

Actividad antioxidante *in vitro* y toxicidad
frente a *Artemia salina* de extractos
hidroalcohólicos de cinco especies de
cítricos

Autora: Yamila Herrera Sánchez
Tutoras: MSc. Katia Ojito Ramos
Lic. Nadine Vega Pérez

Santa clara
2011



Resumen

Los cítricos constituyen un género de plantas rico en contenido de flavonoides, metabolitos secundarios que debido a su efecto antioxidante y baja toxicidad, han recibido en los últimos años mucha atención como potenciales fármacos. En este trabajo nos propusimos determinar la actividad antioxidante *in vitro* y la toxicidad frente a *Artemia salina* de extractos hidroalcohólicos de hojas de cinco especies de cítricos (*Citrus x aurantium* var. *sinensis* L. Osbeck; *Citrus x aurantium* L.; *Citrusx aurantiifolia* Christm. Swingle var. *Mexicana*; *Citrus x latifolia* Tan. y *Citrus reticulata* Blanco.). Los extractos etanólicos y metanólicos de hojas de estas plantas se obtuvieron mediante extracción asistida por ultrasonido. Los fenoles y flavonoides fueron identificados empleando métodos fitoquímicos y cromatografía en placa delgada, y la concentración total de los mismos se determinó mediante el método Folin-Cioalteau- NaCO_3 y $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3$, empleando ácido gálico y quercetina como patrón, respectivamente. La actividad antioxidante de los extractos se determinó mediante la capacidad atrapadora de radicales libre, el poder reductor, y la capacidad antioxidante total, usando ácido ascórbico y quercetina como patrón. La toxicidad de los extractos se evaluó mediante el ensayo de letalidad con *A. salina*. En los extractos etanólicos se encontró mayor presencia relativa de las compuestos químicas que en los extractos metanólicos. Los extractos de *Citrus x latifolia* Tan. y *Citrus reticulata* Blanco. en metanol 70 %, fueron los extractos que menos clases de flavonoides mostraron, mientras que el *Citrus x aurantiifolia* Christm. Swingle var. *Mexicana* en etanol 70% fue el que presentó la mayor variedad de clases de flavonoides. La mayor concentración de fenoles totales se obtuvo en *Citrus reticulata* Blanco. en metanol 70% (38.47 mg de ácido gálico/ mL de extracto) y de flavonoides totales se obtuvo en el extracto etanólico de *Citrusx aurantiifolia* Christm. Swingle var. *Mexicana* (8.54 mg de quercetina/ mL de extracto) y la mandarina en ambos solventes, etanol 70% (8.31 mg de quercetina/ mL de extracto) y metanol 70% (6.89 mg de quercetina/ mL de extracto). Todos los extractos mostraron actividad antioxidante mediante las tres pruebas ensayadas. Los extractos presentaron toxicidad moderada hacia *A. salina*, siendo en el extracto de *Citrus x latifolia* Tan. en metanol 70% el que mostró menor toxicidad ($\text{LC}_{50} = 464.24 \mu\text{g/ mL}$).

Palabras Clave: Actividad antioxidante, *Artemia salina*, cítricos, flavonoides

Abstract

Citruses constitute an important source of flavonoids, secondary metabolites which have been recently studied extensively since they are highly effective antioxidant agents with a low toxic effect. They have received in the last years much attention like potential drugs. The aim of our work was to determine the antioxidant activity and toxicity against *Artemia salina* of leaf alcoholic extracts from five species of citruses (*Citrus x aurantium* var. *sinensis* L. Osbeck; *Citrus x aurantium* L.; *Citrus x aurantiifolia* Christm. Swingle var. *Mexicana*; *Citrus x latifolia* Tan. and *Citrus reticulata* Blanco). The ethanolic and methanolic leaf extracts from these plants were obtained by an ultrasound assisted extraction method. Phenols and flavonoids were identified using phytochemistry and Thin Layer Chromatography methods. Total phenols and flavonoids content was determined by Folin-Ciocalteu- NaCO_3 and $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3$ methods by using gallic acid and quercetin as standard compounds, respectively. The antioxidant activity was determined taking into account the free radical scavenging, the reducing power, and total antioxidant activity of the extracts by using ascorbic acid and quercetin as standard compounds. The toxicity was evaluated by the lethality test against *A. salina*. The major relative presence of the chemical compounds was obtained in ethanolic that in the methanolic extracts. Lima and mandarin extracts in methanol 70% showed fewer classes of flavonoids, whereas the lemon extract in ethanol 70% presented the greater variety of flavonoids classes. The greater total phenols concentration was obtained in mandarin extracts in methanol 70% (38.47 mg gallic acid/ ml of extract) and from total flavonoids was obtained in the lemon ethanolic extract (8.54 mg of quercetin/ ml of extract) and mandarin extract in both solvents, ethanol 70% (8.31 mg of quercetin/ mL of extract) and methanol 70% (6.89 mg of quercetin/ mL of extract). All the extracts showed to antioxidant activity by the three tests. All plant extracts presented moderate toxicity against *A. salina*, being the Lima methanol 70% extract the one that showed the minor toxicity ($\text{LC}_{50} = 464.24 \mu\text{g/ mL}$).

Key Words: Antioxidant Activity, *Artemia salina*, citrics, flavonoids

ÍNDICE

1. <u>Introducción</u>	1
2. <u>Revisión bibliográfica</u>	3
2.1. <u>Estrés oxidativo, implicaciones fisiológicas</u>	3
2.1.1. <u>Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo</u>	4
2.2. <u>Los cítricos como fuente de compuestos bioactivos</u>	5
2.2.1. <u>Clasificación y características morfológicas del género <i>Citrus</i></u>	5
2.2.2. <u>Compuestos bioactivos del género <i>Citrus</i></u>	6
2.3. <u>Flavonoides</u>	8
2.3.1. <u>Características generales de los flavonoides</u>	8
2.3.1.1. <u>Estructura y clasificación de los flavonoides</u>	9
2.3.2. <u>Las plantas como principales fuentes de flavonoides</u>	11
2.3.3. <u>Actividad biológica de los flavonoides</u>	12
2.3.3.1. <u>Actividad antioxidante y prooxidante de los flavonoides</u>	13
2.3.3.1.1. <u>Técnicas de determinación de actividad antioxidante</u>	15
<u>Capacidad de atrapar radicales libres</u>	16
<u>Determinación del poder reductor</u>	16
<u>Ensayos de Peroxidación lipídica</u>	17
<u>Determinación de la actividad antioxidante total</u>	17
<u>Capacidad de quelación de metales</u>	17
2.4. <u>Toxicidad de extractos vegetales</u>	17
3. <u>Materiales y Métodos</u>	19
3.1. <u>Colecta del material vegetal</u>	19
3.2. <u>Obtención de los extractos hidroalcohólicos</u>	19
3.3. <u>Caracterización fitoquímica de los extractos crudos</u>	19
3.3.1. <u>Cromatografía en placa delgada</u>	19
3.4. <u>Cuantificación de compuestos fenólicos</u>	20
3.4.1. <u>Cuantificación de fenoles totales</u>	20
3.4.2. <u>Cuantificación de flavonoides totales</u>	20
3.5. <u>Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos vegetales</u>	20
3.5.1. <u>Determinación de la capacidad de atrapar radicales libres</u>	20
3.5.2. <u>Determinación del poder reductor</u>	21
3.5.3. <u>Determinación de la capacidad antioxidante total</u>	21
3.6. <u>Evaluación de la toxicidad de los extractos vegetales mediante el ensayo de letalidad frente a <i>Artemia salina</i></u>	21
3.7. <u>Procesamiento estadístico</u>	22

4. Resultados	23
4.1. Caracterización fitoquímica de los extractos crudos	23
4.1.1. Cromatografía en placa delgada	24
4.2. Compuestos fenólicos	25
4.3. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos vegetales	26
4.3.1. Capacidad de atrapar radicales libres de los extractos	26
4.3.2. Poder reductor de los extractos vegetales	30
4.3.3. Actividad antioxidante total	31
4.4. Toxicidad de los extractos vegetales	32
5. Discusión de Resultados	33
5.1. Caracterización de los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus ssp.</i>	33
5.2. Contenido de compuestos fenólicos en los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus ssp.</i>	35
5.3. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus ssp.</i>	35
5.4. Toxicidad frente a <i>A. salina</i> de los extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus ssp.</i>	38
6. Conclusiones	39
7. Recomendaciones	40
Referencias	

1. INTRODUCCION

Muchas de las enfermedades que se presentan con mayor frecuencia en la actualidad se producen debido al estrés oxidativo, el cual surge a partir del desequilibrio entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes del organismo y es inducido por radicales libres y especies reactivas del oxígeno que se generan producto del metabolismo celular, en el proceso de obtención de energía (Montserrat, 2003). Estos cambios en los sistemas biológicos son los causantes de patologías como el cáncer (Toh *et al.*, 2000), la aterosclerosis, diabetes mellitus (Kesavulu *et al.*, 2001), enfermedades glomerulares renales, cardiovasculares, coronarias (Landmesser *et al.*, 2000) y enfermedades cerebrales asociadas al envejecimiento, entre muchas otras (Montserrat, 2003). Recientemente, se ha dirigido mucha atención hacia el desarrollo de los etnomedicamentos con el fin de tratar diversas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, para ello se precisa investigaciones acerca de las plantas con alto poder antioxidante y baja toxicidad (Hazra *et al.*, 2008).

En Cuba, el empleo de las plantas medicinales se ha extendido en los últimos años, sin embargo a pesar de que han existido avances en esta sentido, aun hay déficit en cuanto a investigaciones sobre la extracción de los compuestos bioactivos de las plantas, la demostración de su actividad fisiológica, de manera que se faciliten los estudios farmacológicos, así como la síntesis de medicamentos. Para ello, el Programa Nacional Cubano de Medicina Tradicional cuenta entre sus objetivos, evaluar la efectividad e inocuidad de las plantas e incorporar a la medicina actual sus propiedades terapéuticas para, finalmente, incrementar la disponibilidad de productos farmacéuticos (Blanco *et al.*, 2006). En correspondencia con la evaluación farmacológica de las plantas medicinales se encuentra su estudio toxicológico, el cual permite rechazar o avalar la continuidad del proceso investigativo y el uso de un medicamento herbario, ya que es preciso que este sea acertadamente utilizado desde el punto de vista farmacológico y además con un mínimo de efectos tóxicos para el individuo (Khairunnuur *et al.*, 2009).

Los cítricos son plantas bien conocidas por el hombre, no solo por el consumo de sus frutos, de alta demanda a nivel mundial, sino también por sus propiedades curativas. Los cítricos deben su actividad biológica en gran medida a la presencia de fenoles y flavonoides, metabolitos secundarios de las plantas que se oxidan fácilmente, por lo que constituyen potentes antioxidantes (Amin *et al.*, 2006; Anagnostopoulou *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009). Esta característica de los compuestos fenólicos se debe a que tienen la capacidad de secuestrar oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos,

bloqueando la acción deletérea de estas sustancias sobre las células (Romero *et al.*, 2003), por lo que pudieran tener amplia actividad farmacológica, entre las cuales se destacan hepática protectora (Kawada *et al.*, 1998), antialérgica, antitrombótica (Yu, 2004), antiinflamatoria, antiulcerogénica, anticancerígeno (Martínez-Flores *et al.*, 2002), antibacteriana, antiviral, antifúngica (Manrique y Santana, 2008), e incluso pueden ejercer efectos inhibidores sobre algunas enzimas (Herderson *et al.*, 2000). Los cítricos y sus derivados constituyen, por tanto, posibles alternativas para tratar patologías ligadas al estrés oxidativo.

La mayoría de los trabajos publicados sobre las propiedades antioxidantes en plantas de cítricos se centran en extractos obtenidos de los frutos, dígase cáscara (flavelo y albedo) y jugo, y existen muy pocos trabajos sobre las propiedades de las hojas. Sería de gran importancia la obtención de extractos con alto contenido de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, obtenidos a partir de las hojas de estas plantas; con el objetivo de desarrollar un producto farmacológico con actividad biológica demostrada, de poca toxicidad y bajo costo de producción, ya que al emplear las hojas de estas plantas, y no sus frutos, no afectaría la obtención de los mismos, lo cual constituye un proceso de importancia comercial y económica para nuestro país.

Por lo anteriormente expuesto, en este trabajo nos trazamos los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* y la toxicidad frente a *Artemia salina* de extractos hidroalcohólicos de hojas de cinco especies de cítricos: naranja dulce (*Citrus x aurantium* var. *sinensis* L. Osbeck), naranja agrio (*Citrus x aurantium* L.), limón criollo (*Citrus x aurantiifolia* Christm. Swingle var. *mexicana*), lima persa (*Citrus x latifolia* Tan.) y mandarina (*Citrus reticulata* Blanco.)

Objetivos Específicos:

- Caracterizar fitoquímicamente los extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de hojas de las especies de cítricos en estudio.
- Cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos hidroalcohólicos de hojas de las especies de cítricos en estudio.
- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* según la capacidad de atrapar radicales libres, el poder reductor y la capacidad antioxidante total de los extractos hidroalcohólicos de hojas de las especies de cítricos en estudio.
- Determinar la toxicidad frente a *Artemia salina* de los extractos hidroalcohólicos de hojas de las especies de cítricos en estudio.

2. Revisión bibliográfica

2.1 Estrés oxidativo, implicaciones fisiológicas

La vida aeróbica precisa oxígeno para oxidar los nutrientes provenientes de la dieta y así obtener energía. De la reducción parcial de la molécula de oxígeno se pueden generar especies reactivas como el hidropéroxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales libres, superóxido (O_2^-), hidropéroxilo (HO_2^{\cdot}) e hidroxilo (OH), además de los óxidos de nitrógeno: óxido nítrico ($\cdot ON$) y dióxido nítrico (NO_2^{\cdot}). (Montserrat, 2003) Estos radicales libres que son sintetizados fisiológicamente por el organismo humano como parte de su metabolismo energético, en altas concentraciones resultan notablemente peligrosos para los organismos vivos (Droge, 2002) y la producción de ellos se incrementa frente a diferentes agresiones como infecciones, ejercicio físico extremo, dietas desequilibradas, tóxicos alimentarios y contaminantes ambientales entre otros (Montserrat, 2003).

Muchas de las enfermedades que se presentan con mayor frecuencia en la actualidad se producen debido al estrés oxidativo, el cual surge a partir del desequilibrio entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes del organismo. El estrés oxidativo es iniciado por radicales libres, que buscan estabilidad uniéndose mediante un electrón desapareando con macromoléculas biológicas presentes en células humanas saludables, tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, causando daños en proteína y DNA conjuntamente con peroxidación lipídica. Estos cambios en los sistemas biológicos son los causantes de patologías como el cáncer (Toh *et al.*, 2000), la aterosclerosis, diabetes mellitus (Kesavulu *et al.*, 2001), enfermedades glomerulares renales, cardiovasculares, coronarias (Landmesser *et al.*, 2000) y enfermedades cerebrales asociadas al envejecimiento, entre muchas otras (Montserrat, 2003).

Los efectos dañinos causados por los radicales libres están controlados en el organismo humano mediante un amplio espectro de antioxidantes de origen endógeno (enzimas antioxidantes, glutatión, albúmina, transferrina, ceruloplasmina, haptoglobulina, hemopexina, ácido úrico, bilirrubina) y exógenos a través de la dieta (vitaminas E y C, carotenoides, selenio, y compuestos fenólicos como ácidos fenólicos, fenoles no carboxílicos y flavonoides) (Gutteridge, 1995). Entre los componentes del sistema endógeno se destacan las enzimas antioxidantes tales como la paroxanasa, enzima extracelular específica de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) la cual aumenta su concentración de forma masiva como respuesta al aumento del estrés oxidativo (Hegele, 1999). También se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH-Px) cuyas actividades enzimáticas están

consideradas como una de las defensas antioxidantes endógenas más importantes del organismo (Montserrat, 2003).

En ocasiones estos mecanismos protectores son interrumpidos por varios procesos patológicos, entonces los suplementos antioxidantes juegan un rol vital en combatir el daño oxidativo. Recientemente, se ha dirigido mucha atención hacia el desarrollo de los etnomedicamentos con el fin de tratar diversas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, para ello se pretende investigar y llevar a la práctica los conocimientos milenarios acerca de las plantas con alto poder antioxidante y baja citotoxicidad (Hazra *et al.*, 2008).

2.1.1 Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo

Epilepsia

El desarrollo de focos epilépticos en el sistema nervioso central ha sido relacionado con alteraciones en la membrana de neuronas que involucran la generación de radicales libres y la peroxidación de lípidos de membrana. En la epilepsia postraumática y en el desarrollo de las epilepsias idiopáticas infantil y juvenil se ha propuesto la peroxidación lipídica entre los mecanismos que ocasionan estos estados. Existen modelos de epilepsia que inducen peroxidación en la membrana neuronal, como son los modelos de excitotoxicidad con inyecciones de ácido kaínico o de hierro. Se sabe que el α -tocoferol tiene efectos anticonvulsivantes en varios modelos de epilepsia experimental, por lo tanto, puede pensarse que los compuestos con actividad antioxidante sean capaces de ejercer una acción protectora sobre las membranas de las células y contrarrestar tanto la aparición de las descargas epilépticas, como sus efectos deteriorantes. Se piensa que los flavonoides del orégano francés tengan efecto antioxidante y pudieran contribuir a su actividad antiepiléptica. (García *et al.*, 1996).

Alteraciones hepáticas inducidas por estrés oxidativo

Aunque el posible papel protector de los flavonoides en el hígado se conoce escasamente, se ha puesto de manifiesto que la quercetina es capaz de inhibir la activación de las células estrelladas así como la producción de óxido nítrico, alterando vías de expresión de proteínas celulares (Kawada *et al.*, 1998) y que, en modelos de isquemia-reperfusión, reduce la capacidad oxidante del anión superóxido (Huk *et al.*, 1998). Se ha demostrado recientemente que la quercetina, al igual que los antioxidantes de carácter tiólico, reducen la fibrosis y el estrés oxidativo en modelos animales de cirrosis biliar (Peres *et al.*, 2000).

En alteraciones con una respuesta inflamatoria, los macrófagos estimulados por factores tales como endotoxemia o isquemia/reperfusión, desempeñan un papel fundamental. Los macrófagos activados liberan mediadores de la inflamación, incluyendo citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral, así como especies reactivas de oxígeno (ERO) que pueden contribuir a la aparición de estrés oxidativo, especialmente en aquellos casos en que exista un desequilibrio con las defensas antioxidantes de carácter enzimático (catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa) y no enzimático (vitaminas antioxidantes, glutatión y probablemente flavonoides) (Palomero *et al.*, 2001).

Existe mucho interés biomédico en frutos de los cítricos, pues su consumo se asocia con la disminución del riesgo a contraer cáncer colon y recto (Levi *et al.*, 1999), esofágico (Chen *et al.*, 2002) y del estómago (McCullough *et al.*, 2001) así como previniendo al organismo de enfermedades degenerativas. Los cítricos también parecen estar asociados con la disminución de los niveles de lípidos en la sangre (Kurowska *et al.*, 2000), y con el aumento de la calidad de vida de personas de la tercera edad (Fortes *et al.*, 2000). Estudios epidemiológicos han mostrado una relación inversa entre dieta con ingestión de cítricos y las enfermedades cardiovasculares (Tripoli *et al.*, 2007). Entre los componentes que posibilitan estos efectos beneficiosos se encuentran los flavonoides, un grupo de compuestos que constituyen potentes antioxidantes (Peterson *et al.*, 2006a y b).

2.2. Los cítricos como fuente de compuestos bioactivos

2.2.1. Clasificación y características morfofisiológicas del género *Citrus*

La familia Rutaceae agrupa 145-160 géneros y 925-1800 especies, se considera una familia cosmopolita, con abundante representación en la región tropical. En Cuba crecen 8 géneros nativos de la india y 4 géneros que no lo son, con 45 y 8 especies respectivamente (Beurton, 2008). Se ha comprobado la presencia en esta familia de varios tipos de alcaloides, cumarinas, aceites aromáticos esteroidales en cavidades lisígenas, parénquima y pericarpo, no siendo así en conductos resinosos en la corteza, los rayos medulares y nervios de las hojas. El género *Citrus* es uno de los más conocidos y representativos de *Rutaceae*; se desarrolla en forma de árboles o arbustos en sus ramas se aprecian espinas dispersas. Las hojas son alternas, simples; el peciolo es alado o a veces solo marginado, articulado apicalmente. La lámina es coriácea, cortamente pelosa en el envés. El margen es entero, aserrado o crenulado. Las inflorescencias son axilares, unifloras o en racimo corimbiforme. Las flores son hermafroditas o masculinas, actinomorfas, grandes y fragantes. El fruto es en

hesperidio con un exocarpo densamente glanduloso y pigmentado. Las semillas son angulares y generalmente aplanadas, el número es variable, se pueden encontrar unas pocas y en ocasiones llegar a ser numerosas. Los embriones son blancos o verdes y se pueden encontrar varios en una misma semilla por lo que es común la poliembrionía (Sauget, 1946).

Naranja agrio (*Citrus x aurantium* L.) y **naranja dulce** (*Citrus x aurantium* var. *sinensis* L. Osbeck) son especies nativas del sureste de Asia y pueden presentarse en forma de arbusto o árbol con aproximadamente 6 m de alto, fuertemente espinoso. Las hojas son unifolioladas con peciolo articulado apicalmente, marginados o estrechamente alados. El folíolo es glabro, agudo o redondeado, de base cuneiforme y margen subserrado o aserrado-crenulado. Las inflorescencias son unifloras o en racimo corto, paucifloro. Las flores son grandes, hermafroditas y de pétalos ovales. El fruto es ovoide y con cáscara gruesa. La pulpa contiene vesículas verdes pálido o amarillentas y el jugo es agrio. Las semillas son pequeñas, ovoides, lisas agudas y el embrión es blanco. Son muy empleadas con fines comestibles y ornamentales (Beurton, 2008).

Mandarina (*Citrus reticulata* Blanco.) es un híbrido cultígeno, presente en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Puede presentarse en forma de árbol o arbusto de 4-15 m de alto, inerme o con pocas espinas mayormente cortas y finas. Las hojas son subglabras y aromáticas, con un peciolo articulado apicalmente con alas estrechas o anchas. El foliolo es oval u ovado obtusamente agudo o acuminado, de base redondeada o cuneiforme y margen undulado, serrulado, crenulado o entero. Las inflorescencias son unifloras o en racimos cortos paucifloros. Las flores son pentámeras, fragantes, hermafroditas y de pétalos oblongo-lineares. El fruto es subgloboso o ligeramente deprimido con cáscara gruesa amarilla o anaranjada. La pulpa posee vesículas anaranjadas y el jugo varía desde el agrio, el amargo o el dulce. Las semillas son pocas o numerosas, blancas y poliembrionales (Beurton, 2008).

Limón criollo (*Citrus x aurantiifolia* Christm. Swingle var. *mexicana*) y **lima persa** (*Citrus x latifolia* Tan.) son híbridos cultígenos, presentes en muchas regiones tropicales del mundo. Se presentan en forma de árbol o arbusto de 3-5 m de alto, muy ramoso, usualmente con numerosas espinas cortas y rígidas. Las hojas son glabras con el peciolo articulado apicalmente, estrechamente alado, con ala espatulada. El foliolo es oval u oblongo aovado, de base redondeada o margen crenulados. Las inflorescencias son unifloras o en racimo corto paucifloro. Las flores son muy fragantes. El fruto es de globoso a elipsoideo con una cáscara muy fina, densamente glanduloso-punteado. La pulpa contiene vesículas pequeñas y el jugo es muy agrio. Las semillas son rollizas, ovoides, lisas y poliembrionales (Beurton, 2008).

2.2.2 Compuestos bioactivos del género *Citrus*

El género *Citrus* constituye una importante fuente de compuestos bioactivos, lo cual convierte sus especies en portadoras de valiosas propiedades que resultan beneficiosas para plantas y animales. Entre estos compuestos se encuentran fundamentalmente los fenoles y sus derivados, los cuales presentan una estructura anillada que les permite desencadenar un conjunto de reacciones metabólicas que interfieren con enfermedades de difícil resolución. Muchos autores reportan la presencia de antioxidantes en jugo y partes comestibles de naranjas de origen y variedades diferentes (Anagnostopoulou *et al.*, 2006).

Se ha comprobado que especies del género *Citrus* poseen clases particulares de flavonoides que las convierten en portadoras de importantes propiedades farmacológicas. Un ejemplo de ello lo constituye *Citrus x limon* L. cuya principal flavona, Hesperidina, influye positivamente sobre la permeabilidad vascular, incrementa la resistencia capilar, actúa como analgésico y posee propiedades antiinflamatorias (Yaqin *et al.*, 2006). Este metabolito, además elimina radicales libres del oxígeno involucrados en el cáncer, por ello es considerado un efectivo antioxidante. Otra flavona abundante es Eriocitrina, componente de numerosos complejos multivitamínicos, debido a su elevado contenido de residuos glicosilados y correspondiente actividad antioxidante. Su acción fundamental está encaminada a mantener la integridad capilar y la circulación periférica (Del Río *et al.*, 2004).

Otro flavonoide importante en *Citrus x limon* L. es diosmin que posee una alta importancia farmacológica, por lo cual es usado como componente activo de muchas drogas, que se emplean en tratamientos de enfermedades circulatorias como insuficiencias venosas y artritis reumatoidea. Además, posee propiedades antihemorroides, antiperoxidación lipídica y antioxidante. También flavonoles como kampferol y quercetina, se encuentran en la cáscara del limón, los cuales poseen gran actividad antioxidante (González *et al.*, 2010).

Citrus tangerina presenta funciones antimutagénicas, antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales, anticancerígenos y contra la arterosclerosis a consecuencia de que presentan flavonoides como naringenina, hesperidina, didimina, tangeretina y nobiletina que constituyen componentes bioactivos de su pericarpio (Yaqin *et al.*, 2006).

En *Citrus x aurantium* L. se destaca la presencia de hesperidina, naringerina y neoesperidium los cuales están asociados a la reparación del DNA (Peterson *et al.*, 2006a).

Los cítricos son la fuente principal de elementos nutritivos importantes como la vitamina C y otros componentes bioactivos (Peterson *et al.*, 2006a y b) tales como carotenoides y flavonoides, que se pueden encontrar en altas concentraciones incluso en tejidos de la cáscara; por ello el consumo de sus frutos constituye una importante fuente natural de antioxidantes (Anagnostopoulou *et al.*, 2006; Yu, 2004). En diferentes sistemas de plantas los flavonoides presentan un mecanismo para la detoxificación de las células por aluminio y una acumulación particular de flavonoides con hidroxilación en posición orto del anillo B, está correlacionada con la tolerancia a la radiación ultravioleta (Djoukeng *et al.*, 2008).

Existen otros metabolitos secundarios presentes en el género *Citrus*, que actúan también como compuestos bioactivos e intervienen beneficiosamente en organismos animales y vegetales. Dentro de estos se hallan las coumarinas, que presentan actividad antiinflamatoria, antitrombótica, anticoagulante y vasodilatadora (Murphy, 1999)

La mayoría de los autores que han realizado estudios importantes sobre la actividad biológica de los compuestos presentes en los cítricos se han referido al fruto en sí; dígase cáscara, jugo o sumo, etc. Sin embargo poco se ha indagado respecto a otros órganos aéreos de la planta como hojas y ramas. (Djoukeng *et al.*, 2008), han obtenido resultados alentadores en cuanto a la actividad de flavonoides en hojas y ramas, lo que indica una línea de estudio en cítricos con resultados prometedores.

2.3 Flavonoides

2.3.1. Características generales de los flavonoides

Los flavonoides constituyen metabolitos secundarios de las plantas. Fueron descubiertos por el premio Nóbel en Bioquímica Dr. Albert Szent-Gyorgi, quien inicialmente los denominó "vitamina P". Años más tarde este término fue sustituido por el de flavonoide, proveniente del latín *flavus* que significa amarillo, debido al color que poseían los primeros compuestos aislados. Sin embargo también existen pigmentos incoloros, rojos, violetas y azules, los cuales le confieren las coloraciones amarilla, naranja, roja, violeta y azul, a muchas flores, hojas y frutos, (Martínez, 2005). Los flavonoides son sintetizados a partir de una molécula de [fenilalanina](#) y 3 de [malonil-CoA](#), a través de la conocida como vía biosintética de los flavonoides, cuyo producto, la estructura base, se cicla por la acción de una enzima [isomerasa](#). La síntesis se realiza en el citoplasma y luego los flavonoides se dirigen hacia su destino final en las vacuolas celulares. (Escamilla *et al.*, 2009)

La mayoría de los flavonoides poseen nombres triviales con terminación -ina u -ol y son componentes importantes en la dieta humana, su consumo promedio en los países europeos se estima en 23 mg/día (Martínez, 2005)

Los flavonoides son sustancias sólidas, cristalinas, solubles en agua y etanol. Su solubilidad en agua depende del grado de asociación (libre, glicósido ó sulfato) y su solubilidad en solventes orgánicos más o menos oxigenados, depende de su polaridad (Lock *et al.*, 2006). De forma general las propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide y de su forma de asociación (Martínez, 2005). También es significativa su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro, debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados, con un máximo de absorción de luz a los 280nm (Martínez, 2005). Por otro lado, son sustancias fácilmente oxidables y por tanto tienen efecto antioxidante (López, 2002).

2.3.1.1. Estructura y clasificación de los flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (Puebla *et al.*, 2004), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Martínez, 2005; Escamilla *et al.*, 2009). (Figura 1)

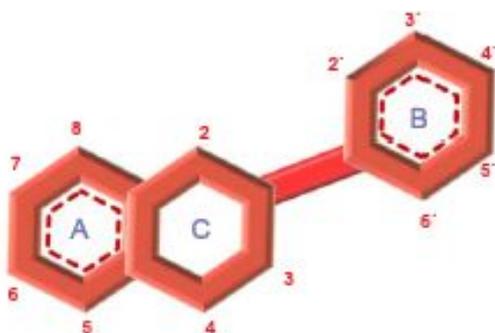


Figura 1. Esqueleto común de los flavonoides con sus tres anillos A, B, C.

La estructura base de los flavonoides puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que son considerados una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser [poli fenólicos](#). (Escamilla *et al.*, 2009). Muchas veces la biosíntesis continúa y los productos finales, también flavonoides, quedan glucosilados portando moléculas de azúcares preferentemente a la posición C₃ y con menor frecuencia al C₇ del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-

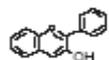
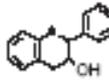
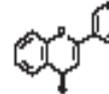
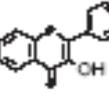
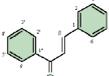
glicósidos, siendo D-glucosa el residuo de azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares pueden ser D-galactosa, L-ramnosa, IL-arabinosa, D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico. La parte sin azúcares de la molécula flavonoide se llama aglicona. (Martínez, 2005)

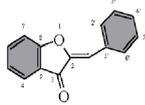
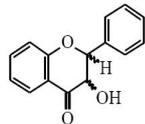
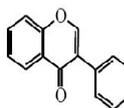
Pueden encontrarse flavonoides parcialmente [polimerizados](#) dando lugar a dímeros, trímeros, o complejos multienlazados, como los [taninos condensados](#) (Martínez, 2005). Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante.

De acuerdo con la nomenclatura de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) pueden clasificarse, según su esqueleto y vía metabólica en Flavonoides, Isoflavonoides y Neoflavonoides.

Los flavonoides a su vez pueden clasificarse en varias clases de acuerdo con el grado de oxidación y de sustitución del anillo pirano central (C). De esta forma aparecen las antocianidinas, pigmentos que confieren las coloraciones rojas, azules y violetas, a numerosas flores, frutos, hojas y semillas (Pérez, 2003). La tabla I muestra otros grupos importantes son los flavanos, flavonas, flavonoles, chalconas, auronas, flavanonoles e isoflavonas.

Tabla I. Clasificación de Flavonoides (Puebla *et al.*, 2004; Martínez, 2005; Salamanca y Correa, 2007)

Nombre	Descripción	Ejemplo	Estructura
Antocianidinas	Tienen un grupo hidroxilo en posición 3, pero además poseen un doble enlace en los carbonos 3 y 4 del anillo C.	Antocianidina	
Flavanos	Tiene un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C.	Catequina	
Flavonas	Posee un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen de grupo hidroxilo en la posición C3, las flavonononas no poseen doble enlace en la posición C2-C3.	Diosmetina	
Flavonoles	Posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C.	Quercetina	
Chalconas	Es la estructura mas simple de los flavonoides C6-C3-C6	Luteolina	

Auronas	Los anillos bencénicos están unidos por un anillo de 5 átomos de carbono	
Flavanonoles o dihidroflavonoles	Posee un grupo carbonilo en posición 4, un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C y no presenta doble enlace entre C2 y C3.	Morina 
Isoflavonas o isoflavononas	Isoflavonoide que posee un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen de grupo hidroxilo en posición 3	Genisteína 

2.3.2. Las plantas como principales fuentes de flavonoides

Los flavonoides están ampliamente distribuidos entre los vegetales superiores, siendo las rutáceas, poligonáceas y umbelíferas las principales familias que los contienen. Abundan, sobre todo, en las partes aéreas jóvenes de las plantas y más expuestas al sol, como hojas, frutos y flores, ya que la luz solar favorece su síntesis (López, 2002), solo algunos pocos se han encontrado en hongos y algas, siendo los O-glicósidos los que con más frecuencia se presentan. Las antocianinas por su parte se encuentran como sales, principalmente en flores, frutos y tejidos con coloraciones que van desde el rojo hasta el violeta y el azul. Muy pocas veces se encuentran varias clases de flavonoides en un mismo tejido vegetal, sin embargo de las raíces de *Lonchocarpus subglauscescens* (leguminosa) se aislaron varias flavonas, flavonoles, isoflavonas, rotenoides, chalconas y flavanoles. (Martínez, 2005).

Estudios realizados reportan como principales fuentes de flavonoides a las uvas y vinos, la cerveza y el cacao en polvo (Salamanca y Correa, 2007), el té verde y negro (Vit *et al.*, 2008), la miel (García, 2008), la manzana, el plátano, los cítricos como la naranja, el limón, la toronja, la lima (González *et al.*, 2010) los tomates, lechugas, cebollas, zanahorias, remolachas, berros y brócolis, pasiflora, manzanilla, tilo, orégano, soja, trigo, Eucalipto, Ginkgo y el roble.

Las flavonas son amarillas y pueden estar en algunas flores, como en la primula, dándoles un color amarillo a sus pétalos, o en frutos, como en la piel de las uvas, son las responsables del color amarillento de los vinos blancos. Hay tres flavonas importantes: la tricetina, presente en el polen de algunas mirtáceas, y también en las podocarpaceas (*Podocarpus spp.*); la apigenina, presente en muchas plantas como la camomila, (*Matricaria recutita*) o el espino blanco (*Crataegus laevigata*); y la luteolina, de color amarillo, que incluso sirve para teñir lana y otros tejidos, para lo cual se ha empleado la Retama de los tintoreros (*Genista tinctoria*) (Martínez, 2005)

Los flavonoles más importantes son: la quercetina que es el flavonol amarillo del polen de muchas fagáceas (*Quercus sp.*); la miricetina, presente en la uva; y el kaempferol que está presente en las inflorescencias. La fisetina es un flavonol que se extrae de las plantas del género *Amphipterygium* (Martínez, 2005)

Entre los flavandioles característicos encontramos la leucocianidina, presente en algunas plantas, como en el plátano, o en el muérdago criollo (*Ligaria cuneifolia*); la leucopelargonidina, presente en la alfalfa de secano (*Medicago truncatula*); y la leucodelfinidina, que es activa en el castaño de indias (*Aesculus hippocastanum*).

Las antocianinas, son los pigmentos hidrosolubles presentes en el líquido vacuolar de las células responsables de la mayoría de las coloraciones rojas, azules y violetas de las flores y hojas.

Los taninos condensados son macromoléculas constituidas por unidades de flavonoides llamadas Antocianidinas. Los taninos están ampliamente distribuidos en las plantas como el té, donde contribuyen al sabor astringente.

Las flavanonas se encuentran en altas concentraciones en los cítricos. Las más importantes son naringenina, presente en el zumo de naranja, limón o pomelo, dándole un sabor amargo; liquiritigenina, presente en el regaliz; y eriodictiol, se presenta en el guisante actuando como quimioatrayente para interactuar con agro bacterias.

Los dihidroflavonoles son los precursores directos de flavandioles y flavonoles, pero también tienen cierta actividad como tales en algunas plantas. Entre los mas importantes se encuentran la dihidromiricetina, presente en las partes aéreas de los brezos (*Erica spp.*), dihidroquercetina, en las uvas blancas o en la zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia*); y dihidrokaempferol (Martínez, 2005).

2.3.3 Actividad biológica de los flavonoides

Está comprobado que los flavonoides son importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas al protegerlas contra agentes agresores externos, como la radiación UV, microorganismos, animales herbívoros y del medio ambiente. Pueden actuar como señalizadores químicos, indicando a los insectos que planta es apropiada para su alimentación, oviposición o simplemente guiándolos y facilitando así la polinización (Martínez, 2005). También juegan un papel ecológico relevante por lo que el hombre ha aprovechado su potencial en la búsqueda de nuevos insecticidas (García *et al.*, 2004).

Estudios recientes indican que los flavonoides actúan como moduladores celulares por interacción con enzimas, receptores, y factores de transcripción en cascadas de señalización intracelulares (Herderson *et al.*, 2000). El papel de los flavonoides como

antioxidantes y moduladores de la señalización celular pudiera explicar su potencial como inhibidores de agentes anticancerígenos y neurodegenerativos. Varios estudios *in vitro* sugieren que los flavonoides actúan como basureros de radicales libres, modulan actividad enzimática, inhiben la proliferación celular, y posee actividad antibiótica, antialérgicas, antidiarreicas, antillagas, y antiinflamatorias (Yu, 2004).

Las propiedades antimicrobianas del propóleo pueden ser atribuidas, principalmente, a los flavonoides. El uso de los flavonoides contra infecciones bacterianas o fúngicas tiene como objetivos matar las células de los microorganismos o dificultar los efectos de difusión de las toxinas bacterianas, además son componentes activos que ejerce gran variedad de cambios biológicos en diversos sistemas, como las respuestas inmunomoduladoras, antiinflamatorias, y antimitogénicas (Manrique y Santana, 2008).

Los flavonoides pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres (Manrique y Santana, 2008). Sus efectos citoprotectores son, por ejemplo, bien potentes en fibroblastos de la piel humana, queratinocitos, células endoteliales y ganglios sensoriales (Martínez-Flóres *et al.*, 2002). Diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos o la autooxidación de los homogeneizados de cerebro (Martínez-Flóres *et al.*, 2002). Asimismo, se ha comprobado su potente capacidad de inhibir *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos y reducir la citotoxicidad de las LDL oxidadas (Hirano *et al.*, 2001; Terao *et al.*, 2001). De hecho, las poblaciones que consumen productos ricos en flavonoides estadísticamente presentan menores riesgos de afecciones cardiovasculares (Geleijnse *et al.*, 2002).

En ensayos clínicos, se ha comprobado que la administración profiláctica de flavonoides disminuye la producción de radicales libres en la reperfusión después del bypass en cirugía de reemplazo vascular (Martínez-Flóres *et al.*, 2002). En estudios epidemiológicos se ha demostrado que con el consumo incrementado de frutas y vegetales se experimenta una reducción del 50% en el riesgo de cánceres digestivos y de las vías respiratorias (Hollman y Katan, 1998). Así, la genisteína bloquea el desarrollo de tumores al prevenir la formación de nuevos vasos impidiendo con ello la llegada del oxígeno y nutrientes a las células neotumorales (Martínez-Flóres *et al.*, 2002).

También los flavonoides modulan la reacción de los estrógenos ligándose a sus receptores con lo que disminuye el riesgo de cáncer de mama. De hecho, se ha puesto de manifiesto que diversos flavonoides pueden inhibir monooxigenasas

dependientes del Citocromo P-450, lo que indicaría un papel potencial en la regulación de la activación de carcinógenos (Herderson *et al.*, 2000) y que chalconas y flavononas en concreto son inductoras de las quinonas reductasas y podrían tener un papel preventivo en la progresión de los hematomas (Miranda *et al.*, 2000).

2.3.3.1 Actividad antioxidante y prooxidante de los flavonoides

Los antioxidantes se clasifican en dos principales categorías: primarios y secundarios. Los antioxidantes primarios son aquéllos que reaccionan con especies reactivas de oxígeno (ERO). Los antioxidantes secundarios actúan debido a numerosos mecanismos, reduciendo la velocidad de oxidación de lípidos por varias acciones, pero sin estabilizar a las ERO. También pueden desactivar metales pesados prooxidantes o ceder hidrógeno a los antioxidantes primarios provocando su regeneración (Harborne, 1994; Akoh y Min, 2002).

La capacidad de los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue reconocida en los años treinta; sin embargo, el mecanismo antioxidante fue ignorado, en gran medida, hasta hace poco tiempo. El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. (Pérez, 2003; Monroy *et al.*, 2007; Vit *et al.*, 2008).

Los flavonoides secuestran oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos, bloqueando la acción deletérea de estas sustancias sobre las células. Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia el radical hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (Pérez, 2003; Romero *et al.*, 2003). Además los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Martínez-Flóres *et al.*, 2002). La actividad antioxidante de los flavonoides ha sido determinada en queratinocitos, fibroblastos dérmicos, ganglios sensoriales, endotelio, tejido nervioso y en lipoproteínas de baja densidad. (Pérez, 2003; Vit *et al.*, 2006)

Entre las características estructurales que le confieren la capacidad antioxidante a los flavonoides, se encuentran

- Presencia del grupo O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Doble enlace, en conjunción con la función 4- oxo del anillo C.

— Grupos 3' y 5'OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante. (Pérez, 2003)

Siguiendo estos criterios, el flavonoide quercetina es el que mejor reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante (Fig. 4), su capacidad antioxidante resulta 5 veces mayor al demostrado por las vitaminas E y C (Martínez-Flóres *et al.*, 2002). La función antioxidante de la quercetina muestra efectos sinérgicos con el ácido ascórbico (vitamina C), el cual reduce la oxidación de la quercetina, de manera tal que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo. Por otra parte, la quercetina protege de la oxidación a la vitamina E, con lo cual también presenta efectos sinergizantes (Escamilla *et al.*, 2009). Así, se ha demostrado que el flavonoide inhibe la fotooxidación de la vitamina E en la membrana de las células sanguíneas en presencia de hematoporfirina como fotosensibilizador (Rice-Evans y Packer, 2003).

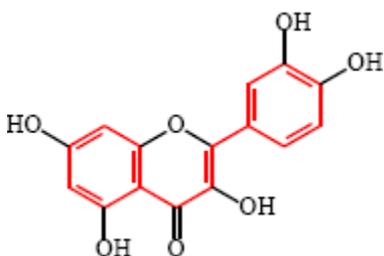


Figura 2. Estructura química de la Quercetina y los principales grupos encargados de su acción antioxidante.

No obstante, los flavonoides no constituyen un grupo homogéneo de compuestos y las mismas propiedades que caracterizan su actividad antioxidante, determinan que puedan presentar efectos prooxidantes. Los mecanismos moleculares que determinan la actividad de los flavonoides en ese sentido, se basan en la formación de un radical aroxilo lábil o de un complejo flavonoide hierro redox lábil. En el primer caso, la autooxidación del radical aroxilo genera un anión superóxido (O_2^-) que, siguiendo la secuencia conocida, genera el dañino radical hidroxilo ($HO\cdot$). Estos mecanismos pueden constituir la base de las acciones mutagénicas y citotóxicas descritas para algunos flavonoides (Martínez-Flóres *et al.*, 2002). Debe destacarse que las propiedades prooxidantes y mutagénicas de los flavonoides se hallan unidas a la acción de eliminar radicales libres que tienen estos compuestos. Sin embargo, lo que determina el carácter antioxidante o prooxidante de esta reacción inicial es la estabilidad/labilidad redox del compuesto radical formado a partir del flavonoide original. La autooxidación del radical aroxilo o la formación de compuestos ternarios

entre el ADN, el cobre y los flavonoides, son posibles explicaciones de la mutagenicidad mediada por los flavonoides (Martínez-Flóres *et al.*, 2002); ahora bien, dichas acciones sólo parecen producirse cuando las dosis de flavonoides utilizadas son muy altas (Da Silva *et al.*, 2002).

2.3.3.1.1 Técnicas de determinación de actividad antioxidante

Varios son los ensayos *in vitro* empleados para la evaluación de la actividad de compuestos bioactivos como los fenoles y flavonoides, basándose fundamentalmente en las diferentes propiedades que estos poseen para realizar su acción antioxidante. La capacidad de atrapar radicales libres, la determinación del poder reductor, el ensayo de peroxidación lipídica, la evaluación de la actividad antioxidante total y la capacidad de quelar metales; son las principales. Se pueden encontrar diversas variantes de estas técnicas, en dependencia de los reactivos y patrones empleados, siempre de acuerdo con el objetivo que se persiga. El compuesto utilizado generalmente como patrón es la quercetina, ya que es un flavonoide que reúne una serie de propiedades químicas que la hacen un compuesto de referencia muy eficaz (Mariani *et al.*, 2008).

Capacidad de atrapar radicales libres

Para determinar la capacidad de atrapar radicales libres se desarrollan métodos no enzimáticos que proporciona información básica de la habilidad para eliminar radicales libres de compuestos o mezclas individuales. El radical 1, 1-difenil, 2-picril hidrazil (DPPH) se emplea para determinar la capacidad de atrapar radicales libres de varios compuestos naturales como los compuestos fenólicos, antocianinas o extractos crudos de plantas. El radical DPPH es atrapado por el antioxidante dado mediante la donación de un grupo hidrógeno, formándose el DPPH-H reducido. Ocurre entonces un cambio de coloración de púrpura a amarillo que indica la reducción química de la especie. La disminución de la absorbancia puede ser medida a 517 nm y da una medida de la capacidad antioxidante del compuesto en cuestión (Chang *et al.*, 2007).

Una técnica mejorada para determinar la capacidad de atrapar radicales libres es la generación del catión radical de 2,29-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonic acid) (ABTS), que supone la producción directa de un catión ABTS cromóforo de color azul/ verde como resultado de la reacción que ocurre entre el persulfato de potasio y el cation radical ABTS. Con absorción a longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm, así como el máximo más comúnmente usado a 415 nm. La adición de un antioxidante dado al catión radical ABTS pre-formado lo reduce a una extensión y escala de tiempo en dependencia de su actividad antioxidante. Así el porcentaje de la

inhibición del catión radical ABTS es determinado en función de la concentración del antioxidante y la duración de la reacción, empleando como patrón un antioxidante dado como por ejemplo el trolox, el ácido ascórbico o la quercetina. Este método es aplicable al estudio de compuestos puros y extractos naturales; tanto solubles en agua como en lípidos. (Re *et al.*, 2009)

Determinación del poder reductor

El poder reductor de un compuesto constituye un indicador significativo de su potencial actividad antioxidante (Yildirim *et al.*, 2000). La existencia de reductores es la llave del poder reductor, que supone la actividad antioxidante por la acción de romper la cadena de radical libre donando un átomo de hidrógeno (Xing *et al.*, 2005). En este ensayo se produce la reducción del hierro del complejo Fe^{3+} - ferricianuro a la forma Fe^{2+} (Gülçin, 2006), formando un complejo azul prusia que permite determinar el poder reductor de la muestra mediante la lectura espectrofotométrica a 700 nm (Cheng *et al.*, 2002).

Ensayos de Peroxidación lipídica

El ensayo para determinar la capacidad antioxidante de un compuesto mediante la peroxidación lipídica, la lipoproteína de baja densidad (LDL), se obtiene mediante la oxidación de ácidos grasos ricos en enlaces no saturados, que pueden reaccionar con dos moléculas de ácido de tiobarbitúrico para dar lugar a un complejo coloreado rojo-rosado, el incremento de los valores de la absorbancia a 532 nm expresados en porcentaje de inhibición da una medida de la capacidad antioxidante del compuesto en estudio (Senevirathne *et al.*, 2006)

Determinación de la actividad antioxidante total

En la determinación de la actividad antioxidante de un compuesto natural ha sido empleado en múltiples ocasiones el método del fosfo-molibdato. Este es un método espectrofotométrico que se ha desarrollado para la determinación cuantitativa de capacidad antioxidante total de un compuesto. Es un ensayo basado en la reducción de Mo (VI) a Mo (V) con la consiguiente formación de un complejo fosfato/ Mo (V) de color verde y un pH ácido. Con un máximo de absorción a los 695nm y empleando como patrones a la vitamina E o al ácido ascórbico (vitamina C) (Prieto *et al.*, 1999). En él, un incremento en los valores de la absorbancia indica que la muestra posee una significativa capacidad antioxidante (Pan *et al.*, 2008).

Capacidad de quelación de metales

En el ensayo para determinar la capacidad antioxidante de un compuesto basándose en la propiedad de quelación de metales, la Ferrozina al unirse al hierro (Fe^{2+}) produce un complejo de color violeta. En presencia de un agente quelante (compuesto antioxidante), la formación de este complejo se ve interrumpida y como consecuencia de ello el color violeta del complejo disminuye hasta tomar un tono rojizo. En este ensayo se suele emplear como compuesto de referencia el etileno diamino tetra ácido acético (EDTA). Con un máximo de 652 nm donde un incremento de la absorbancia indica la significancia de la capacidad antioxidante del compuesto en cuestión (Hazra *et al.*, 2008)

2.4 Toxicidad de extractos vegetales

La evaluación de la acción tóxica de los extractos de plantas es indispensable a fin de considerarlo como un tratamiento seguro; ello incluye la evaluación de la toxicidad intrínseca de la planta y de los efectos agudos de dosis excesivas. En la actualidad existe una tendencia encaminada a sustituir el uso de los animales de laboratorio en pruebas toxicológicas, debido a los altos costos y el sufrimiento causado a los animales en estas pruebas (Lagarto *et al.*, 2001).

Una de las tecnologías de vital importancia para el descubrimiento y desarrollo de nuevos productos de origen natural son los ensayos biológicos o bioensayos. En la última década, se han incorporado algunos ensayos de gran utilidad y eficacia que requieren pequeñas cantidades de muestras, resultan baratos, fáciles de utilizar, y permiten evaluar de una forma rápida la bioactividad de extractos crudos y de fracciones, conduciendo con seguridad a los principios activos y descartando todo lo que no sea de interés (Carballo *et al.*, 2002; Torokne *et al.*, 2007).

Uno de los bioensayos más utilizados es el ensayo de *Artemia salina*. Este es un ensayo general, de amplio uso para determinar el efecto letal de los materiales en nauplios de *Artemia*, ya que es muy sensitivo a una variedad de sustancias y puede considerarse un bioensayo útil, rápido y simple para predecir la toxicidad de extractos de plantas (Lagarto *et al.*, 2001); de esta manera se predice su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos y/o ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos (Pino *et al.*, 2008). El mosquito doméstico *Culex quinquefasciatus* es otro insecto empleado en modelos de toxicidad de extractos naturales (García *et al.*, 2004).

En el Ensayo de toxicidad general de *Artemia salina* los extractos crudos, fracciones o compuestos puros de origen natural son evaluados a concentraciones iniciales de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ en viales que contienen 5 mL de solución salina y 10 nauplios, cada uno es considerado una réplica (tres por concentración). Después de 24 horas,

se cuenta el número de nauplios muertos. La muerte de los nauplios se establece por la falta total de movimientos durante 10 segundos de observación bajo el estereomicroscopio (Pino *et al.*, 2008). Los valores de LD₅₀ e intervalos de confianza 95%, se calculan usando el método análisis estadístico Probit, programa Polo (LeOra Software, Berkeley, California) (Finney, 1985). La LD₅₀ se define como la concentración de un material tóxico letal al 50% de los organismos de la prueba (Pino *et al.*, 2008).

Este método, ha sido usado en investigaciones en plantas medicinales llevadas a cabo en diferentes países para evaluar la toxicidad, la acción gastroprotectora, y otras acciones biológicas, que en algunos casos estuvieron relacionados con estudios farmacológicos llevados a cabo para diferentes componentes químicos (Lagarto *et al.*, 2001). Además este ensayo es considerado una herramienta útil para evaluación preliminar de toxicidad de toxinas fúngicas, metales pesados, insecticidas y en comprobación citotóxica de materiales dentales (Pelka *et al.*, 2000).

3.3 Materiales y métodos

3.1 Colecta del material vegetal

Se colectó, en el Centro de Estudio Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, material foliar de cinco especies de cítricos: naranjo dulce (*Citrus x aurantium* var. *sinensis* L. Osbeck), naranjo agrio (*Citrus x aurantium* L.), limón criollo (*Citrus x aurantiifolia* Christm. Swingle var. *mexicana*), lima persa (*Citrus x latifolia* Tan.) y mandarina (*Citrus reticulata* Blanco.). Las especies colectadas se identificaron taxonómicamente y una muestra de cada especie se depositó en el herbario de dicha institución (O. Méndez No. 9882, 9878, 9884, 9885, 9883 (ULV)). El material vegetal se lavó con abundante agua, se secó en una estufa a 60 °C durante 24 h y se pulverizó en molino de 5 pulgada.

3.2 Obtención de los extractos hidroalcohólicos

Se prepararon dos clases de extractos a partir de las muestras colectadas: metanólicos y etanólicos. A 1 g del material vegetal pulverizado se adicionó 20 mL de etanol o metanol al 70%. Posteriormente, las soluciones se sometieron a ultrasonido (Ultrasonic Cell Crusher, Scientz-IIID, China), durante 20 min a una temperatura de muestra de 60 °C. Finalmente, los extractos se filtraron al vacío (Water Circulating Multi Propose Vacuum Pump SHB-III, Liuyi, China).

3.3 Caracterización de los extractos crudos

3.3.1 Caracterización fitoquímica

El análisis fitoquímico de los extractos se realizó acorde con el método descrito por (Schabra *et al.* (1984)). Se analizó la presencia de saponinas, fenoles, taninos, aminoácidos, aminos, coumarinas, quinonas, alcaloides, triterpenos, esteroides y flavonoides. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.3.1 Cromatografía en placa delgada (TLC)

Se realizó un análisis cromatográfico de los extractos obtenidos, para el cual se empleó como fase estacionaria placas del sílica gel 60 F254, (Merck, Alemania) y tres sistemas de fase móvil diferentes: etanol -agua (3:2), n -butanol -ácido acético -agua (4:1:5) y metanol -ácido acético -agua (19:1:1). Los cromatogramas se evaluaron a 254 y 365 nm para la identificación de las diferentes clases de flavonoides (Wagner *et al.*, 1996).

3.4 Cuantificación de compuestos fenólicos

3.4.1 Cuantificación de fenoles totales

La determinación de fenoles totales se realizó según el método descrito por Tuberoso *et al.* (2009), con algunas modificaciones. A 1 mL de cada extracto vegetal se adicionó 80 µL de Folin-Cioalteau 1N, se dejó reposar durante 5 min y se adicionaron 800 µL de Na₂CO₃ al 7%, se completó hasta 2 mL con agua destilada, se mezcló empleando vortex y se incubó durante 90 min a una temperatura de 23 °C. Finalmente, se realizó la lectura a 750 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleigh 1601, China). El contenido de fenoles totales de cada extracto se expresó en mg de ácido gálico/ mL de extracto, mediante extrapolación en una curva de calibración empleando como patrón ácido gálico a diferentes concentraciones. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.4.2 Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación del contenido de flavonoides totales se realizó empleando el método NaNO₂ – ALCL₃, descrito por Liu y Zhu (2007), con algunas modificaciones. A 1 mL de cada extracto vegetal se le adicionaron 60 µL de una solución de NaNO₂ al 5%, se mezcló con vortex durante 5 min, seguidamente se añadieron 60 µL de ALCL₃ al 5%, se mezcló mediante vortex y se dejó reposar durante 6 min. Posteriormente, se adicionaron 400 µL de NaOH 1 M, se dejó en reposo durante 10 min y se realizó la lectura espectrofotométrica a 415 nm antes de 30 min. El contenido de flavonoides total de cada extracto se expresó en mg de quercetina/ mL de extracto, por extrapolación en una curva de calibración realizada empleando como patrón quercetina a diferentes concentraciones. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.5 Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos vegetales

3.5.1 Determinación de la capacidad de atrapar radicales libres

La capacidad atrapadora de radicales libres de los extractos se determinó mediante el ensayo con 2,2' -azinobis -(3 -etilbezotiazoline -6 -ácido sulfónico) (ABTS) a través del método descrito por Re *et al.* (1999), usando ácido ascórbico y quercetina como patrones antioxidantes. El catión de ABTS.+ se obtuvo mediante la oxidación química con persulfato de potasio; el ABTS fue disuelto en agua destilada hasta una concentración de 7 mM, posteriormente se mezcló con persulfato de potasio a 2.45 mM. La mezcla ABTS.+ -persulfato de potasio se dejó reposar en oscuridad total a

temperatura del cuarto entre 12 y 16 h. Se tomaron 2 mL de la solución de ABTS.+ y se ajustó la absorbancia a 0.700 ± 0.020 nm a una longitud de onda de 734 nm. Posteriormente, se adicionó 10 μ L de cada uno de los extractos a diferentes concentraciones (2, 4, 6 μ g/mL) a 1 mL de ABTS, respectivamente. Al transcurrir 1 min se realizó una segunda lectura espectrofotométrica. El porcentaje de inhibición de la absorbancia se calculó según la fórmula $((A_0 - A) / A_0) \times 100$, y según este se consideró la capacidad atrapadora de radicales libres de cada extracto. Cada determinación se realizó por triplicado.

3.5.2 Determinación del poder reductor

La determinación del poder reductor de los extractos vegetales y de los patrones antioxidantes quercetina y ácido ascórbico se realizó según el método descrito por Pan *et al.*, (2008). Se tomó 1 mL de cada extracto a diferentes concentraciones (12.5, 25, 50, 200 y 400 μ g) de flavonoides totales/ mL de solvente) y se adicionó 2.5 mL de tampón fosfato al 0.2 M pH 6.6. Posteriormente, se adicionó 2.5 mL de ferricianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$) al 1%, se calentó hasta una temperatura de 50 °C durante 20 min, luego se añadieron 2.5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 1%, se centrifugó a 3000 g durante 10 min. A 2.5 mL del sobrenadante se le adicionó 2.5 mL de agua destilada y 0.5 mL de tricloruro férrico ($FeCl_3$) al 0.1%, finalmente se realizó la lectura espectrofotométrica a 700 nm. Se consideró el aumento de la absorbancia como indicador del poder reductor de los extractos. Cada determinación se realizó por triplicado.

3.5.3 Determinación de la capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante total se determinó por el método descrito por Prieto *et al.* (1999) modificado. A 180 μ L de extracto, se adicionó 1.82 mL de reactivo A, compuesto por ácido sulfúrico al 0.6 M, fosfato de sodio a 28 mM y molibdato de amonio a 4 mM. La mezcla se incubó a 95 °C durante 150 min. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura del cuarto y se determinó la absorbancia a 695 nm. Las lecturas se repitieron a los 30, 60, 90, 120 y 150 min. Se consideró el aumento de la absorbancia como indicador de actividad antioxidante total. Cada determinación se realizó por triplicado.

3.6 Evaluación de la toxicidad de los extractos vegetales mediante el ensayo de letalidad frente a *Artemia salina*.

Se valoró la actividad tóxica *in vitro* de los extractos mediante el ensayo de letalidad frente a *Artemia salina*. Se evaluaron tres concentraciones diferentes de cada uno de

los extractos hidroalcohólicos: 10, 100 y 1 000 µg/mL. En 2 mL de agua de mar artificial (23 g de NaCl, 11 g de MgCl₂ 6 H₂O, 4 g Na₂SO₄, 1.3 g CaCl₂ 2H₂O, 0.7 g KCl en 1 000 mL de agua destilada) se colocaron entre 10 y 15 nauplios de *A. salina* y se adicionaron los extractos a concentraciones diferentes. A las 24 h en contacto, se realizó un conteo de los nauplios sobrevivientes, este ensayo se realizó por triplicado. La toxicidad de los extractos se expresó mediante el porcentaje de mortalidad de los nauplios de *A. salina* y se interpretó de la siguiente forma: 0-10% no tóxico, 11-50% moderadamente tóxico, 51-90% altamente tóxico y 100 % extremadamente tóxico (Borroto *et al.*, 2010). Los porcentajes de mortalidad se graficaron en función de la concentración utilizada y se obtuvo la línea de tendencia potencial. A partir de la ecuación de la gráfica se determinó la concentración letal para el 50% de la población expuesta (CL₅₀).

3.7 Procesamiento estadístico

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico PASW Statistics para Windows versión 18.0, verificándose en todos los casos el cumplimiento de los supuestos de normalidad por la prueba de Sapiro Wilk. Se emplearon pruebas paramétricas para los datos que mostraron distribución normal; se realizó un análisis de varianza para un factor (ANOVA de un factor) para las variables independientes, y las pruebas de comparaciones múltiples se realizaron empleando las pruebas HSD de Tukey y T de Dunnett. Se emplearon pruebas no paramétricas a los datos que no seguían una distribución normal; el análisis de varianza entre variables dependientes se realizó empleando la Prueba de Friedman. El análisis de varianza para dos variables no relacionadas se realizó empleando la prueba U de Mann Whitney y para varias muestras independientes la prueba de Kruskal Wallis. Los análisis de correlación entre variables se realizaron mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas para un valor de $p < 0.05$.

4. Resultados

4.1 Caracterización fitoquímica de los extractos

En todos los extractos de cítricos, se encontraron abundante presencia de quinonas y aminoácidos, taninos, fenoles, flavonoides y dihidroflavonoles, siendo los aminoácidos y aminos los de mayor presencia (Tabla II). Se encontró mayor presencia de fenoles y taninos en los extractos etanólicos que en los metanólicos, sin embargo los extractos metanólicos de naranjo agrio, naranjo dulce y lima persa fueron los que mostraron mayor presencia de flavonoides. Solamente la mandarina mostró presencia de esteroides y triterpenos tanto en el extracto etanólico como metanólico. Las coumarinas no se presentaron en ningún extracto de tipo etanólico y en los metanólicos se encontró en todos excepto en el de lima persa. De forma general en los extractos etanólicos se encontró mayor presencia relativa de los compuestos químicos que en los extractos metanólicos.

Tabla II. Análisis fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de hojas de cinco especies de cítricos: Naranjo agrio (NA); Naranjo dulce (ND); Limón criollo criollo (LMN); Mandarina (MAN); Lima persa (LMA).

Compuesto Químico	Etanol 70%					Metanol 70%				
	NA	ND	LMN	MAN	LMA	NA	ND	LMN	MAN	LMA
Saponinas	+++	+++	++	+++	+++	-	++	++	-	+++
Taninos y fenoles	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+
Aminoácidos y aminos	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Coumarinas volátiles	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Alcaloides	+++	-	+++	+++	+++	++	-	-	-	+++
Esteroides y triterpenos	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-
Quinonas	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
Flavonoides: Flavonas, flavonoles, flavanonas	+	+	+	+	+	+++	+++	+	+	+++
Dihidroflavonoles	+++	+++	-	+	++	+++	+++	-	+++	+++

Leyenda: (+, ++, +++) Presencia relativa del compuesto químico. (-) No presencia del compuesto químico.

Los extractos de naranjo agrio, lima persa, mandarina en etanol 70%, y la lima persa en metanol 70%; fueron los de mayor representación de compuestos químicos. Mientras que los de naranjo agrio, mandarina y el limón criollo en metanol 70%, fueron los de menor representación de especies químicas.

4.1.1 Cromatografía en placa delgada

En todos los extractos etanólicos se encontró presencia de flavonol 3-glicosilados, flavonas y flavonol 3,5-metoxilado; solamente se encontró presencia de flavonoides 3-hidroxilados en el extracto de limón criollo y solo en el de lima persa no se encontró la presencia de flavonoles 3,5-metoxilados (Tabla III).

En los extractos metanólicos no se encontró presencia de flavonoles 3-glicosilados ni flavonas; en el extracto de limón criollo sólo se encontró la presencia de flavonoides 3-hidroxilados y en el extracto de lima persa y mandarina solamente hubo presencia de flavonoles 3,5-metoxilados.

Los extractos de lima persa y mandarina en metanol 70%, fueron los que menos clases de flavonoides mostraron, mientras que el extracto de limón criollo en etanol 70% fue el que presentó la mayor variedad de clases de flavonoides.

El sistema de cromatografía que más clases de flavonoides mostró fue el BAA y el que menos mostró fue el MAA. En las corridas con EA y MAA, ninguno de los extractos ensayados mostró presencia de flavonoides 5-hidroxilados.

Tabla III. Clases de flavonoides identificadas en extractos de naranjo agrio en etanol 70% (NA-et); naranjo dulce en etanol 70% (ND-et); limón criollo en etanol 70% (LMN-et); lima persa en etanol 70% (LMA-et); mandarina en etanol 70% (MAN-et); naranjo agrio en metanol 70% (NA-met); naranjo dulce en metanol 70% (ND-met); limón criollo en metanol 70% (LMN-met); lima persa en metanol 70%

(LMA-met); mandarina en metanol 70% (MAN-met) mediante TLC (sílica gel 60 F254; etanol: agua (EA), metanol: ácido acético: agua (MAA) y n-butanol: ácido acético: agua (BAA)), evaluados a 365 nm.

Extractos	Sistemas de Fase Móvil		
	BAA	MAA	EA
NA-E	Flavonoles 3-glicosilados Flavonas Flavonoles 3,5-metoxilados Flavonoides 5-hidroxilado	Flavonoles 3-glicosilados Flavonas	Flavonoles 3-glicosilados Flavonas Flavonoles 3,5-metoxilados
ND-E	Flavonoles 3-glicosilados Flavonas Flavonoles 3,5-metoxilados Flavonoides 5-hidroxilados	Flavonoles 3,5-metoxilados	Flavonoles 3-glicosilados Flavonas Flavonoles 3,5-metoxilados
LMN-E	Flavonoides 3-hidroxilados Flavonoides 5-hidroxilados	Flavonoles 3-glicosilados Flavonas Flavonoles 3,5-metoxilados	Flavonoles 3-glicosilados Flavonas Flavonoles 3,5-metoxilados
LMA-E	Flavonoles 3-glicosilados Flavonas Flavonoides 5-hidroxilados	-----	Flavonoles 3-glicosilados, Flavonas
MAN-E	Flavonoles 3-glicosilados Flavonas Flavonoles 3,5-metoxilados Flavonoides 5-hidroxilados	Flavonoles 3,5-metoxilados	Flavonoles 3-glicosilados Flavonas Flavonoles 3,5-metoxilados
NA-M	Flavonoles 3,5-metoxilados Flavonoides 5-hidroxilados	-----	Flavonoles 3,5-metoxilados
ND-M	Flavonoles 3,5-metoxilados Flavonoides 5-hidroxilados	Flavonoles 3,5-metoxilados	Flavonoles 3,5-metoxilados
LMN-M	Flavonoides 3-hidroxilados	Flavonoides 3-hidroxilados	Flavonoides 3-hidroxilados
LMA-M	Flavonoles 3,5-metoxilados	----	----
MAN-M	Flavonoles 3,5-metoxilados	Flavonoles 3,5-metoxilados	Flavonoles 3,5-metoxilados

4.2 Compuestos fenólicos

En todos los extractos ensayados, se obtuvieron concentraciones superiores a los 25 mg/mL de fenoles totales en base a ácido gálico y a los 4 mg/mL de flavonoides totales en base a quercetina como se muestra en la tabla IV.

Tabla IV. Contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos hidroalcohólicos de hojas de cinco especies de cítricos. naranja agrio en etanol 70% (NA-et); naranja agrio en metanol 70% (NA-met); naranja dulce en etanol 70% (ND-et); naranja dulce en metanol 70% (ND-met); limón criollo en etanol 70% (LMN-et); limón criollo en metanol 70% (LMN-met); mandarina en etanol 70%

(MAN-et); mandarina en metanol 70% (MAN-met); lima persa en etanol 70% (LMA-et); lima persa en metanol 70% (LMA-met).

Extractos	Concentración de fenoles totales mg de ácido gálico/mL de extracto ($\bar{X} \pm SD$) *	Concentración de flavonoides totales mg de quercetina/mL de extracto ($\bar{X} \pm SD$) **
NA-et	31.82 \pm 2.81 ^{ab}	4.89 \pm 0.88 ^{bc}
ND-et	32.25 \pm 5.11 ^{ab}	5.62 \pm 1.21 ^{bc}
LMN-et	33.91 \pm 3.07 ^a	8.54 \pm 1.02 ^a
LMA-et	27.07 \pm 2.59 ^b	5.90 \pm 1.23 ^{bc}
MAN-et	35.33 \pm 2.93 ^{ab}	8.31 \pm 1.05 ^{ab}
NA-met	29.98 \pm 2.74 ^{ab}	4.29 \pm 0.21 ^{bc}
ND-met	26.31 \pm 3.24 ^b	4.38 \pm 1.18 ^{bc}
LMN-met	32.25 \pm 5.60 ^{ab}	4.74 \pm 0.67 ^{bc}
LMA-met	25.85 \pm 2.42 ^b	4.62 \pm 0.46 ^c
MAN-met	38.47 \pm 6.36 ^a	6.89 \pm 1.31 ^{ab}

* Datos analizados por las Pruebas Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney

** Datos analizados por ANOVA de un factor/ Prueba HSD de Tukey

Las medias con letras diferentes en una columna difieren estadísticamente para una $p < 0.05$

En cuanto a la concentración de fenoles totales solo se hallaron diferencias significativas entre valores extremos (38.47 mg/ mL (MAN-met) y 33.91 mg/ mL (LMN-et) frente a 27.07 mg/ mL (LMA-et) y 25.85 mg/ mL (LMA-met). No se encontraron diferencias significativas en la concentración de fenoles totales entre los diferentes solventes de extracción en ninguna de las plantas ensayadas.

En cuanto al contenido de flavonoides totales los extractos que mostraron mayor concentración fueron el limón criollo en etanol 70% (8.54 mg/ mL) y la mandarina en ambos solventes, etanol 70% (8.31 mg/ mL) y metanol 70% (6.89 mg/ mL), coincidiendo con los extractos de mayor concentración de fenoles totales. Solo se encontraron diferencias significativas en la concentración de flavonoides totales entre los diferentes solventes de extracción para el limón criollo.

4.3 Actividad antioxidante *in vitro* de los extractos vegetales

4.3.1 Capacidad de atrapar radicales libres

Como se muestra en la figura 3, todos los extractos mostraron capacidad de atrapar radicales libres. No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición de la absorbancia de los diferentes extractos de cítricos, sin embargo se encontró

que existen diferencias entre los porcentajes de inhibición de las diferentes plantas y los patrones de quercetina y ácido ascórbico, siendo estos últimos superiores.

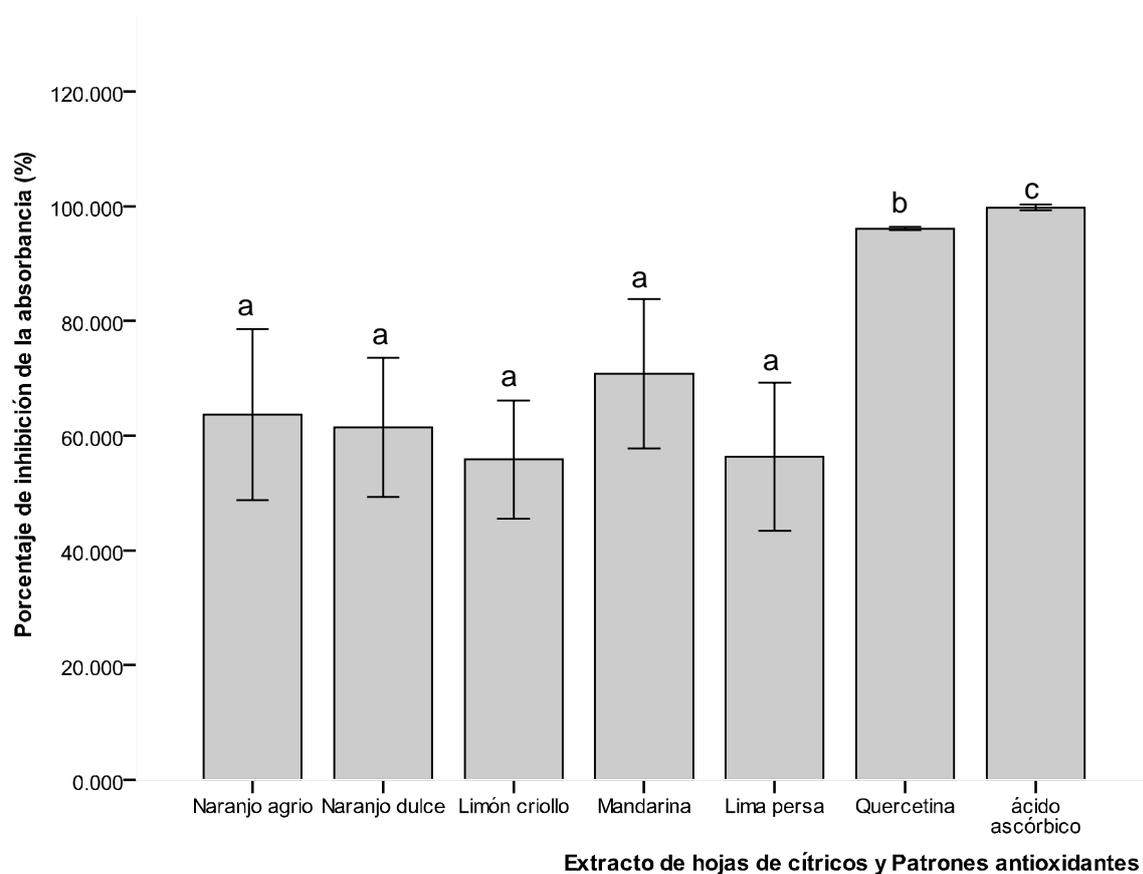


Figura 3. Capacidad de atrapar radicales libres expresados en porcentaje de inhibición de la absorbancia a 734 nm (%) de los extractos hidroalcohólicos de cinco especies de cítricos y de los patrones quercetina y ácido ascórbico. Los datos fueron analizados empleando las Pruebas no paramétricas Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney. Las barras con letras diferentes difieren estadísticamente para $p < 0.05$

En cuanto a los diferentes solventes empleados en la extracción, como se muestra en la figura 4, la naranja dulce fue la única especie de cítrico que mostró diferencia significativa en los valores de inhibición de la absorbancia cuando se empleó etanol 70% (44.23 %) y metanol 70% (78.56%) como solvente de extracción, siendo con el extracto metanólico donde se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición de la absorbancia, por consiguiente la mayor capacidad de atrapar radicales libres.

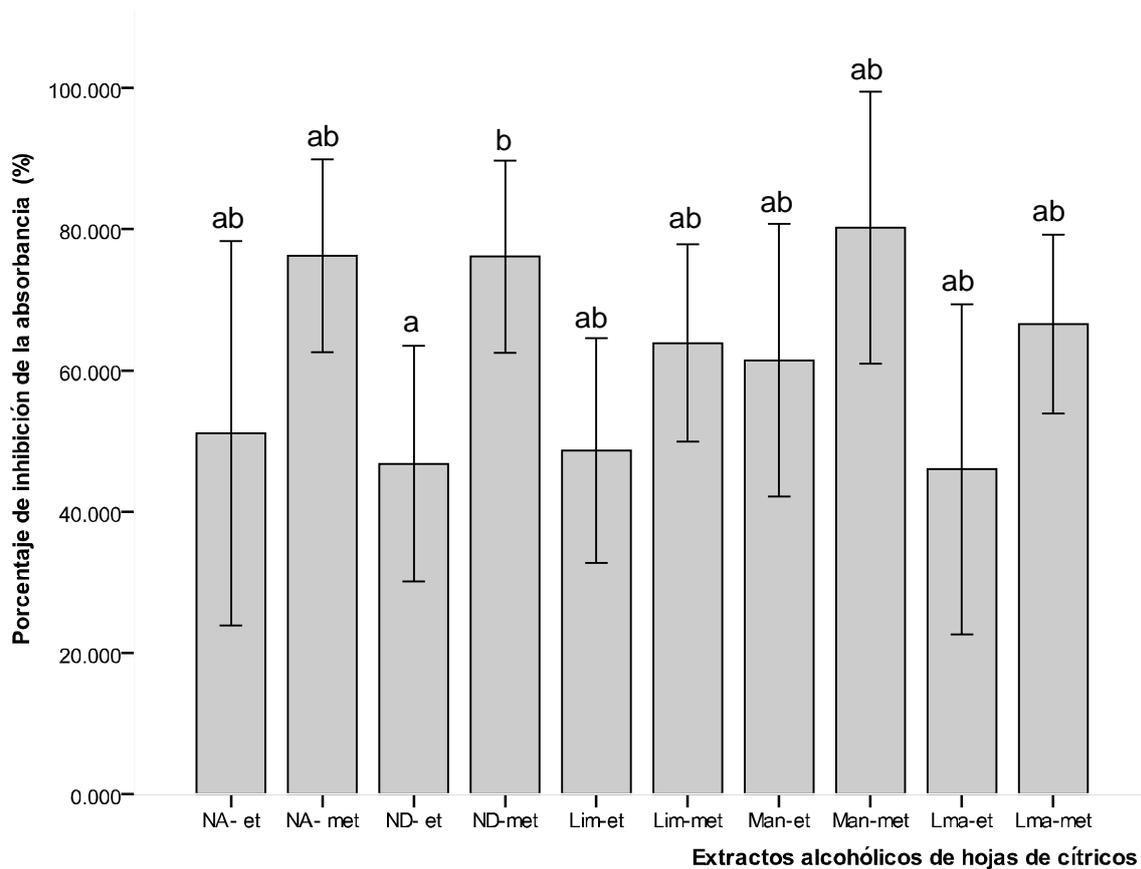


Figura 4. Capacidad de atrapar radicales libres expresados en porcentaje de inhibición de la absorbancia de las cinco especies de cítricos con los diferentes solventes de extracción, etanol y metanol al 70 % a 734 nm. Naranja agrio en etanol 70% (NA-et); naranja agrio en metanol 70% (NA-met); naranja dulce en etanol 70% (ND-et); naranja dulce en metanol 70% (ND-met); limón criollo en etanol 70% (LMN-et); limón criollo en metanol 70% (LMN-met); mandarina en etanol 70% (MAN-et); mandarina en metanol 70% (MAN-met); lima persa en etanol 70% (LMA-et); lima persa en metanol 70% (LMA-met). Los datos fueron analizados empleando las Pruebas no paramétricas Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney. Las barras con letras diferentes difieren estadísticamente para $p < 0.05$

La capacidad de atrapar radicales libres de los diferentes extractos de cítricos, a diferentes concentraciones de flavonoides totales se muestran en la figura 5.

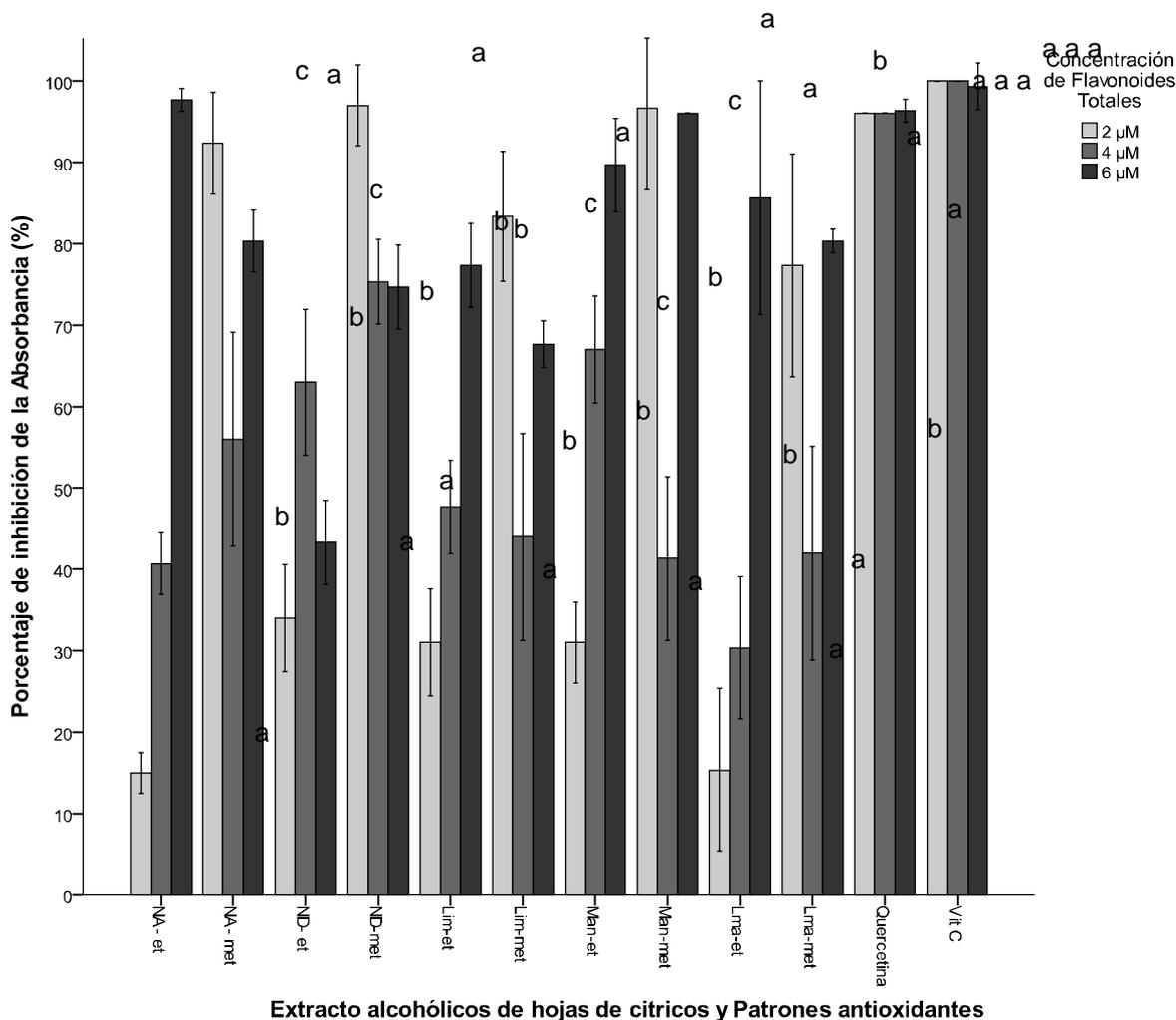


Figura 5. Porcentaje de inhibición de la absorbancia de los extractos hidroalcohólicos de naranjo agrio en etanol 70% (NA-et); naranjo agrio en metanol 70% (NA-met); naranjo dulce en etanol 70% (ND-et); naranjo dulce en metanol 70% (ND-met); limón criollo en etanol 70% (LMN-et); limón criollo en metanol 70% (LMN-met); mandarina en etanol 70% (MAN-et); mandarina en metanol 70% (MAN-met); lima persa en etanol 70% (LMA-et); lima persa en metanol 70% (LMA-met) a tres concentraciones de flavonoides totales diferentes. Los datos fueron analizados empleando las Pruebas no paramétricas Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney. Las barras con letras diferentes en el mismo extracto difieren estadísticamente para $p < 0.05$

Los extractos etanólicos, con excepción del de naranjo dulce, mostraron diferencias significativas entre los valores de absorbancia a las diferentes concentraciones de flavonoides totales, a mayor concentración de flavonoides totales mayor absorbancia por tanto, mayor capacidad de atrapar radicales libres, mostrando muy buena relación **lineal** entre ambos factores, con coeficientes de correlación superiores a 0.942.

En todos los extractos metanólicos, aunque existieron diferencias significativas en los valores de absorbancia según la concentración de flavonoides totales, no hubo relación lineal entre estas variables, obteniéndose los mayores valores de absorbancia a la 2 μM de flavonoides totales. En el caso de los patrones de quercetina y ácido ascórbico no hubo

diferencias significativas en la capacidad de atrapar radicales libres con respecto a las concentraciones empleadas.

4.4.2 Poder reductor de los extractos vegetales

Todos los extractos de cítricos ensayados mostraron poder reductor a diferentes concentraciones de flavonoides totales (figura 6).

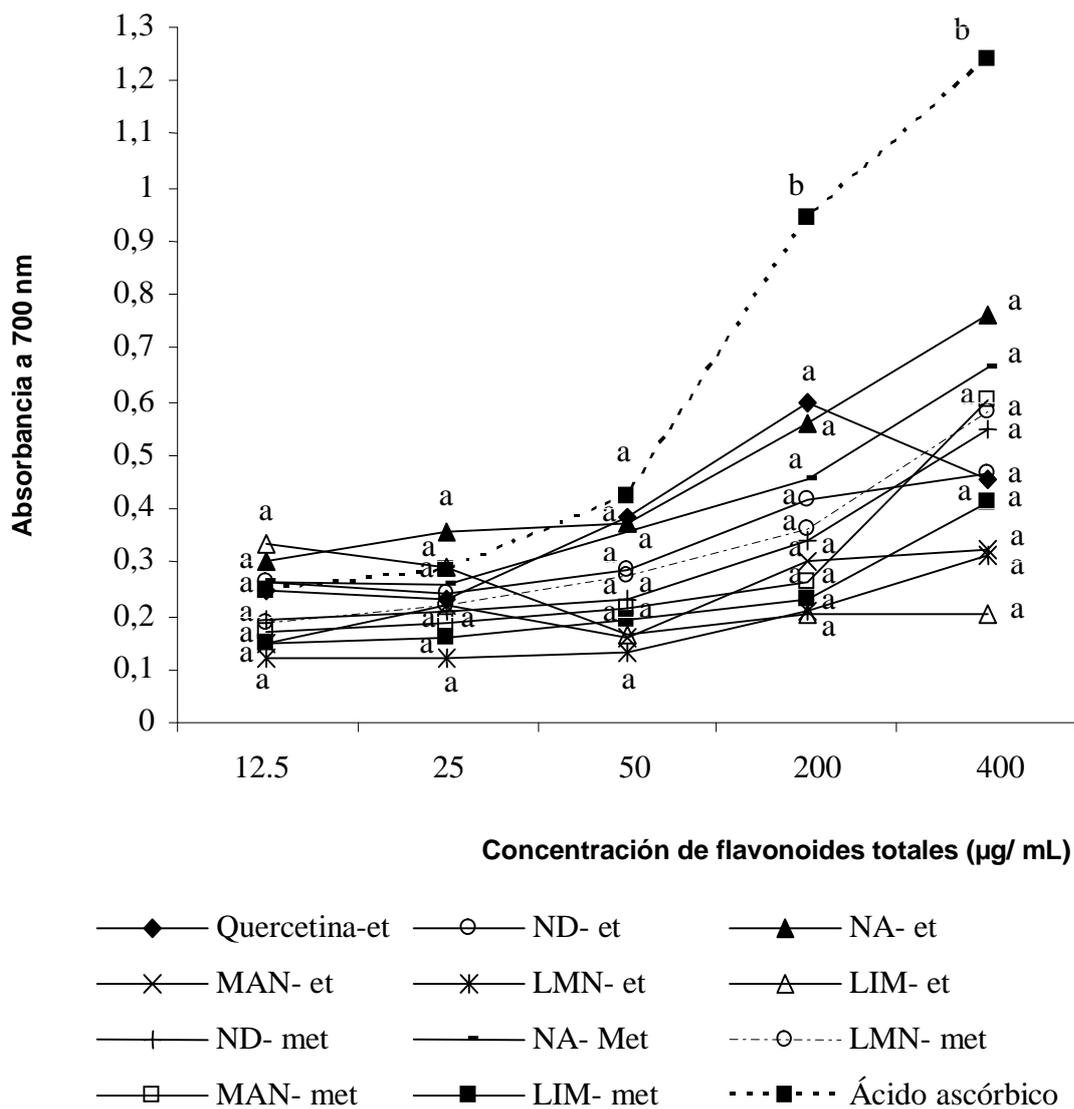


Figura 6. Poder reductor de los extractos hidroalcohólicos de cinco especies de cítricos y de los patrones de quercetina y ácido ascórbico; a cinco diferentes concentraciones de flavonoides totales. Naranja agrio en etanol 70% (NA-et); naranja agrio en metanol 70% (NA-met); naranja dulce en etanol 70% (ND-et); naranja dulce en metanol 70% (ND-met); limón criollo en etanol 70% (LMN-et); limón criollo en metanol 70% (LMN-met); mandarina en etanol 70% (MAN-et); mandarina en metanol 70% (MAN-met); lima persa en etanol 70% (LMA-et); lima persa en metanol 70% (LMA-met). Los datos fueron analizados empleando las Pruebas no paramétricas Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney. Las medias con letras diferentes a una misma concentración difieren estadísticamente para una $p < 0.05$

A las concentraciones inferiores a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (12.5, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no se encontraron diferencias significativas en cuanto al poder reductor de ninguno de los extractos ensayados, ni entre ellos ni con los patrones quercetina y ácido ascórbico. Las diferencias significativas en el poder reductor se encontraron a concentraciones de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y solamente con respecto al ácido ascórbico.

Los extractos naranjo agrio, tanto en etanol 70% como en metanol 70%, naranjo dulce en metanol 70%, lima persa en etanol 70%, mostraron diferencias significativas entre los valores de absorbancia a las diferentes concentraciones de flavonoides totales, a mayor concentración de flavonoides totales mayor poder reductor, mostrando buena relación lineal entre ambos factores, con coeficientes de correlación superiores a 0.851, no así en el resto de los extractos para los cuales no hubo diferencias significativas entre los valores de absorbancia a diferentes concentraciones de flavonoides totales.

4.3.3 Actividad antioxidante total

La capacidad antioxidante total de los cinco extractos de cítricos analizados se muestran en la figura 7.

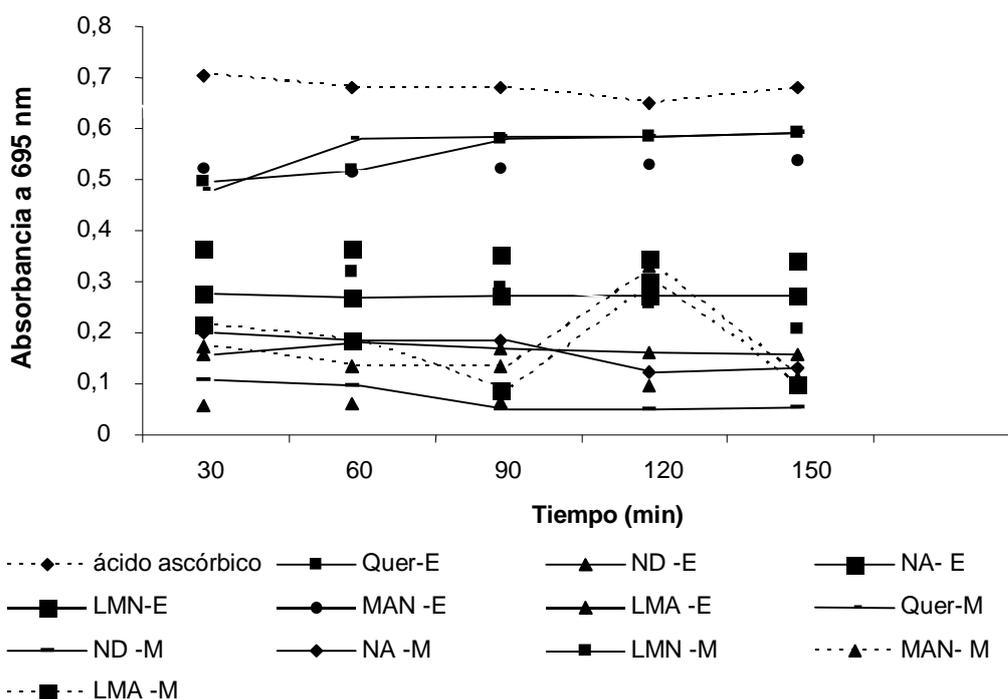


Figura 7. Capacidad antioxidante total de extractos de cinco especies de cítricos. Naranja agrio en etanol 70%(NA-et); naranja agrio en metanol 70% (NA-met); naranja dulce en etanol 70% (ND-et); naranja dulce en metanol 70% (ND-met); limón criollo en etanol 70% (LMN-et); limón criollo en metanol 70% (LMN-met); mandarina en etanol 70% (MAN-et); mandarina en metanol 70% (MAN-met); lima persa en etanol 70% (LMA-et); lima persa en metanol 70% (LMA-met). Los datos fueron analizados empleando las Pruebas no paramétricas Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney. Las medias con letras diferentes a un mismo tiempo difieren estadísticamente para una $p < 0.05$

No se encontraron diferencias significativas en los valores de absorbancia entre los cinco tiempos diferentes de ninguno de los extractos hidroalcohólicos de cítricos, ni en la actividad antioxidante total entre ninguno de los extractos ni los patrones ensayados.

4.4 Toxicidad de los extractos vegetales

La toxicidad de los extractos hidroalcohólicos de hojas de las cinco especies de cítricos estudiadas frente a *A. salina* fue dependiente de la dosis, mostrando el máximo de letalidad a concentraciones de 1 000 µg/ mL y el menor a concentraciones menores de 10 µg/ mL .

En la Tabla V se muestra la CL₅₀ para todos los extractos hidroalcohólicos ensayados.

Tabla V. Concentración letal para el 50 % de la población de nauplios de *A. salina* expuesta (DL₅₀) a extractos hidroalcohólicos de cinco especies de cítricos (naranja agrio en etanol al 70 % (NA-et); naranja agrio en metanol al 70 % (NA-met); naranja dulce en etanol al 70 % (ND-et); naranja dulce en metanol al 70 % (ND-met); limón criollo en etanol al 70 % (LMN-et); limón criollo en metanol al 70 % (LMN-met); mandarina en etanol al 70 % (MAN-et); mandarina en metanol al 70 % (MAN-met); lima persa en etanol al 70 % (LMA-et); lima persa en etanol al 70 % (LMA-met).

Extractos	CL₅₀ (µg/ mL)
NA-et	408.32
ND-et	449.48
LMN-et	170.53
LMA-et	379.72
MAN-et	261.09
NA-met	100.23
ND-met	421.21
LMN-met	74.78
LMA-met	464.24
MAN-met	190.94

El extracto de lima persa en metanol 70% mostró en mayor valor de LC₅₀ (464.24 µg/ mL) resultando, por tanto, ser el extracto de menor toxicidad, mientras que el extracto de limón criollo en metanol al 70% mostró menor valor de CL₅₀ (74.78 µg/ mL) resultando, por tanto, ser el extracto de mayor toxicidad.

5. Discusión de Resultados.

5.1 Caracterización de los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus ssp.*

El género cítrico abarca varios tipos: naranjas (agrias y dulces), mandarinas, toronjas, limones y limas, y cada especie o cruzamiento híbrido tiene una o más variedades (Peterson *et al.*, 2006a). En la última década ha existido un marcado interés biomédico sobre las frutas de este género, por estar asociadas a disminuir el riesgo de enfermedades colorrectales (Levi *et al.*, 1999), del esófago (Levi *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002), cánceres gástricos (Palli *et al.*, 2001), y del estómago (McCullough *et al.*, 2001), entre otros. Los componentes responsables de estos efectos beneficiosos son desconocidos, pero los flavonoides, que son los metabolitos secundarios más activos en estas plantas (Djoukeng *et al.*, 2008), pudieran estar implicados (Peterson *et al.*, 2006a).

Existe muy poca información sobre estudios fitoquímicos de extractos crudos de *Citrus ssp.* Iqbal y Beg. (2001) realizaron un estudio fitoquímico de extractos alcohólicos al 70% de corteza del fruto de *C. sinensis* donde solamente reportaron la presencia de fenoles y taninos. En este estudio para ambos extractos hidroalcohólicos de hojas de esta especie de planta se encontraron la presencia de otros compuestos químicos como saponinas, aminoácidos y aminos, quinonas y diferentes clases de flavonoides.

Numerosos estudios del contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en diferentes especies de cítricos han sido publicados (e.g. Yu, 2004; Ghafar *et al.*, 2010, Guimarães *et al.*, 2010) La mayoría de estos se han realizado en el jugo, la corteza y aceites esenciales aislados del fruto (e.g. Anagnostopoulou *et al.*, 2006; Gattuso *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2010), pero existe muy poca la información disponible sobre el contenidos de compuestos fenólicos y flavonoides en hojas de estas plantas (Djoukeng *et al.*, 2008).

Peterson *et al.* (2006a y 2006b), realizaron una compilación y revisión analítica de toda la literatura publicada hasta ese momento sobre compuestos fenólicos en frutos de cítricos. Sobre naranjas, tanto agria como dulce, mandarina y toronja, encontraron 125 publicaciones, de ellas muy pocas citaciones para clases de flavonoides y otros compuestos con excepción de flavanonas, algunos datos sobre flavonoles en naranjas dulces, flavonas (hidroxiflavonas y metoxiflavonas) y las antocianinas (Rapisarda *et al.*, 1994) y ninguno para flavonoles o isoflavonoides. De acuerdo con este estudio las flavanonas son la clase principal de flavonoides presentes en frutos de cítricos. En estudios más recientes Gattuso *et al.* (2007) encontraron flavanonas-O-glicosiladas como naringina, hesperidina, narirutina; flavonas como diosmina; polimetoxiflavonas

como tangeretina y agliconas como taxifolin y kaemferol en jugo de naranja dulce y naranja agria respectivamente. Ghafar *et al.*, (2010) y Khan *et al.* (2010), mencionaron a la cáscara de naranja dulce como rica en flavononas. También Ghafar *et al.* (2010) encontró en extractos de cáscara de mandarina abundante presencia de flavononas y flavonas, y en el jugo, de flavononas y polimethoxy flavonas.

Peterson *et al.*, (2006b), solamente encontraron cinco artículos científicos sobre limón y cuatro sobre lima. En el limón, cuatro de estas publicaciones reportaron la presencia de flavonoles y dos la presencia de hidroxiflavonas (Peterson *et al.*, 2006b). En el caso de la lima, se encontraron las mismas clases de flavonoides que para el limón. Sin embargo, estudios más recientes muestran que el fruto del limón (Yu, 2004; Gattuso *et al.*, 2007) y la lima (Ghafar *et al.*, 2010) presentan abundantes flavanonas como la hesperidina y flavonas.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo coinciden con todos estos estudios, los extractos etanólicos de hojas de naranjo agrio y naranjo dulce mostraron abundante presencia de flavonas, flavonoles, flavanonas, y dihidroflavonoles; así como en el extracto metanólico de hojas de mandarina, se encontró dihidroflavonoles y flavonoles metilados, además, en todos los extractos de hojas de limón criollo y lima persa, encontramos la presencia de flavonoles, flavonas y flavanonas. Del mismo modo, Djoukeng *et al.* (2008), realizaron un perfil de flavonoides en hojas de *Citrus paradisi* L. Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf. y *Citrus sinensis* L. Osb. x *Poncirus. trifoliata* L. Raf. donde encontraron un total de 47 compuestos fenólicos y entre los flavonoides se identificaron: apigenina (flavona), eriodictiol, naringenina (flavanona), kaemferol y quercetina (flavonoles). También, Shalaby *et al.* (2011) encontraron kaemferol, quercetina, rutina y hesperidina, entre otros flavonoides, en hojas de *C. aurantifolia* y *C. sinensis*.

El hecho de que la composición de flavonoides sea similar en hojas que en frutos de estas especies de cítricos, puede deberse a las funciones fisiológicas de estos metabolitos secundarios, por ejemplo la capacidad de absorber ciertas radiaciones ultravioleta, los convierte en filtros solares para proteger los tejidos vegetales de radiaciones dañinas, y además se ha sugerido que participan en el proceso de la fotosíntesis (Moriguchi *et al.*, 2003). Las diferentes actividades biológicas halladas para algunos de los flavonoides y las evidencias experimentales de que algunos aumentan la resistencia de ciertas plantas contra diferentes enfermedades, es decir, que actúan como fitoalexinas (Echeverri, 1987), sugieren que estas sustancias también pudieran formar parte de un mecanismo químico de defensa vegetal. La capacidad inhibidora de ciertas hormonas vegetales presentada por algunos

flavonoides sugiere que actúan como reguladores del crecimiento vegetal (Arbona y Gómez-Cárdenas, 2008).

5.2 Contenido de compuestos fenólicos en los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus spp.*

Los resultados obtenidos en la cuantificación de los compuestos fenólicos difieren de los obtenidos en los análisis cualitativos, lo cual puede deberse a la presencia de algunas clases de estos metabolitos que no pueden detectarse por estas técnicas cualitativas, lo que hace que extractos con escasa positividad de presencia relativa para un compuesto químico en cuestión, tengan concentraciones totales superiores.

En general, todos los extractos de hojas de cítricos presentaron valores de fenoles totales (Anagnostopoulou *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2010) y flavonoides totales (Peterson *et al.*, 2006a y b; Ghafar *et al.*, 2010) superiores a los reportados para frutos y jugos de estas especies de cítricos. Solamente, Guimarães *et al.* (2010), en las fracciones volátiles de aceites esenciales de frutos de limón y lima reportan valores de fenoles y flavonoides totales superiores a los obtenidos en este estudio.

Estas diferencias pueden deberse a los órganos de la planta analizados, y además estar condicionadas por los diversos métodos de extracción, solventes y condiciones ambientales en los cuales se obtuvieron los extractos. En consecuencia, Anagnostopoulou *et al.* (2006) obtuvieron al emplear diferentes solventes de extracción, las mayores concentraciones de compuestos fenólicos en fracciones metanólicas de extractos de cáscaras de frutos de *C. sinensis*, en concordancia con lo encontrado por Chung *et al.* (1999) y Parejo *et al.* (2002) para esta misma especie.

5.3 Actividad antioxidante *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus spp.*

Numerosas son las pruebas que se han desarrollado para medir la capacidad antioxidante tanto de alimentos como de muestras biológicas. Sin embargo, no existe un método universal que pueda determinar la capacidad antioxidante de todas las muestras cuantitativamente (Guimarães *et al.*, 2010). Por supuesto, la fuente de radicales libres, las características del sistema y los mecanismos de la reacción antioxidante, son críticos en la selección de los métodos apropiados teniendo en consideración la finalidad del uso de los resultados. Por tales motivos, es recomendable realizar la evaluación de la actividad antioxidante por varios métodos (Khan *et al.*, 2010). En este trabajo se emplearon tres métodos para la determinación

in vitro de la actividad antioxidante de los diferentes extractos hidroalcohólicos de hojas de especies de cítricos.

Para expresar la capacidad de atrapar radicales libres de los extractos de plantas, se emplean de modo general dos especies de radicales estables, ABTS•⁻ y DPPH• (Almeida *et al.*, 2009). El radical ABTS •⁺ es el más indicado para las determinaciones en compuestos coloreados, como es el caso de los extractos de hojas de cítricos, debido a que este radical presenta un máximo de absorción cerca de la región infrarroja (734 nm) que reduce las posibilidades de interferencias por compuestos coloreados que absorban en la región visible del espectro o de los compuestos resultantes de una reacción secundaria (Re *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2009). El análisis mediante ABTS se puede utilizar en sistemas de solventes orgánicos y acuosos, además, requiere un tiempo de reacción corto, por lo que hace a éste un método más deseable que el análisis mediante el radical DPPH (Dae-Ok *et al.*, 2002). Se emplearon como patrones el ácido ascórbico y la quercetina por ser compuestos con probada capacidad de atrapar radicales libres (Fernández-López *et al.*, 2005; Dae-Ok *et al.*, 2002), poder reductor (Kim *et al.*, 2010) y además ser compuestos abundantes en estas plantas (Moriguchi *et al.*, 2003; Fernández-López *et al.*, 2005; Djoukeng *et al.*, 2008)

Son numerosos los estudios donde se ha demostrado la capacidad de atrapar radicales libres de extractos obtenidos a partir de frutos de diferentes especies de cítricos (e.g. Anagnostopoulou *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2010). Las actividades antioxidantes de las especies del fruto de los cítricos están de acuerdo con su cantidad de compuestos fenólicos (Ghafar *et al.*, 2010). Varios informes han demostrado una relación estrecha entre el contenido de fenoles totales y la alta actividad antioxidante (Prasad *et al.*, 2005; Amin *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009), coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo para extractos hidroalcohólicos de hojas de las especies de cítricos estudiadas, donde en los extractos etanólicos con excepción de la naranja dulce la capacidad de atrapar radicales libres mostró una correlación lineal positiva con respecto a la concentración de flavonoides totales.

Anagnostopoulou *et al.* (2006) analizaron la correlación entre la capacidad de atrapar radicales libres y el contenido de compuestos fenólicos de diferentes fracciones de extractos de cáscaras y de frutos de *C. sinensis*, y a pesar de que obtuvieron en las fracciones metanólicas una significativa capacidad de atrapar radicales libres y un alto contenido de compuestos fenólicos, no obtuvieron buenos índices de correlación, resultados que coinciden con los obtenidos en este estudio para todos los extractos metanólicos de hojas de cítricos ensayados. Ghafar *et al.* (2010) encontraron

correlaciones negativas entre la capacidad de atrapar radicales libres y el contenido de fenoles totales, lo que probablemente se deba a la presencia de otras resinas fenólicas en las muestras de los extractos que pudieron haber contribuido a la actividad antioxidante. Esto también puede explicarse por el establecimiento de relaciones antagónicas entre las diferentes clases de flavonoides y otros compuestos (Montserrat, 2003; Escamilla *et al.*, 2009)

El poder reductor de un compuesto sirve como indicador significativo de su actividad antioxidante. El método de determinación del poder reductor se basa fundamentalmente en la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} en presencia de una muestra, en este caso un extracto vegetal, donde un incremento en los valores de la absorbancia a 700 nm indican un significativo poder reductor (Hazra *et al.*, 2008). La existencia de reductonas es la clave de la energía de reducción, que exhiben sus actividades antioxidantes con la acción de romper la cadena radical libre donando un átomo de hidrógeno (Pan *et al.*, 2008)

Todos los extractos de cítricos ensayados mostraron poder reductor a diferentes concentraciones de flavonoides totales lo cual se puede explicar debido al alto contenido de fenoles y flavonoides presentes en los mismos que le confiere considerables propiedades antioxidantes. Guimarães *et al.* 2010, obtuvieron resultados similares en diferentes fracciones de extractos de corteza de limón, naranja y lima.

Empleando este método también se ha encontrado correlación entre la concentración de compuestos fenólicos en los extractos vegetales y el incremento en la absorbancia y por consiguiente el incremento del poder reductor (Chang *et al.*, 2007; Hazra *et al.*, 2008) resultado que coincide con los obtenidos en este trabajo donde los extractos naranjo agrio, tanto en etanol 70% como en metanol 70%, naranjo dulce en metanol 70%, lima persa en etanol 70% mostraron buena relación lineal entre ambos factores, con coeficientes de correlación superiores a 0.851.

El ensayo para determinar la actividad antioxidante total se basó fundamentalmente en la reducción de Mo (VI) a Mo (V) inducida por los extractos y en la consiguiente formación de un complejo fosfato/ Mo (V), de color verde y pH ácido. El incremento de los valores de la absorbancia indica que el extracto posee significativa actividad antioxidante total. Todos los extractos probados mostraron capacidad antioxidante total sin diferencias significativas a tiempos diferentes, coincidiendo con Prieto *et al.*, (1999) los cuales reportaron que la actividad antioxidante total no variaba en el tiempo; no así en los resultados de Pan *et al.*, (2008) que obtuvo que la actividad antioxidante total se incrementa a medida que aumenta la concentración y el tiempo de reacción, en extractos de *Dimocarpus longan* Lour (logan). Teniendo en cuenta que Prieto *et al.*, (1999) estandarizaron esta técnica empleando ácido ascórbico y glutatión como

compuestos patrones, y que los cítricos son plantas ricas en estos compuestos, la estabilidad en el tiempo podría deberse a la presencia de este compuesto, y no al extracto vegetal propiamente.

Los flavonoides secuestran oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos, bloqueando la acción deletérea de estas sustancias sobre las células (Pérez, 2003; Romero *et al.*, 2003). Además los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Rice-Evans y Bourdon, 1993; Martínez-Flóres *et al.*, 2002). Entre las características estructurales que le confieren la capacidad antioxidante a los flavonoides, se encuentran la presencia de grupos 3' y 5' OH en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante (Pérez, 2003). Las flavonas y flavonoles, cuentan con estos grupos en su estructura, y fueron clases de flavonoides encontrados en los extractos de hojas de cítricos obtenidos en nuestro trabajo, por lo que puede deberse a este tipo de compuesto la actividad antioxidante de los mismos.

5.4 Toxicidad frente a *A. salina* de los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus spp.*

La evaluación de la toxicidad de extractos vegetales es indispensable con el objetivo de considerar un tratamiento seguro, permite la definición de la toxicidad intrínseca de la planta y los efectos de una sobredosis aguda.

El método para la evaluación de la toxicidad frente a *A. salina* es considerado un instrumento útil para la evaluación preliminar de toxicidad, por la simplicidad del procedimiento, que requiere pequeñas cantidades de muestras y permite la evaluación rápida en extractos de plantas (Krishnaraju *et al.*, 2006).

En este trabajo los extractos de hojas de cítricos resultaron ser de baja toxicidad, aunque son necesarios experimentos de citotoxicidad para comprobar este efecto.

En la literatura consultada solamente encontramos un reporte de este tipo de estudio en especies de cítrico, específicamente en extractos de corteza del fruto de *Citrus aurantium* L. (Lagarto *et al.*, 2001), donde se obtuvieron similares resultados que los nuestros, y se compararon con estudios de toxicidad realizados en ratones, mostrando una buena correlación entre los resultados.

De forma general, los resultados obtenidos demuestran el potencial de los extractos hidroalcohólicos de hojas de cítricos para su empleo como potentes antioxidantes, aunque sería necesario realizar otros estudios, de estabilidad y formulación química,

así como la evaluación de la toxicidad del extracto en animales experimentales y establecer su seguridad para proponer su uso como producto farmacológico.

Conclusiones

- Se caracterizaron fitoquímicamente los extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de hojas de naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), naranja agria (*Citrus x aurantium* L.), limón criollo (*Citrus x limon* L. Burms.f), lima persa (*Citrus latifolia* Tan.) y mandarina (*Citrus tangerina* Hort. Ex Tan), encontrándose la mayor representación de especies químicas en los extractos de naranja agria, lima, mandarina en etanol 70%, y lima en metanol 70%.
- Los extractos con mayor concentración de fenoles totales fueron mandarina en metanol 70 % (38.47 mg de ácido gálico/ mL de extracto) y limón en etanol (33.91 mg de ácido gálico/ mL de extracto).
- Los extractos con mayor concentración de flavonoides totales fueron el limón en etanol 70 % (8.54 mg de quercetina/ mL de extracto) y la mandarina en ambos solventes, etanol 70% (8.31 mg de quercetina/ mL de extracto) y metanol 70% (6.89 mg de quercetina/ mL de extracto).
- Todos los extractos mostraron capacidad de atrapar radicales libres, alto poder reductor y elevada la capacidad antioxidante tota.
- Los extractos presentaron toxicidad moderada hacia *A. salina*, siendo en el extracto de lima en metanol 70% el que mostró menor toxicidad ($LC_{50} = 464.24 \mu\text{g/ mL}$).

Recomendaciones

- Realizar caracterizaciones químicas de los extractos con técnicas de mayor resolución como son la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y la Espectrofotometría de Masa.
- Realizar estudios farmacológicos y de estabilidad del producto.
- Evaluar la toxicidad del extracto en animales experimentales y establecer su seguridad para proponer su uso como producto farmacológico.

Referencias bibliográficas

Akoh, C. C. y D. B. Min (2002): **Food lipids, chemistry, nutrition and biotechnology**. 2ª Ed, New York. Marcel Dekker.

Almeida, I. F., E. Fernández, J. L. Lima, P. Valentão, P. B. Andrade, R. M. Seabra, P. C. Costa y M. F. Bahia. (2009): Oxygen and nitrogen reactive species are effectively scavenged by eucalyptus globulus leaf water extract. **J med food**. 12(1): 175-183.

Amin, I., Y. Norazaidah y K. Hainida. (2006): Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched amaranthus species. **Food chem**. 94: 47-52.

Anagnostopoulou, M. A., P. Kefalas, V. P. Apageorgiou, A. N. Assimopoulou y D. Boskou. (2006): Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chem**. 94: 19–25.

Arbona, V. y A. Gómez-Cadenas (2008): Hormonal modulation of citrus responses to flooding. **J. Plant growth regul**. 27: 241–250.

Beurton, C. (2008): Rutaceae. En: Greuter, W. & Rankin, R. (ed.). **Flora de la República de Cuba. Fascículo**. 14(3). A.R. Gantner Verlag KG. Liechtenstein. Berlín.

Blanco, N., A. Ramos y Á. Vizoso. (2006): Evaluación tóxica y genotóxica del extracto fluido de *Ocimum gratissimum* L. **Rev cubana plant med**. 11(1).

Borroto, J., R. Trujillo, Y. C. de la Torre, N. Waksman, M. Hernández y R. Salazar. (2010): Antimicrobial Activity of the dichloromethane extract from *in vitro* Cultured Roots of *Morinda royoc* L. and Its Main Constituents. 0 (0): 1 – 4.

Carballo, J. L., Z. L. Hernández-Inda, P. Pérez y M. D. García- Grávalos (2002): A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**. 2:17.

Chang, H.Y., Y. L. Ho, M. J. Sheu, Y. H. Lin, M. C. Tseng, S. H. Wu, G. J. Huang y Y. S. Chang (2007): Antioxidant and free radical scavenging activities of *Phellinus merrillii* extracts. **Botanical Studies**.48:407-417.

Chen, H., M. Ward, B. Graubard, E. Heineman, R. Markin, N. Potischman, R. Russell, D. Weisenburger y L. Tucker (2002): Dietary patterns and adenocarcinoma of the esophagus and distal stomach. **Am. J. Clin. Nutr.** 75: 137–144.

Chung, H. S., L. C. Chang, S. K. Lee, L. A. Shamon, R. B. Van Breemen y R. G. Mehtal. (1999): Flavonoid constituents of *chorizanthe diffusa* with potential cancer chemopreventive activity. **J. Agric. food chem.** 47: 36–41.

Dae-Ok, K., I. K. won, J. L. Hyong y Y. I. Chang. (2002): Vitamin C equivalent antioxidant capacity (vceac) of phenolic phytochemicals. **J. Agric. Food chem.** 50 (13): 3713–3717.

Da Silva, J., S. M. Herrmann, W. Peres, N. P. Marroni, J. Gonzalez y B. Erdtmann (2002): Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food Chem Toxicol.** 40: 941-947.

Del Río, J. A., M. D. Fuster, P. Gómez, I. Porras, A. García-Lidón y A. Ortuño (2004): Citrus limon: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. **Food Chem.** 84: 457–461.

Droge, W. (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev.** 82: 47-95.

Djoukeng, J. D., V. Arbona, R. Argamasilla y A. Gómez-cadenas. (2008): Flavonoid profiling in leaves of citrus genotypes under different environmental situations. **J. Agric. Food chem.** 56(23).

Echeverri, L. F. (1987): Productos naturales biológicamente activos, departamento de química, Universidad de Antioquia, Medellín.

Escamilla, C., E. Cuevas y J. Guevara (2009): Flavonoides y sus acciones antioxidante. **Rev Facultad de Medicina UNAM.** 52 (2) Marzo-abril.

Fernández- López, J., N. Zhi, I. Aleson, J. A. Pérez y V. Kuri. (2005): Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. **Meat science.** 69: 371–380.

Finney, D. J. (1985): The Median Lethal Dose and Its Estimation. **Archives of Toxicology**. 56:215- 218.

Fortes, C., F. Forastiere, S. Farchi, E. Rapiti, G. Pastori y C. Perucci (2000): Diet and overall survival in a cohort of very elderly people. **Epidemiology**. 11: 440–445.

García, J. D, T. E. García, R. Menéndez y M. T. Buznego. (1996): Efecto antioxidante de los extractos fluido y de flavonoides de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (Orégano francés). **Rev cubana plan med**. 1(2): 27-30.

García, M. (2008): Cuantificación de fenoles y de flavonoles totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.

García, R., R. Pérez, C. Rodríguez y M. Soto (2004): Toxicidad de alcaloides de *Erythrina americana* en larvas de *Culex quinquefasciatus*. **Rev fitotecnia mexicana**. (27): 297-303.

Gattuso, G., D. Barreca, C. Gargiulli, U. Leuzzi y C. Caristi. (2007): flavonoid composition of citrus juices. **Molecules**. 12: 1641-1673 .

Geleijnse, J. M., L. J. Launer, D. A. Van der Kuip, A. Hofman y J. C. Witteman (2002): Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study. **Am J Clin Nutr**. 75: 880-886.

Ghafar, M. F. abd, K. N. Prasad, K. K. weng y A. ismail. (2010): Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from citrus species. **African journal of biotechnology**.9(3):326-330.

González-Molina, E., R. Domínguez, D.A. Moreno y C. García (2010): Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 51: 327–345.

Gülçin, I. (2006): Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. **Life Sciences**.78: 803–811.

Gutteridge, J. M. (1995): Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin Chem**. 41: 1819-1828.

Guimarães, R., L. Barros, J. C. M. Barreira, M. A. J. Sousa, A. M. Carvalho y I. C. Ferreira. (2010): Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. **Food chem toxicol.** 48: 99–106.

Harborne, J. B. (1994): **The flavonoids, advances in research since.** (1986): 2a. Ed. Great Britain: Capman y Hall.

Hazra, B., S. Biswas y N. Mandal. (2008): Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine.**8:63.

Hegele, R. A. (1999): Paraxonase genes and disease. **Ann Med.** 31:217- 224.

Herderson, M. C., C. L. Miranda, J. F. Stevens, M. L. Deinzer y D. R. Buhler. (2000): In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenilated flavonoids from hops. **Humulus lupuls. Xenobiotica.** 30: 235-251.

Hirano, R., W. Sasamoto, A. Matsumoto, H. Itakura, O. Igarashi y K. Kondo (2001): Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. Internal Medicine , National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan. **J Nutr Sci Vitaminol.** 47: 357-362.

Hollman, P. C. H. y M. B. Katan. (1998): Absorption, Metabolism and Bioavailability of Flavonoids. En: Flavonoids in Health and Disease. Ed. Marcel Dekker, INC. New York. 22:483-522.

Huk, I., V. Brovkovich, V. Nanobash, G. Weigel, C. Neumayer y L. Partyka. (1998): Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemiareperfusion injury: an experimental study. **British Journal of Surgery.** 85: 1080-1085.

Iqbal, A. y A. Z. Beg. (2001): Antimicrobial and phytochemical studies on 45 indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of ethnopharmacology.** 74:113–123. 137.1

Kawada, N., S. Seki, M. Inoue y T. Kuroki. (1998): Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and Nacetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. **Hepatology**. 27: 1265-1274.

Kesavulu, M. M., B. K. Rao, R. Giri, J. Vijaya, G. Subramanyam y C. Apparao. (2001): Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetics with coronary Herat diseases. **Diabetes Res Clin Pract**. 53: 33-39.

Khan, M. K., M. Abert-Vian, A-S. Fabiano-Tixier, O. Dangles y F. Chemat. (2010): Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (citrus sinensis L.) Peel. **Food chem**. 119: 851–858

Khairunnuur, F. A. , A. Zulkairi, A. Azrina, M. A. M. Moklas, S. Khairullizam, M. S. Zamree y m. A. Shahidan. (2009): Nutricional Composition, *in vitro* Antioxidant Activity and *Artemia Salina* L. Lethality of Pulp and Seed of Tamarindus indica L. Extracts. **Mal J Nutr**. 15(1): 65-75.

Kim, N. Y., M K. Jang, D. G. Lee, K. H. Yu, H. Jang y M. Kim. (2010): Comparison of methods for proanthocyanidin extraction from pine (*Pinus densiflora*) needles and biological activities of the extracts Nutrition Research and Practice. **Nutr Res Pract**. 4(1): 16-22.

Krishnaraju, A. V., T. V. N. Rao, D. Sundararaju, M. Vanisree, H. S. Tsay y G. V. Subbaraju. (2006): Biological screening of medicinal plants collected from eastern ghats of india using *Artemia salina* (brine shrimp test). **International journal of applied science and engineering**.. 4 (2): 115-125.

Kurowska, E., J. Spence, J. Jordan, S. Wetmore, D. Freeman, L. Piche y P. Erratore (2000): HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. **Am. J. Clin. Nutr**. 72:1095–1100.

Lagarto, A., R. Silva, L. Guerra, L. Iglesias (2001): Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**. 8(5): 395–400.

Landmesser, U., R. Merten, S. Spiekermann, K. Buttner, H. Drexler y B. Horing. (2000): Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary

artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. **Circulation**.101: 2264-2270.

Levi, F., C. Pasche, C. La Vecchia, F. Lucchini y S. Franceschi (1999): Food groups and colorectal cancer risk. **Br. J. Cancer**. 79: 1283–1287.

Levi, F., C. Pasche, F. Lucchini, C. Bosetti, S. Franceschi, P. Monnier y C. Vecchia. (2000): Food groups and oesophageal cancer risk in vaud, switzerland. **Eur. J. Cancer prev.** 9: 257–263.

Li, H., X. Wang, P. Li y H. Wang. (2009): Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected china wines. **Food chem.** 112: 454-460.

Liu, B., Y. Zhu. (2007): Extraction of flavonoids from flavonoid-rich parts in tartary buckwheat and identification of the main flavonoids. **J. Food Eng.** 78: 584-587.

Lock, O., I. Cabello y V. Doroteo (2006): Análisis de Flavonoides en plantas. Pontificia Universidad Católica del Perú.

López, T. M. (2002): Flavonoides. **Fitoterapia** 21(4)

Manrique, A. J. y W. C. Santana (2008): Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. **Zootecnia Trop.** 26(2): 157-166.

Mariani, C., A. Braca, S. Vitalini, N. De Tommasi , F. Visioli y G. Fico (2008): Flavonoid characterization and in vitro antioxidant activity of *Aconitum anthora* L. (*Ranunculaceae*).**Science Direct. Phytochemistry.** 69: 1220–1226.

Martínez, A. (2005): Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Martínez-Flórez, S., J. González-Gallego, J. M. Culebras y M^a J. Muñón. (2002): Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr. Hosp.** XVII (6) 271-278.

McCullough, M., A. Robertson, E. Jacobs, A. Chao, E. Calle y M. Thun (2001): A prospective study of diet and stomach cancer mortality in United States men and women. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.** 10: 1201–1205.

Miranda C. L., G. L. Apondo, J. K. Stevens, M. L. Deinzer y D. R. Buhler (2000): Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductases in mouse Hepa 1clc7 cells. **Cancer.**

Monroy, A., A. Totosaus, L. González, A. de la Fuente y I. García (2007): Antioxidantes Chile ancho (*Capsicum annum* L. *grossum sendt.*) y romero (*Rosmarinus officinalis* L.) como fuentes naturales de antioxidantes. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria.* 6(6).

Montserrat, F. C. (2003): Efectos antioxidantes del aceite de oliva y de sus compuestos fenólicos. Departamento de medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Moriguchi, T., M. Kita, Sh. Hasegawa y M. Omura. (2003): Molecular approach to citrus flavonoid and limonoid biosynthesis. **Food Agriculture & environment.**1(1):22-25.

Murphy, M. (1999): Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**1.564–582.

Pan, Y., K.Wang, S.Huang, H.Wang, X.Mu, Ch.He, X.Ji, J.Zhang y F.Huang (2008): Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel. **Food Chem.** 106: 1264–1270.

Palli, D., A. Russo, I. Ottini, G. Masala, C. Saieva, A. Amorosi, A. Cama, C. D'amico, M. Falchetti, R. Palmirotta, A. Decarli, R. M. Costantini y J. R. Fraumeni Jr. (2001): Red meat, family history, and increased risk of gastric cancer with microsatellite instability. **Cancer res.** 61: 5415–5419.

Palomero, J., A. I. Galán, M. E. Muñoz, M. J. Tuñón, J. González-Gallego y R. Jiménez. (2001): Effects of aging on the susceptibility to the toxic effects of cyclosporin

in rats: Changes in liver glutathione and antioxidant enzymes. **Free Radical Biology & Medicine**. 30: 836-845.

Parejo, I., F. Viladomat, J. Bastida, A. Rosas-romero, N. Flerlage y J. Burillo. (2002): Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. **J Agric. food chem**. 50: 6882–6890.

Pelka, M., C. Danzl, W. Distler y A. Petschelt (2000): A new screening test of dental materials. **Journal of Dentology**. 28: 341-345.

Pérez, G. (2003): Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. **Rev Cub Inv Biom**. 22(1):48-57.

Peres, W., M. J. Tuñón, S. Mato, P. S. Collado y J. González-Gallego. (2000): Hepatoprotective effects of the flavonoid quercetin in rats with biliary obstruction. **Journal of Hepatology**. 33:742- 750.

Peterson, J. J., J. T. Dwyer, G. R. Beecher, S. A. Bhagwat, S. E. Gebhardt, D. B. Haytowitz y J. M. Holden. (2006) a: A flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. **Journal of food composition and analysis**. 19:66–73.

Peterson, J. J., G. R. Beecherb, S. A. Bhagwatc, J. T. Dwyera, S. E. Gebhardtc, D. B. Haytowitzc y J. M. Holden (2006) b: Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. **J Food Composition and Analysis**.19: 74–80.

Pino, O., F. Lazo, O. Leon, B. P. S. Khambay y C.B. ranford-White (2008): Cuban flora as a source of bioactive compounds. **The International Journal of Cuban Studies**. 1(1):1-9.

Prasad, N. K., S. Divakar, G. R. Shivamurthy y S. M. Aradhya. (2005): Isolation of a free radical scavenging antioxidant from water spinach (ipomoea aquatica forsk). **J. Sci. Food agric**. 85: 1461-1468.

Prieto, P., M. Pineda, y M. Aguilar (1999): Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**. 269: 337–341.

Puebla, P., M. Guerrero y S. Correa (2004): Flavonoides del Género *Croton* **Revista Colombiana de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**. 33(1):78-85.

Rapisarda, P., B. Fallico, R. Izzo y E. Maccarone. (1994): A simple and reliable method for determining anthocyanins in blood orange juices. **Agrochimica**. 38: 157–164.

Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang y C. Rice-Evans (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**. 26 (9/10)1231–1237.

Rice-Evans, C. A. y L. Packer. (2003): **Flavonoids in health and disease**. 2nd ed. New York: M. Dekker.

Rice-Evans, C. A. Y R. Bourdon. (1993). Free radical lipid interaction and their pathological consequences. **Progress lipid res**. 12: 71-110.

Romero, A., M. Doval, A. Sturla y A. Judis (2003): Propiedades antioxidantes de compuestos polifenólicos presentes en extractos hidroalcohólicos de soja fermentada. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.

Salamanca, G. y I. Correa (2007): Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. **Zootecnia Trop**. 25(2): 95-102.

Sauget, J. (1946): Flora de Cuba. La Habana.

Schabra, S. C., F.C. Ulso y E. N. Mshin. (1984): Phytochemical screening of tanzanian medical plants. **J. Ethnopharmacol**. 11: 157-159.

Senevirathne, M., S-H. Kim, N. Siriwardhana, J-H. Ha, K-W Lee y Y-J. Jeon. (2006): Antioxidant Potential of *Ecklonia cava* on Reactive Oxygen Species Scavenging, Metal

Chelating, Reducing Power and Lipid Peroxidation Inhibition. **Food Science and Technology Internacional**. 12: 27.

Shalaby, N. M., H. I. Abd-alla, H. H. Ahmed y N. Basoudan. (2011): Protective effect of citrus sinensis and citrus aurantifolia against osteoporosis and their phytochemical constituents. **J. Med. Plant. Res.** 5 (4): 579-588.

Terao, J., S. Yamaguchi y M. Shirai (2001): Protection by quercetin and quercetin 3-O-beta-D-glucuronide of peroxynitrite-induced antioxidant consumption in human plasma low-density lipoprotein. **Free Radic Res.** 35: 925-931.

Toh, Y., S. Kuninaka, M. Mori, T. Oshiro, Y. Ikeda y H. Nakashima. (2000): Reduced expression of manganese superoxide dismutase mRNA may correlates with invasiveness in esophageal carcinoma. *Oncology*. 59: 223-228.

Torokne, A., R.Vasdinyei y B. M. Asztalos (2007): A Rapad Microbiotest for the Detection of yanobacterial Toxins. **Environ Toxicol.** 64-68.

Tripoli, E., M. La Guardia, S. Giammanco, D. Di Majo y M. Giammanco (2007): Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chem** .104: 466–479.

Tuberoso, C. I. G., P. Montorob, S. Piacenteb, G. Coronac, M. Deianac, M. A. Dessic, C. Pizzab y P. Cabrasa (2009): Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica* All. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 50: 440–448.

Vit, P., G. Gutiérrez, D. Titera, D. Vendar y A. Rodríguez (2008): Mieles checas categorizadas según su actividad antioxidante. **Bioquímica clínica**. 42 (2): 237-44.

Wagner, H., S. Bladt, E.M. Zgainski. (1996): **Plant Drug Analysis a Thin Layer Chromatography. Springer-Verlag, Berlín.**

Xing, R., H. H. Yu, S. Liu, W. W. Zhang, Q. B. Zhang y Z. E. Li (2005): Antioxidant activity of di.erently regioselective chitosan sulfates in vitro. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 13: 1387–1392.

Yildirim, A., A. Mavi, M. Oktay, A. A. Kara, F. Algur y V. Bilaloglu (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.

Yu, J. (2004): *Citrus limonoids* and flavonoids: extraction, antioxidant activity and effects on hamster plasma cholesterol distribution. A Dissertation. **Horticultura.**