto 2.

DETERMINACIÓN DE GRUPOS FLAVONOIDES POR REACCION DE SHINODA Y H_2SO_4

Para esta prueba se realizarán 5 soluciones preparadas a 10ml, se macera 1 gramo de materia vegetal del corte histológico en Etanol y después se calienta la muestra a 60°C por 10 minutos, las muestras serán constituidas por las siguientes secciones de la bellota.

A. 1 gr de Tegumento

B. 1 gr de Pericarpo

C. 1 gr de Endospermo

D. 0.33gr de Tegumento + 0.33gr de Pericarpo + 0.33gr de Endospermo

E. Nada (control negativo)

Se realiza el calentado de las muestras y se toman dos tubos con 3ml cada uno, a un tubo se le hace la prueba de Shinoda (Mamani Mayta, 2017), se le agrega una viruta de magnesio y 0.5 ml de HCl concentrado, después se reportan las coloraciones, al otro tubo se le realiza una prueba con H_2SO_4 (una gota de solución al 50% con agua) y se reportan los tonos de colores.

El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos. (Bermejo de Zaa, 2014)

DISCUSION DE RESULTADOS

RECUPERACIÓN DE SUSTRATO (interior) EN RELACIÓN CON EL PESO FRESCO

Se identificó un pigmento de interés en la parte interna de la bellota, se trata de un pigmento que se adhiere en las superficies y que con la exposición al ambiente (aire) cambia de color (se oxida) teóricamente es un compuesto de naturaleza antioxidante.

N° de Bellotas	Peso total	Peso del interior
1	4.24	2.69
2	6.25	4.09
3	10.18	7.12
4	15.08	10.65
5	19.51	13.96
6	23.86	16.76
7	28.56	20.02
8	32.2	22.51
9	34.49	24.03
10	36.91	25.74

Tabla 5 Pesos de bellotas para realizar un promedio del peso de las bellotas en gramos por medio del método de mínimos cuadrados

Diámetro de la bellota	Largo de Bellota
1.65 cm	2.95 cm

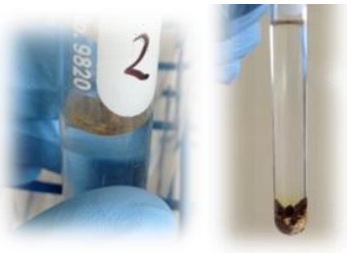
Tabla 4 promedio de dimensiones de las bellotas

Haciendo un ajuste por mínimos cuadrados, la relación promedio del peso de sustrato entre el peso fresco es del **70.39%** esto quiere decir que, del total del peso recolectado, este es el peso realmente utilizable para la obtención de los metabolitos de interés.

PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

METANOL - Se observa una extracción amarillenta de forma ligera a lo largo del tubo, concentrado en su mayoría en la parte de abajo, el soluto y el extracto tienen densidades mayores que el solvente.

ETANOL - Se observa una extracción amarillenta, el soluto y el extracto tienen mayor densidad que el solvente, se observa una tonalidad menos concentrada que el tubo 1



ISOPROPANOL -El compuesto amarillo tiene mayor presencia que en el tubo 1 y 2, solo que se diferencia en el solvente una tonalidad rosa-anaranjada

CLORURO DE METILENO - El soluto tiene menor densidad que el solvente y se establece muy levemente el solvente con pequeñas partículas, no se observa algún extracto.

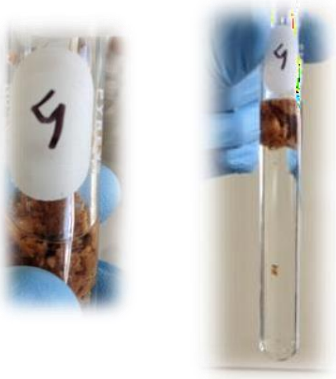
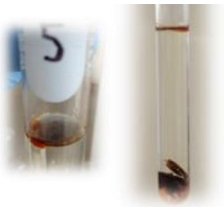


Figura 60 Tubos de ensaye de pruebas de solubilidad.

CLORURO DE METILENO + ACETONA- Se observa perfectamente un extracto de menor densidad que el solvente, diferenciado de la solución por un color marrón, el sustrato tiene mayor densidad que el disolvente.



AGUA- El solvente con un compuesto rosa- anaranjado a lo largo de él, el soluto es más denso que el solvente. La cascara tiene una estructura poco comprimida que flota sobre el disolvente

ACETATO DE ETILO - Se observa poca coloración de un extracto amarillo, sin embargo, también se observa una tonalidad anaranjado- morado muy leve, el soluto es más denso que el disolvente.

HEXANO -Se observa ausencia de extracto, el solvente adquirió una tonalidad anaranjado-morado muy leve, el soluto tiene mayor densidad que el disolvente.

ACETATONA - Se observa un extracto con mayor concentración en la parte inferior del tubo, así como una tonalidad de amirrollo-anaranjado del solvente, la densidad del soluto es mayor a la del solvente.

Figura 61 Tubos de ensaye de las pruebas de solubilidad.

SELECCIÓN DEL SISTEMA PARA PURIFICAR POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

SISTEMA 5:5 **SISTEMA 8:2**

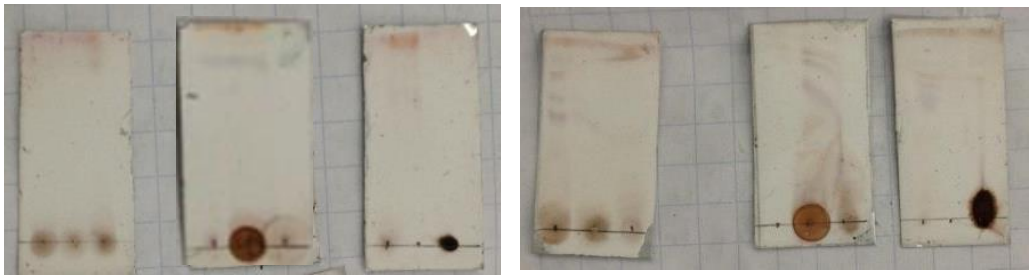


Figura 62 resultados de la CCF de metanol, etanol, isopropanol, cloruro-acetona, agua, acetato, hexano; de izquierda a derecha.

Se seleccionó un solvente por su especificidad al extraer, es decir si observamos la figura anterior en el sistema 5:5 podemos ver que la mayoría de compuestos quedan “en medio” del recorrido por la fase estacionaria, en cambio en el sistema 8:2 no observamos compuestos sino hasta el final del recorrido de la muestra por la fase estacionaria, esto quiere decir que los componentes al ser menos polares, con un sistema de baja polaridad como lo es el 5:5 tiene la misma intensidad en la afinidad con todos ellos, sin embargo al aumentar la polaridad del sistema de la fase móvil podemos concluir que las pequeñas diferencias de afinidad con el nuevo sistema más polar hace que tanto se separen mejor como que se desplacen de una manera más “ordenada y espaciada” que es ideal para su recuperación total. Por lo que se ha decidido optar por el sistema más polar el 8:2 cloruro de metileno y etanol respectivamente.

EXTRACCIÓN EN SOXHLET (alcohol etílico)

Una vez terminada la extracción, se observó cuando la concentración de solvente parecía no llevar más soluto (coloración típica de los fenoles) y se retiró, se secó en el rotavapor y luego se pesó en la balanza analítica, restando el peso del matraz.

El peso del extracto fue de 0.43 gr esto quiere decir que si se utilizaron cargas de 30gr podemos decir que el extracto fue del 1.4% mediante este procedimiento, lo que nos permite comparar la efectividad con nuevas técnicas y poner en la balanza las ventajas y desventajas de trabajar con ella. En este caso en particular, una de las desventajas de trabajar con compuestos antioxidantes y equipos de extracción lenta como lo es el soxhlet, es que, a través del proceso, muchos factores pueden dañar la calidad del extracto, digamos el contacto con el aire interno del sistema y altas temperaturas durante aproximadamente 8 horas, por lo que se debe tomar en cuenta estos factores en caso de compuestos sensibles.

PURIFICACIÓN DE SUSTANCIAS POR COLUMNA CROMATOGRÁFICA

Durante 3 días se utilizó le sistema para obtener una sustancia pura, sin embargo, dada la situación de la alta sensibilidad de los compuestos obtenidos, se optó por realizar otra extracción en diferente sistema y polaridad.

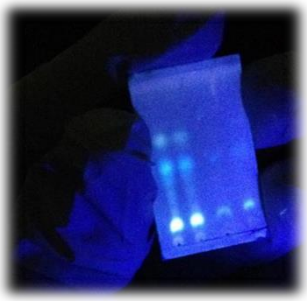


Figura 63 Las placas se revelaban siempre a luz UV.

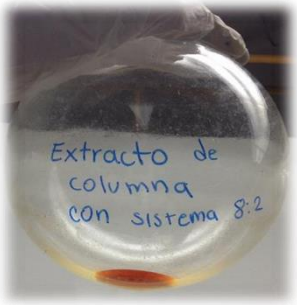


Figura 64 extracto total de la columna.

Se realizó un cambio al procedimiento, sustituyendo el sistema de la columna cromatográfica por uno de menor polaridad; este se conforma por 7 partes de Acetato de Etilo y 3 de Hexano.

Figura 65 Placa de CCF de compuestos "aislados" que se foto-degradan.

Durante 3 días de purificación se logró tener solo un compuesto puro repitiendo los mismos pasos anteriores, después de esto se cambió de sistema por solventes enteros Diclorometano, Etanol, Acetato de Etilo y Metanol. Ahora vertiendo el total de 600 ml de solvente a través de la columna, a excepción del MeOH que solo se corrieron por el sistema 200 ml.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PREPARATIVA

Se reveló al UV las zonas de compuestos puros, posteriormente se procedió a raspar estas zonas con mucho cuidado para remover el gel de sílice con el compuesto y diluirlo en Cloruro de metileno (tridestilado) Se raspó cuidadosamente la zona con el analito, luego se recuperó el gel de sílice y en un embudo se vierte para después diluir los compuestos y depositarlos en un matraz.

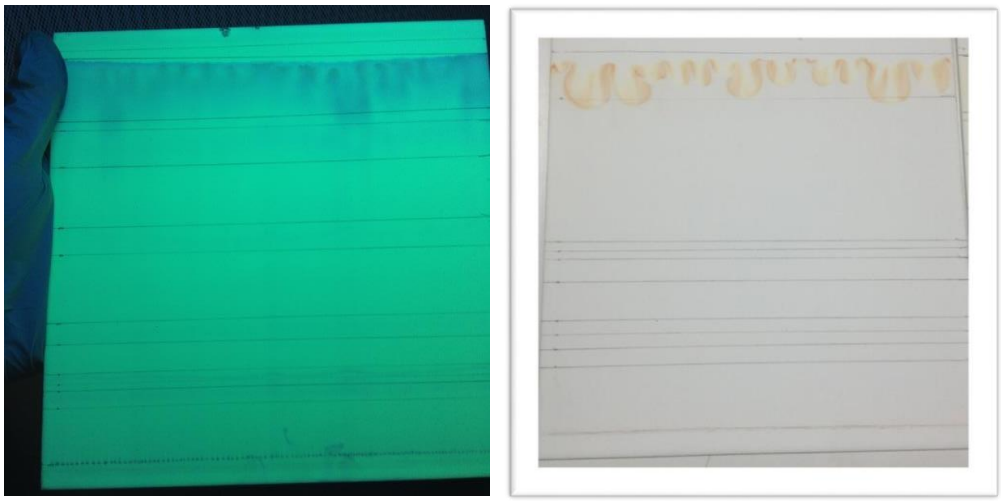


Figura 66 El resultado de la cromatografía en capa fina preparativa, de lado izquierdo se ve la placa en luz ultravioleta

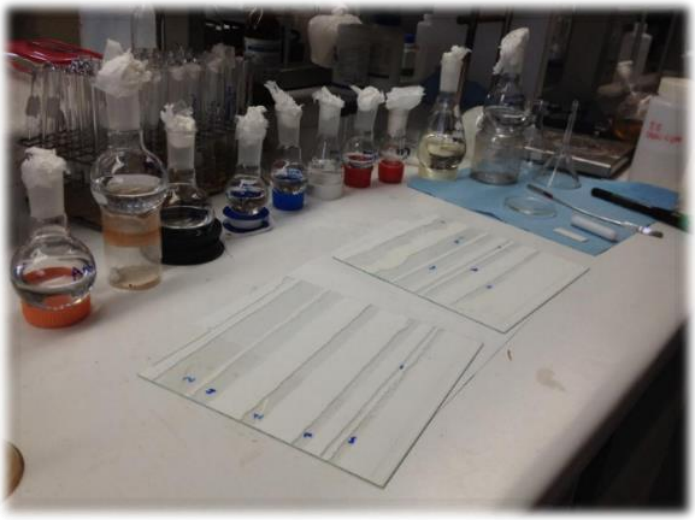


Figura 67 recuperación de todos los analitos separados.

Incluso después de utilizar este método algunos analitos se descompusieron, por lo cual comprobamos los que estaba completamente puros, obteniendo un total de 5 analitos puros mediante esta técnica

Figura 69 Como se puede observar en la placa se muestra como algunas muestras se descompusieron.

Figura 68 Analitos puros.

A pesar de los múltiples esfuerzos para purificar el extracto de flavonoides es casi imposible hacerlo sin degradar los compuestos mediante el uso de gel de sílice, esto se explica debido a su naturaleza ácida que afecta enormemente.

RELACIÓN DE CONSTANTE DIELÉCTRICA Y PORCENTAJE DE EXTRACTO EN EQUIPO SOXHLET

Solvente	Constante dieléctrica	% de extracto
Hexano	2	2.4
Éter Etílico	4.3	1.1
Acetato de etilo	6.02	1
Cloruro de metileno	8.93	0.5
Acetona	20.7	1
Etanol	24.5	1.3
Metanol	32.7	1.2
Agua	80.1	11.7

Tabla 6 Relación peso de extracto-constante dieléctrica del disolvente.

Aquí podemos observar el % de peso del extracto de diversas fases, así como la constante dieléctrica de cada compuesto, de lo cual podemos intuir la naturaleza polar de los componentes de la bellota, en este caso vemos presencia tanto de compuestos no polares, como de elementos polares, sin embargo descartando al agua (por la obviedad de que extrae casi cualquier glucósido de cualquier naturaleza) , observamos que la tendencia es de compuestos no polares en su mayoría, esto nos habla también un complejo contenido de aceites vegetales y biomoléculas (metabolitos primarios).

IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS POR RMN.

Una vez que se obtuvieron los extractos, estos se llevaron a sequedad en el rotavapor. El contenido del extracto se llevó al alto vacío, se tomó una muestra y se disolvió en cloroformo deuterado ($CDCl_3$) y se colocó cada muestra en un tubo de RMN. Se realizó la caracterización de los extractos por Resonancia Magnética Nuclear de ^{1}H. A continuación, se muestran los espectros de RMN de ^{1}H a 500 MHz de los primeros 3 disolventes, donde se observan señales múltiples e intensas en la región de 5 ppm; en el espectro de ^{13}C se distinguen señales entre 120 y 140 ppm, características de dobles enlaces, en particular de estructuras derivadas de los anillos aromáticos de flavonoides. En el espectro de ^{13}C del extracto de éter etílico, se observa una señal en 170 ppm característico para un C de C=O de flavona. En el espectro de ^{13}C del extracto de hexano, se observan las señales para los anillos aromáticos en 130 a 140 ppm y el C del carbonilo de flavona en 173 ppm.

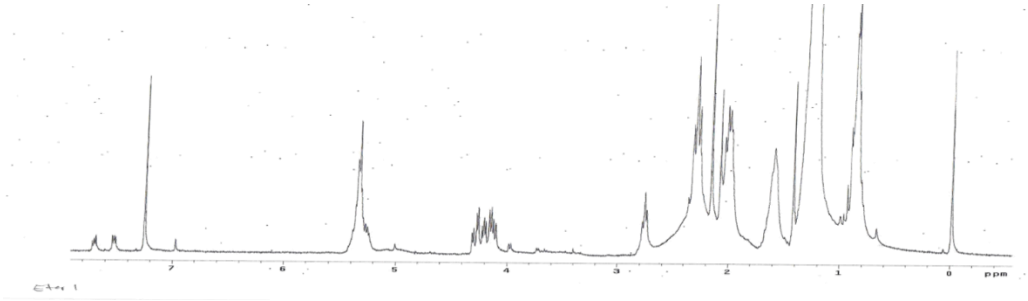


Figura 71 Espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ del extracto de éter etílico.

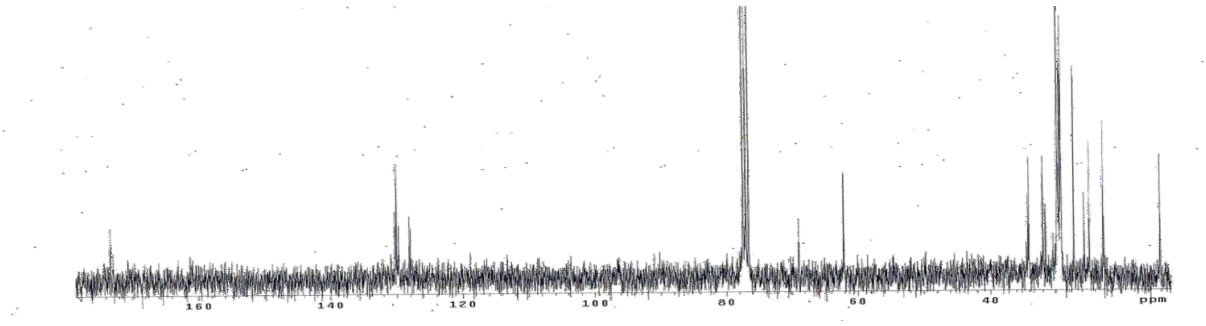


Figura 70 Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en $CDCl_3$ del extracto de éter etílico.

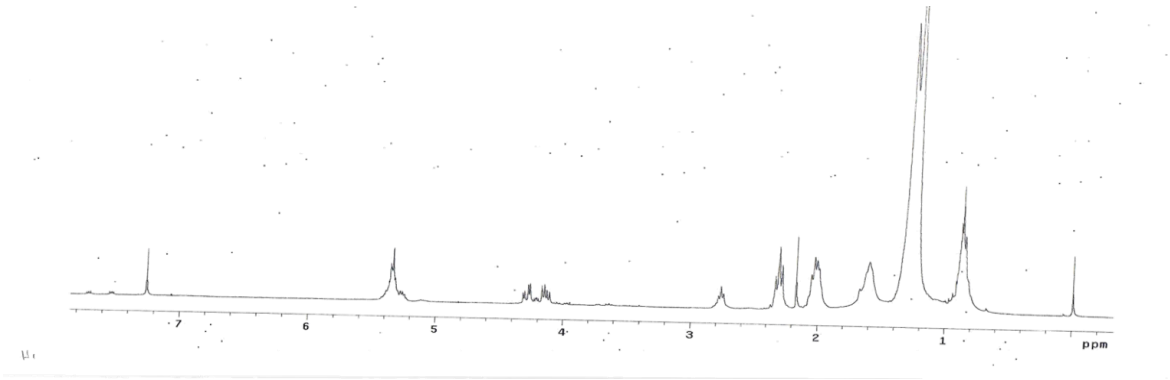


Figura 73 Espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ del extracto de hexano.

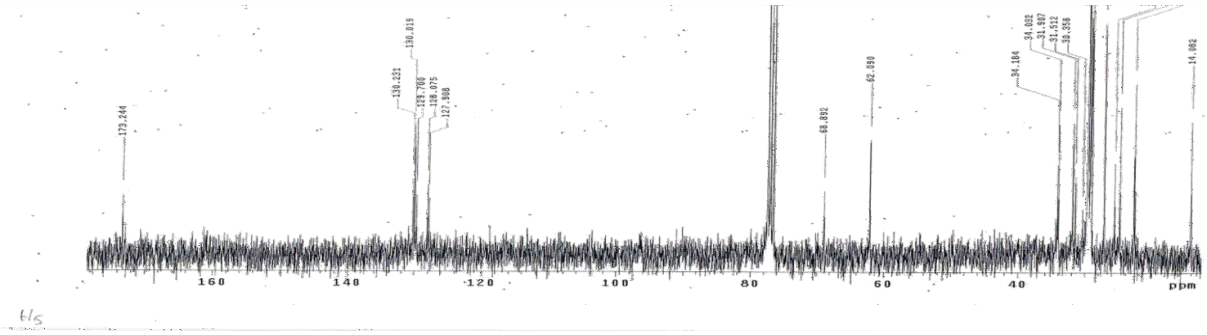


Figura 72 Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en $CDCl_3$ del extracto de hexano.

El espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz del extracto de AcOEt, se observan señales múltiples e intensas en la región de 4 a 5 ppm que pueden pertenecer a glucósidos; en el espectro de RMN de ^{13}C se distinguen señales entre 60 y 70 ppm, características de carbonos base de oxígeno (C-OH, C-O-C), y señales en la región alrededor de 130 ppm que son desplazamientos característicos de estructuras derivadas de los anillos aromáticos de flavonoles o sus glúcidos. En el espectro de ^{13}C del extracto de éter etílico, se observa una señal en 170 ppm característico para un C de C=O de flavona.

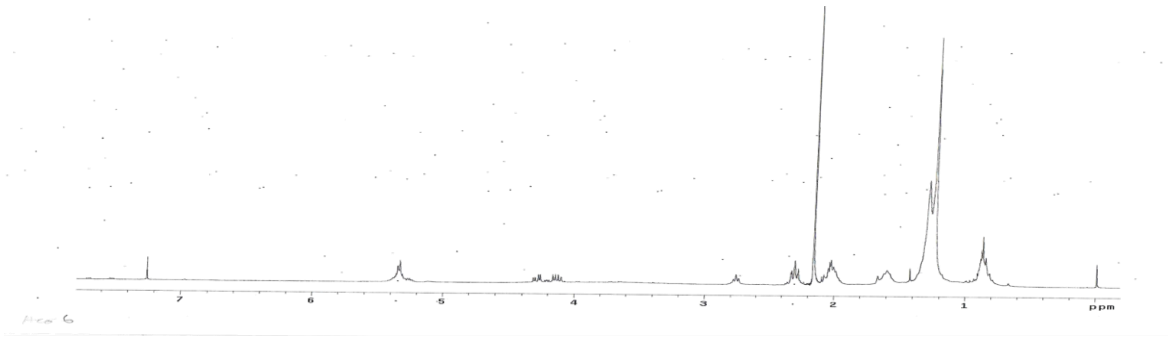


Figura 75 Espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ del extracto de acetato de etilo.

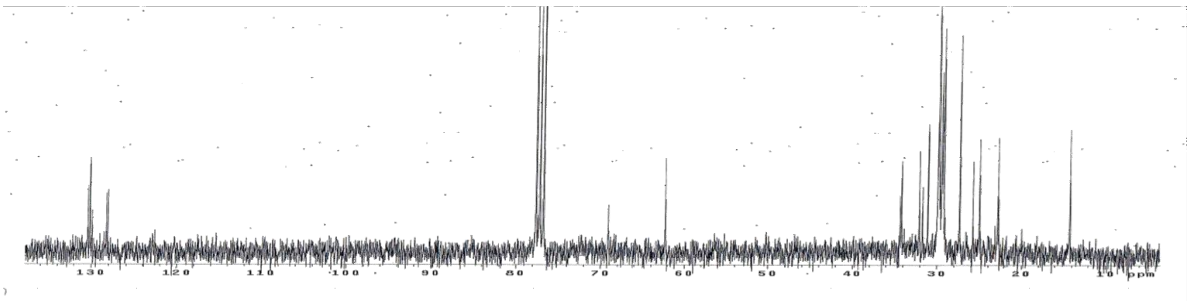


Figura 74 Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en $CDCl_3$ del extracto de acetato de etilo.

En los espectros de ^{1}H de los extractos en donde vamos aumentando la polaridad, se pueden observar la presencia de señales en la región de 7 a 8 ppm, características de compuestos aromáticos, así como señales de hidrógenos unidos a grupos hidroxilos, de igual manera en el espectro de ^{13}C se puede observar la presencia de carbonos aromáticos y carbonos cuaternarios que son base de grupo carbonilo; y a campo más alto se destacan carbonos base de oxígeno, lo que confirma la presencia de compuestos flavonoides en estos extractos.

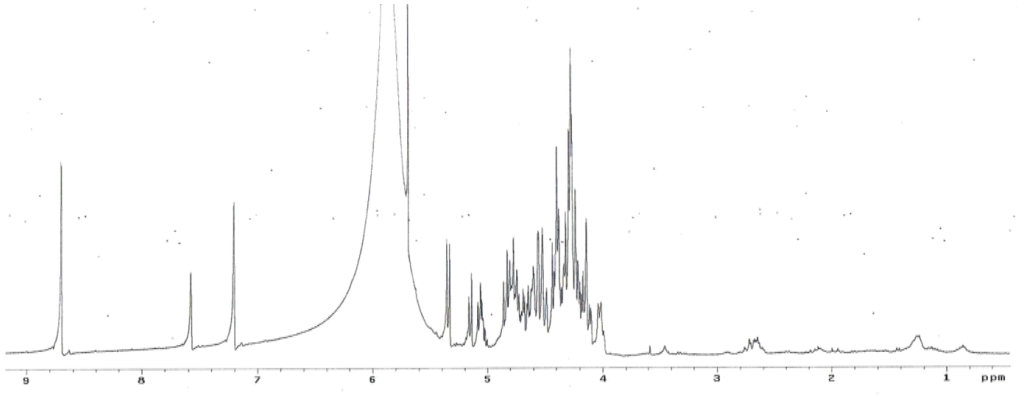


Figura 76 Espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ del extracto de etanol.

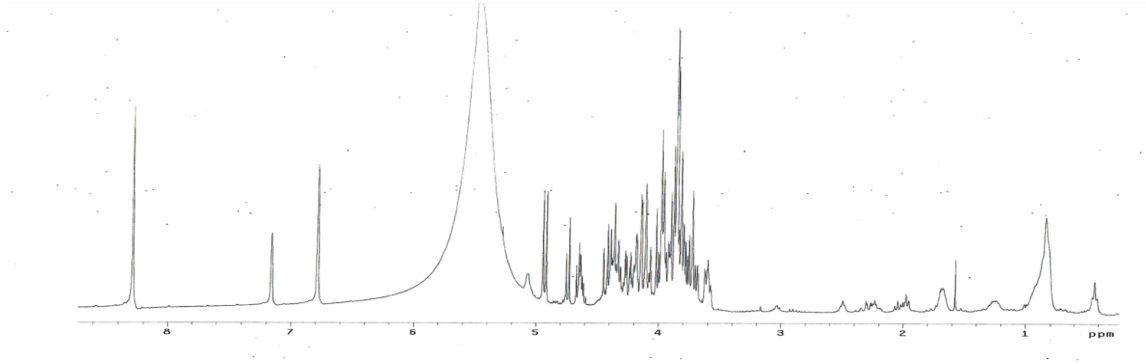


Figura 77 Espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ del extracto de metanol.

.

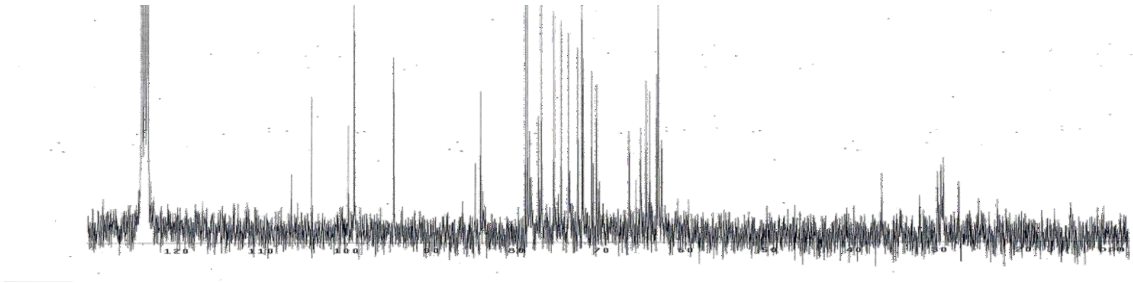


Figura 78 Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en $CDCl_3$ del extracto de metanol.

En los espectros de RMN de ^{1}H del extracto en agua, se pueden observar la presencia de señales en la región de 4 a 5 ppm, características de compuestos con protones unidos a C-O de glucósidos, así como señales de hidrógenos unidos a grupos hidroxilos. Resaltan las señales que se observan en el límite de la ventana espectral en 12 ppm, que puede pertenecer a un protón del OH de un C adyacente a carbonilo de flavona. En el espectro de RMN de ^{13}C no se acumuló el experimento el tiempo suficiente para observar las señales.

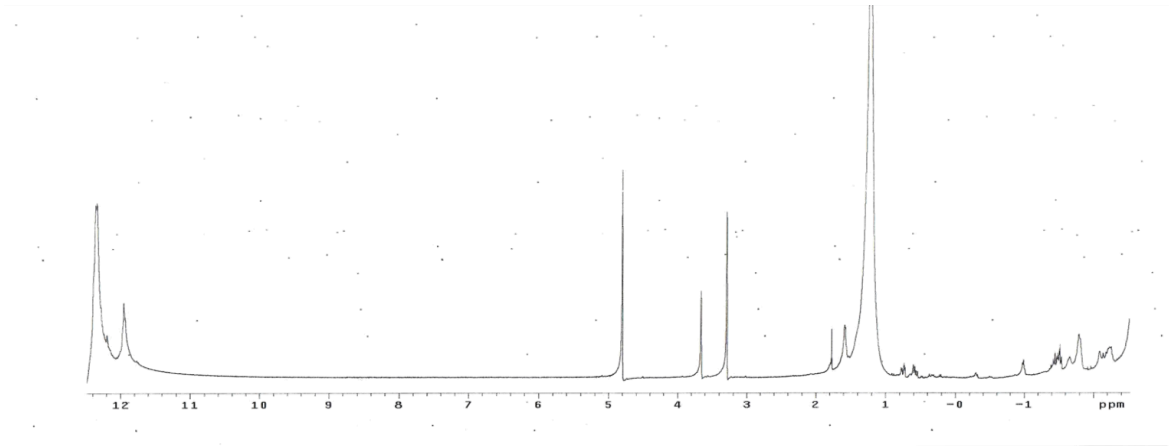


Figura 79 Espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ del extracto de H_2O.

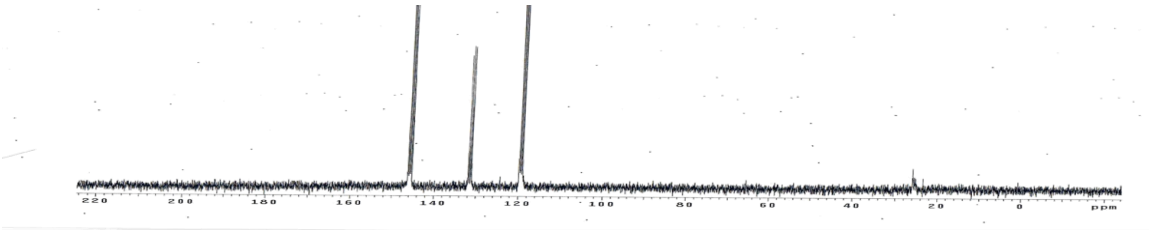


Figura 80 Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en $CDCl_3$ del extracto de H_2O.

Por medio de estos métodos espectroscópicos como la RMN y las pruebas cualitativas, permiten proponer estructuras químicas como flavonoides de núcleo flavona y flavanona. Para acercarnos más a la estructura real se tendría que evaluar con reactivos de desplazamiento químico en RMN y de esta manera confirmar dichas estructuras químicas.

La identificación y caracterización estructural de flavonoides y sus conjugados aislados de material vegetal, como compuestos únicos o como parte de mezclas de productos naturales estructuralmente similares, crean algunos problemas debido a la presencia de formas isoméricas de agliconas flavonoides y sus patrones de glicosilación. Un número de métodos analíticos se utilizan para la caracterización de flavonoides. En muchos casos, análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) (^{1}H y ^{13}C) son necesarios para la identificación inequívoca de compuestos desconocidos; otros métodos instrumentales (espectrometría de masas, espectrofotometría UV e IR) aplicada para la identificación de los compuestos orgánicos no proporcionan la información necesaria para responder a todas las cuestiones estructurales. Utilización de estándares durante análisis y comparación de tiempos de retención, así como propiedades espectrales, especialmente cuando los compuestos son presentes en una mezcla, es crítico.

EXTRACCIÓN ALCOHOLICA POR MICROONDAS

La extracción asistida por microondas tiene varias ventajas, que han sido bien establecidos desde el primer informe de Ganzler (Ganzler, 1986) y la tecnología ha evolucionado bien con el tiempo, con sistemas desarrollados para la química analítica y la extracción de muestras.

En comparación con los métodos convencionales de extracción, la extracción por microondas puede llevar mucho menos tiempo. Por ejemplo, la extracción soxhlet toma al menos 1 hora y a veces 12-24 h para la mayoría de las extracciones, y consume mucho solvente, la extracción por microondas toma alrededor de 10 minutos o menos, lo que

reduce significativamente el tiempo necesario para extracción, que es un factor muy importante en caso de aplicaciones de la química analítica (Chen, 2007). Los períodos de extracción prolongados y la exposición a alta temperatura -en el caso de soxhlet- pueden afectar significativamente la calidad del extracto. Los compuestos termolábiles se pierden durante el proceso, lo que conduce a menores rendimientos. Pero en caso de la extracción por microondas, como el proceso es más rápido, el rendimiento de los compuestos bioactivos es generalmente mayor y comparable a los métodos de extracción modernos como la extracción de líquido presurizado, la extracción de líquido supercrítico y extracción subcrítica. Otro inconveniente de la extracción convencional es que influye en la integridad de los glucósidos flavonoides durante extracción prolongada afectando así la reproducibilidad y estabilidad (Stalikas, 2007), mientras que la degradación de los flavonoides se previene durante la extracción por microondas (Kothari, 2010)

Se obtuvo una solución viscosa de color marrón rojizo y se decantó el contenido del vial sin arrastrar partículas sólidas a otro vial limpio para llevarlo a sequedad en rotavapor, se colocaron en viales ámbar y se guardaron en un refrigerador de laboratorio, a una temperatura de alrededor de 3°C – 7°C y los viales fueron recubiertos con aluminio para evitar la foto-degradación.

Figura 81 vial del equipo de extracción por microondas con la muestra en sólido al fondo.

A veces, si la configuración del equipo utilizado lo permite, el proceso de extracción asistido por microondas es apoyado por alta presión, que mejora significativamente la eficiencia del proceso de extracción, es el caso del ensayo que realizamos, el equipo del que disponemos en el laboratorio funciona con viales sellados neumáticamente. (Lan, 2003)

En extracción asistida por microondas a alta presión, la tasa de aumento de temperatura y presión del sistema está relacionada con la capacidad del solvente para absorber energía de microondas, su calor específico y su calor de vaporización. La combinación de la tecnología de microondas y la presión se han realizado con éxito para la extracción de ginsenósidos (Chen, 2007)y muestra potencial para la extracción de flavonoides, como es posible constatar en nuestros ensayos. En la gráfica de la Figura 64, podemos apreciar, en las condiciones de extracción, al alcanzar la temperatura que programamos en el método desarrollado, la presión que alcanzamos en la muestra es de 8 bares, y esta presión se mantiene constante mientras se aplica potencia y se mantiene la temperatura programada (200 ºC), por lo que podemos confirmar que la extracción se realiza a presión y temperatura constantes en los 5 minutos que dura el calentamiento. Esto mejoró el porcentaje de extracción, redujo el tiempo en el cual la muestra está expuesta a alta temperatura, y el uso de disolvente utilizado.

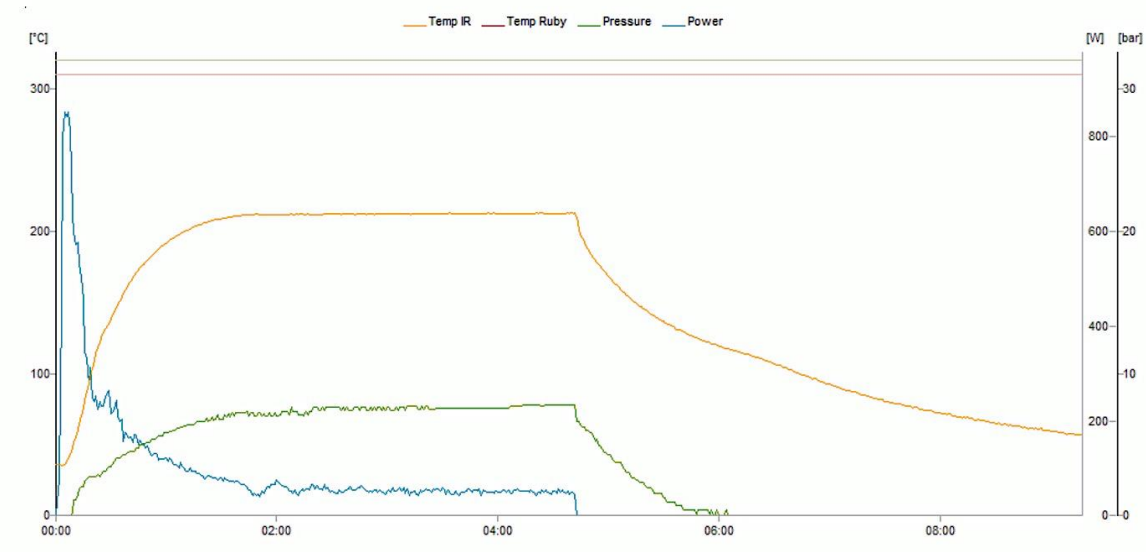


Figura 82 . Gráfica de microondas en la obtención del extracto de las bellotas de Q. rugosa

En general, los procesos de extracción asistidos por microondas son mejor o comparables con la extracción por métodos convencionales. La optimización de los parámetros del proceso y uso de las tecnologías modernas o facilitadoras pueden mejorar significativamente la eficiencia de la extracción. Por tanto, para la mejora de la extracción de flavonoides, todavía hay mucho por explorar en términos de extracción parámetros y tecnologías del proceso. (Wang, 2008)

DETERMINACIÓN DE DENSIDAD Y PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN

Peso del picnómetro vació = 12.4633 gr

Peso de Etanol = 8,348645 gr/10ml

Peso Extracto 1(1:5) = 8.45979167 gr

Peso solo Extracto 1(1:5) = 0.11115 g/10ml

Peso Extracto 2(1:5) = 8.476066607 gr

Peso solo Extracto 2(1:5) = 0.127425 gr/10ml

Peso del sustrato inicial 1: 1.85 gr

Peso del sustrato inicial 2: 2.61 gr

Volumen de extracción (MW): 5mL

	DENSIDAD	**PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN**
Extracto 1	0.55575 g/10ml	15.02%
Extracto 2	0.637125 gr/10ml	12.20%

Tabla 7 Densidad de Extractos y porcentaje de extracción.

PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN PROMEDIO = 13.61%

Este procedimiento fue necesario para poder comparar las concentraciones de los extractos en los siguientes experimentos, de no tenerlos sería prácticamente imposible determinar objetivamente su potencial antioxidante y composición fenólica, también nos aclara el panorama del porcentaje de extracción, cabe recalcar que este análisis no se tenía previsto durante las extracciones en microondas, por lo cual se diluyeron los extractos y perdimos la oportunidad de pesar los extractos secos, para solventar esta situación decidimos medir su densidad y así calcular el peso de los componentes extraídos.

DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES POR REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU

Se calculó una recta relacionando la concentración/absorbancia del Ácido Gálico para extrapolar los resultados de los extractos a equivalentes de ácido gálico

Concentración ug	0	0.6	0.9	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7
PROM	0.2805	2.479	2.633	2.681	2.612	2.7685	2.75	2.773	2.7735

Figura 83 resultados absorbancias de curva de calibración

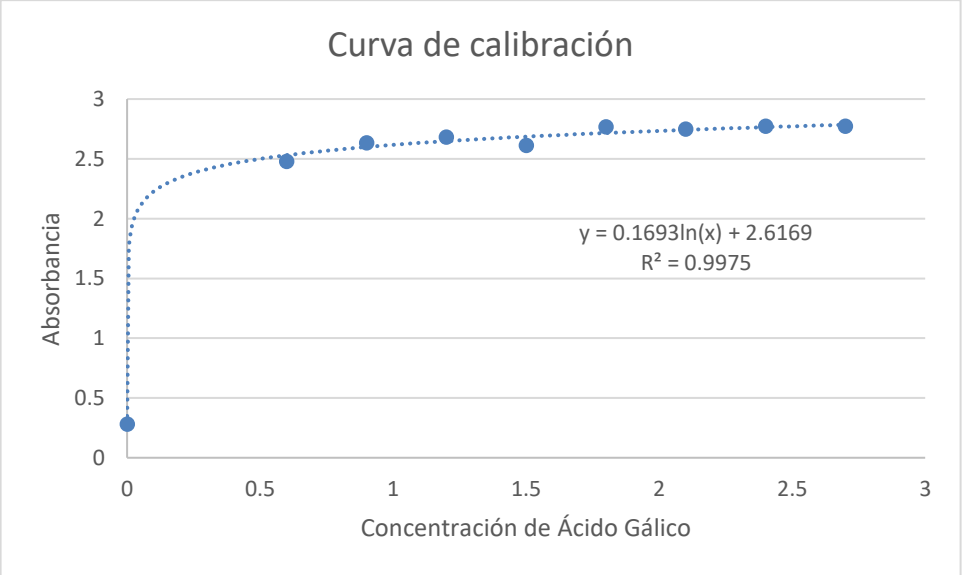


Figura 84 Curva de calibración logarítmica de ácido gálico.

se utilizó en este caso una ecuación logarítmica ya que se ajustaba mejor a los datos y al proceso que se da, a diferencia de la lineal se apega más a la realidad ya que existe una concentración en donde la absorbancia llega a un tope máximo, el cual sería 2.6169

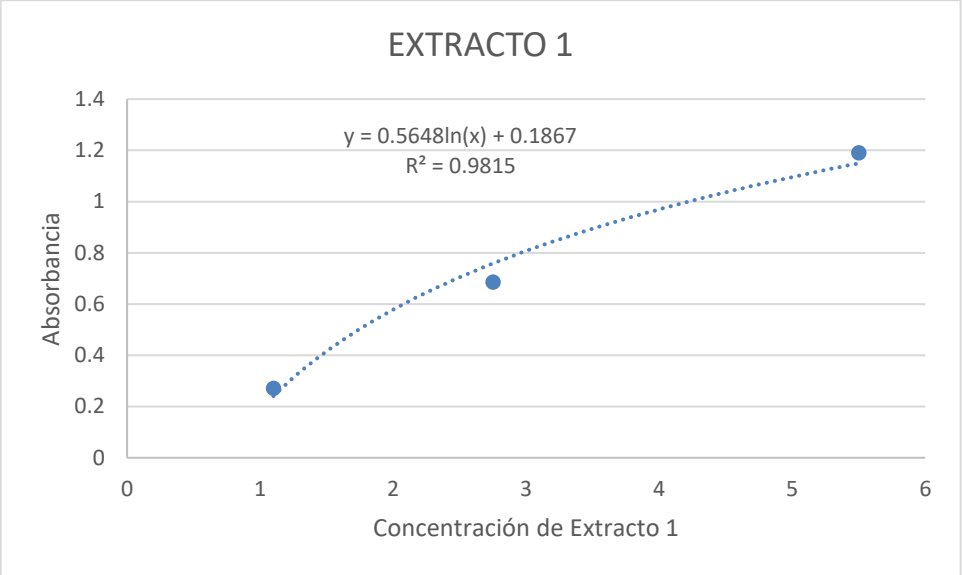


Tabla 8 correlación concentración/Absorbancia de extracto 1.

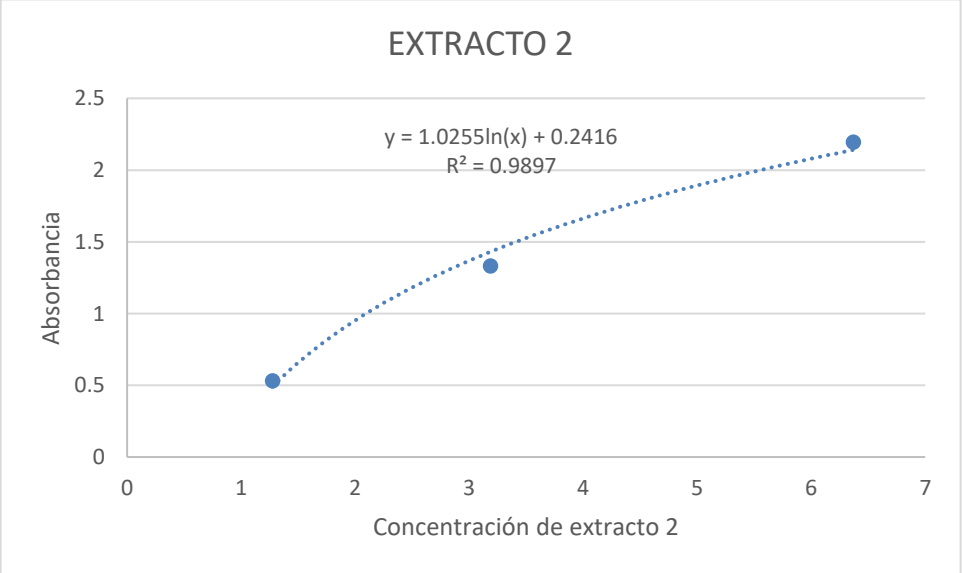


Tabla 9 correlación concentración/Absorbancia de extracto 2.

Las concentraciones de stock del extracto 1 y 2 se disolvieron 1:5 para este ensayo, por lo tanto, como resultado del ensayo de densidad pasaron de 0.055 g/mL y 0.0637 g/mL respectivamente a las concentraciones finales de 11.1 mg/mL para el extracto 1 y 12.742 ug/mL para el extracto 2, a lo cual en la metodología se tomaron 20, 50 y 80 uL por lo tanto resultaron las concentraciones que se muestran en la tabla siguiente relacionadas con el promedio de sus absorbancias.

	EXT1				EXT2		
mg/ml	1.1	2.75	5.5		1.2742	3.1855	6.371
Absorbancia	0.2715	0.686	1.1905		0.532	1.3325	2.196

Tabla 10 Resultados de folin-ciocalteu

Mediante las ecuaciones obtenidas se calculó cual sería la concentración de cada extracto que lograría la misma absorbancia que 1mg/mL de ácido gálico, por lo que se utilizó la ecuación para obtener el valor de absorbancia.

En la ecuación:

$$y = 0.1693 \ln(x) + 2.6169$$

se sustituyó la x por el valor de la concentración que buscamos (1), queda:

$$y = 0.1693 \ln(1) + 2.6169 \qquad y = 2.6169 \text{ (valor de absorbancia)}$$

se despejó la ecuación para obtener la concentración

$$y = m*\ln(x)+b \rightarrow x = e^{(y-b)/m}$$

con lo que se sustituyeron las variables de las dos curvas

Extracto 1 $x = e^{(2.6169-0.1867)/0.5648)}$

x = 11.69 mg/mL para el Extracto 1

Extracto 2 $x = e^{(2.6169-0.2416)/1.0255)}$

x = 6.296 mg/mL para el Extracto 2

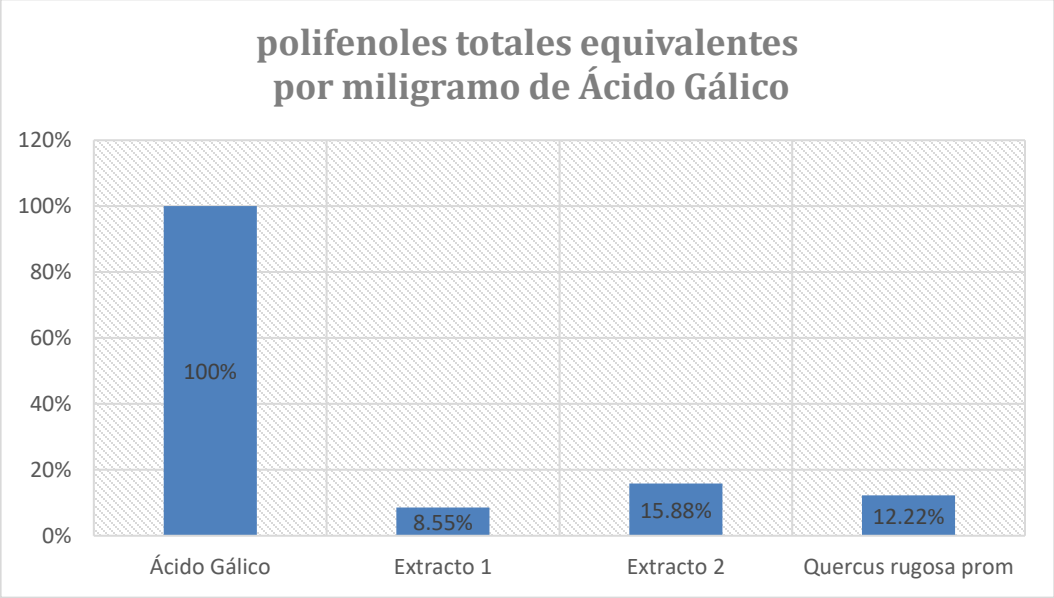


Figura 85 Polifenoles totales equivalentes a miligramo de ácido gálico.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR METODOLOGÍA DE DPPH

Figura 86 Placa de 96 pozos donde se realizó el ensayo de capacidad antioxidante por metodología de radical DPPH.

	1	2	3	4	5	6	7	8
a	0.07	2.68	4.647	5.874	4.874	4.604	4.702	5.246
b	0.062	2.667	4.776	4.755	5.378	4.704	5.873	4.407
c	0.057	2.753	4.28	4.55	4.406	5.377	4.793	4.605
d	0.081	2.761	3.003	4.757	2.559	4.213	2.444	3.997
e	0.074	2.774	1.79	3.907	1.436	3.979	1.466	3.665
f	0.075	2.776	1.023	3.479	0.881	3.468	0.8	3.237
g	0.055	2.686	0.575	3.182	0.471	3.152	0.584	3.071
h	0.06	2.703	0.355	3.012	0.369	3.014	0.356	2.957

Figura 87 resultados de las absorbancias del experimento a 515 nm.

	PROM 1	PROM 2	[Ext2] (3,5,7)	ABS PROMEDIO(3,5,7)	[Ext2] (4,6,8)	ABS PROMEDIO(4,6,8)
a	0.06675	2.725	6.371 ug/uL	4.741	3.1855 ug/uL	5.241333333
b			3.1855 ug/uL	5.342333333	1.5927 ug/uL	4.622
c			1.5927 ug/uL	4.493	0.7963 ug/uL	4.844
d			0.7963 ug/uL	2.668666667	0.3981 ug/uL	4.322333333
e			0.3981 ug/uL	1.564	0.199 ug/uL	3.850333333
f			0.199 ug/uL	0.901333333	0.0995 ug/uL	3.394666667
g			0.0995 ug/uL	0.543333333	0.0497 ug/uL	3.135
h			0.0497 ug/uL	0.36	0.0248 ug/uL	2.994333333

Figura 88 Promedios de las absorbancias y concentración de extracto 2.

A diferencia del estudio de folin-ciocalteu, en este ensayo se utilizaron líneas de tendencia rectas para obtener ecuaciones de rectas, esto se realizó porque se tomó un intervalo muy reducido de la curva logarítmica, sin embargo, al recrear la curva de inhibición se realizó la gráfica en base logarítmica.

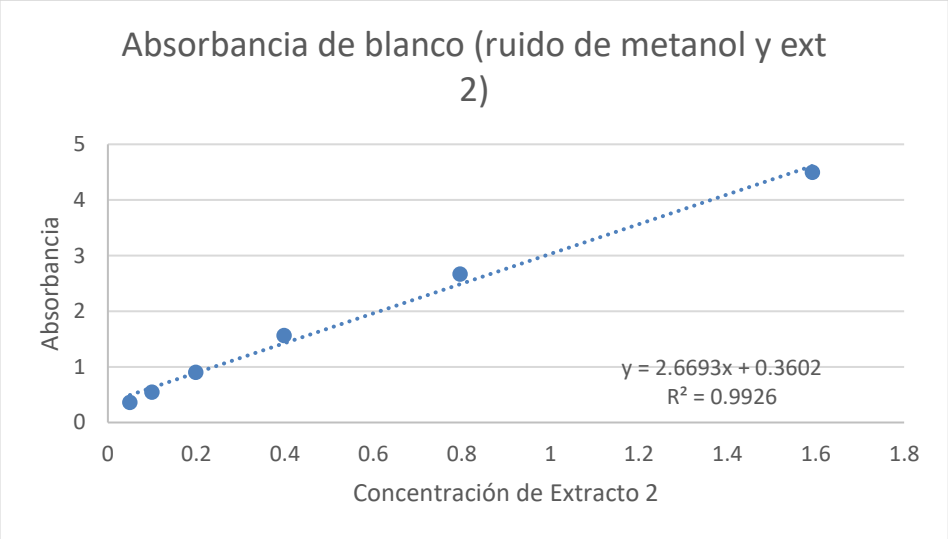


Figura 89 Gráfica de absorbancia del "ruido".

Se descartaron dos datos de las filas (a y b) para mejorar la R de la ecuación, mediante la

sustitución de valores en la ecuación es posible restar absorbancias, esto para solucionar el problema de la diferencia de concentraciones de la manera más precisa.

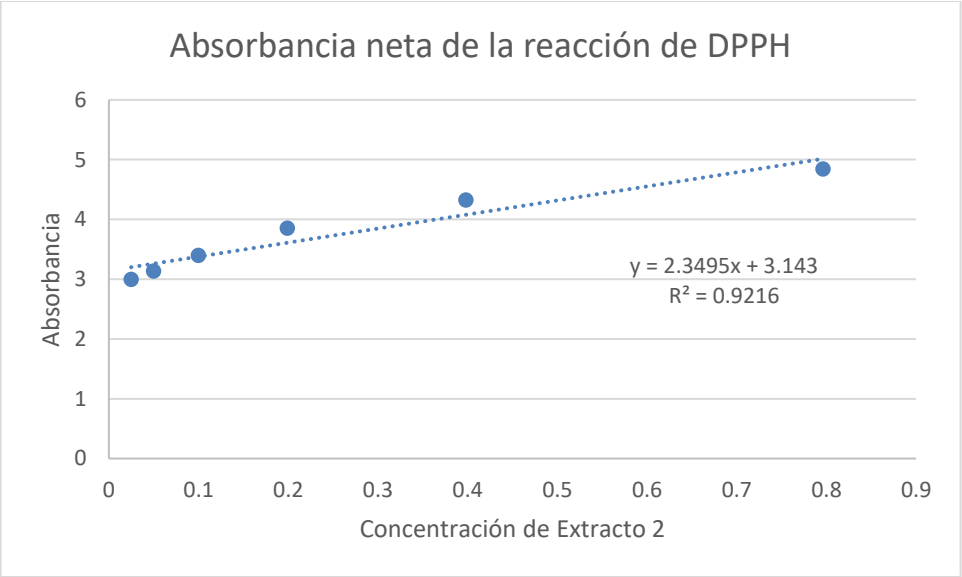


Figura 90 Absorbancia neta del experimento.

A la absorbancia neta se le sustrajo la absorbancia del ruido producido por los demás compuestos en la reacción, se omitieron los primeros dos valores de las filas (a y b) para mejorar la R de la ecuación.

x (ug/uL)	ABS RUIDO	ABS NETA	ABS DPPH
6.371	17.3663103	18.1116645	0.7453542
3.1855	8.86325515	10.62733225	1.7640771
1.59275	4.61172758	6.885166125	2.27343855
0.796375	2.48596379	5.014083063	2.528119275
0.398188	1.42308189	4.078541531	2.655459638
0.199094	0.89164095	3.610770766	2.719129819
0.099547	0.62592047	3.376885383	2.750964909
0.049773	0.49306024	3.259942691	2.766882455
0.0248	0.42639864	3.2012676	2.77486896

Tabla 11 Tabla donde se sustrajo absorbancia del ruido de la absorbancia total, y se obtuvo la absorbancia de DPPH.

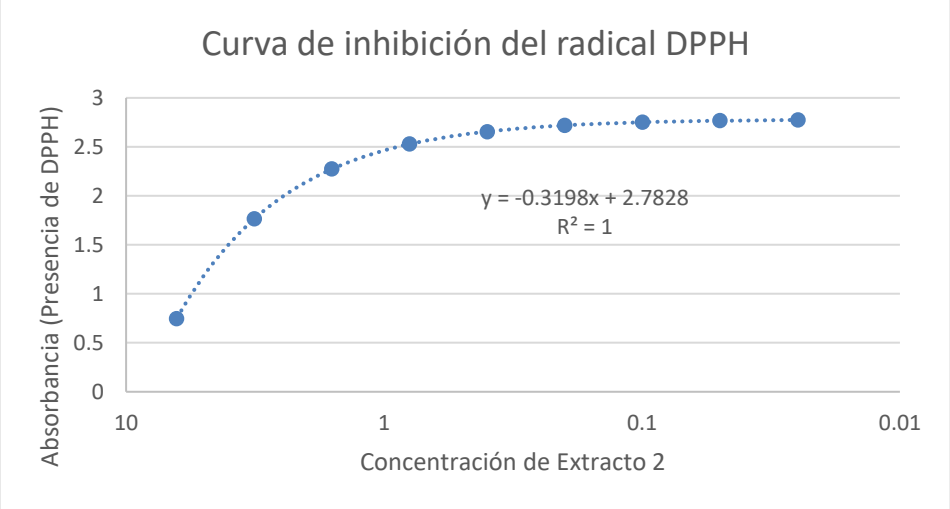


Figura 91 Curva de inhibición del radical DPPH, este grafico fué modificado en el eje x con base logarítmica. Se realizó con los datos obtenidos anteriormente.

Con la gráfica de la curva de inhibición obtenemos su ecuación y se determinó la concentración de Extracto 2 con la cual es posible secuestrar la mitad de los radicales DPPH (Ic50).

Tomando en cuenta que la absorbancia cuando la concentración del extracto tiende a 0 ug es de 2.7828, lo que inferimos que cuando se encuentra al 50% inhibido, respondería a el valor de absorbancia 2.7828/2 = 1.3914

Sustituyendo las variantes de la ecuación de la gráfica

$y = mx+b$ $x = (y-b)/m$

$x = (1.3914 - 2.7828) / (-0.3198)$ $x = 4.35$ ug/uL Extracto 2 Ic50 = 4.35 ug/uL

DETERMINACIÓN DE GRUPOS FLAVANOIDES POR SHINODA Y H_2SO_4

Cuando no hay interferencia de pigmentos no flavonoides, el material vegetal se puede ensayar directamente; por ejemplo, Si los pétalos blancos de una flor se ponen amarillos en presencia de vapores de amoniaco, deben contener flavonas y/o flavonoles. Las chalconas y las auronas viran de amarillo a rojo. Los pétalos que contienen antocianinas viran a rojo intenso en presencia de amoniaco. Las flavonas y flavonoles se disuelven en ácido sulfúrico concentrado y originan soluciones fuertemente amarillas. Las flavanonas dan colores anaranjados o guinda a rojo azuloso. Los datos reportados para estas pruebas nos indican la presencia de flavanonas en el tegumento, en el pericarpo no existe presencia de flavonoides, en el endospermo existen concentraciones bajas de flavanonas.

Solución	Color(H_2SO_4)
A	ROSA FUERTE CON PRECIPITADO OSCURO
B	CAFÉ OXFORD SIN PRECIPITADO
C C	NARANJA OPACO CON PRECIPITADO
D	PRECIPITADO SALMÓN

Tabla 12 Resultados del ensayo de H_2SO_4.

Figura 92 Resultado del ensayo de Shinoda, Coloraciones de cada corte histológico: a)) Tegumento, b) Pericarpo, c) Endospermo, d) mezcla e) control negativo.

Solución	Color (SHINODA)
A	ROSA FUERTE
B	AMARILLO
C	ROSA CLARO
D	SALMON
E	NADA

Tabla 13 Resultados de ensayo de Shinoda.

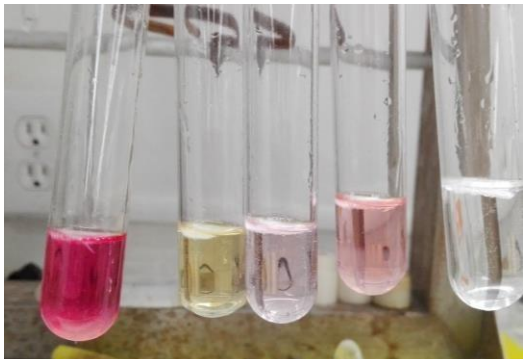


Figura 93 Resultado del ensayo de H_2SO_4, Coloraciones de cada corte histológico a) Tegumento, b) Pericarpo, c) Endospermo, d) mezcla e) control negativo.

Los datos reportados para estas pruebas nos indican la presencia de flavonoides en el tegumento, en el pericarpo no existe presencia de flavonoides, en el endospermo existen concentraciones bajas de estos.

Los compuestos fenólicos son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas en las que desarrollan diversas funciones, como la protección frente a condiciones externas estímulos que pueden provenir de un ataque. Se encuentran en casi todos los alimentos de origen vegetal aportando color, sabor amargo, astringencia y/o aroma, siendo su distribución muy diversa dentro de las plantas (hojas, flores, frutos, semillas, tallos, raíces). Los compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides, poseen diferente actividad biológica, pero las más importantes son la actividad antioxidante y la antitumoral. Nuestros hallazgos nos muestran la presencia inequívoca de estos compuestos, que podrán ser de utilidad en diversas áreas de aplicación.

CONCLUSIONES

La presencia de los principios bioactivos en los extractos acuosos y orgánicos de la bellota de *Quercus rugosa* se identificó satisfactoriamente por medio de cromatografía en capa fina (CCF), y se confirmó mediante las pruebas fitoquímicas correspondientes. En la primera etapa de la investigación se trabajó con el extracto etanólico y se buscó el aislamiento de sus compuestos para así conocer los compuestos mayoritarios. Sin embargo, esta metodología no era la adecuada para tratar los compuestos debido a que son lábiles, por lo que se realizaron extracciones selectivas que permitieron caracterizar los compuestos presentes en cada uno de los extractos.

Se identificó la presencia de flavonoides en las muestras de bellota, y si bien los metabolitos presentes tiene una excelente capacidad antioxidante, su poca disponibilidad -dados los factores de ciclos de cosecha, peso de la bellota, peso del tegumento, peso de la cosecha- resulta ser una opción poco rentable; sin embargo, la escasez que presenta la obtención puede suponer una mezcla antioxidante muy valorizada en el mercado, ya que su capacidad antioxidante reportada en este trabajo de tesis fue muy alta y de gran relevancia,

lo que sugiere que podrían ser una alternativa útil y sustentable para la extracción de compuestos antioxidantes. Debido a los resultados obtenidos, sería muy interesante realizar estudios similares en otras especies del género Quercus cuya bellota no tiene el color rojizo violeta para conocer si la actividad antioxidante es similar a la detectada en esta especie o si es diferente, lo que sin lugar a dudas sería de gran interés en el género y una guía para la obtención de productos naturales antioxidantes.

GLOSARIO

A

Afinidad electroquímica: o afinidad química también puede referirse a la tendencia de un átomo o compuesto para combinarse por una reacción química con átomos o compuestos de composición distinta.

Agua subcrítica: Se considera que el agua está en estado subcrítico cuando se encuentra en estado líquido entre los 100°C y 374°C.

Alta presión hidrostática: es la presión que se somete un cuerpo sumergido en un fluido, debido a la columna de líquido que tiene sobre él.

Angiogénesis: La angiogénesis es el proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes formados en la etapa temprana de la vasculogénesis.

Anticancerígena: Relacionado con la prevención o el retraso de la aparición del cáncer.

Antiespasmódico: es un medicamento que ayuda a combatir las contracturas, calambres y convulsiones en el cuerpo.

Antiinflamatorio: sustancia que reduce la inflamación (enrojecimiento, inflamación y dolor) en el cuerpo.

Antioxidantes: Sustancia que impide la formación de óxidos.

Antisecretor: sustancias disminuyen la formación de ácido del estómago.

Antiviral: Los antivirales son un tipo de fármaco usado para el tratamiento de infecciones producidas por virus.

Antropológico: Es un término de origen griego compuesto por las palabras anthropos, que quiere decir 'hombre' o 'humano', y logos, que quiere decir 'conocimiento' o 'ciencia'. La antropología estudia los fenómenos humanos, por lo que toma en cuenta tanto las sociedades originarias y antiguas como las presentes.

Apoptosis: es una vía de destrucción o muerte celular programada o provocada por el mismo organismo, con el fin de controlar su desarrollo y crecimiento.

Astringencia: El adjetivo astringente permite calificar a aquello que provoca en la lengua una sensación que combina la amargura y la sequedad.

B

Bases púricas: se encuentran en los ácidos nucleicos (tanto DNA como RNA) son la adenina y la guanina.

Bellota: Fruto de la encina, el roble, el alcornoque y otros árboles, comestible, pequeño y

alargado, cubierto por una piel fina, fuerte y flexible, de color marrón claro y cáscara dura y rugosa en uno de sus extremos.

Biomasa: Cantidad de productos obtenidos por fotosíntesis, susceptibles de ser transformados en combustible útil para el hombre y expresada en unidades de superficie y de volumen.

C

Caducifolio: hace referencia a los árboles o arbustos que pierden su hoja durante una parte del año, la cual coincide en la mayoría de los casos con la llegada de la época desfavorable, la estación más fría (invierno).

Campo eléctrico: El campo eléctrico es un campo físico que se representa por medio de un modelo que describe la interacción entre cuerpos y sistemas con propiedades de naturaleza eléctrica

Características electromagnéticas: propiedades que describen la interacción de partículas cargadas con campos eléctricos y magnéticos.

Características electroquímicas: propiedades que describen el estímulo eléctrico y la reactividad química de un sistema. Más concretamente, los mecanismos es decir de la oxidación y de reducción en una reacción.

Carcinogénesis: Conjunto de fenómenos que determinan la aparición y desarrollo de un cáncer.

Carcinomas: Tumor maligno que se forma a partir del tejido epitelial de los órganos.

Cardiovascular: El término cardiovascular se refiere al corazón (cardio) y a los vasos sanguíneos (vascular). El sistema cardiovascular comprende: Las arterias.

Carotenoides: los carotenoides son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides que se encuentran de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos

Cinasa: En bioquímica, una cinasa o quinasa es una enzima que cataliza la transferencia de grupos fosfato de moléculas donadoras de fosfato de alta energía a sustratos específicos.

Citocinas: Las citoquinas son proteínas pequeñas que regulan la función de las células que las producen sobre otros tipos celulares.

Clúster de fierro-sulfuro: Lugares específicos en las proteínas donde se encuentran aminoácidos.

Cóncavas: Una superficie que tiene una curvatura hacia adentro, siendo su parte central la más hundida o deprimida.

Cotiledones: Hoja primera que, sola o junto a otra u otras, se forma en el embrión de una planta fanerógama, modificada especialmente y que en algunos casos acumula sustancias de reserva

Cromatografía: Método de análisis que permite la separación de gases o líquidos de una mezcla por adsorción selectiva

Crónico: Que está muy arraigado o se tiene desde hace mucho tiempo.

D

Diabetes: Enfermedad crónica e irreversible del metabolismo en la que se produce un exceso de glucosa o azúcar en la sangre y en la orina; es debida a una disminución de la secreción de la hormona insulina o a una deficiencia de su acción.

E

Ecosistemas: Sistema biológico constituido por una comunidad de seres vivos y el medio natural en que viven.

Efectos sinérgicos: Acción conjunta de varios órganos en la realización de una función concreta.

Electrófilo: Un electrófilo es un reactivo químico atraído hacia zonas ricas en electrones que participa en una reacción química aceptando un par de electrones formando un enlace con un nucleófilo. Ya que los electrófilos aceptan electrones, ellos son ácidos de Lewis

Electrón desapareado: Un electrón desparejado o electrón desapareado es aquel que no tiene su espín compensado por otro electrón de espín opuesto en el mismo átomo. Visto de otro modo, son aquellos que se encuentran solos en un orbital, que se dice que está semiocupado.

Elución: Es el proceso de extraer un material de otro lavando con un solvente.

Encefalopatía miálgica: Enfermedad caracterizada por una profunda fatiga, anormalidades del sueño, dolor y otros síntomas que empeoran con el esfuerzo.

Encinares: Terreno poblado árboles de encinos.

especie endógena: Se denomina vegetación o flora endógena a las especies autóctonas o nativas

Ésteres: Son compuestos orgánicos derivados de petróleo o inorgánicos oxigenados en los cuales uno o más grupos hidroxilos son sustituidos por grupos orgánicos alquilo.

F

fase estacionaria: Material que permanece dentro de la columna cromatográfica durante la cromatografía y que retiene algún componente de la muestra, posee una gran área superficial y puede ser un sólido o un líquido dispuesto sobre un sólido que actúa como soporte.

fase móvil: Es un fluido que puede ser líquido, gas o fluido supercrítico que se usa como portador de la mezcla y que se hace pasar a través de la columna cromatográfica y la fase estacionaria. Origen: lugar físico donde se coloca la muestra al principio.

Fitoquímico: Son compuestos químicos producidos por las plantas, estos generalmente juegan un papel en el crecimiento de la planta o en su defensa contra competidores, patógenos o depredadores.

G

Glicemia: Es la cantidad de glucosa o azúcar en la sangre y es una de las fuentes de energía para nuestro cuerpo, sobre todo para las células.

Glucósidos: Son moléculas compuestas por un glúcido y un compuesto no glucídico. Los glucósidos desempeñan numerosos papeles importantes en los organismos vivos.

H

Heterósidos: Son moléculas compuestas por un glúcido y un compuesto no glucídico. Los glucósidos desempeñan numerosos papeles importantes en los organismos vivos.

Hidroperóxidos: Los hidroperóxidos o peroxoles son compuestos que contienen el grupo funcional hidroperóxido. Si la R es orgánica, los compuestos se denominan hidroperóxidos orgánicos. Dichos compuestos son un subconjunto de peróxidos orgánicos, que tienen la fórmula ROOR.

Homeostasis: Es una propiedad de los organismos que consiste en su capacidad de mantener una condición interna estable compensando los cambios en su entorno mediante el intercambio regulado de materia y energía con el exterior.

J

Jardín Botánico: Un jardín botánico es un tipo de jardín destinado al audio, conservación y divulgación de la diversidad de las especies vegetales. Los jardines botánicos son por lo general instituciones habilitadas por un organismo que puede ser público, privado o asociativo, aunque en ciertos casos la gestión puede ser mixta.

L

Leucocitos: Célula globosa e incolora de la sangre de los animales vertebrados que se encarga de defender el organismo de las infecciones.

Lípido: Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas, que están constituidas principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida por oxígeno que integran cadenas hidrocarbonadas alifáticas o aromáticas, aunque, también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno.

Lisis celular: Es el proceso de ruptura de la membrana celular de células o bacterias que

produce la salida del material celular, provocado por lisinas.Todas las células tienen una membrana hecha de fosfolípidos que separan el contenido celular del ambiente extracelular.

M

Macromoléculas: Una macromolécula es una molécula de gran tamaño creada comúnmente a través de la polimerización de subunidades más pequeñas. Por lo general, se componen de miles, o más, de átomos. Pueden ser tanto orgánicas como inorgánicas y las más comunes en bioquímica son biopolímeros y grandes moléculas no poliméricas

Mecanismos etiopatogénicos: el término etiopatogenias (Etiología + Patogénesis) hace referencia a las causas y mecanismos de cómo se produce una enfermedad concreta.

Metabolismo: Es el conjunto de reacciones bioquímicas y procesos fisicoquímicos que ocurren en una célula y en el organismo.

Metabolitos secundarios: los compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es letal para el organismo, al contrario que los metabolitos primarios

Metales pesados: los más importantes son: Arsénico (As), Cadmio (Cd), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Mercurio (Hg), Níquel (Ni), Plomo (Pb), Estaño (Sn) y Cinc (Zn). Metales tóxicos son aquellos cuya concentración en el ambiente puede causar daños en la salud de las personas.

Mitocondria: las mitocondrias son orgánulos celulares eucariotas encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular. Actúan como centrales energéticas de la célula y sintetizan ATP a expensas de los carburantes metabólicos.

Morfología: es la disciplina encargada del estudio de la estructura de un organismo o características. Esto incluye aspectos físicos de la apariencia externa, así como aspectos de la estructura interna del organismo como huesos y órganos.

Muerte celular programada: es la muerte de una célula como resultado de eventos dentro de una célula, como la apoptosis o la autofagia. La MCP se lleva a cabo en un proceso biológico, que generalmente confiere ventaja durante el ciclo de vida de un organismo.

O

Oxidación: se da cuando un elemento o compuesto pierde uno o más electrones. Generalmente, cuando una sustancia se oxida (pierde electrones), otra sustancia recibe o capta dichos electrones reduciéndose. Este es el mecanismo básico que promueve las reacciones de óxido-reducción o redox.

P

Pedúnculo: rabillo que sostiene un capítulo o una inflorescencia unifloral y, posteriormente a su fecundación, su fruto. En dicho caso, es entonces una mera prolongación del tallo

Perennifolio: el término perennifolio procede del latín perennis, duradero, perenne, y de folium, hoja. Esta flora también recibe el nombre de sempervirente o siempreverde ya que, pese a que existe en zonas de estaciones frías, siempre mantiene el follaje.pa

Periantos sésiles: piezas de la flor que en conjunto forman el cáliz; suelen ser verdosos y tienen una función protectora; junto a los pétalos de la corola forman el perianto. sésil:

sentada, carente de peciolo en el caso de las hojas o de pedúnculo o pedicelo en las flores

Plaquetas: las plaquetas o trombocitos son pequeños fragmentos citoplasmáticos, irregulares, carentes de núcleo, de 2-3 µm de diámetro, derivados de la fragmentación de sus células precursoras, los megacariocitos.

Polaridad química: es una propiedad de las moléculas que representa la separación de las cargas eléctricas en la misma molécula. Esta propiedad está íntimamente relacionada con otras propiedades como la solubilidad, el punto de fusión, el punto de ebullición, las fuerzas intermoleculares, etc.

R

Radicales libres: es una especie química, caracterizada por poseer uno o más electrones desapareados. Se forma en el intermedio de reacciones químicas, a partir de la ruptura homolítica de una molécula y, en general, es extremadamente inestable y, por tanto, con gran poder reactivo y de vida media muy corta.

S

Shock séptico: es una enfermedad que se produce cuando una infección provoca una hipotensión arterial peligrosa. Esta afección puede producirse por cualquier tipo de bacteria. El cuerpo responde de manera inflamatoria a las toxinas, lo que puede provocar daños en los órganos.

Sistema inmunitario: es una compleja red de células, tejidos y órganos. Juntos ayudan a su cuerpo a combatir infecciones y otras enfermedades

Solución: es una mezcla homogénea a nivel molecular o iónico de dos o más sustancias puras que no reaccionan entre sí, cuyos componentes se encuentran en proporciones variables. También se puede definir como una mezcla homogénea formada por un disolvente y por uno o varios solutos.

Soluto: El soluto es la sustancia que se disuelve en otra sustancia. Por ejemplo: el azúcar que se disuelve en agua.

Solventes orgánicos: son compuestos orgánicos volátiles que se utilizan solos o en combinación con otros agentes, para disolver materias primas, productos o materiales residuales, utilizándose como agente de limpieza, para modificar la viscosidad, como agente tensoactivo, como plastificante, como conservante o como portador de otras sustancias que, una vez depositadas, quedan fijadas y el disolvente se evapora

Suelos erosionados: suelos que han sido dañados en su composición de nutrientes, agua o microbiota.

Sustratos: la base, materia o sustancia que sirve de sostén a un organismo, ya sea vegetal, animal o protista, en el cual transcurre su vida; el sustrato satisface determinadas necesidades básicas de los organismos como la fijación, la nutrición, la protección, la reserva de agua,

T

Taninos: Sustancia muy astringente, que se extrae de la corteza de algunos árboles, como el castaño o el roble, y se emplea principalmente en el curtido de pieles y en la elaboración de ciertos fármacos.

Técnicas de espectroscopía: Son aquellas en las que el analito sufre procesos de

absorción, emisión o luminiscencia. El resto corresponde a técnicas no espectroscópicas.

Termolábiles: que se destruye al alcanzar una temperatura más o menos elevada

Turgentes: se denomina turgencia al fenómeno que ocurre cuando una célula se dilata debido a la presión ejercida por los fluidos y por el contenido celular sobre las paredes de la célula.

U

Ubiquitinada: adjetivo para señalar la modificación de una molécula por parte de la célula, la ubiquitina puede asociarse a proteínas y marcarlas para su destrucción, obteniéndose productos que bien pueden ser útiles para la célula o deshechos.

Usos etnobotánicos: las relaciones entre los grupos humanos y su entorno vegetal, es decir el uso y aprovechamiento de las plantas en los diferentes espacios culturales y en el tiempo

V

Vasodilatación: es un proceso fisiológico que se lleva a cabo en los vasos sanguíneos como consecuencia de otros factores o por la administración de medicamentos, lo que conlleva a un aumento en el tamaño del conducto arterial o venoso, es decir el flujo sanguíneo se incrementa

REFERENCIAS

Abeysinghe. (2007). Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Dood Chemistry, vol. 104,*, pp. 1338-1344.

Aggarwal, V. T. (2019). Role of reactive oxygen species in cancer progression: molecular mechanisms and recent advancements. *Biomolecules*, 9(11), 735.

Alessandra Bocco, M.-E. C. (1998). Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts. *Journal of Agricultural Food Chemistry, vol. 46,* , 2123-2129.

Al-Gubory, K. H. (2018). *Nutritional antioxidant therapies: treatments and perspectives.* Springer.

Almajano, M. P. (2009). *Determinación de la Actividad Antioxidante de las Bayas Goji.* Barcelona: Consorci Escola Industrial.

Amin, A. G.-M.-S. (2009). Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs. *International journal of biomedical science: IJBS,*, 5(1), 1.

Anaya Lang, A. L., & Espinosa García, F. J. (2006). La química que entreteje a los seres vivos. *Ciencias*, 83.

Benavente-García, O. C. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 4505-4515.

Bermejo de Zaa, A. D. (2014). Determinación de parámetros químico-físico de las tinturas

al 20% obtenidas de las hojas, tallos y frutos de Melia azedarach L (Pursiana). *Revista Habanera de Ciencias Médicas,*, 13(5), 670-680.

Bonfil, C. (1998). The effects of seed size, cotyledon reserves, and herbivory on seedling survival and growth in Quercus rugosa and Q. laurina (Fagaceae). *American Journal of Botany, 85(1),*, 85(1), 79-87.

Bonfil, C. (2006). Regeneration and population dynamics of Quercus rugosa at the Ajusco Volcano, Mexico. In Ecology and conservation of neotropical montane oak forests. *Springer, Berlin, Heidelberg*, 155-163.

Brand-Williams, W. C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

Caballero, B. F. (2015). *Encyclopedia of food and health.* Academic Press.

Cano, A. y. (2004). Actividad antioxidante hidrofílica y lipofílica y contenido en vitamina C en zumos de naranja comerciales: relacion con sus caracteristicas organolépticas. *CYTA-Journal of Food, vol. 4,* (nº 3,), 185-189,.

Carrol, K. K. (1999). *internacional Patente nº 9916167.*

Chávez, F. Z. (1998). Observaciones sobre la distribución de encinos en México. *Polibotánica*, (8), 47-64.

Chen, L. D. (2007). Continuous determination of total flavonoids in Platycladus orientalis (L.) Franco by dynamic microwave-assisted extraction coupled with on-line derivatization and ultraviolet–visible detection. *Analytica chimica acta*, 596(1), 164-170.

Cheuka, P. M. (2017). The role of natural products in drug discovery and development

against neglected tropical diseases. *Molecules*, 22(1), 58.

Danila Di Majo, M. G. (2005). Flavanones in Citrus Fruit: Sructure-antioxidant activity relationships. *Food Research International, vol. 49,* , 2883-2888.

Delia B. Rodriguez-Amaya, M. K.-F. (2008). Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *Journal of Food Composition Analysis, vol. 10,*, 445-463,.

Espargaró, A. G.-T. (2017). Combined in vitro cell-based/in silico screening of naturally occurring flavonoids and phenolic compounds as potential anti-Alzheimer drugs. *Journal of natural products*, 80(2), 278-289.

Finkel, T. a. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature, vol. 408,*, 230-247.

Gamboa-Gómez, C. I.-M.-L.-O.-J.-E.-G. (2017). In vitro and in vivo assessment of anti-hyperglycemic and antioxidant effects of Oak leaves (Quercus convallata and Quercus arizonica) infusions and fermented beverages. *Food Research International*, 102, 690-699.

Ganzler, K. S. (1986). Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of chromatography A*, 371, 299-306.

García Martínez, E. M. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. *Universidad Politécnica de Valencia*, vol. 1, p. 2-8.

Gaviria Pérez, M. F. (2019). Optimización de la extracción asistida por microondas en mezclas etanólicas de Vaccinium meridionale y el estudio de su actividad antioxidante y antimicrobiana. *Bachelor's thesis, Uniandes*.

Geankoplis, C. J. (1998). *Procesos de transporte y operaciones unitarias, 3° ed.* México: Continental.

Gutteridge, J. M. (2018). Mini-review: oxidative stress, redox stress or redox success. *Biochemical and biophysical research communications*, 502(2), 183-186.

Heim, K. E. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.

Heinrich, M. (2005). Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures. *Frontiers in Medicinal Chemistry-Online, 2(1),* , 431-450.

Hoda, M. H. (2019). *Role of Phenolic Phytochemicals in Diabetes Management: Phenolic Phytochemicals and Diabetes.* Springer.

Hu, G. C. (1995). Inhibition of oncogene expression by green tea and (-)-epigallocatechin gallate in mice. *Nutrition and cancer*(nº 2013-9,), 203-209.

Ibarra, M. L. (2006). Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en salud*, 8(1), 7-15.

Kothari, V. &. (2010). Antioxidant activity of seed extracts of Annona squamosa and Carica papaya. *Nutrition and Food Science*, 40(4), 403–408.

Kozłowska A., S.-W. D. (2017). Plant Flavonoids in Health, Prevention, and Treatment of Chronic Diseases. In Nutritional Antioxidant Therapies: Treatments and Perspectives. *Springer, Cham.*, 347-376.

Lan, D. Y. (2003). A novel microwave-assisted extraction method for extracting flavonoids

from Radix et caulis acanthopanacis senticosi. . *Chemical Journal of Chinese Universities*, 24(8), 1403-1405.

M. St-Onge. (2005). Dietary fats, teasm dairy and nuts; potential functional foods for weight control. *Am. J. Clinical. Nutrition,, vol. 81,*, 7-15.

Madhujith, T. &. (2007). Antioxidative and antiproliferative properties of selected barley (Hordeum vulgarae L.) cultivars and their potential for inhibition of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5018-5024.

Mamani Mayta, D. G. (2017). Parámetros de calidad de harinas de Amaranthus caudatus Linnaeus (amaranto), Chenopodium quinoa Willd (quinua), Chenopodium pallidicaul Aellen (kañahua), Lupinus mutabilis Sweet (tarwi). *Revista con-ciencia*, 5(1), 27-38.

Martinez, M. J. (2005). Biologically active substances from the genus Baccharis L.(Compositae). *Studies in Natural Products Chemistry*, 30, 703-759.

Martínez-Valverde, I. M. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos latinoamericanos de Nutricion*, 5-18.

Masschelein-Kleiner, L. (2004). *Les solventes.* Santiago de Chile: Centro Nacional de Conservación y Restauración: Centro Nacional de Conservación y Restauración. (pp 61).

Moris, D. S. (2017). The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation. *Annals of translational medicine*, 5(16).

Novo, E. &. (2008). Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis & tissue repair*, 1(1), 1-58.

Ortega Ramírez, A. M. (2017). Caracterización del efecto y mecanismo de acción sobre canales ASIC de tres flavonoides obtenidos a partir del pasto marino Thalassia testudinum.

Özcan, T. (2007). Characterization of Turkish Quercus L. taxa based on fatty acid compositions of the acorns. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(7), 653-662.

Pal, G. B. (2020). Evaluation of oxidative stress and its modulation by L-Arginine and L-Ascorbic acid in repetitive restraint stress model in Wistar rats. *Obesity Medicine*, 17, 100172.

Penny M Kris-Etherton, K. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 71-88.

Pérez Mojica, E. (2017). Estudio preliminar del género Quercus (Fagaceae) en Tamaulipas, México. *Acta botánica mexicana*(nº Serie 11-9,), 120, 59-111.

Praticò, D. a. (2000). Oxidative Injuy in Diseases of the Central Nervous System: Focus on Alzheimer's Disease. *Am, J, Med, , vol. 109,* , 577- 585.

Rakić, S. P.-M. (2007). Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chemistry*, 104(2), 830-834.

Ramos, R. G. (2019). Nutraceuticals From Mexican Plants As Antibacterial Agents. *In Handbook of Research on Food Science and Technology Volume 3*, 181-196.

Rodríguez Perón, J. M. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista cubana de medicina militar* , 30.1 15-20.

Sepúlveda-Jiménez, G. T.-T.-E.-T.-M. (2005). La Producción de las Especies Reactivas de Oxígcno en las Interacciones de las Plantas con Patógcnos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(3).

Skowyra, C. G. (2014). Characterization of phytochemicals in petals of different colours from Viola× wittrockiana Gams and their correlation with antioxidant activity. *Journal of Agricultural Science*, 6, 93–105.

Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18), 3268-3295.

Tektonidis, T. G. (2015). A Mediterranean diet and risk of myocardial infarction, heart failure and stroke: a population-based cohort study. *Atherosclerosis*, 243(1), 93-98.

Ursini, F. M. (2016). Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox biology*, 8, 205-215.

Vinha, A. F. (2016). Chemical and antioxidant profiles of acorn tissues from Quercus spp.: Potential as new industrial raw materials. *Industrial Crops and Products*, 94, 143-151.

Wang, Y. Y. (2008). Analysis of ginsenosides in Panax ginseng in high pressure microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*, 110(1), 161-167.

Wolff, S. P. (1993). Diabetes mellitus and free radicals: free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *British medical bulletin*, 49(3), 642-652.

Wölle, J. e. (1996). Selective inhibition of tumor necrosis factor–induced vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by a novel flavonoid: Lack of effect on

transcription factor NF-κB. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology , vol. 16,* (nº 1501-8,), 1501-1508.