

Aplicación de un Diseño de Experimentos Box-Behnken para la determinación de las condiciones de extracción de compuestos antioxidantes de *Decatropis bicolor*

E. Contreras¹, T. Hernández², J. Jaimes¹, J.G. Pérez¹, J.F. Gutiérrez², J. Ramírez*²

1 Universidad Autónoma del Estado Hidalgo, Área Académica de Química, Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5, Colonia Carboneras, C.P. 42067, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. **2** Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Área Académica de Gastronomía, Exhacienda de la Concepción s/n, Pueblo San Juan Tilcuautla, C.P. 42160, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. *juan_ramirez@uaeh.edu.mx

RESUMEN

En México, el estado de Hidalgo cuenta con una gran variedad de plantas fanerógamas utilizadas para tratar cierto tipo de condiciones de salud, por ejemplo, *Decatropis bicolor* conocida como Aranthó. Sin embargo, existe poca información sobre su uso como fuente de compuestos antioxidantes. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones de extracción de antioxidantes de *Decatropis bicolor* aplicando el diseño de experimentos de Box-Behnken. Las variables analizadas fueron: tiempo (5, 15 y 25 minutos), temperatura (20, 55 y 90°C) y concentración de la muestra (2, 6 y 10%). La actividad antioxidante se midió mediante las técnicas DPPH y FRAP, mientras que el contenido de fenoles totales se cuantificó mediante el método de Folin-Ciocalteu. Los extractos acuosos presentaron valores de 295 a 1511 mg ET/100g vía radical DPPH. En cuanto a la actividad antioxidante vía reacciones redox, se encontraron valores de 138 a 691 mg EFe²⁺/100g. En todos los extractos acuosos de *D. bicolor* se observó la presencia de compuestos fenólicos en concentraciones variables, desde 739 a 2232 mg EAG/100g. La temperatura fue el factor determinante en la extracción, independientemente del tiempo y la cantidad de Aranthó utilizada.

Palabras clave: *Decatropis bicolor*, extracción sólido-líquido, antioxidantes, Box-Behnken.

ABSTRACT

In Mexico, the state of Hidalgo has a wide variety of phanerogam plants used to treat certain types of health conditions, for example, *Decatropis bicolor* known as Aranthó. However, there is little information about its use as a source of antioxidant compounds. Therefore, the objective of this work was to determine the extraction conditions of antioxidants from *Decatropis bicolor* by applying the Box-Behnken design of experiments. The variables analyzed were: time (5, 15, and 25 minutes), temperature (20, 55, and 90°C), and sample concentration (2, 6, and 10%). The antioxidant activity was measured using the DPPH and FRAP techniques meanwhile, the total phenol content was quantified by the Folin-Ciocalteu method. The aqueous extracts presented values from 295 to 1511 mg ET/100g via DPPH radical. Regarding the antioxidant activity via redox reactions, values of 138 to 691 mg EFe²⁺/100g were found. In all the aqueous extracts of *D. bicolor*, the presence of phenolic compounds was observed in variable concentrations, from 739 to 2232 mg EAG/100g. The temperature was the determining factor in the extraction, regardless of the time and the amount of Aranthó used.

INTRODUCCIÓN

Decatropis bicolor es una planta conocida comúnmente como aranthó, pertenece al género *Decatropis* y a la familia Rutaceae (CONABIO, 2016), la cual comprende 161 géneros y 1813 especies alrededor del mundo (Estanislao et al., 2016).

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

En la medicina tradicional mexicana las diversas partes de *D. bicolor*, son utilizadas para tratar las infecciones bacterianas (García et al., 2000; Ríos et al., 2011), curar dolor de espalda, dolor de cabeza, resfriado, cálculos en vesícula, diarreas, afecciones renales, y cáncer (Estanislao et al., 2016). Por ejemplo, en comunidades como El Cardonal, en el estado de Hidalgo, las hojas, son utilizadas para preparar infusiones como tratamiento del cáncer de seno (Estanislao et al., 2016). Por otro lado, diversos estudios han demostrado que los extractos de esta planta inhiben ligeramente el desarrollo de *Aspergillus flavus* (Cárdenas et al., 2007) y de *Bacillus subtilis* (Villavicencio, 1990).

Lo anterior puede atribuirse a que se ha demostrado en estudios fitoquímicos la presencia de esteroides, cumarinas (Cárdenas et al., 2007), flavonoides y triterpenos (Cortés, 2005). El primer análisis fotoquímico realizado en *D. bicolor*, reportó la presencia de eskimmianina, cumarina y dictamina, los cuales son compuestos frecuentemente aislados de la familia Rutaceae. En estudios posteriores realizados por García et al., (2000) y García et al., (2003) en extractos orgánicos en diclorometano y metanol se identificaron las cumarinas: felopterina, isopimpinelinam heraclenin, seselin, psoralen, impertor y heraclenol, así como al triterpeno lupeol. La evaluación *in vitro* de dichos compuestos permitió establecer que la seselina y heraclenol son los principales responsables del efecto antiinflamatorio de dicha planta. Así mismo se encontró que seselin es un potente agente antifúngico durante el almacenamiento del maíz (Kovač et al., 2017).

Estanislao et al., en el 2006, identificaron los compuestos presentes en el aceite esencial de las hojas frescas, y encontraron 23 compuestos los cuales fueron separados en 7 clases como terpenos, alcoholes, ácidos carboxílicos, aldehídos, derivados del benceno y otros compuestos. Los componentes con mayor abundancia del aceite esencial fueron 1,5-ciclooctadieno, 3-(metil-2) propenil, β -terpineol, 1-(3-metil-ciclopent-2-enil)-ciclohexeno, 2-heptanol, y limoneno. Tales compuestos fueron identificados a partir de una extracción sólido-líquido; sin embargo hay poca información de su uso como fuente natural de antioxidantes. Por ello el objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones de extracción de antioxidantes presentes en Aranthó (*Decatropis bicolor*) mediante la aplicación de un diseño de experimentos Box-Behnken.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

La muestra de aranthó fue adquirida en el mercado 1º de mayo, de la ciudad de Pachuca de Soto, Hidalgo, México. Se secó al aire libre durante aproximadamente 20 días a temperatura ambiente, se molió en una licuadora (Oster BLSTEG7881R, México) hasta pulverizarse y se almacenó en frascos de plástico hasta su uso.

Obtención de extractos acuosos por medio de un diseño de experimentos Box-Behnken para determinar las condiciones físicas de extracción

Para determinar las mejores condiciones de extracción de *Decatropis bicolor* con mayor actividad antioxidante, se realizó un diseño de experimentos Box- Behnken (DBB), utilizando tres factores: temperatura (A), tiempo (B) y concentración de muestra (C) y 3 puntos centrales. El modelo matemático correspondiente al DBB se presenta en la Ec. (1)

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

donde y hace referencia a las respuestas evaluadas que fueron el contenido de fenoles totales y las capacidades antioxidantes medida por los métodos DPPH• y FRAP. Por otra parte, el término x se refiere a las variables utilizadas en el estudio, el termino β₀ es la constante del modelo, mientras que los coeficientes del modelo están representados por los efectos lineales β_A, β_B, β_C, cuadráticos β_{AA}, β_{BB}, β_{CC} y la interacción entre las variables β_{AB}, β_{AC}, y β_{BC}. Finalmente, el término ε representa el error experimental (Box y Behnken, 1960).

Los factores de control y niveles seleccionados en el diseño se muestran en la Tabla I y se eligieron considerando las condiciones normales de preparación de una infusión mediante extracción convencional (Ramírez et al., 2016). Cada variable independiente puede tomar tres posibles valores, codificados como -1, 0 y 1, en función de si se trata del valor mínimo, medio o máximo, respectivamente. Con esta codificación, el diseño indicó la realización de 15 experimentos los cuales se realizaron por triplicado.

Tabla I. Condiciones para la obtención de extractos acuosos

Extracción convencional		Niveles seleccionados		
Factores de control		-1	0	1
A	Temperatura (°C)	20	55	90
B	Tiempo (min)	5	15	25
C	Muestra (g/100g)	2	6	10

Preparación de extractos acuoso

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

Medición de las variables de respuesta

Actividad antioxidante por DPPH•

Para esta determinación se utilizó el método de Brand-Williams et al., (1995), con algunas modificaciones (Xu et al., 2017). Se preparó una curva de calibración de 0 a 33 μM de Trolox 1 mM en MeOH. A cada solución estándar se añadieron 2.9 mL de DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) 0.1 mM en MeOH. La absorbancia se midió a 515 nm utilizando MeOH como blanco. La actividad antioxidante se expresó en miligramos equivalentes de Trolox por 100 g de muestra (mg ET/100 g).

Poder Antioxidante Reductor Férrico (FRAP)

Se realizó utilizando la técnica de Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones sugeridas por Chohan et al., (2008). El reactivo FRAP se preparó a partir de un tampón de acetato (300 mM, pH 3,6), cloruro férrico hexahidratado (20 mM) y TPTZ 10 mM (4,6-tripiridil-s-triazina) preparado en HCl 40 mM. Las tres soluciones se mezclaron en proporciones de 10:1:1 (v/v/v). Se preparó una curva de calibración de 0 a 100 mM de $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 40 mM en HCl. La absorbancia se midió a 593 nm usando un blanco que solo contenía reactivo FRAP. Los valores obtenidos se expresaron en miligramos de iones ferrosos equivalentes por 100 g de muestra (mg EFe²⁺ /100 g).

Fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Para la cuantificación de fenoles totales se preparó una curva de calibración en un intervalo de concentración de 0 a 15 mg/L a partir de una solución estándar de 1000 mg/L de ácido gálico (AG). De cada estándar se tomó el volumen correspondiente, se adicionaron 2 mL de Na₂CO₃ (7.5%) y 2 mL de reactivo de Folin y Ciocalteu (2 M) y se diluyó a 10 mL con agua destilada. La absorbancia se midió a 760 nm (Xu et al., 2017). Los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra (mg EAG/100 g). Todas las determinaciones para las respuestas variables se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la determinación del contenido de fenoles totales y de actividad antioxidante por DPPH• y FRAP de los 15 extractos acuosos de *D. bicolor* se muestran en la Tabla II.

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

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

(n=3 ± SD: Desviación estándar)

Los valores de fenoles totales se situaron entre 739.6 y 2232.2 mg EAG/100 g. Los extractos analizados mediante DPPH• mostraron valores de actividad antioxidante de 295.5 a 1,511.5 mg ET/100 g. En cuanto

a la actividad antioxidante determinada por FRAP, se encontraron valores entre 138.9 - 691.6 Fe²⁺/100 g. Para las tres determinaciones el valor más alto se obtiene a partir de 2% de muestra, extraído a 90° C durante 15 minutos.

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

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

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

Los coeficientes de correlación determinados fueron superiores al 95% para fenoles totales y FRAP, así como mayor al 90% para DPPH•, lo que indica que este diseño de experimentos resulta útil para optimizar las condiciones de extracción convencional a las cuales se debe someter a *D. bicolor* para lograr la mayor extracción de compuestos con actividad antioxidante y fenoles totales (Tabla IV).

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

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

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

Los coeficientes de regresión y diferencias significativas para cada factor se presentan en la Tabla V. La temperatura influyó significativamente en la liberación de compuestos fenólicos y en la actividad antioxidante determinada por FRAP, tanto en términos lineales (β_A) ($p < 0.0001$ fenoles y 0.001 FRAP) como cuadráticos (β_{AA}) ($p < 0.01$ fenoles y 0.001 FRAP). Lo cual puede ser observado en los gráficos de contorno (Figuras 1a y 2a) donde a mayor temperatura mayor liberación de compuestos.

Tabla V. Coeficientes estimados de la ecuación polinómica de segundo orden para fenoles totales, DPPH• y FRAP

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

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

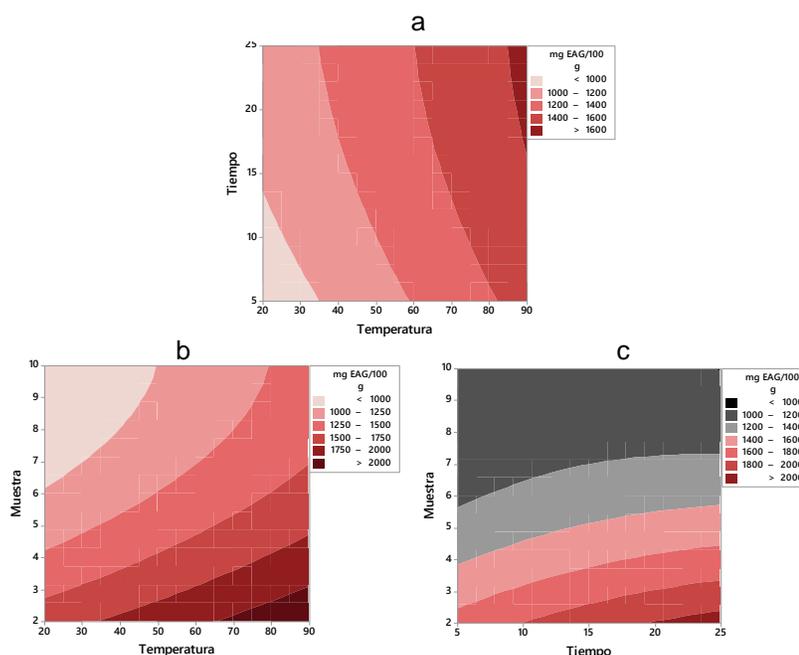


Figura 1. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre el contenido de fenoles totales, obtenido por extracción convencional de aranthó

Por otro lado, el tiempo mostró afectar de manera significativa la liberación de compuestos fenólicos en su forma lineal (β_B) ($p < 0.05$), lo cual se observa en la Figura 1c, obteniéndose valores mayores de 2000

mg EAG/100 g tras 20 minutos de exposición. Mientras que, en su forma cuadrática (β_{BB}), el tiempo tuvo un efecto significativo de $p < 0.01$ en FRAP. Las tres determinaciones se vieron influenciadas significativamente por la concentración de muestra a $p < 0.01$ DPPH• y a $p < 0.0001$ fenoles totales y FRAP, así como este último en su forma cuadrática a $p < 0.0001$.

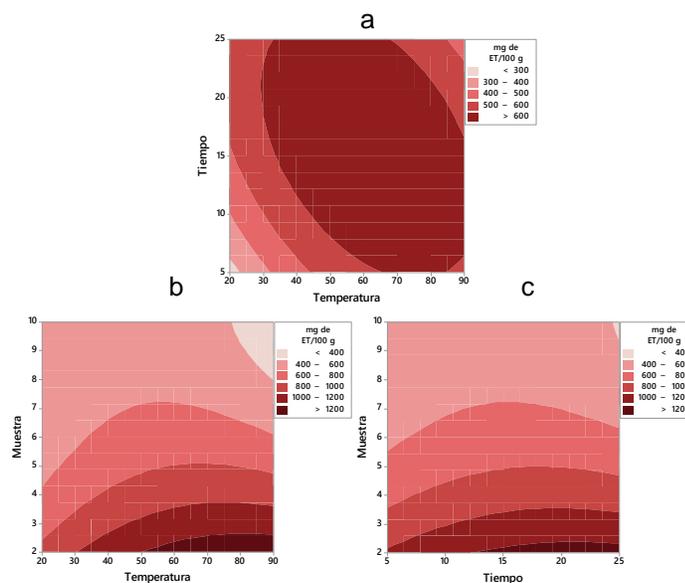


Figura 1. Gráficos de contorno del efecto de a) Temperatura*Tiempo, b) Temperatura*Muestra, c) Tiempo*Muestra, sobre la actividad antioxidante por DPPH•, obtenida por extracción convencional de aranthó

En la Figura 1c, se puede observar que la interacción tiempo-muestra (β_{BC}) influyó significativamente ($p < 0.05$) en fenoles totales, donde a tiempos entre 20 y 25 minutos con una concentración de muestra menor de 3%, se obtienen más de >2000 mg EAG/ 100 g.

El modelo obtenido a partir de los resultados del diseño de experimentos Box-Be para la extracción convencional de aranthó, se sometió a un procedimiento de optimización. Las condiciones óptimas propuestas para la extracción fueron: 90°C de temperatura; 17 minutos; 2% de concentración de muestra. Se validó el modelo mediante la comparación de los valores predichos y experimentales de compuestos fenólicos y antioxidantes (Tabla VI), no se encontraron diferencias significativas entre si ($p > 0.05$). Lo que permite que el modelo sea adecuado para obtener los mejores valores de temperatura, tiempo y muestra para la extracción convencional de aranthó, así como estos valores sean reproducibles.

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

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

CONCLUSIÓN

El diseño experimental planteado permitió definir las condiciones físicas de extracción para la obtención de extractos acuosos de *D. bicolor* con elevada actividad antioxidante. La temperatura fue el factor determinante en la extracción, independientemente del tiempo y la cantidad de *D. bicolor* utilizado.

BIBLIOGRAFÍA

- Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 239, 70–76.
- Box, G. E. P., Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2, 455-475.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT*, 28, 25–30.
- Cárdenas, O. N. C., Pérez, G. C., Zavala, S. M. A., Hernández, R. A. B., Pérez, S. G., (2007). Actividad antifúngica de seis plantas sobre *Aspergillus flavus* Link. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 36(3), 21-26.
- Chohan, M.; Forster-Wilkins, G.; Opara, E. (2008). Determination of the Antioxidant Capacity of Culinary Herbs Subjected to Various Cooking and Storage Processes Using the ABTS*+ Radical Cation Assay. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 63, 47–52.
- CONABIO. (2016). Especies, México: CONABIO. <http://bios.conabio.gob.mx/especies/6035108>.
- Cortés, C. J. (2005). Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento del cáncer e infecciones en Tepatepec, Hidalgo (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
- Estanislao, G. C. C., Aquino, C. A., Pérez, I D. G., San Martín, M. E., Morales, L. J. (2016). Decatropis bicolor (Zucc.) Radlk essential oil induces apoptosis of the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(266), 1-11.
- García A. A., González, L. N., Márquez, C., Martínez, V. M. (2003). Cumarinas presentes en especies del género *Casimiroa*. *Revista de la Sociedad Química de México*, 47(2), 151-154
- García, A. A., Ramírez, A. T., Parra, D. H., Velázquez, G., Martínez, V. M. (2000). Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model. *Planta Medica*, 66(3), 279-281.
- Kovač, T., Kovač, M., Strelec, I., Nevistić, A., Molna, M. (2017). Antifungal and antiaflatoxic activities of coumarinyl thiosemicarbazides against *Aspergillus flavus* NRRL 3251. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 68, 9-15.
- Li, S., Li, S., Gan, R., Song, F., Kuang, L., Li, H. (2013). Antioxidant capacities and total phenolic

- contents of infusions from 223 medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 51, 289-298.
- Nikolic, M., Glamoclija, J., Ferreira, I., Caldhelha, R., Fernandez, A., Markovic, T., Markovic, D., Giweli, A., Sokovic, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183-190.
- Rajha, H. N., Darra, E. N., Hobaika, Z., Boussetta, N., Vorobiev, E., Mroun, R. G., Louka, N. (2014). Extraction of total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and tannins from grape by products by response Surface methodology. Influence of solid-liquid ratio, particle size, time, temperature and solvent mixtures on the optimization process. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 397-409.
- Ramírez, G. J., Jaime, O. J., Castañeda, O. A., Añorve, M. J., Salazar, P. M., González, O. G., Contreras, L. E. (2017). Optimization of Physical Conditions for the Aqueous Extraction of Antioxidant Compounds from Ginger (*Zingiber officinale*) Applying a Box-Behnken Design. *Plant Foods for Human Nutrition*. 71(3).
- Ríos, Y. M., Ramírez, C. A., León, R. I., Estrada, S. S., Navarrete, V. G., Aguilar, G. B. (2011). Complete NMR assignment of 3, 4-seco-lup-20 (29)-en- 3-oic acid from *Decatropis bicolor*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 50, 329 – 331.
- Sánchez, G. A., Álvarez, Z. E., López, M. L. (2016). Diversity and distribution patterns of ferns and lycophytes in a cloud forest in Mexico. *Revista Chapingo*, 22(3), 234-253.
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., Tarantilis, P. A. (2013). Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 53, 46-54.
- Villavicencio, M. A. (1990). Actividad antimicrobiana de *Decatropis bicolor*. En: *Tiempo nuestro, investigación científica y tecnológica*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, 139-147.
- Villavicencio, M. A., Pérez, E. B. E. (2002). *Plantas útiles del Estado de Hidalgo*. Tomo II. Pachuca, Hgo., México: UAEH.
- Xu, D.P.; Zheng, J.; Zhou, Y.; Li, Y.; Li, S.; Li, H.B. (2017). Ultrasound- assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. *Food Chem.*, 217, 552–559