



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE
EXTRACTOS ORGÁNICOS DE SEMILLAS DE *HELIOCARPUS
TEREBINTHINACEUS*”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

JESICA BELINA MARTÍNEZ VÁSQUEZ

DIRECTOR

DR. RAÚL SALAS CORONADO

CODIRECTORA

DRA. MA. ANABERTA CARDADOR MARTÍNEZ

HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA. JUNIO DE 2007.

Dedico esta tesis a Dios por haberme permitido el milagro de la vida, por ser mi luz, mi fuerza, mi verdad y por dejarme llegar hasta este día.

A mi madre Estela Vásquez Jiménez y a mi padre Félix Martínez Córdova porque sin su apoyo no hubiese podido concluir este trabajo ni todas las metas que me he propuesto.

A mis abuelos María, Juan, Esperanza y Santos gracias por su apoyo y valores que han inculcado.

A mis hermanos Myriam, Gladys, Ivonne, Fabiola, Félix y a mi sobrina Ximena por estar en mis mejores momentos y por su apoyo incondicional.

A Enriqueta y Leonor por sus consejos y compartir bellos momentos.

A mis compañeros y amigos en especial a Ana, Berenice, Eliane, Erik, Fatima, Froy, Hugo, Melina, Reynolds, Rita y Sandra quienes siempre han estado conmigo brindándome su ayuda, consejos, amistad sincera y cariño.

Este trabajo de investigación no hubiera sido posible sin el apoyo de muchas personas.

Muchas gracias a mi asesor, Dr. Raúl Salas Coronado, quien leyó mis numerosas revisiones y me ayudó a dar sentido a la confusión.

A mi asesora externa de tesis la Dra. Ma. Anaberta Cardador Martínez por su ayuda y por su valiosa colaboración en este proyecto.

Gracias también a los miembros de mi comité de tesis, Dra Norma F. Santos Sánchez, M.C. Leslie S. Arcila Lozano, M.C. Vania S. Robles González, por sus críticas y consejos para hacer de este un mejor trabajo.

A los maestros que me guiaron en mi formación profesional.

Al personal de intendencia de la Universidad Tecnológica de la Mixteca por brindarme su apoyo en la recolección de semilla para la realización de esta tesis.

Finalmente gracias a mis padres Estela y Félix quienes siempre estuvieron apoyándome en todos los aspectos de mi vida.

Este trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca y en los laboratorios del Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica del Estado de Jalisco (CIATEJ).

RESUMEN

La actividad antioxidante de los extractos de hexano, éter etílico, cloroformo, acetato de etilo, acetona y metanol de las semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus* (cuetla) se determinó por el método de poder reductor (FRAP) y del radical libre estable DPPH[•]. Cada uno de los extractos presentó una actividad antirradical y poder reductor significativos. A partir de una concentración de 100 µg/mL, los extractos presentaron una absorbencia significativa (0.10-0.64) en poder reductor a una longitud de onda de 700 nm. En relación al secuestro del radical libre DPPH[•], el porcentaje de actividad antirradical fue de 25.6% -52.7% a una longitud de onda de 545 nm. La actividad antirradical y el poder reductor están relacionados a la polaridad del disolvente y a la concentración del extracto. De tal manera que al aumentar estos valores aumentaron la actividad antirradical y el poder reductor. Esto indica que los extractos de metanol y acetato de etilo son los que presentan una mejor actividad antioxidante, atribuible a la presencia de compuestos fenólicos. La cuantificación de fenoles totales nos indicó que efectivamente los extractos de acetato de etilo y metanol contienen la mayor cantidad de estos compuestos y al determinar los flavonoides se logró establecer que de los fenoles totales, una parte importante corresponde a flavonoides. Consecuentemente, se concluye que la actividad antioxidante de los extractos orgánicos de semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus* se debe principalmente a la presencia de flavonoides.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	IV
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABLAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
INTRODUCCIÓN	1
1 ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS.....	4
1.1 Estrés oxidativo.....	4
1.2 Daño oxidativo a biomoléculas.....	6
1.3 Procesos fisiológicos y fisiopatológicos relacionados con los radicales libres	7
1.4 Función de los antioxidantes	7
1.4.1 Sistema enzimático	7
1.4.2 Sistema no enzimático	8
1.4.3 Sistemas reparadores	8
1.4.3.1 Directo.....	9
1.4.3.2 Indirecto	9
1.5 Características de los antioxidantes	9

1.6	Antioxidantes en alimentos.....	9
1.7	Antioxidantes indispensables para la salud.....	10
1.8	Fuentes naturales de los antioxidantes	11
1.9	Estudios relacionados con las propiedades biológicas de plantas de la familia <i>Tiliaceae</i>.....	12
1.10	Métodos para evaluar la actividad antioxidante	13
1.10.1	Análisis del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP).....	15
1.10.2	Método del DPPH•	16
1.11	Cuantificación de compuestos fenólicos.....	17
1.11.1	Técnica de Folin-Ciocalteu (FC).....	19
1.11.2	Determinación de flavonoides.....	19
1.11.3	Determinación de taninos.....	20
2	METODOLOGÍA	22
2.1	Equipos	22
2.2	Colecta de material vegetal	22
2.3	Preparación de las semillas	22
2.4	Preparación de los extractos	22
2.5	Poder reductor de los extractos (FRAP)	23
2.5.1	Preparación de las diluciones	23
2.5.2	Método de poder reductor	24
2.6	Actividad antioxidante de los extractos (DPPH•)	24

2.6.1	Preparación de las diluciones	24
2.6.2	Solución de DPPH•	24
2.6.3	Método de DPPH•	25
2.6.4	Cálculo de la actividad antirradical.....	25
2.7	Análisis estadístico de los resultados	25
2.8	Estudio fitoquímico.....	26
2.8.1	Determinación de fenoles totales	26
2.8.2	Determinación de flavonoides.....	26
2.8.3	Determinación de taninos condensados	27
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	29
3.1	Rendimiento de los extractos	29
3.2	Poder reductor (FRAP)	29
3.3	Actividad antirradical (DPPH*)	31
3.4	Determinación de compuestos fenólicos.....	33
3.4.1	Determinación de flavonoides.....	34
3.4.2	Determinación de taninos condensados	36
4	CONCLUSIONES	39
5	PERSPECTIVAS.....	40
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
	APÉNDICE A.....	49

APÉNDICE B	50
APÉNDICE C	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol, Izquierda y semillas del <i>H. terebinthinaceus</i> , derecha.....	2
Figura 2. Mecanismo de reacción del radical superóxido	6
Figura 3. Mecanismo de reacción de enzimas antioxidantes.....	8
Figura 4. Antioxidantes como secuestradores de radicales libres.....	11
Figura 5. Estructura de dos flavonoides aislados de <i>Tilia argentea</i>	12
Figura 6. Poder reductor del extracto acuoso de <i>Tilia argentea</i> (fam. <i>Tiliaceae</i>).....	13
Figura 7. Poder reductor de los extractos acuosos del té de tila (<i>Tilia argentea</i>), salvia griega (<i>Salvia triloba</i> L.) y algunos té negros comerciales de Turquía (<i>Camelia sinensis</i>)	14
Figura 8. Mecanismo de reacción de 2'-aminoetildifenilborato con la rutina	20
Figura 9. Mecanismo de reacción de vainillina con taninos	21
Figura 10. Poder reductor de extractos de semilla de <i>H. terebinthinaceus</i>	30
Figura 11. Preparación de los extractos.....	49
Figura 12. Preparación de las diluciones	50
Figura 13. Esquema para la medición de poder reductor	51
Figura 14. Preparación de diluciones para el método de DPPH•.....	52
Figura 15. Esquema del método de DPPH•.....	52
Figura 16. Curva de calibración de fenoles totales	53

Figura 17. Curva de calibración para flavonoides	54
Figura 18. Curva de calibración para taninos.....	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Diluciones para preparar la curva de calibración de fenoles totales	26
Tabla 2.	Diluciones para preparar la curva de calibración de flavonoides	27
Tabla 3.	Diluciones para preparar la curva de calibración de taninos.....	28
Tabla 4.	Rendimiento de los extractos de semilla del <i>H. terebinthinaceus</i> ...	29
Tabla 5.	Actividad antirradical de los extractos de la semilla del <i>H. terebinthinaceus</i>	32
Tabla 6.	Contenido de fenoles totales en extractos de semilla de <i>H. terebinthinaceus</i>	33
Tabla 7.	Contenido de flavonoides en extractos de semilla de <i>H. terebinthinaceus</i>	35
Tabla 8	Contenido de taninos condensados en extractos de semillas de <i>H. terebinthinaceus</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ROS	Especies reactivas de oxígeno
RL	Radicales libres
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
DPPH[•]	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
FRAP	Análisis del poder reductor férrico/antioxidante
SOD	Superóxido dismutasa
CAT	Catalasa
GPx	Glutación peroxidasa
FC	Folin-Ciocalteu
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
ABTS	6-sulfonato-3-etilbenzotiazolina
AAR	Actividad antirradical
BHT	Hidroxitolueno butilado
O₂^{•-}	Anión superóxido
•OH	Radical hidróxilo
UV	Ultravioleta
Vis	Visible
ROO[•]	Radical peroxilo
TCL	Cromatografía en capa fina
CG	Cromatografía de gases
DMSO	Dimetilsulfóxido

INTRODUCCIÓN

Actualmente el área de las ciencias de los alimentos y de la nutrición se ha hecho presente cada vez con mayor intensidad, sobre todo aquella conocida como la de los "alimentos funcionales" que acepta el papel de los componentes alimenticios, como nutrientes esenciales para el mantenimiento de la vida así como de la salud, y de los componentes no nutricionales pero que contribuyen a prevenir o retardar las enfermedades crónicas de la edad madura (Best, 1997; Hollingworth, 1997).

Los alimentos funcionales contienen también sustancias fisiológicamente activas que cumplen, al igual que los nutrientes esenciales, una función de beneficio contribuyendo a reducir la incidencia de ciertas enfermedades crónicas y por tanto son necesarias para una vida saludable (Caragay, 1992).

Un alimento funcional se define como: "todo aquel alimento semejante en apariencia física al alimento convencional, consumido como parte de la dieta diaria, pero capaz de producir efectos metabólicos o fisiológicos, útiles en la conservación de una buena salud física y mental, reduciendo el riesgo de enfermedades crónico-degenerativas, además de sus funciones nutricionales básicas". Cabe mencionar, que el alimento con carácter de funcional no necesariamente está clasificado como un medicamento.

Dentro de los alimentos funcionales, encontramos productos tales como los aceites vegetales, los productos de soya y los tés. En relación a estos últimos, es importante resaltar que en la literatura se ha encontrado que el té verde y el té negro tienen propiedades terapéuticas y quimiopreventivas

(Dufrense *et al.*, 2001; Wiseman *et al.*, 2001) atribuidas a la presencia de antioxidantes, esto también sucede con el té de tila. El té de tila, se obtiene de las flores del tilo, un árbol que pertenece a la familia *Tiliaceae*. El *H. terebinthinaceus* (cuetla) Figura 1, al igual que el tilo, pertenece a la familia *Tiliaceae*.

En la familia *Tiliaceae*, existen especies que poseen propiedades biológicas importantes, como la *Tilia tomentosa* que presenta actividad relajante muscular (Hosseinzadeh *et al.*; 2003), y se utiliza generalmente contra los síntomas de la tos, la gripe y la bronquitis (Gruenwald *et al.*, 2000). Cabe señalar que a partir de esta planta se aislaron dos flavonoides, los cuales tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias (Toker *et al.*, 2004). Otras plantas que también pertenecen a la familia *Tiliaceae* son la *Micrococos paniculata* a quien se le atribuyen propiedades insecticidas (Bandara *et al.*; 2000) y a la *Triumfetta rhomboidea* actividad antimicrobiana y antiviral (Cos *et al.*; 2002).



Figura 1. Árbol, izquierda y semillas del *H. terebinthinaceus*, derecha

La familia *Tiliaceae*, hasta la fecha ha sido poco estudiada, y del *H. terebinthinaceus* no existe información científica, sólo se tiene la clasificación taxonómica. El *H. terebinthinaceus*, es un árbol que mide de 5 a 10 m de altura; Figura 1. La población de la región mixteca lo utiliza en infusiones para tratamientos de diversas enfermedades de la piel como son el acné, el paño facial; también lo utilizan para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Es probable que estas propiedades se deban principalmente a la presencia de compuestos fenólicos, tal y como ha sido señalado en algunos estudios previos, *vide supra*.

Diversos estudios llevados a cabo en los últimos años, han puesto de manifiesto el poder antioxidante de algunos compuestos fenólicos presentes en distintas bebidas y frutas (zumos de fruta, vino, té, tomate, naranja y pomelo). Esta propiedad se asocia a su capacidad de capturar radicales libres, que hace que presenten un efecto positivo frente a distintas perturbaciones de la calidad de los alimentos y de la salud. En este último sentido, son numerosos los trabajos que muestran su efecto protector frente a determinadas enfermedades como alteraciones cardiovasculares y cancerígenas (Lindley, 1998; Papas, 1999).

En relación a esto surge la necesidad de estudiar el *Heliocarpus terebinthinaceus* (cuetla) y sus propiedades antioxidantes. Hoy en día, no se tienen datos científicos del árbol *Heliocarpus terebinthinaceus*, por ello fue importante realizar un estudio del mismo. Se sabe que extractos de las partes aéreas de especies pertenecientes a la familia *Tiliaceae*, poseen compuestos con actividad antioxidante, por lo cual se planteó evaluar ésta propiedad en las semillas del cuetla.

Para el presente estudio, fue necesario determinar la actividad antirradical y el poder reductor de las fracciones de hexano, éter etílico, cloroformo, acetona, acetato de etilo y de metanol de las semillas del *Heliocarpus terebinthinaceus*. Adicionalmente, se cuantificaron los fenoles totales, los flavonoides y taninos.

1 ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS

En el presente capítulo se describe de manera particular el origen de los radicales libres y los factores que promueven la generación de estos, así como los daños que causan la presencia de los mismos en los sistemas biológicos. También, se hace un análisis de la importancia biológica de los antioxidantes, la función que tienen en los alimentos y en los sistemas biológicos en general. Adicionalmente, se señalan algunas de las propiedades de los antioxidantes y la relación que guardan con su estructura. Finalmente, se presentan algunas de las plantas más representativas de la familia *Tiliaceae* y los estudios fitoquímicos y de actividad antioxidante reportados en la literatura. Así como el fundamento de algunas metodologías para la medición de la actividad antioxidante.

1.1 Estrés oxidativo

El oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia (Davis, 1995), representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular al mismo tiempo que involucra un peligro potencial debido a las características paramagnéticas de este gas, responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos y dotados de una reactividad alta conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés).

Las ROS son radicales libres (RL) o precursores de radicales. En los orbitales, los electrones giran en pares con un espín particular, esto se conoce como máxima estabilidad natural; por tanto, si hay electrones desapareados en un orbital, se generan especie moleculares altamente reactivas que tienden a robar un electrón de cualquier otro átomo para compensar su deficiencia electrónica.

El oxígeno, es el principal radical libre, ya que el tiene dos electrones desapareados.

Entre las ROS destacan:

Radicales: ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$), alcoxilo (RO^{\bullet}), peroxilo (ROO^{\bullet}) y óxido de nitrógeno (NO^{\bullet})

No radicales: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singulete $^{\bullet}O_2$ y peroxinitrito ($ONOO^-$).

Las ROS tienen un origen tanto endógeno, como exógeno. Entre las fuentes endógenas destacan:

1. La cadena respiratoria, donde la reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de las ROS.
2. Las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos), utilizan el sistema de la NADPH oxidasa generando directamente al ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Por otra parte, como mecanismo de defensa, dichas células también generan óxido de nitrógeno (NO^{\bullet}), por acción de la óxido-nítrico-sintasa sobre la arginina intracelular. La combinación del $O_2^{\bullet-}$ con el NO^{\bullet} da lugar a la formación del $ONOO^-$ capaz de inducir peroxidación lipídica en las lipoproteínas.
3. La autooxidación de compuestos de carbono tales como aminoácidos, proteínas, lípidos, glicósidos y ácidos nucleicos dan lugar también a la formación de estos radicales.
4. La activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario como la hipoxantina, xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamino oxidasa y ciclooxigenasa, lipoxigenasa, son fuentes representativas de esta producción (Fridovich, 1976).

Las fuentes exógenas de radicales libres pueden ser:

Ambientales. Radiación electromagnética, luz solar, ozono, tabaco, etc.

Farmacológicas. Xenobióticos, drogas, etc.

Nutricionales. Contaminantes, aditivos, pesticidas, etc.

1.2 Daño oxidativo a biomoléculas

Son muchas las ROS que actúan como oxidantes biológicos, pero el $O_2^{\bullet-}$ es el mayor reductor, la simple adición de un protón da lugar a la formación de HO_2^{\bullet} , convirtiéndose este en un agente oxidante muy activo. Estas transformaciones se resumen en la Figura 2:

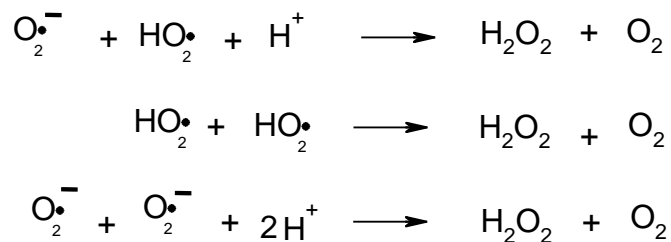


Figura 2. Mecanismo de reacción del radical superóxido

Las ROS producen acciones diversas sobre el metabolismo de los principios inmediatos, que pueden ser el origen del daño celular:

1. Sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL).
2. Sobre los glicósidos, actúan alterando las funciones celulares tales como las asociadas a la actividad de las interleucinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores.
3. Sobre las proteínas produciendo inactivación y desnaturalización.
4. Sobre los ácidos nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis.

1.3 Procesos fisiológicos y fisiopatológicos relacionados con los radicales libres

Ante el estrés oxidativo el organismo responde con la defensa antioxidante, pero en determinadas ocasiones puede ser insuficiente, desencadenando diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos.

En la actualidad son muchos los procesos relacionados con la producción de radicales libres como son: mutagénesis, transformación celular, cáncer, arteriosclerosis, infarto de miocardio, diabetes, enfermedades inflamatorias, trastornos del sistema nervioso central, envejecimiento celular, etc. (Rice-Evans *et al.*, 1995; Halliwell, 1996).

1.4 Función de los antioxidantes

Los sistemas biológicos en ambientes oxigenados han desarrollado mecanismos de defensa, tanto a nivel fisiológico como bioquímico. Entre ellos destacan, a nivel fisiológico, el sistema microvascular, cuya función es mantener los niveles de O_2 en los tejidos y a nivel bioquímico, la defensa antioxidante puede ser enzimática o no enzimática, así como ser un sistema reparador de moléculas. A continuación se resumen los mecanismos de defensa bioquímicos:

1.4.1 Sistema enzimático. Los organismos aerobios han desarrollado enzimas antioxidantes tales como: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y DT-diaforasa, que actúan tal y como se muestra en las ecuaciones siguientes (Figura 3).

La SOD es la responsable de la reacción de dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , que en reacciones posteriores, catalizadas por la catalasa o por la GPx, se convierte en H_2O y O_2 . La catalasa se encuentra principalmente en los peroxisomas, y su función principal consiste en eliminar el H_2O_2 generado de la β -oxidación de los ácidos grasos, mientras que la GPx degrada el H_2O_2

1.4.3.1 Directo. Reducción de los grupos (S-S) de los aminoácidos azufrados de las proteínas por enzimas específicas como la disulfuro reductasa y la sulfóxido reductasa.

1.4.3.2 Indirecto. En primer lugar se reconoce el daño molecular siendo éste eliminado o degradado, y en segundo lugar se sintetiza la parte eliminada. Esto ocurre tanto en las proteínas oxidadas y en peróxidos lipídicos de cadenas hidrocarbonadas, así como en las oxidaciones del ADN y ARN.

1.5 Características de los antioxidantes

Las principales características de un compuesto o sistema antioxidante son, la prevención o detección de una cadena de propagación oxidativa, mediante la estabilización del radical generado y la regeneración del antioxidante radicalario ayudando así a reducir el daño oxidativo en el cuerpo humano (Namiki, 1990).

Gordon (1990) da una clasificación de los antioxidantes, mencionando que; hay dos tipos principales de antioxidantes, el "primario" (ruptura de la reacción en cadena, secuestradores de radicales libres) y el "secundario" o "preventivo". Los mecanismos antioxidantes "secundarios" pueden incluir la desactivación de metales, inhibición de los hidroperóxidos lipídicos interrumpiendo la producción de volátiles indeseables, la regeneración de antioxidantes "primarios", eliminar el oxígeno singulete, etc.

Por lo anterior se puede definir como antioxidantes en el ámbito de los alimentos como “aquellas sustancias que, en bajas cantidades, actúan previniendo o retardando grandemente la oxidación de materiales fácilmente oxidables tales como las grasas” (Chipault, 1962).

1.6 Antioxidantes en alimentos

En el organismo se produce un equilibrio entre oxidantes/antioxidantes, cuando este equilibrio se rompe a favor de los oxidantes se produce un estrés

oxidativo el cual está implicado en muchos procesos fisiopatológicos, *vide supra*. Por tanto, es de vital importancia el consumo de alimentos que contengan antioxidantes naturales y de esta manera se pueda mantener el equilibrio entre oxidantes/antioxidantes o incluso esté a favor de los antioxidantes. Además, si tenemos en cuenta que durante la vida se produce un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, y a medida que el individuo envejece dicho balance está a favor de los oxidantes, es de vital importancia un consumo de alimentos ricos en antioxidantes naturales para contrarrestarlos (Cao *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1999).

1.7 Antioxidantes indispensables para la salud

En los últimos años ha cobrado especial interés, el estudio de la actividad biológica de los polifenoles y en especial la evaluación de la capacidad antioxidante asociada a ellos. Los polifenoles en vegetales, frutas y té pueden prevenir enfermedades degenerativas, incluyendo cánceres, con la acción antioxidante.

Se ha comprobado también su capacidad para actuar como donadores de hidrógenos o quelar iones metálicos como el hierro y el cobre, inhibiendo la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales están implicadas en la patogénesis de las enfermedades coronarias (Hertog *et al.*, 1993). Cabe mencionar que algunos polifenoles (como los aislados del té) inhiben la oxidación de las LDL *in vitro* (Riemersma *et al.*, 2001). En experimentos *in vitro*, también se ha confirmado el papel protector de la quercetina, la cual ejerce efectos de inhibición frente a células cancerígenas en humanos: en colon (Ranelletti *et al.*, 1992), glándula mamaria y ovario (Scambia *et al.*, 1990), en región gastrointestinal (Yoshida *et al.*, 1990) y en la leucemia (Yoshida *et al.*, 1992; Teofili *et al.*, 1992; Ren *et al.*, 2001). En experiencias con animales, una dosis oral de polifenoles suprimió la carcinogénesis de varios agentes carcinógenos (Sakakibara *et al.*, 2003). Los polifenoles también demuestran actividad de vasorrelajación y antialérgica (Sakakibara *et al.*, 2003).

Diversos estudios ponen de manifiesto que los polifenoles presentan mayor poder antioxidante combinados que de forma aislada (Ueda y Armstrong, 1996). Esta afirmación justifica el estudio de la actividad antioxidante de los extractos de semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus*.

1.8 Fuentes naturales de los antioxidantes

Las plantas como fuentes de antioxidantes se pueden utilizar para la preservación del valor nutritivo previniendo el deterioro oxidativo de lípidos y para propósitos medicinales. La mayor parte de la capacidad antioxidante de los vegetales puede ser debida a los polifenoles que poseen características biológicas extensas y, particularmente, a su propiedad de secuestro de radicales libres (Aquino *et al.*, 2001).

Una gran cantidad de estudios han establecido que los compuestos fenólicos de las plantas incluyendo los flavonoides son antioxidantes potentes con efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos (Middleton y Kandaswami, 1994; Rice-Evans *et al.*, 1997).

La actividad antioxidante de los polifenoles es la propiedad de mayor interés, ya que ha sido blanco de un sin número de estudios; este efecto se debe a que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, los cuales reaccionan con los radicales libres (Figura 4).

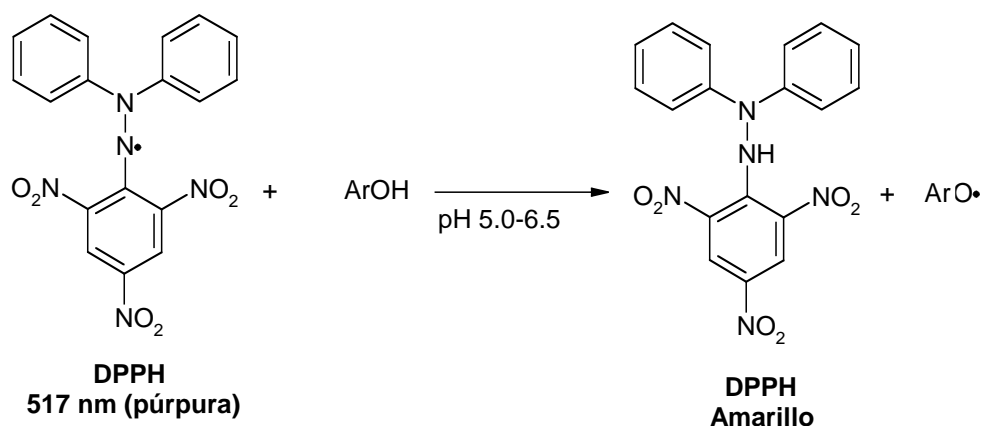


Figura 4. Antioxidantes como secuestradores de radicales libres

Consecuentemente es importante determinar la cantidad y especies de polifenoles en vegetales, frutos y tés. El número de polifenoles naturales se ha estimado en casi más de un millón, porque aparecen generalmente como glicósidos, y las diferentes especies de azúcares y sus diferentes formas de enlaces generan una gran variedad. Sin embargo, la bioactividad se atribuye al fragmento aglicona no al azúcar (Sakakibara *et al.*, 2003).

1.9 Estudios relacionados con las propiedades biológicas de plantas de la familia *Tiliaceae*

La *Tilia argentea* (fam. *Tiliaceae*), también conocida como *Tilia tomentosa*, es una planta utilizada mundialmente contra los síntomas de la tos, gripe y bronquitis (Gruenwald *et al.*, 2000). A partir de las hojas de esta planta se aislaron dos flavonoides glicosídicos, el 3,7-O- α -L-diramnosilkaempferol y la 3,7-O- α -L-diramnosilquercetina (Figura 5). Estos compuestos tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias en dosis de 50 mg/kg sin inducir algún daño gástrico y/o presentar problemas de toxicidad (Toker *et al.*, 2004).

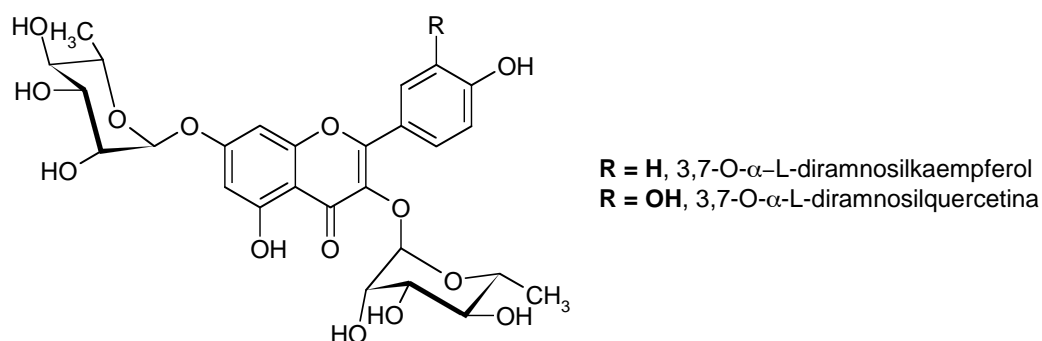


Figura 5. Estructura de dos flavonoides aislados de *Tilia argentea*

Yildirim *et al.*, (2000) realizaron un estudio comparativo de la actividad antioxidante y antimicrobiana a partir de extractos de tres plantas, *Tilia argentea* (té de tila), *Salvia triloba* L. (salvia griega), y *Camelia sinensis* (té negro). Para

medir la actividad antioxidante utilizaron el método de tiocianato y el método de poder reductor. Los resultados obtenidos por ambos métodos, en un intervalo de 50 a 500 μg de extracto acuoso liofilizado de la planta correspondiente, indican que la actividad antioxidante aumenta conforme aumenta la concentración del extracto (Figura 6).

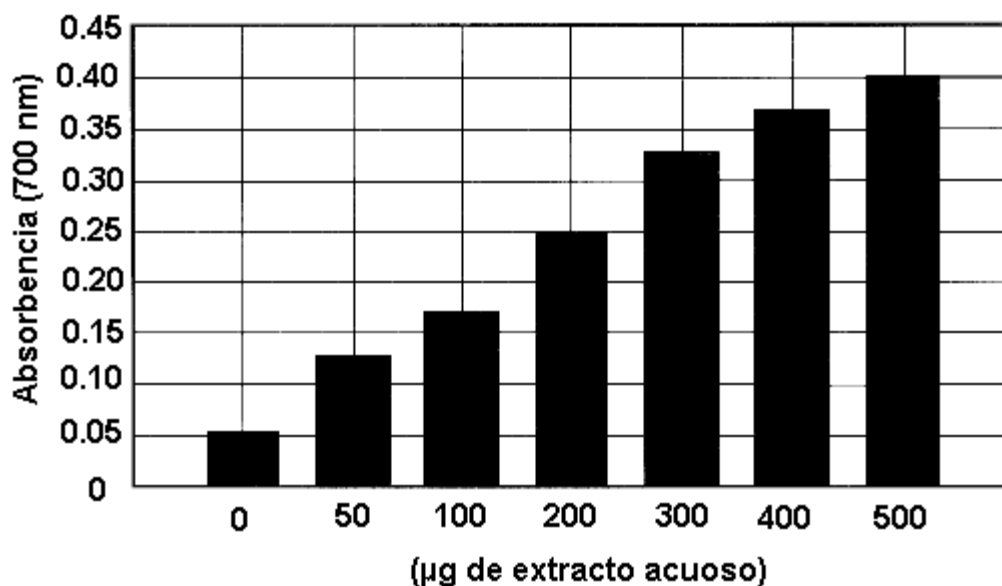


Figura 6. Poder reductor del extracto acuoso de *Tilia argentea* (fam. Tiliaceae)

En ese mismo estudio Yildirim *et al.*, demostraron que *Tilia argentea* tiene un efecto antioxidante y reductor equiparable a *Camelia sinensis* (Figura 7). El estudio se realizó a una concentración de 100 μg de extracto acuoso.

1.10 Métodos para evaluar la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de un compuesto puede evaluarse *in vitro* por medio de experimentos sencillos que examinan directamente dicha habilidad y que a la vez evalúan el posible efecto prooxidante sobre diferentes moléculas.

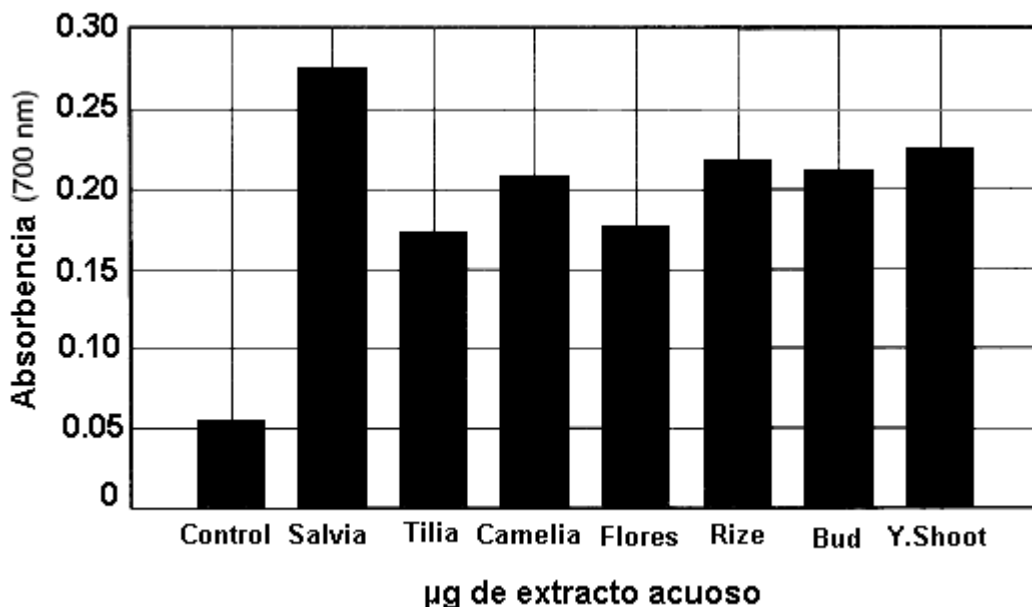


Figura 7. Poder reductor de los extractos acuosos del té de tila (*Tilia argentea*), salvia griega (*Salvia triloba L.*) y algunos té negros comerciales de Turquía (*Camelia sinensis*)

Estos métodos deben ser rápidos, reproducibles y requerir cantidades pequeñas de los compuestos químicos por analizar, además de no estar influenciados por las propiedades físicas de dichos compuestos (Marco, 1968). Los resultados de los ensayos *in vitro* pueden usarse como un indicador directo de la actividad antioxidante *in vivo*; un compuesto que es poco efectivo *in vitro*, no será mejor *in vivo* (Aruoma *et al.*, 1997). Estos ensayos también pueden alertar sobre posibles efectos dañinos de los compuestos químicos. La mayoría de los métodos para determinar actividad antioxidante consisten en acelerar la oxidación en un sistema lipídico, usualmente por calentamiento, y monitoreando a continuación el consumo de oxígeno, la pérdida de sustrato o bien la formación de producto. Debido a que muchos factores pueden afectar la oxidación, incluyendo la temperatura, la presión de oxígeno y catalizadores metálicos, los resultados pueden variar dependiendo de las condiciones de oxidación empleadas. Los ensayos que miden sustratos o productos, también

pueden dar resultados variables dependiendo de su especificidad (Fukumoto y Mazza, 2000).

Los siguientes son ejemplos de los modelos *in vitro* más frecuentemente usados para la evaluación de la actividad antioxidante total.

- a) Método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) (Brand-Williams *et al.*; 1995). Limitado por su reproducibilidad interensayos.
- b) Ensayo FRAP, (Del inglés ferric-reducing antioxidant power), (Benzie y Strain, 1996). Mide la capacidad de reducción.
- c) Método ORAC, (Del inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Cao *et al.*, 1997). Cada antioxidante analizado presenta comportamientos muy dispares.
- d) Método del 6-sulfonato-3-etilbenzotiazolina (ABTS) (Re *et al.*, 1999). La capacidad de captura de radicales libres en este método no es un reflejo de su verdadera actividad antioxidante.
- e) Método del N,N-dimetil-*p*-fenilendiamina (DMPD) (Fogliano *et al.*, 1999). Método con reproducibilidad interensayo alta, útil para medios no lipídicos.

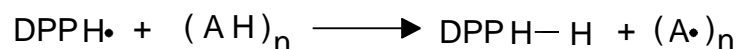
A continuación se describen los métodos utilizados en el presente trabajo:

1.10.1 Análisis del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP). El análisis de FRAP fue introducido por Benzie y Strain (Benzie y Strain, 1996; Pulido-Bravo y Saura-Calixto, 2000) para medir la actividad antioxidante total y se basa en la capacidad de los polifenoles para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} . Este método fue modificado recientemente para su uso en microplacas de 96-pozos (Tsao y Deng, 2004), dando una reproducibilidad mejor y un rendimiento de procesamiento más alto de muestras. El análisis se basa en el poder reductor de un antioxidante que reduce el ion férrico (Fe^{3+}) al ion ferroso (Fe^{2+}); formando un complejo azul. Una absorción alta a una longitud de onda de 700

nm indica un poder de reducción alto del fitoquímico, es decir una actividad antioxidante alta (Roginsky y Lissi, 2005).

El valor de FRAP se ha usado para determinar la actividad antioxidante de vinos rojos (Arnous *et al.*, 2001). El trabajo de Schleisier *et al.*, (2002) fue diseñado para determinar la actividad antioxidante en jugos y extractos de té en equivalentes de Fe²⁺. El índice inicial absoluto de la reducción de la ferrilmetilmoglobina determinado por espectroscopía en la región visible fue sugerido para caracterizar la actividad antioxidante de flavonoides individuales (Silva *et al.*, 2002).

1.10.2 Método del DPPH•. Brand-Williams *et al.*, (1995) evaluaron la actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) en una solución metanólica. La reducción del DPPH• se monitorea por la disminución en la absorbencia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH• absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales. El modelo que explica la actividad de un compuesto como antirradical se ejemplifica con la siguiente ecuación:



Donde AH es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, tal es el caso de los fenoles. El nuevo radical formado (A•) puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A). La reacción entre el DPPH• y un compuesto depende de la conformación estructural del mismo, por lo que las comparaciones cuantitativas no siempre son apropiadas.

1.11 Cuantificación de compuestos fenólicos

La cuantificación e identificación de los componentes fenólicos en la dieta ha despertado un gran interés por su importancia nutricional, lo que ha hecho que cada día sean más los datos que se pueden encontrar en la bibliografía científica sobre el perfil fenólico de los alimentos. Además, la gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, han traído consigo la necesidad de desarrollar un gran número de técnicas analíticas para su identificación y cuantificación (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

Dentro de las técnicas analíticas para la cuantificación y/o identificación de compuestos fenólicos se encuentran las técnicas cromatográficas como son la cromatografía de capa fina (TCL), la cromatografía de gases (CG) y la de líquidos de alta resolución (HPLC) (Escarpa y Gonzalez, 2001), y también se encuentran las técnicas espectrofotométricas (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

a) **Técnicas espectrofotométricas.** Los métodos espectrofotométricos no son nuevos en el campo de la química analítica y hasta hoy en día son usados frecuentemente para la determinación de polifenoles (Escarpa y Gonzalez, 2001). Entre este tipo de técnicas, los métodos usados comúnmente para determinar polifenoles en alimentos destacan el ensayo de la vainillina para la determinación de compuestos flavan-3-ol, dihidrochalconas y proantocianidinas que tienen una unión simple en la posición 2,3 y poseen grupos hidroxilos en la posición meta del anillo B (Martínez-Valverde *et al.*, 2000) y el ensayo de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de polifenoles totales, esta técnica llegó a ser la más utilizada para determinar de manera cuantitativa a los polifenoles. Este método consiste básicamente en generar cierto color a través de la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu en un medio alcalino a una determinada muestra.

Swain y Goldstein (1964), revisaron diversos métodos espectrofotométricos, y con base en esta revisión recomendaron el ensayo de Folin-Ciocalteu como el reactivo más conveniente para la determinación espectrofotométrica de polifenoles totales (Escarpa y Gonzalez, 2001). Por esta

razón, se decidió usarlo en la determinación de fenoles en los extractos de *H. terebinthinaceus*.

b) **Ensayos ultravioleta.** Se han realizado numerosos estudios para desarrollar técnicas rápidas de cuantificación de compuestos fenólicos mediante ensayos ultravioletas. Cada grupo de compuestos fenólicos se caracteriza por tener una o varias absorbencias máximas a distintas longitudes de onda dentro del espectro ultravioleta. Así, los fenoles simples tienen una absorbencia máxima entre 220 y 280 nm, mientras que los compuestos fenólicos relacionados presentan una amplia variación en la longitud de onda a la cual presentan una absorbencia máxima. Una de las técnicas más empleadas dentro de este grupo es la determinación del ácido clorogénico, el cual se cuantifica después de su extracción con etanol y posterior lectura de la absorbencia máxima a una longitud de onda de 325-328 nm (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

c) **Técnicas cromatográficas.** Las técnicas cromatográficas han permitido la separación, aislamiento, purificación e identificación de compuestos fenólicos, así como el estudio de la interacción entre los polifenoles y otros componentes de los alimentos. Hoy en día, las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) son las más empleadas para la separación y cuantificación de compuestos fenólicos. Existen distintos soportes y fases móviles que permiten el análisis de antocianinas, procianidinas, flavonas y ácidos fenólicos. Mediante el empleo de HPLC, se puede determinar un gran número de polifenoles de interés nutricional, como fenoles simples, ácidos fenólicos y sus derivados, y los distintos flavonoides; sin embargo, esta técnica requiere la utilización de métodos de extracción adecuados a cada uno de los compuestos a analizar. Esto conduce a un tratamiento muy elaborado de las muestras (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

A continuación se analizan los fundamentos de los métodos utilizados en el presente trabajo para la determinación de compuestos fenólicos.

1.11.1 Técnica de Folin-Ciocalteu (FC). La determinación de fenoles totales no está directamente relacionada con la medición de actividad antioxidante, pero puede ser útil para tales estudios, en especial si se combinan con métodos para medir actividad antioxidante.

Entre los métodos para la medición de fenoles totales se encuentra el de FC, uno de los métodos más antiguos para determinar el contenido de fenoles totales. Esta prueba consiste en mezclar tungstato y molibdato en un medio altamente básico (Na_2CO_3 al 5-10 %, acuoso). Los polifenoles son fácilmente oxidables en medio básico quienes reaccionan con el molibdato formando óxido de molibdeno MoO , este compuesto puede ser identificado y cuantificado por espectroscopía de uv/vis debido a que absorbe a una longitud de 750 nm. El contenido de fenoles totales generalmente, se expresa en equivalentes de ácido gálico. La prueba de FC es similar a la de ABTS ya que ambos métodos ayudan a la determinación de polifenoles y monofenoles. La ventaja del método de FC sobre ABTS es que FC está relacionado con la aparición de una absorbencia que es consecuencia de la aparición de color debido a la reacción, no a una disminución de la absorbencia como ocurre con la prueba de ABTS. Otra de las ventajas es que ésta prueba (FC) no requiere de una estandarización de las condiciones del análisis. Aunque, si bien el método de FC no está relacionado con la medición de actividad antioxidante, parece ser uno de los mejores métodos para estimar esta actividad antioxidante en alimentos, con la excepción de que la muestra no contenga una cantidad de proteínas significativa. En la literatura se pueden encontrar diversos ejemplos de la aplicación del método de FC con respecto a productos alimenticios como es el caso del vino rojo y blanco, té y jugos (Roginsky y Lissi, 2005).

1.11.2 Determinación de flavonoides. El compuesto 2-aminoetil difenil borato reacciona en metanol con el grupo hidroxilo de los flavonoides en la posición 2' del anillo B para formar el 2'-difenilborato del flavonoide correspondiente, estos compuestos presentan una coloración amarilla, (Figura

8). La presencia de ese compuesto, se determina a partir de espectrofotometría a una longitud de onda de 404 nm. La rutina pertenece al grupo de los flavonoles y se usa rutinariamente como estándar en esta técnica. Cabe señalar que la determinación de flavonoides se hace en un medio neutro (Robertson y Hall, 1989).

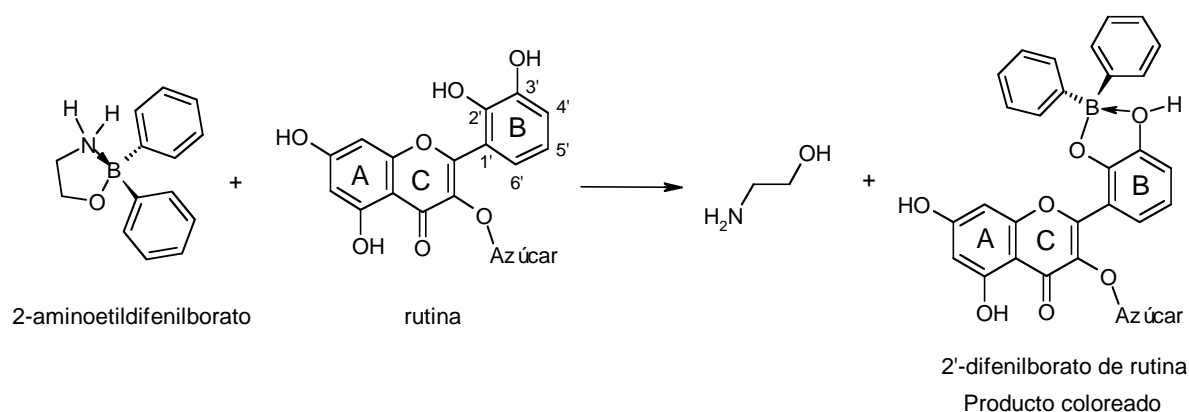


Figura 8. Mecanismo de reacción de 2'-aminoetildifenilborato con la rutina

1.11.3 Determinación de taninos. El método de la vainillina se usa ampliamente para la cuantificación de proantocianidinas (taninos condensados) en frutas y granos. El ensayo de la vainillina es específico para flavan-3-ol, dihidrochalconas y proantocianinas, las cuales tienen un enlace simple en la posición 2,3 y poseen grupos hidroxilos en la posición *meta* del anillo B. La catequina es un flavan-3-ol monomérico frecuentemente usado como un estándar en el ensayo de la vainillina. El metanol, disolvente usado para el ensayo de la vainillina, puede afectar la cinética de reacción de la catequina y taninos con vainillina diferencialmente. El ensayo de la vainillina en metanol es más sensible para los taninos poliméricos que para los flavan-3-oles monoméricos. Este ensayo es generalmente reconocido como un método útil para la detección y cuantificación de taninos condensados en plantas debido a

su sensibilidad, especificidad y simplicidad. Sin embargo, debe ser considerada la posibilidad de interferencias con dihidrochalconas y antocianinas. El método se puede usar para cuantificar taninos condensados en un intervalo de 5-500 μg con precisión y exactitud mayores a 1 μg cuando la concentración óptima de reactantes y disolventes son elegidos (Shahidi y Naczka, 1995).

Este método se basa en la condensación de la vainillina con proantocianinas en una solución acidificada. La vainillina protonada, un electrofílico débil, reacciona con el anillo del flavonoide en la posición 6 u 8. El producto de esta reacción se deshidrata fácilmente para dar un color rosa ligero a un intenso rojo cereza (Figura 9). La estabilidad del color del aducto vainillina-tanino puede incrementarse cuando la luz es excluida y la temperatura de reacción es controlada y entonces se obtienen resultados exactos y reproducibles (Shahidi y Naczka, 1995).

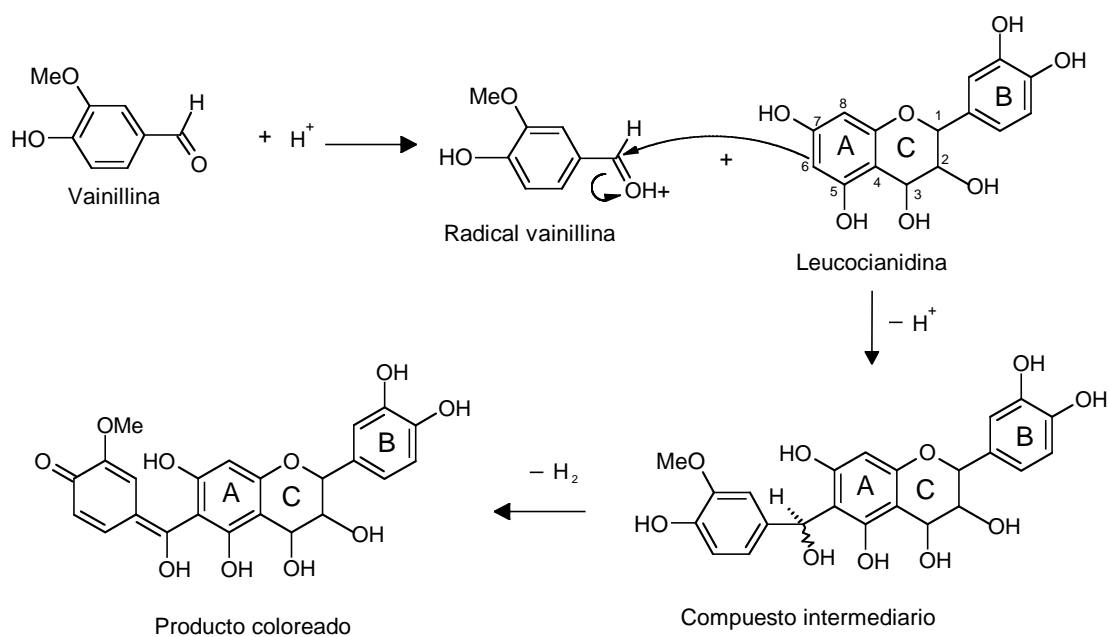


Figura 9. Mecanismo de reacción de vainillina con taninos

2 METODOLOGÍA

2.1 Equipos

Espectrofotómetro UV/Vis, Lambda 35 Perkin Elmer; Espectrofotómetro de Elisa, Stat-Fax-2000, Awareness Technologies Inc., centrífuga, rotavapor y sonicador.

2.2 Colecta de material vegetal

La colecta se realizó aleatoriamente de las plantas que crecen dentro del área que ocupa la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM). Esta se hizo cuando las semillas estaban maduras, lo cual ocurre entre los meses de enero y febrero. Las semillas se secaron a temperatura ambiente, protegiendo el material de la acción directa de la luz solar. Las semillas se almacenaron dentro de bolsas de plástico, perfectamente cerradas con el fin de evitar la presencia de microorganismos, tales como los hongos.

2.3 Preparación de las semillas

La semilla se molió con un molino de tornillo.

2.4 Preparación de los extractos

Se pesaron 37 g de semilla molida y seca, se llenaron los cartuchos para el equipo Soxhlet con esta semilla pesada, se colocaron los cartuchos en el equipo Soxhlet agregándoles 150 mL de hexano a cada uno de los cartuchos, se dejó sifonear por un período de 5 horas para llevar a cabo la extracción, pasado este tiempo se recupera el disolvente por evaporación rotatoria obteniéndose el extracto seco.

Por otra parte, los cartuchos que aun contienen las semillas se dejan secar a temperatura ambiente resguardándolos de la luz y una vez secos, se colocan nuevamente en el equipo y se le agregan 150 mL de éter etílico a cada uno de los cartuchos, se deja sifonear nuevamente por un período de 5 horas y pasado este tiempo el disolvente se evapora por medio de evaporación rotatoria y se obtiene el extracto seco de éter etílico. Nuevamente los cartuchos que contienen a la semilla, se dejan secar a temperatura ambiente y se repite el mismo procedimiento siguiendo el orden cloroformo, acetato de etilo, acetona y finalmente metanol, de acuerdo a la polaridad del disolvente, ver Figura 11 en apéndice A.

En el caso de los extractos de éter etílico y hexano se realizó un desengrasado que consistió en agregar 20 mL de metanol tanto al extracto de hexano como al de éter etílico, después se llevó a cabo un filtrado (filtro de No. 40) y por último el disolvente se recuperó por medio de evaporación rotatoria, ver Figura 11 en apéndice A.

La fracción de metanol se hidrolizó con ácido sulfúrico al 1 % por 4 horas y se hicieron extracciones con acetato de etilo y se llevó a sequedad.

2.5 Poder reductor de los extractos (FRAP)

2.5.1 Preparación de las diluciones. Se pesó 1 mg de extracto seco y se diluyó en 3 mL de etanol y después en 7 mL de agua destilada. Esta dilución corresponde a 1000 µg de extracto seco o una concentración de 100 µg/mL.

Se tomaron 3 mL de la dilución anterior y se diluyó en 1 mL de agua destilada. Esta dilución corresponde a 300 µg o a una concentración de 75 µg/mL de extracto seco

Se tomó 1 mL de la dilución de 1000 µg y se diluyó en 1 mL de agua destilada. Esta dilución corresponde a 50 µg/mL, y en extracto seco equivale a haber pesado 100 µg de extracto seco por haber tomado una décima parte de la solución original.

Se tomó 1 mL de la dilución de 1000 μg y se diluyó en 3 mL de agua destilada. La concentración final es de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y en extracto seco equivale a 100 μg de extracto seco porque se toma la décima parte de la solución original.

Se tomó 1 mL de la dilución de 1000 μg y se diluyó en 9 mL de agua destilada. Esta dilución corresponde a 100 μg de extracto seco o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cada una de las diluciones se realizó por triplicado.

Al final, se tiene una serie de soluciones con concentraciones de 100, 75, 50, 25 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ver Figura 12 en apéndice B.

2.5.2 Método de poder reductor. A cada una de las diluciones se les agregó 2.5 mL de buffer de fosfatos de potasio (0.2 M, pH 6.6) y 2.5 mL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ al 1% W/V en agua, después se incubó a 50 °C por 20 min. Una vez pasado el tiempo de incubación se le agregó 2.5 mL de ácido tricloroacético, al 10% W/V en agua y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. De esta solución se tomaron 2.5 mL del sobrenadante y se mezclaron con 2.5 mL de agua destilada. Posteriormente, se agregaron 0.5 mL de FeCl_3 al 1% y se dejó reposar por 10 min, para finalmente medir la absorbencia a 700 nm en un espectrofotómetro de UV/Vis, ver Figura 13 en apéndice B.

2.6 Actividad antioxidante de los extractos (DPPH•)

2.6.1 Preparación de las diluciones. Se pesaron los viales de cada una de las muestras y se diluyeron en 1 mL de DMSO para obtener soluciones stock de las cuales se tomaron 100 μL y se diluyeron en 900 μL para obtener la primera dilución. De esta dilución se tomaron 100 μL y se diluyeron en 900 μL para obtener la segunda dilución y así sucesivamente ver figura 14 en apéndice B.

2.6.2 Solución de DPPH•. Se pesaron 1.23 mg de DPPH• en un matraz aforado previamente tarado y se disolvieron en 25 mL de DMSO para obtener una solución 125 μM , la cual se puso en agitación en un sonicador. Se

recomienda cubrir de aluminio el vaso o recipiente que contenga la solución, para protección contra la luz.

2.6.3 Método de DPPH•. En una placa de 96 pozos, se añadieron 20 μ L de extracto y 0.2 mL del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•, 125 μ M). Se agregaron 0.02 mL de BHT (100 μ M) como estándar y como absorbencia control 0.02 mL de DMSO y a cada una se le añaden 0.2 mL de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•, 125 μ M). Las muestras y los estándares se preparan por triplicado. La placa se mantiene cubierta y en la oscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos y pasado este tiempo, se lee en un espectrofotómetro de ELISA a 545 nm, ver Figura 15 en apéndice B.

2.6.4 Cálculo de la actividad antirradical. La actividad antirradical (AAR) se calculó como porcentaje de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•), usando la ecuación siguiente:

$$\% AAR = \frac{(A_{control} - A_{muestra})}{A_{control}} (100)$$

Donde:

AAR = actividad antirradical

A muestra = absorbencia de la muestra a 545 nm

A control = absorbencia del control (ausencia del antioxidante)

2.7 Análisis estadístico de los resultados

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existía diferencia significativa, en el poder reductor y actividad antirradical, entre los diferentes extractos orgánicos de semilla de *H. terebinthinaceus*. El estudio se realizó sobre los datos obtenidos a las concentraciones más altas.

2.8 Estudio fitoquímico

2.8.1 Determinación de fenoles totales. Se preparó una solución stock de 1 mg/mL de ácido gálico. Se prepararon las siguientes diluciones para obtener la curva de calibración ver Apéndice C.

A 20 μ L del extracto o estándar correspondiente, por triplicado, se le agregaron 1.5 mL de agua destilada, 100 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu, después de 5 minutos se agregaron 300 μ L de solución de carbonato de sodio al 20 %, se dejó reposar por 2 h a temperatura ambiente o 30 min a 40°C. Posteriormente se midió la absorbencia a 765 nm. La concentración de fenoles se calcula con base en la curva de calibración y se expresó como mg equivalentes de ácido gálico/mL, Tabla 1.

Tabla 1. Diluciones para preparar la curva de calibración de fenoles totales

Concentración mg/mL	Solución stock (μ L)	Agua destilada (μ L)
0.00	0	1000
0.05	50	950
0.10	100	900
0.15	150	850
0.20	200	800
0.25	250	750
0.30	300	700
0.40	400	600
0.45	450	550
0.50	500	500

2.8.2 Determinación de flavonoides. Se preparó una solución stock de 0.1 mg/mL de rutina. Posteriormente se prepararon las diluciones para la curva de calibración, Tabla 2 ver Apéndice C.

A 100 μ L del extracto o estándar correspondiente, por triplicado, se le agregaron 1 mL de CH₃OH y 50 μ L de 2-aminoetil difenilborato al 1%, se dejó

reposar a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se midió la absorbencia a 404 nm. La concentración se calculó con base en la curva de calibración y se expresa como mg equivalentes de rutina/mL.

Tabla 2. Diluciones para preparar la curva de calibración de flavonoides

Concentración mg/mL	Solución stock (μL)	Metanol (μL)
0.00	0	1000
0.10	100	900
0.20	200	800
0.30	300	700
0.40	400	600
0.50	500	500
0.60	600	400
0.70	700	300
0.80	800	200
0.90	900	100
1.00	1000	0

2.8.3 Determinación de taninos condensados. Se preparó una solución stock de 0.2 mg/mL de (+)-catequina en metanol. Posteriormente se prepararon las diluciones para la curva de calibración, Tabla 3 ver Apéndice C.

A 100 μ L del extracto o estándar correspondiente, por triplicado, se le agregaron 1 mL de reactivo de vainillina en CH₃OH (1 volumen de reactivo de vainillina al 1% con 1 volumen de HCl al 10% en CH₃OH), se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se midió la absorbencia a 500 nm. La concentración se calculó con base en la curva de calibración y se expresó como mg equivalentes de (+)-catequina/mL.

Tabla 3. Diluciones para preparar la curva de calibración de taninos

Concentración mg/mL	Solución stock (μL)	Metanol (μL)
0.00	0	1000
0.01	100	900
0.02	200	800
0.03	300	700
0.04	400	600
0.05	500	500
0.06	600	400
0.07	700	300
0.08	800	200
0.09	900	100
0.10	1000	0

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Rendimiento de los extractos

En la Tabla 4 podemos observar que el rendimiento mas alto se obtuvo del extracto de hexano ya que se obtuvieron 0.6530 g de peso seco, equivalentes al 1.8 %, a partir de 37 g de semilla, en segundo orden está el extracto de éter etílico con 0.2558 g (0.69 %), después el extracto de acetato de etilo con 0.1967 g, en orden descendente sigue el extracto de metanol con 0.1812 g de extracto seco, y al final con un valor similar cloroformo y acetona. Estos resultados sugieren una mayor proporción de compuestos no polares en las semillas de *H. terebinthinaceus*.

Tabla 4. Rendimiento de los extractos de semilla del *H. terebinthinaceus*

Extracto	Peso de extracto (g)	Rendimiento (%)
Hexano	0.6530	1.8
Éter etílico	0.2558	0.69
Cloroformo	0.1699	0.46
Acetato de etilo	0.1967	0.53
Acetona	0.1600	0.40
Metanol	0.1812	0.49

3.2 Poder reductor (FRAP)

De acuerdo a los resultados de la prueba FRAP realizada a los extractos orgánicos de *H. terebinthinaceus*, descritos en la Figura 10, podemos establecer que los extractos más activos son el de metanol y acetato de etilo. Como era de esperarse, el extracto menos activo fue el de hexano. Esto,

posiblemente se puede atribuir, entre otras cosas, a que el método implica la determinación del poder reductor del extracto bajo condiciones hidrofílicas. Consecuentemente, se presentó una solubilización limitada de los metabolitos presentes en los extractos menos polares.

Del análisis estadístico, se desprende que sí existe una diferencia significativa de poder reductor entre todos los extractos.

Los extractos de metanol y acetato de etilo son idóneos para realizar una separación y caracterización espectroscópica de metabolitos secundarios, debido a que tienen los compuestos que le confieren el mayor poder reductor a las semillas de *H. terebinthinaceus*.

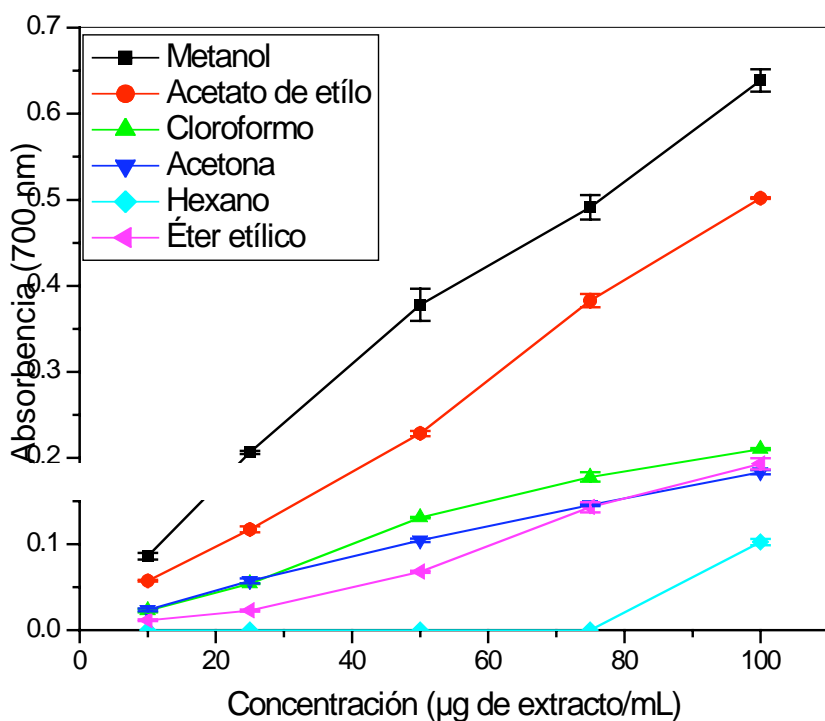


Figura 10. Poder reductor de extractos de semilla de *H. terebinthinaceus*

Los extractos orgánicos polares de *H. terebinthinaceus*, al presentar poder reductor, consecuentemente tienen la capacidad de donar electrones al

Fe³⁺ para convertirlo en Fe²⁺. Esto conlleva, finalmente a decir que dichos extractos tiene actividad antioxidante.

Al hacer un análisis comparativo de los datos obtenidos para *H. terebinthinaceus* con datos reportados en la literatura, tal como el descrito por Yildirim *et al.* (2000). Encontramos que para el extracto acuoso de *Tilia argentea*, a una concentración de 50-500 µg se tienen absorbencias de 0.1 a 0.4 aproximadamente a 700 nm. Esto nos indica que los extractos orgánicos polares (de acetato de etilo y metanol) de *H. terebinthinaceus* a concentraciones menores, de 10-100 µg, tienen una absorbencia mayor que los extractos acuosos de *T. argentea*, por lo que se puede sugerir que los extractos polares derivados de *H. terebinthinaceus* tienen un poder reductor mayor que el extracto acuoso de *Tilia argentea* (té de tila).

Se debe de considerar que en el caso del té de tila se trata de una muestra liofilizada a partir del extracto acuoso, mientras que en el caso del *H. terebinthinaceus* son extractos que concentran a los principios activos, mediante una lixiviación de la materia prima con disolventes orgánicos con polaridad ascendente.

Cabe señalar que se realizaron estudios preliminares donde se involucraron muestras con concentraciones de extractos superiores a los 100 µg/mL (valores hasta de 500 µg/mL), sin encontrarse cambios importantes en el poder reductor de las mismas.

3.3 Actividad antirradical (DPPH[•])

Los extractos estudiados, tanto los polares como los no polares, Tabla 5, tienen actividad antioxidante. En este ensayo se analizó el efecto inhibitor, de radicales, por los extractos y se puede observar que los extractos polares (metanol y acetato de etilo) nuevamente muestran una actividad mayor para atrapar al radical libre DPPH[•]. Dicha actividad, va disminuyendo de acuerdo a la polaridad.

En esta prueba se toma en cuenta el IC₅₀, es decir, el índice de concentración necesario para decolorar en un 50% la concentración inicial de DPPH[•], con el fin de tener un parámetro de referencia entre los extractos. En esta prueba hay una concentración constante de DPPH[•] por lo cual aunque se incremente la concentración del extracto habrá un límite de decoloración. Al realizar el análisis estadístico se observó que existe diferencia significativa entre la mayoría de los extractos, excepto entre los extractos de metanol y acetato de etilo.

Por otro lado, la presencia de color en los extractos debido a la oxidación de metabolitos secundarios, provoca interferencias al momento de llevar a cabo la lectura del DPPH[•], esto puede conducir a una disminución aparente de la actividad antirradical de los extractos.

Con respecto al BHT, se utilizó como estándar por ser uno de los mejores antioxidantes. En la Tabla 5, podemos observar que a una concentración de 0.26 mg de BHT/mL DMSO tiene una actividad antirradical del 50 %.

Tabla 5. Actividad antirradical de los extractos de la semilla del *H. terebinthinaceus*

Extracto	%AAR* ($\pm\sigma$)[†]	Concentración de extracto (mg/mL)
Hexano	25.63 \pm 0.29	65.3
Éter etílico	27.54 \pm 0.56	25.58
Cloroformo	36.86 \pm 0.59	16.99
Acetato de etilo	51.38 \pm 0.33	19.67
Acetona	49.19 \pm 0.88	13.08
Metanol	52.67 \pm 0.71	18.12
BHT	50.00 \pm 0.90	0.26

*porcentaje de actividad antirradical

[†] desviación estándar

Los extractos de metanol, acetato de etilo y cloroformo presentan la misma tendencia en poder reductor y actividad antirradical, adicionalmente los dos primeros, en ambas pruebas, tienen la mayor actividad. Por otra parte, los extractos de acetona y éter etílico manifiestan un comportamiento irregular. Esto se puede atribuir a que los extractos de metanol, acetato de etilo y cloroformo transfieren electrones e hidrógenos con relativa facilidad. Sin embargo, el extracto de acetona transfiere con mayor facilidad hidrógenos que electrones, para el extracto de éter etílico sucede todo lo contrario.

No se encontraron reportes en la literatura, de estudios de plantas pertenecientes a la familia *Tiliaceae* donde se haya utilizado el método del DPPH• para determinar su actividad antioxidante.

3.4 Determinación de compuestos fenólicos

En la Tabla 6 podemos observar que, como era de esperarse de acuerdo a los resultados obtenidos para la actividad antioxidante y poder reductor, los extractos más polares presentan una cantidad mayor de fenoles totales ya que estos compuestos debido a su estructura tienen un grado alto de polaridad.

Tabla 6. Contenido de fenoles totales en extractos de semilla de *H. terebinthinaceus*

Extracto	mg /mL	mg/g extracto*	mg/100g semilla*
Hexano	1.96	3.00	8.10
Éter etílico	9.33	36.49	98.63
Cloroformo	7.55	44.44	120.12
Acetato de etilo	21.95	111.59	301.60
Acetona	20.62	128.87	348.36
Metanol	11.81	65.18	176.21
Total	73.22	389.57	1053.02

* mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto o por 100 g de semilla respectivamente.

Scogings *et al.* (2004) determinaron fenoles totales en *Grewia occidentales (tiliaceae)* por el método de azul de prusia (Price and Butler; 1977) utilizando como estándar al ácido gálico. La cantidad de fenoles totales obtenida para el extracto acuoso de esta planta fue de 5000 mg/100 g de hoja. Al comparar a esta cantidad con el valor obtenido de la suma total de los fenoles presentes en los extractos de *H. terebinthinaceus*, 1053.02 mg/100 g de semilla, se aprecia que *G. occidentales* tiene aproximadamente 5 veces la cantidad de fenoles totales presentes en *H. terebinthinaceus*. Esto puede atribuirse a que el estudio de *G. occidentales* se realizó con el extracto acuoso, mientras que para *H. terebinthinaceus* se usaron los extractos orgánicos. Es importante mencionar que los extractos acuosos pueden contener una concentración mayor de taninos que los extractos orgánicos y esto se puede reflejar en la medición de fenoles totales.

Adicionalmente, Caramori *et al.* (2004), determinaron fenoles totales, usando el mismo método, presentes en el extracto acuoso de *Apeiba tibourbou (Tiliaceae)* llamada comúnmente Pau jangada, obteniendo 22.7 mg/100 g de hoja lo que nos indica que esta planta tiene una concentración de fenoles baja respecto al *H. terebinthinaceus*.

Con base en la cantidad de fenoles totales, se sugiere que *H. terebinthinaceus* tiene una mayor actividad antioxidante que *Apeiba tibourbou*, pero no que *Grewia occidentales*.

3.4.1 Determinación de flavonoides. En la Tabla 7, podemos apreciar que los extractos más polares (metanol, acetato de etilo y acetona) son los que contienen una cantidad mayor de flavonoides, con respecto a los menos polares (cloroformo, éter etílico y hexano).

Resulta importante destacar que en el caso de las fracciones de éter etílico y hexano a pesar de ser disolventes no polares están presentes los flavonoides. Cabe recordar que los flavonoides son compuestos químicos

polares y que generalmente están presentes en los extractos de metanol, acetona y acetato de etilo.

Tabla 7. Contenido de flavonoides en extractos de semilla de *H. terebinthinaceus*

Extracto	mg/mL	mg/g extracto*	mg/100g semilla*
Hexano	0.25	0.38	1.04
Éter etílico	1.71	6.68	16.79
Cloroformo	1.22	7.16	21.47
Acetato de etilo	3.34	16.96	41.60
Acetona	2.70	20.66	59.25
Metanol	4.30	23.73	59.93
Total			200.08

* mg equivalentes de rutina por g de extracto o por 100 g de semilla respectivamente.

Estos resultados confirman que de los fenoles totales encontrados en el extracto de metanol, Tabla 6, el 36.41 % son flavonoides (4.30 mg de flavonoides/11.81 mg de fenoles totales), mientras que en el extracto de acetato de etilo, los flavonoides representan el 15.22 % (3.34 mg de flavonoides/21.95 mg de fenoles totales) indicando que hay una proporción mayor de flavonoides en el extracto de metanol que en el extracto de acetato de etilo.

Toker -a- *et al.* (2004), reportaron que el contenido de flavonoides en *Tilia argentea*, es de 610, 980 y 730 mg/100 g de extracto acuoso de flores, ramas y hojas respectivamente. Al comparar estos valores con el valor obtenido para *H. terebinthinaceus* se puede apreciar que la *T. argentea* tiene entre 3 y 4 veces más flavonoides. Sin embargo, al comparar el poder reductor de estas plantas (Yildirim *et al.*, 2000) se encontró que los extractos orgánicos polares de *H. terebinthinaceus* presentan mayor poder reductor con respecto al extracto acuoso de las flores de *T. argentea*. Este resultado, aparentemente contradictorio puede atribuirse a que los extractos de *H. terebinthinaceus*

contienen flavonoides con mayor poder reductor que los presentes en *T. argentea*.

3.4.2 Determinación de taninos condensados. En la Tabla 8 podemos notar que, como es de esperarse, los extractos menos polares (hexano y éter etílico) presentan menor cantidad de taninos con respecto a los más polares (metanol, acetona, acetato de etilo y cloroformo). Es importante resaltar que en el caso de los extractos de hexano y éter etílico a pesar de ser no polares, contienen taninos; tomando en consideración que estos compuestos son hidrofílicos.

Tabla 8 Contenido de taninos condensados en extractos de semillas de *H terebinthinaceus*

Extracto	mg/mL	mg/g extracto*	mg/100g semilla*
Hexano	0.11	0.17	0.46
Éter etílico	0.22	0.88	2.37
Cloroformo	1.01	5.94	16.07
Acetato de etilo	0.47	2.37	6.43
Acetona	0.54	4.10	11.08
Metanol	0.73	4.03	10.88
Total			47.29

* mg equivalentes de (+)-catequina por g de extracto o por 100 g de semilla respectivamente

Estos resultados ratifican que de los fenoles totales encontrados en el extracto de metanol, tabla 6, el 6.2 % son taninos (0.73 mg de taninos/11.81 mg de fenoles totales), mientras que en los extractos de acetato de etilo y acetona, representan solamente el 2.1 % (0.47 mg de taninos/21.95 mg de fenoles totales) y el 2.6 % (0.47 mg de taninos/21.95 mg de fenoles totales) respectivamente. Con respecto al extracto de cloroformo, se observó que existe la mayor cantidad de taninos. Estos representan el 13.4 % de los fenoles totales

(1.01 mg de taninos/7.55 mg de fenoles totales), valor equiparable al obtenido para flavonoides, 16 % de flavonoides (1.22 mg de flavonoides/7.55 mg de fenoles totales), Tabla 7.

Es importante resaltar que el extracto de cloroformo al presentar una cantidad de taninos importante, podría ser el factor determinante de la actividad antioxidante baja de ese extracto (% AAR= 36.86 ± 0.59), Tabla 5.

Scogings *et al.* (2004), determinaron taninos condensados en hojas de *Grewia occidentales (tiliaceae)* por el ensayo de proantocianidina-ácido-butanol (Porter *et al.*, 1986), utilizando como estándar a taninos de sorgo. La cantidad de taninos condensados obtenida para el extracto acuoso de esta planta fue de 3000 mg/100 g de hoja (30 mg/g). Al comparar a esta cantidad con el total de taninos, 47.29 mg de taninos/100g de semilla, en *H. terebinthinaceus*, podemos apreciar que *Grewia occidentales* tiene una mayor cantidad de taninos condensados. La diferencia tan grande se debe a que en el caso de *Grewia occidentales* se usó el extracto acuoso.

Bajpai *et al.*, (2005); compararon el contenido de fenoles totales de hojas con el de semillas de cinco especies de plantas. En ese estudio se observó que hay una diferencia importante en la concentración de fenoles. Las plantas presentaron de manera sistemática una cantidad mayor de fenoles en las hojas que en las semillas. En este mismo estudio midieron el poder reductor y el IC₅₀ de actividad antirradical frente a DPPH encontrando de manera general que las hojas de esas plantas tienen menor actividad antioxidante que las semillas. Lo anterior sugiere una relación directa entre los fenoles totales y la actividad antioxidante.

Adicionalmente, podemos suponer que las hojas de *H. terebinthinaceus* tienen una concentración mayor de fenoles totales que las semillas y consecuentemente una mayor actividad antioxidante.

Por otra parte, en la literatura existen varios estudios donde señalan que regularmente los extractos orgánicos polares tienen de 3 a 4 veces más fenoles

totales que los extractos acuosos (Moreno *et al.*, 2006; Canadanovic-Brunet *et al.*, 2006). Esto quiere decir que el extracto acuoso, generalmente tendrá una menor actividad antioxidante que los extractos orgánicos polares.

4 CONCLUSIONES

Derivado del presente estudio se logró establecer:

Una metodología para la obtención de extractos orgánicos a partir de las semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus*, obteniendo las fracciones orgánicas de hexano, éter etílico, cloroformo, acetato de etilo, acetona y metanol.

La actividad antirradical y poder reductor de cada uno de los extractos de las semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus* como parámetro para establecer la actividad antioxidante. Los extractos con actividad antioxidante mayor fueron los de acetato de etilo y metanol.

La cantidad de fenoles totales, flavonoides y taninos tienen una relación directa con el poder reductor y actividad antirradical de los extractos. Consecuentemente, se puede establecer que la actividad antioxidante de los extractos orgánicos de *Heliocarpus terebinthinaceus* se debe a los compuestos fenólicos. Particularmente, esto se refleja en los extractos de metanol y acetato de etilo, los cuales presentan el porcentaje más alto de fenoles. Cabe resaltar que los flavonoides son los compuestos fenólicos más abundantes en esos extractos. Por lo tanto, se concluye que las semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus* tienen actividad antioxidante derivada principalmente de los flavonoides.

5 PERSPECTIVAS

Aislar y caracterizar metabolitos secundarios a partir de los extractos de semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus*.

Determinar la actividad antioxidante del extracto acuoso de semillas y otras partes aéreas de *Heliocarpus terebinthinaceus*.

Implementar nuevas metodologías para la medición de la actividad antioxidante como son el ABTS y ORAC.

Mejorar el sistema de extracción para disminuir los tiempos de extracción y así atenuar la degradación de los antioxidantes. Esto se podría lograr con el uso de un sistema de extracción por microondas.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aquino R., Morelli S., Lauro M.R., Abdo S., Saija A., Tomaino A. **2001**. Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of an Extract of *Anthurium versicolor* Leaves. *J. Nat. Prod.* 64, 1019-1023.
- Arnous A., Makris D.P., Kefalas P. **2001**. Effect of principle polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5736-5742.
- Aruoma O.I., Halliwell B., Williamson G. **1997**. *In vitro* methods for characterizing potential prooxidant and antioxidant actions of nonnutritive substances in plant foods. In Antioxidant methodology, *in vivo* and *in vitro* concepts. Ed. AOCS press, Champaign, Illinois, 172-204.
- Bajpai M., Mishra A., Prakash D., **2005**, Antioxidant and free radical scavenging activities of some leafy vegetables. *Int. J. Sci Nutr.*, 56,473-481.
- Bandara K.A.N.P., Kumar V., Jacobsson L, Molleyres L.P. **2000**. Insecticidal piperidine alkaloid from *Microcos paniculata* stem bark. *Phytochem.* 54, 29-32.
- Benzie I.F.F. and Strain J.J. **1996**. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *J. Anal. Biochem.* 239, 70-76.
- Best D. **1997**. All natural and nutraceutical. *Prepared Foods.* 166, 32-38.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. **1995**. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* 28, 25-30.

- Canadanovic-Brunet J.M., Djilas S.M., Cetkovic G.S., Tumbas V.T., Mandic A.I., Canadanovic V.M. **2006**. *Int. J. Food Technol.* 41, 667-673.
- Cao G., Booth S.L., Sadowski J.A., Prior R.L. **1998**. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1081.
- Cao G., Sofic E., Prior R.L. **1997**. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radicals Biol. Med.* 22, 749-760.
- Caragay A.B. **1992**. Cancer-preventive foods and ingredients. *Food Technol.* 46, 65-68.
- Caramori S.S., Lima C.S., Fernandes K.F. **2004**. Biochemical Characterization of Selected Plant Species from Brazilian Savannas. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47, 253-259.
- Chipault J.R. **1962**. Antioxidants for food use. In Lunderberg WO. *Autoxidation and antioxidants*, Wiley, New York, 477-542.
- Cos P., Hermans N., De Bruyne T., Apers S., Sindambiwe J.B., Vanden B.D., Pieters L., Vlietinck A.J. **2002**. Further evaluation of Rwandan medicinal plant extracts for their antimicrobial and antiviral activities. *J. Ethnopharmacol.* 79, 155-163.
- Davis J.K. **1995**. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 1-31.

- Dufrense C.J., Farnworth E.R.A. **2001**. A Review of latest research findings on the health promotion proprieties of tea. *J. Nutr. Biochem.* 12, 404-412.
- Escarpa A, Gonzalez M.C. **2001**. An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic compounds in food. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31, 57–139.
- Fogliano V., Verde V., Randazzo G., Ritieni A. **1999**. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1935-1940.
- Fridovich I. **1976**. Free radicals in Biology, Academic Pres. Vol.1
- Fukumoto L.R., Mazza G. **2000**. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3597-3604.
- Gordon M.H. **1990**. The mechanism of antioxidant action *in vivo*. Food Antioxidants, Elsevier, London, 1-18.
- Gruenwald J., Brendler T., Jaenicke C. **2000**. PDR for Herbal Medicines. 2nd edition, Thompson-Physicians' Desk Reference, 477-478.
- Halliwel B. **1996**. Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.* 16, 33-50.
- Hertog M.G.L., Feskens E.J.M., Hollman P.C.H., Katan M.B., Kromhout D. **1993**. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 342, 1007-1011.
- Hollingworth P. **1997**. Mainstreaming healthy foods. *Food Technol.* 51, 55-58.

- Hosseinzadeh H., Ramezani M., Namjo N. **2003**. Muscle relaxant activity of *Elaeagnus angustifolia* L. fruit seeds in mice. *J. Ethnopharmacol.* 84, 275-278.
- Lindley M.G. **1998**. The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* 9, 336-340.
- Martínez-Valverde I., Periago M.J., Ros G. **2000**. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 50, 5-18.
- Marco G.J. **1968**. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45, 594-598.
- Middleton E. Jr., Kandaswami C. **1994**. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London, 619-652.
- Moreno S., Scheyer T., Romano S.C., Vojnov A.A. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Res.* 40, 223-231.
- Muñiz P., Sáez G., Valls V. **2000**. Función y mecanismos antioxidantes. Importancia durante la transición feto-neonato. Radicales libres y estrés oxidativo en biomedicina importancia y utilidad de los antioxidantes en la prevención de procesos fisiopatológicos relacionados. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados. 63-70.
- Namiki M. **1990**. Antioxidants/antimutagens in food *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29, 273-300.

- Papas A.M. **1999**. Diet and antioxidant status. Antioxidant status, diet, nutrition, and health. Boca Raton, London, New York, Washington, DC: CRC Press.
- Porter L.J., Hrstich L.N., Chan B.C. **1986**. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochem.* 25, 223-30.
- Price M.L., Butler L.G. **1977**. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain *J. Agric. Food Chem.* 25, 1268-1273.
- Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. **2000**. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by modified ferric reducing/antioxidant power assay *J. Agric. Food Chem.* 48, 3396-3402.
- Ranelletti F.O., Ricci R., Larocca L.M. **1992**. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors *Int. J. Cancer.* 50,486-492.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. **1999**. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay *Free Radical Biol. Med.* 26, 1231-1237.
- Ren W., Qiao Z., Wang H. **2001**. Tartary buckwheat flavonoid activates caspase 3 and induces HL-60 cell apoptosis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 23, 427-432.
- Rice-Evans C., **1995**. Free radicals and antioxidants in normal and pathological processes: In Oxidative stress, lipoproteins and cardiovascular dysfunction. Portland Press, London, 1-32

- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. **1997**. Antioxidant properties of phenolic compound. *Trends Plant Sci.* 2, 152-159.
- Riemersma R.A., Rice-Evans C., Tyrrell R.M., Clifford M.N., Lean M.E. **2001**. Tea flavonoids and cardiovascular health. *QJM.* 94, 277-282.
- Robertson A. and Hall M.N. **1989**. A critical investigation into the flavonost method for thea. *Food Chem.* 34, 57-70.
- Roginsky V., Lissi E.A. **2005**. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92, 235-254.
- Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K. **2003**. Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas. *J. Agric. Food Chem.* 51, 571-581.
- Scambia G, Ranelletti F.O., Panici P.B. **1990**. Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II estrogen binding sites in primary ovarian tumors and cultured cell. *Br. J. Cancer,* 62, 942-947.
- Schleisier K., Harwat M., Böhm V., Bitsch R. **2002**. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Res.* 36, 177-187.
- Scogings P.F., Dziba L.E., Gordon I.J. **2004**. Leaf chemistry of woody plants in relation to season, canopy retention and goat browsing in a semiarid subtropical savanna. *Austral Ecology,* 29, 278-286.
- Shahidi F., Naczki M. **1995**. Methods of analysis and quantification of phenolic compounds. Chap 9 Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Technomic publishing Co. INC. USA., 281-320.

- Silva M.M., Santos M.R., Caroco C., Rocha R., Justino C., Mira L. **2002**. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids. Re-examination. *Free Radical Res.* 36, 1219-1227.
- Swain T.; Goldstein J.L. **1964**. Methods in Polyphenol Chemistry. Pergamon Press, Oxford, 131-146.
- Teofili L, Pierlli L, Lovino M.S. **1992**. The combination of quercetin and cytosine arabinoside synergistically inhibits leukemic cell growth. *Leukemia Res.* 16, 497-503.
- Toker G., Küpeli E., Memisoglu M., Yesilada E.; **2004**. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *J. Ethnopharmacol.* 95, 393-397.
- Toker G., Küpeli E., Memisoglu M., Yesilada E., Aslan M. **2004**. Main flavonoids of *Tilia argentea* DESF. Ex DC. Leaves. *Turk J. Chem.* 28, 745-749.-a-
- Tsao R., Zeyuan D. **2004**. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J. Chromatogr. B.* 812, 85-99.
- Ueda T., Armstrong D. **1996**. Preventive effect of natural and synthetic antioxidants on lipid peroxidation in the mammalian eye. *Ophthalmic Res.* 28, 184-192
- Wiseman S.; Mulder T.; Rietved A. **2001**. Tea flavonoides: bioavailability *in vivo* and effects on cell signalling pathways *in vitro*. *Antioxid. Redox Signaling.* 3, 1009-10021.
- Yildirim A., Mavi A., Oktay M., Aydan A., Faruk A.O., Bilaloglu V. **2000**. Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Tilia* (*Tilia*

Argentea Desf Ex DC), Sage (*Salvia Triloba L.*), and Black Tea (*Camellia Sinensis*) Extracts. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5030-5034.

Yoshida M, Sakai T., Hosokawa N. **1990**. The effects of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Lett.* 260, 10-13.

Yoshida M., Yamamoto M., Nikaido T. **1992**. Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res.* 52, 6676-6681.

Young J.F., Nielsen S.E., Haraldsdottier J., Danesfvar B., Lauridsen S.T., Knuthsen P., Crozier A., Sandstrom B., Dragsted L.O. **1999**. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 87-94.

APÉNDICE A

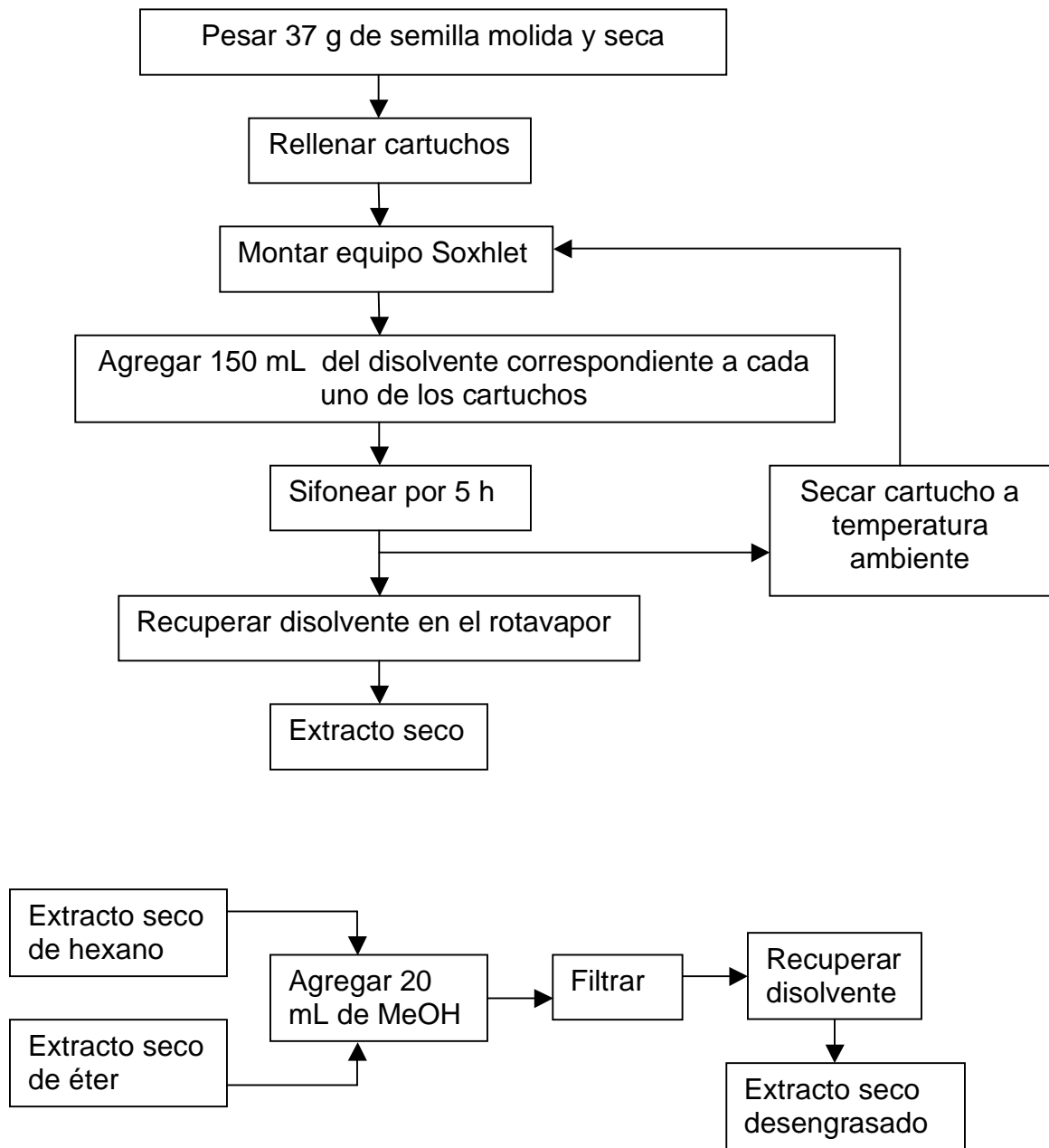


Figura 11. Preparación de los extractos

APÉNDICE B

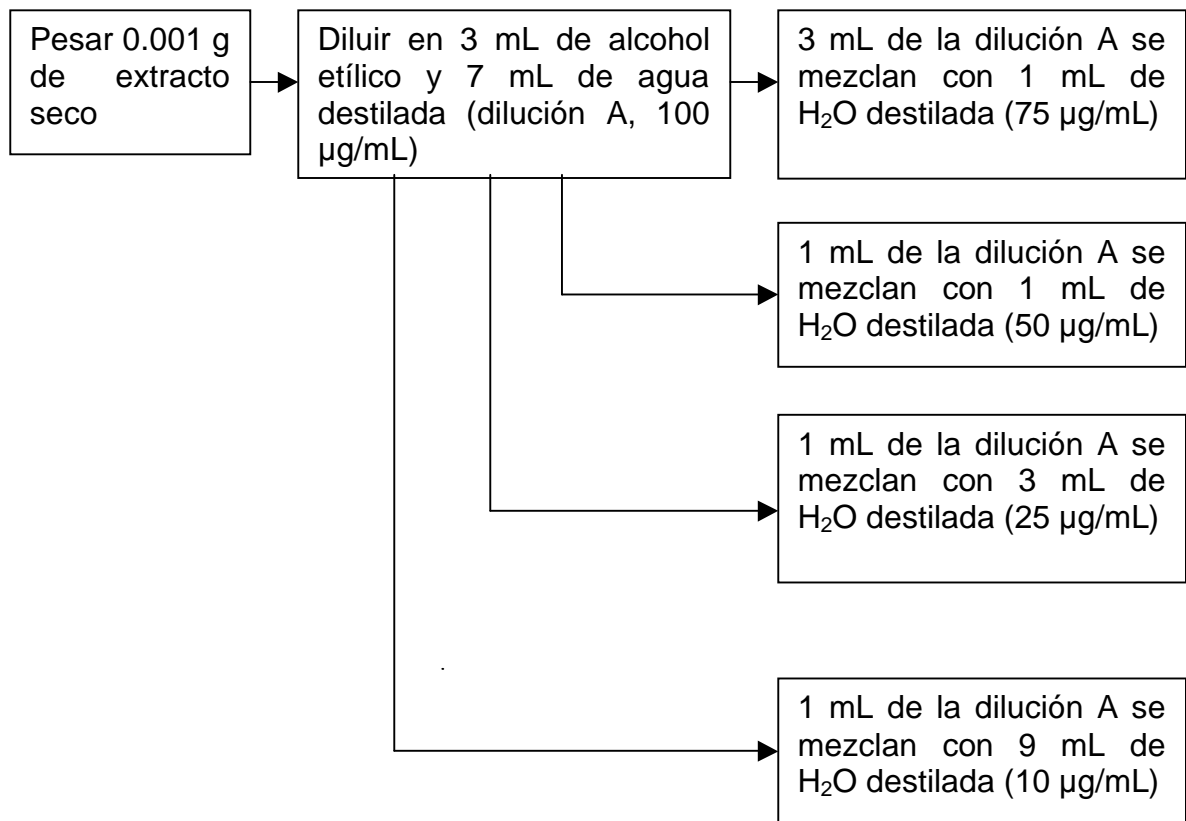


Figura 12. Preparación de las diluciones

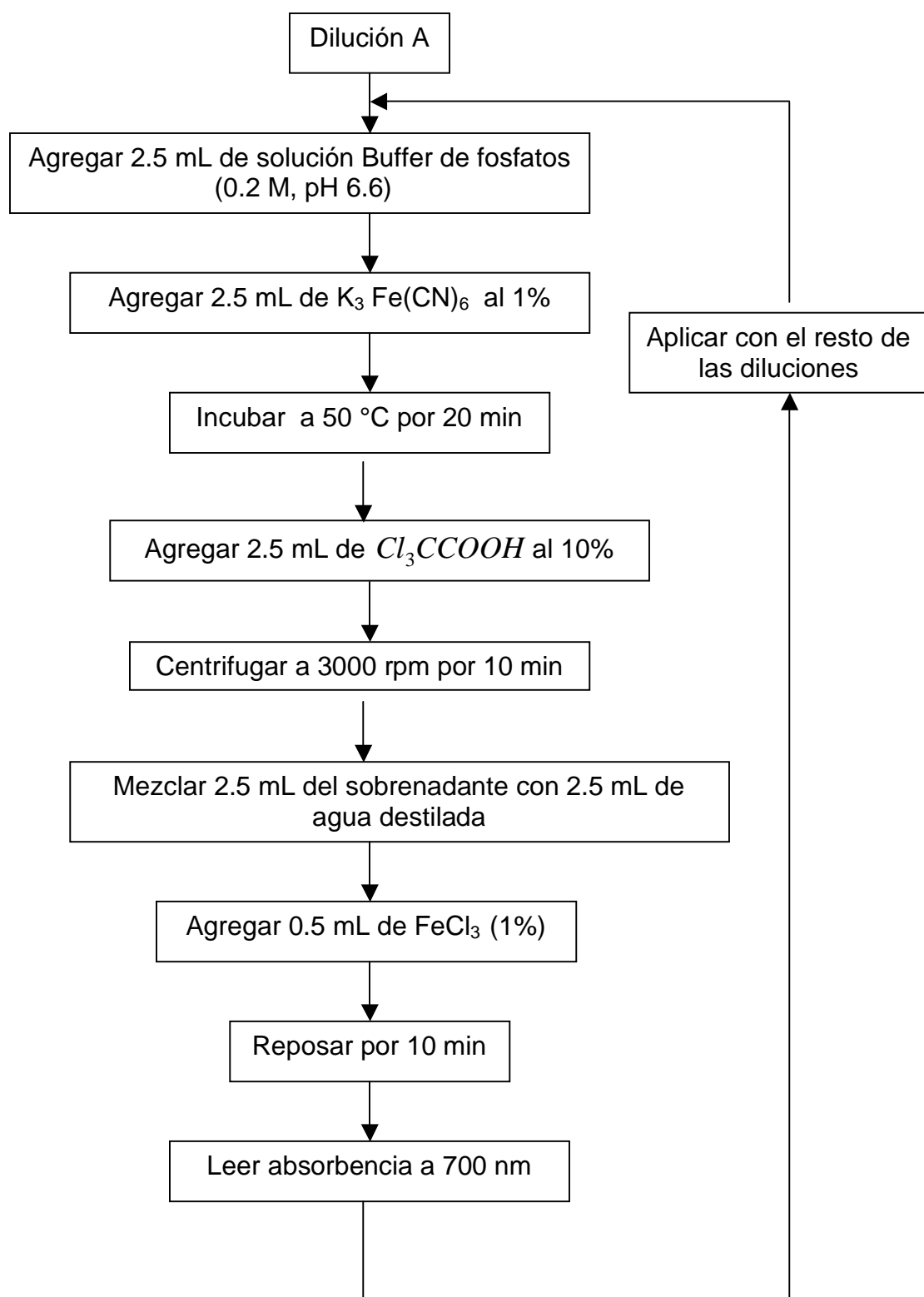


Figura 13. Esquema para la medición de poder reductor

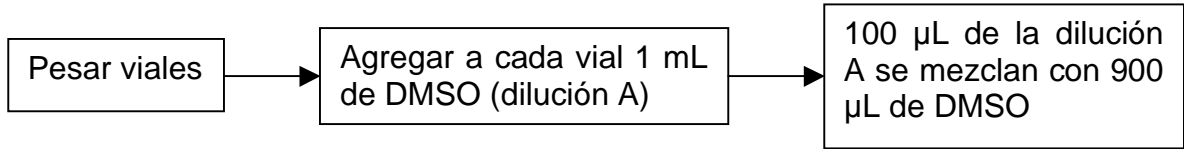


Figura 14. Preparación de diluciones para el método de DPPH•

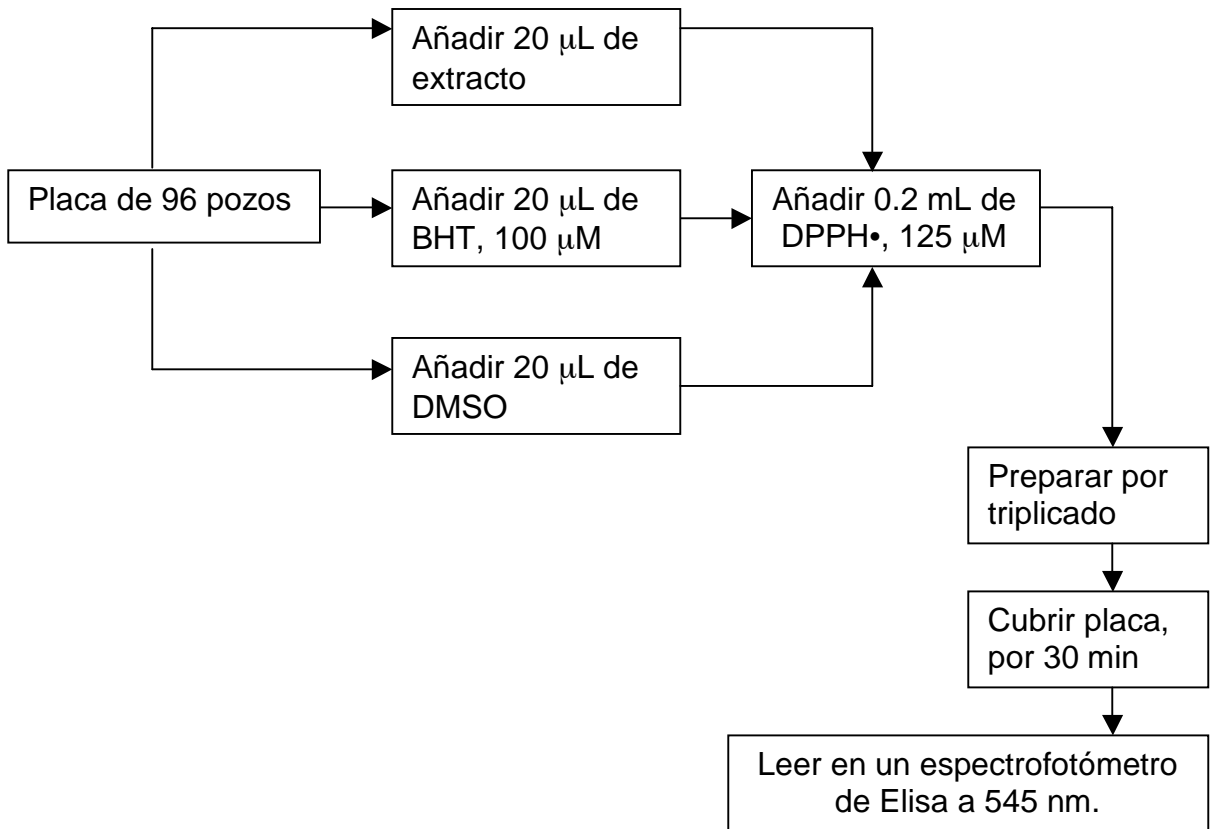


Figura 15. Esquema del método de DPPH•

APÉNDICE C

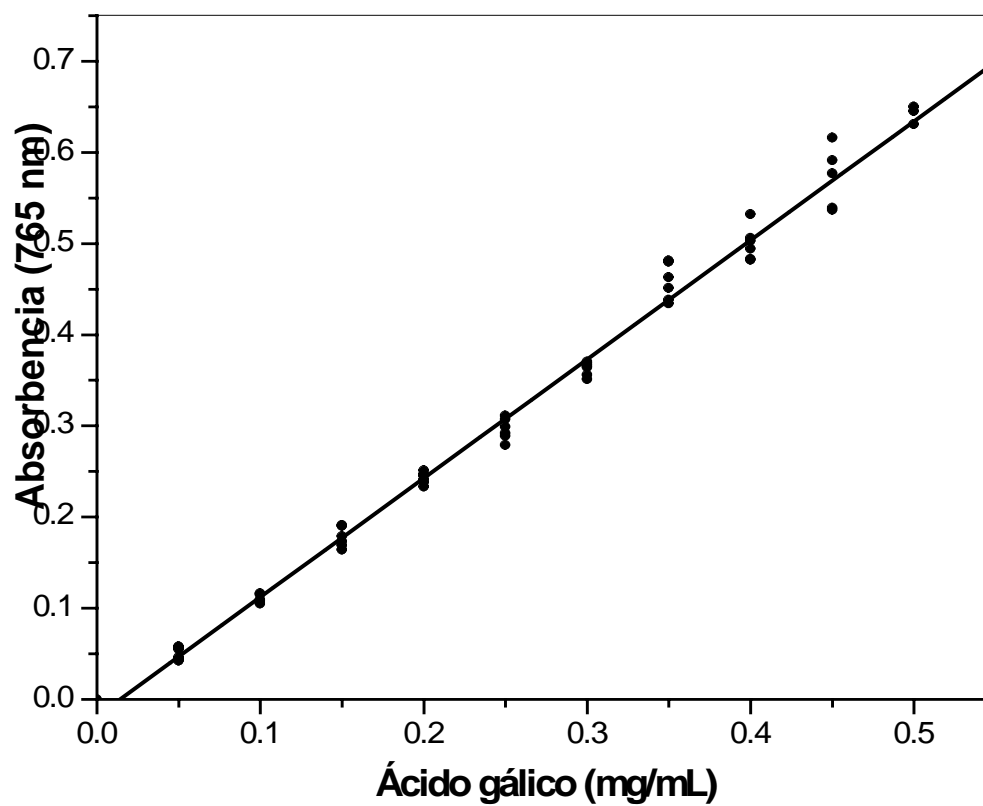


Figura 16. Curva de calibración de fenoles totales

$$Y = 1.3051X + 0.0183$$

$$R^2 = 0.9959$$

$$\sigma = 0.01699$$

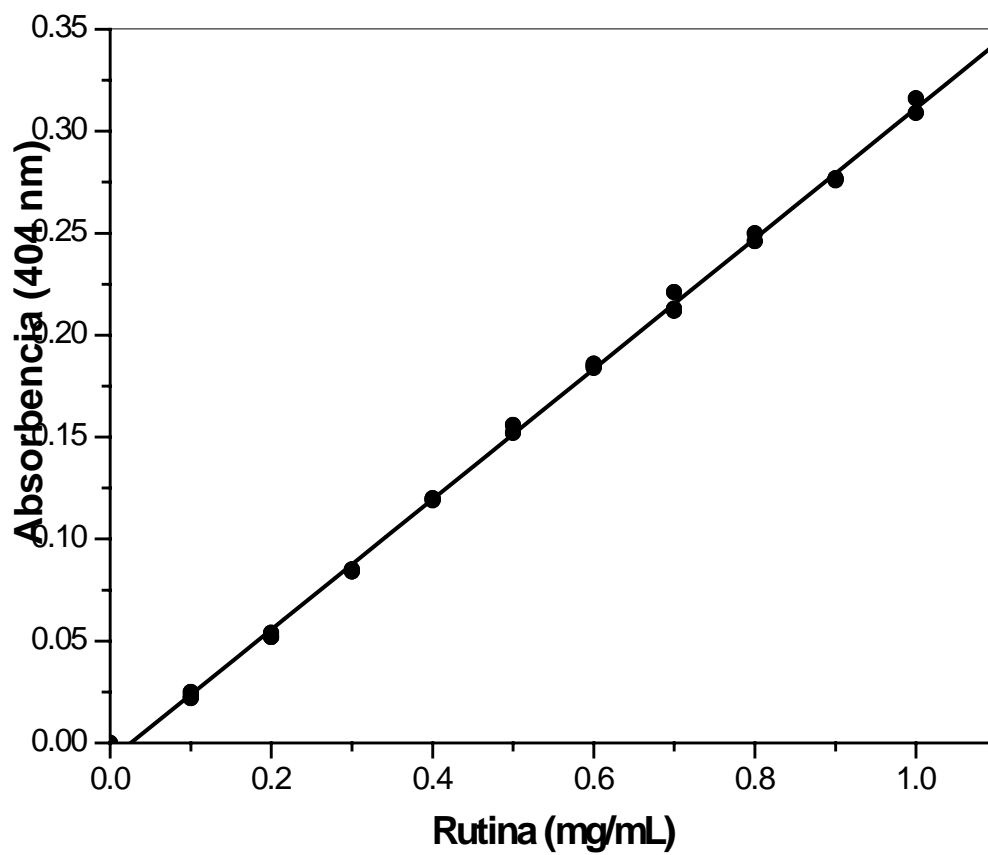


Figura 17. Curva de calibración para flavonoides

$$Y = 0.31953 X + 0.0083$$

$$R^2 = 0.9994$$

$$\sigma = 0.00332$$

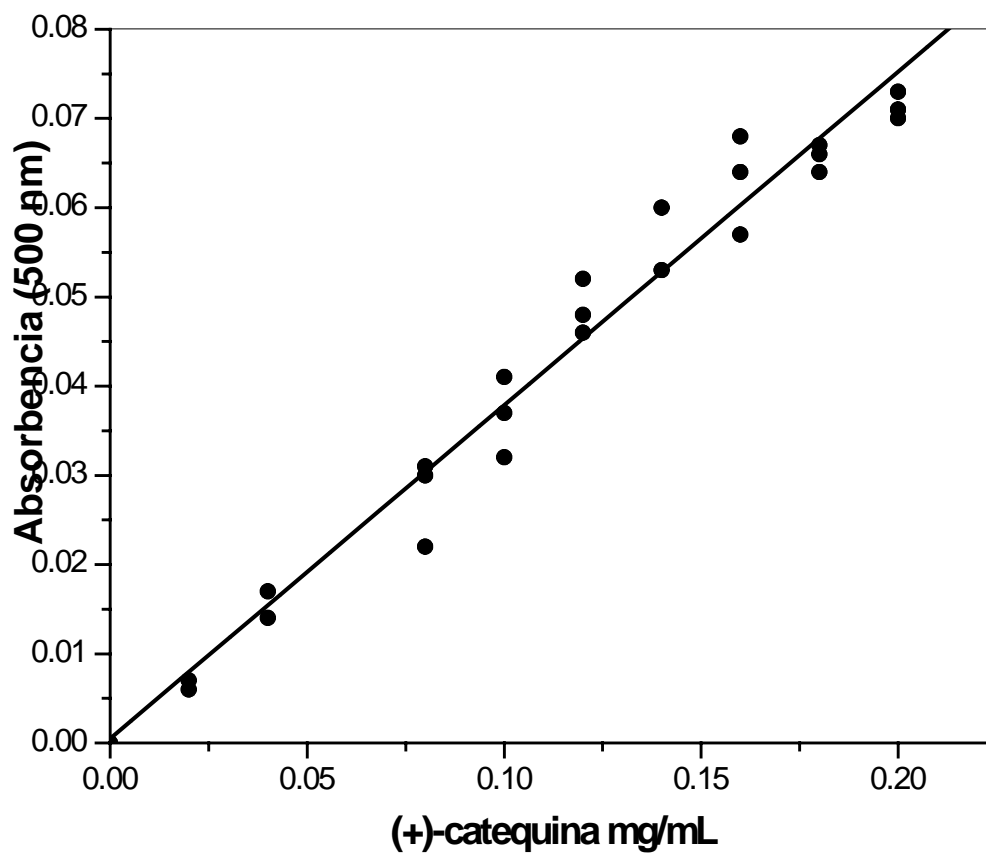


Figura 18. Curva de calibración para taninos

$$Y = 0.3739X + 0.00048$$

$$R^2 = 0.98526$$

$$\sigma = 0.0041$$