

UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

FACULTAD DE QUIMICA-FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

Tesis en opción al Título de Licenciada en Ciencias Farmacéuticas

*Contenido fenólico y actividad antioxidante
de extractos metanólicos obtenidos de las
hojas y los frutos de *Pittosporum
pentandrum*.*



Autora: Mey Lyn Díaz Pérez.

Tutora:

Dra. C. María Elisa Jorge Rodríguez.

Colaboradora:

Lic. Anh Vu Ngoc

Santa Clara - 2014

Hago constar que el presente trabajo de diploma fue realizado en la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas como parte de la culminación de estudios de la especialidad de Ciencias Farmacéutica, autorizando a que el mismo sea utilizado por la Institución, para los fines que estime conveniente, tanto de forma parcial como total y que además no podrá ser presentado en eventos, ni publicados sin autorización de la Universidad.

Firma del Autor

Los abajo firmantes certificamos que el presente trabajo ha sido realizado según acuerdo de la dirección de nuestro centro y el mismo cumple con los requisitos que debe tener un trabajo de esta envergadura referido a la temática señalada.

Firma del Autor

Firma del Jefe de
Departamento donde se
defiende el trabajo

Firma del Responsable de
Información Científico-Técnica

PENSAMIENTO



**EL CABALLO SE ALISTA PARA EL DÍA DE LA
BATALLA;
MÁS JEHOVÁ ES EL QUE DA LA VICTORIA.
[PRO 21:31](#)**



DEDICATORIA

A quienes han estado conmigo en esta travesía sin apartarse ni un momento de mi lado, a quienes con tanto esfuerzo lo han dado todo, más allá de lo que han poseído, a quienes les debo mi amor y respeto por haberme educado y guiado en mi vida personal y profesional. A esos que cada momento daban lo mejor de sí para verme un día cumplir esta meta.

A mis abuelos Mirelia y Roberto.

AGRADECIMIENTO



Agradezco primeramente a Dios, porque me ha sostenido, me ha sido por estandarte, por fortaleza en la debilidad, mi gozo en medio de la dificultad y mi victoria, te agradezco Señor por hacerme en todo más que vencedora.

Le agradezco a mi mamá porque en medio de estos años ha estado a mi lado, siempre creyendo en mí, esforzándose por darme lo mejor y porque yo salga adelante con honores como ella también lo hizo una vez; también le agradezco al hombre que ha estado a su lado, a Frank, a mi viejito calvo, porque ha compartido las cargas de mi mamá, por haber estado para mí cuando estaba saludable, pero también cuando enfermaba, por cuidarme y amarme como su hija.

Agradezco a mi papá, porque aunque lejos ha sabido enseñarme grandes lecciones que me han hecho la muchacha que soy hoy y me han dado el carácter que hoy poseo, porque me ha hecho fuerte y luchadora. Porque con gran esfuerzo ha sabido sustentarme, porque sé que temprano se levanta y tarde se acuesta para que en este tiempo nada me falte. Agradezco también a la gran mujer que tiene a su lado, a Magilé, mi mamita peliona, porque en ella encuentro una amiga, una consejera y otra mamá que nunca me ha dejado de amar y sostener, aun en las circunstancias más difíciles.

Agradezco a mis abuelos amados, porque sin ellos yo nunca hubiese logrado mis metas, ellos han sido apoyo, ayuda, sostén. Les agradezco por formarme en un hogar al que siempre vuelvo y en una familia hermosa donde todos nos ayudamos.

Agradezco a mis hermanos que me han comprendido y amado todos estos años, aun estando lejos, a Frank, a los jimaguas, a Entico.

A mi abuela Blanca, a mi tía Nancy, a mis tíos y tías, a mis primos, y a todos mis familiares, aquellos que de una forma u otra han contribuido a que mi carrera saliera adelante.

Gracias a mis pastores y mentores, por orar por mí, por guiarme y enseñarme: a Francisco y Elizabeth, que han sido como mis padres en Cristo, a Jorge y Hani, a Diagne y Lizandra, a todos mis hermanos y hermanas en Cristo, que me han sostenido y ayudado tantas veces, en especial a Dania y Riskel, a Dacia, mi hermana de Surinam, a Diane y Blanqui; a Lizzi, a Susana, a Felix y Dianelis, a los dos Dairon, a Yosbel.

Agradezco a mis profesores, porque me han enseñado las ciencias y las letras, y a mis compañeros, que por tantos años hemos compartido un aula universitaria.

De forma especial agradezco a mi tutora Eliza por su dedicación y amor, por su ayuda valiosa y por su sonrisa cada día. Agradezco a Anh, la colaboradora de la tesis, por su atención y esfuerzo, agradezco a Venancio, un gran profesional que nos fue de gran ayuda, por su paciencia y disposición para con nosotros.



Mey Lyn Díaz Pérez

*Contenido fenólico y actividad antioxidante de extractos metanólicos obtenidos de las hojas y los frutos de *Pittosporum pentandrum*.*



RESUMEN

En el presente trabajo se estudiaron extractos obtenidos de las hojas y los frutos de la *Pittosporum pentandrum*, recolectada en el Jardín Botánico de la Universidad Central de Las Villas. Los extractos fueron obtenidos por extracción sólido-líquido, con metanol como solvente. Fue evaluada la composición fenólica de los extractos, determinando los fenoles, flavonoides y taninos totales a través de técnicas espectrofotométricas y se determinó la actividad antioxidante de cada extracto, por comparación con patrones de antioxidantes (quercetina, rutina, vitamina C y E), a través de cinco ensayos *in vitro*. El contenido fenólico y de flavonoides resultó ser cinco veces superior para el fruto que para las hojas, mientras que el contenido de taninos fue inverso a este resultado, las hojas poseen cinco veces mayor cantidad de este metabolito que los frutos, con un valor (4%) superior a muchas plantas reportadas en farmacopeas vigentes. Los valores del contenido fenólico y de flavonoides se encuentra en total correspondencia con los resultados obtenidos al evaluar la actividad antioxidante en extractos, demostrado a través de los dos mecanismos de acción descritos en la literatura de los métodos antioxidantes “*in vitro*”: la evaluación de la peroxidación lipídica y la habilidad secuestradora a los radicales libres. El extracto de los frutos mostró una actividad antioxidante superior al de las hojas en el mecanismo de la captación de radicales y similar en el mecanismo de la peroxidación lipídica. Al comparar estos con los valores obtenidos para los patrones de antioxidantes, los extractos mostraron menor actividad en el primer mecanismo y similar a rutina, quercetina y vitamina C en el segundo.

ABSTRACT





ABSTRACT

In this investigation, were studied about the extracts obtained of fruits and leaves of the plant *Pittosporum pentandrum*, was collected by the group of UCLV Botanical Garden and Pharmacy Department has included this species among its priorities research. This investigation has for objective, to evaluate the potential of its possible uses in traditional Cuban medicine. These extracts were obtained by the method of solid – liquid extraction with methanol as solvent. The phenolic, flavonoids and tannins contents were determined by the spectrophotometric technics and the antioxidant activities of each extract were determined by the comparison with the antioxidant standards (quercetin, rutin, vitamins C and E) by five *in vitro* assays.

The phenolic and flavonoids content of fruits extracts resulted five times higher than for the leaves, although the tannins contents was the inverse to this result, the leaves extracts have more content of this metabolite than the fruits, with a 4% higher than many plants reported in the actual pharmacopeias. The phenolic and flavonoids contents values are totally correspondent with the results obtained in evaluating the antioxidant activity of extracts, demonstrated by two action mechanisms described in the literature: the ability of lipid peroxidation and scavenging free radicals. The fruits extracts showed a higher antioxidant activity than the leaves in the scavenging ability mechanism to free radicals, are similar in the mechanism of lipid peroxidation.

By comparison with values obtained for the antioxidant standards, these extracts showed minor activity on the first mechanism and similar to rutin, quercetin and vitamin C on the second.

ÍNDICE

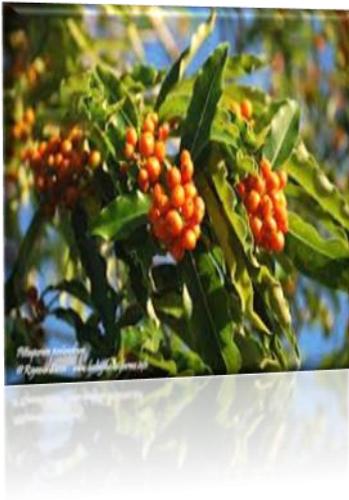




ÍNDICE	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1.1. Consideraciones generales sobre el uso las plantas medicinales en la actualidad.....	4
1.2. Estudios reportados de la planta	7
1.2.1. Estudios científicos reportados de la planta estudiada.....	8
1.3. Extractos. Métodos de extracción.	9
1.4. Metabolitos de plantas medicinales evaluados en el presente trabajo. Su relación con la actividad antioxidante.....	10
1.5. Métodos para la evaluación de la actividad antioxidante.....	7
1.5.1. Actividad secuestradora del radical libre DPPH	15
1.5.2. Determinación de la capacidad antioxidante total por el método del molibdato de amonio (TAOC).	16
1.5.3. Ensayo de la fuerza antioxidante reducida del ión férrico (FRAP)	16
1.5.4. Determinación de la actividad antioxidante total por método de tiocianato férrico (FTC, por sus siglas en inglés).....	16
1.5.5. Ensayos de ácido tiobarbitúrico.....	17
1.6. Relación de la actividad antioxidante con el contenido de fenoles presente en la planta.....	17
1.7. Consideraciones finales de la revisión bibliográfica:	19
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.	20
2.1. Extractos, equipos y reactivos.....	20
2.2. Obtención y determinación del rendimiento de extractos secos obtenidos a partir de las hojas y los frutos del <i>Pittosporum pentandrum</i>	22
2.2.1. Metodología de obtención y almacenamiento de los extractos	22
2.2.2. Determinación del rendimiento de extractos secos.....	22
2.3. Determinación del contenido total de compuestos fenólicos en los extractos obtenidos.....	22
2.4. Determinación del contenido total de flavonoides en los extractos obtenidos...	23
2.5. Determinación del contenido total de taninos en los extractos obtenidos.	24
2.6. Actividad antioxidante de los extractos obtenidos de <i>Pittosporum pentandrum</i>	25
2.6.1. Actividad secuestradora del radical libre DPPH.....	26
2.6.2. Capacidad antioxidante total (TAOC).....	27
2.6.3. Determinación del poder reductor/antioxidante férrico (FRAP).....	28
2.6.4. Método del tiocianato férrico (FTC).....	28
2.6.5. Método del ácido tiobarbitúrico (TBA).	29
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	30
3.1 Determinación del rendimiento de los extractos obtenidos	30
3.2. Resultados del contenido fenólico total en los extractos evaluados.	30
3.3. Resultados del contenido de flavonoides en los extractos.	31
3.4. Resultados del contenido del contenido de taninos en la planta.	32
3.5. Actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de las hojas de <i>Pittosporum pentandrum</i>	33
3.5.1. Actividad secuestradora del radical libre DPPH.....	33
3.5.2. Fuerza antioxidante reducida del ión férrico (FRAP).....	37
3.5.3. Capacidad antioxidante total.....	38
3.5.4. Actividad antioxidante por el método FTC.....	40



3.5.5. Actividad antioxidante por el método TBA.....	41
CONCLUSIONES	43
RECOMENDACIONES	43
BIBLIOGRÁFIAS	44



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

La OMS (Organización Mundial de la Salud) considera como planta medicinal todo vegetal que contiene, en uno o más de sus órganos, sustancias que pueden ser usadas con finalidades terapéuticas o que son precursores en la semisíntesis químico-farmacéutica. El aprovechamiento por el hombre de las plantas medicinales consta en numerosos testimonios escritos pertenecientes a distintas civilizaciones y culturas. El uso de remedios de origen vegetal se remonta a la época prehistórica, y es una de las formas más extendidas de medicina, presente en virtualmente todas las culturas conocidas; la industria farmacéutica actual se ha basado en los conocimientos tradicionales para la síntesis y elaboración de fármacos, y el proceso de verificación científica de estas tradiciones continúa hoy en día, descubriéndose constantemente nuevas aplicaciones⁽¹⁾.

La organización mundial de la salud estima que en muchos países desarrollados el 70-80% de la población ha usado de alguna forma la medicina tradicional; además, en algunos países asiáticos y africanos el 80% de la población depende de la medicina tradicional para la atención primaria de su salud⁽²⁾.

Entre las plantas medicinales utilizadas en todo el mundo a largo de la Historia, y aun de la prehistoria del hombre, las plantas aromáticas y sus componentes olorosos ocupan un lugar especial. Desde que Homo sapiens discriminó el alimento tóxico, el aire limpio del contaminado, o reconoció las virtudes del aroma de una flor o un fruto, comenzó a familiarizarse con gustos y olores que determinaron su habitud, su comportamiento, sus costumbres, sus medicinas, hasta sus placeres y sus vicios, hasta sus recuerdos y deseos. La vida era para él, entre otras cosas, una experiencia que se genera desde el olfato y el paladar. Desde entonces, su memoria se enriquecía con sabores y olores, que fueron formando parte de su cultura y de su idiosincrasia⁽³⁾.

Cada día y con mayor frecuencia surgen en los países más desarrollados un vivo interés por el estudio y la investigación, el consumo y la producción de plantas aromáticas y medicinales que le abre un amplio y creciente campo de aplicación a la industria farmacéutica, alimentaria y perfumero-cosmética. En este contexto muchos países han desarrollado innovaciones tecnológicas que eran necesarias y urgentes para la reconversión y modernización general de los procesos empleados en la fabricación de productos derivados de la flora aromática y medicinal. No siempre es



válido suponer que una planta aromática es simplemente aquella que genera un olor o un sabor particular, sea este agradable o no. En esta caracterización debe plantearse muchas veces excepciones. Una planta puede carecer de un olor típico en condiciones naturales, pero puede generar una esencia de gran valor si se le procesa adecuadamente⁽²⁾.

Por otra parte la oxidación de los productos alimenticios, cosméticos y medicinales produce un deterioro muy significativo en los mismos, haciendo que pierdan la mayoría de las veces las propiedades para las cuales fueron elaborados. Las grasas y aceites presentes en estos productos pueden deteriorarse fácilmente debido a la oxidación, produciéndose una serie de reacciones con participación de radicales libres que se propagan y finalmente se convierten en compuestos estables oxigenados que conllevan a la pérdida de aroma y sabor, así como otras características indeseables que degradan la calidad del producto. Para prevenir tales reacciones se utilizan compuestos con propiedades antioxidantes, en su amplia mayoría sintéticos, como es Butilhidroxitolueno (BHT), Butilhidroxianisol (BHA) y el Propilgalato (PG), por mencionar algunos. Últimamente ha crecido la demanda de “productos de origen natural”, libres de aditivos químicos sintéticos, y se ha incrementado el estudio y el uso de sustancias que contengan antioxidantes naturales⁽⁴⁾.

Nuestro país no está exento de todo este rescate de la medicina popular lo cual tiene gran importancia desde el punto de vista económico y dentro del campo de la salud pública, constituyendo una alternativa a tener en cuenta por nuestros investigadores, debido a que posee una rica flora y una valiosa tradición en el uso de las plantas medicinales. Por esto desde 1992 cuenta con un programa nacional de medicina natural que se perfecciona cada año con la inclusión de nuevas especies⁽⁵⁾.

Este programa de medicina natural del Ministerio de Salud Pública de nuestro país incluye el uso de plantas para múltiples afecciones; son muchas las plantas aromáticas insertadas en él y cada día se realizan estudios a nuevas especies de plantas para determinar si pueden incluirse en dicho programa. Teniendo en cuenta esto en el Departamento de Farmacia de la Universidad Central de las Villas existe un grupo de investigación que tiene como objetivo fundamental el estudio de las plantas medicinales, particularmente especies de plantas aromáticas con actividad

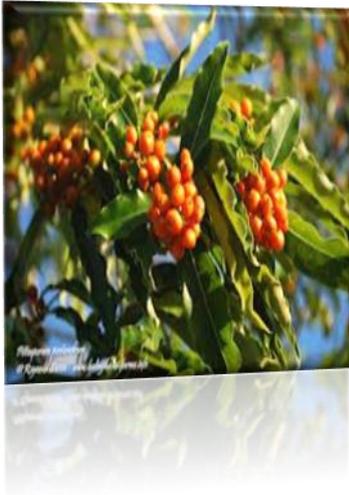


antioxidante. Tal es el caso del *Pittosporum pentandrum*, género de origen Gondwana, cuya distribución actual se extiende desde Australia, Oceanía, Asia Oriental y algunas partes de África⁽⁶⁾. Se le conoce comúnmente como pitósporo, que pertenece a la familia Pittosporaceae.

Para desarrollar el presente trabajo se tuvo en cuenta la poca información existente de la planta *Pittosporum pentandrum* en la literatura y el objetivo de mantener viva la tradición herbolaria para encontrar nuevos compuestos activos con propiedades antioxidantes que actúen contra diversas enfermedades. Durante la investigación se estudiaron los extractos obtenidos de las hojas y los frutos de esta planta con vistas a evaluar sus posibles potencialidades como fitomedicamento. La planta es cultivada por el equipo de investigación del Jardín Botánico de la UCLV en el área de cultivo de especies localizadas principalmente en la región central de nuestro país.

Constituye, por tanto, el **problema científico** del presente trabajo que la planta *Pittosporum pentandrum*, que crece en la región central de Cuba no posee estudios reportados que permitan proponer su uso en la medicina tradicional y en la industria farmacéutica. Atendiendo a ello, con el objetivo de contribuir con el programa de medicina natural y tradicional del país, este trabajo científico parte de la siguiente **hipótesis**: Si se realizan estudios que permitan conocer el rendimiento, el contenido fenólico y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de las hojas y los frutos de *Pittosporum pentandrum*, se realizará un aporte importante a la información necesaria para proponer su uso en las industrias: farmacéutica, alimentaria o cosmética. Para fundamentar dicha hipótesis se trazaron los siguientes objetivos:

- Obtener y determinar el rendimiento de los extractos metanólicos obtenidos a partir de las hojas y los frutos de *Pittosporum pentandrum*, aplicando técnicas tradicionales de extracción.
- Determinar el contenido de fenoles, flavonoides y taninos totales de los extractos evaluados.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos obtenidos de las hojas y los frutos de *Pittosporum pentandrum*, aplicando diferentes ensayos *in vitro*.



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Consideraciones generales sobre el uso las plantas medicinales en la actualidad.

El uso de las plantas aromáticas y medicinales tiene un origen muy antiguo. El testimonio más antiguo del uso de las plantas por razones no alimentarias se encontró en una excavación en Shanidar, Irak; que data alrededor de 60.000 años. El conocimiento de las plantas era extenso en las civilizaciones antiguas y su utilización formaba la base médica hasta el siglo diecinueve⁽⁶⁾.

En la actualidad existe un reconocimiento del empleo de fuentes naturales de medicamentos y en especial de la fitoterapia, justificado en muchos casos por razones económicas, disminución de efectos tóxicos crónicos muy frecuentes en sustancias químicas puras, con una tendencia en los países desarrollados al retorno del empleo de productos naturales en el tratamiento de diversas afecciones⁽⁷⁾.

Las plantas medicinales son todas aquellas plantas que contienen, en alguno de sus órganos, principios activos, los cuales, administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades de los hombres y de los animales en general⁽⁸⁾.

En la medicina moderna estas plantas tienen importantes aplicaciones: son fuente directa de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos⁽⁹⁾. Se han continuado utilizando tanto de manera directa como indirecta, para la extracción de sus principios activos. De ahí que el mercado se haya hecho más exigente y demande mayores cantidades de producto y mayor calidad en el mismo. Por otra parte, su uso se está extendiendo como aditivos naturales en los llamados productos biológicos, verdes, naturales, ecológicos, etc., a medida que estas categorías de alimentos se vuelven necesarios para algunos sectores sociales⁽⁶⁾.

Existen en el mundo unas 250,000 especies vegetales de las cuales solo se conocen científicamente el 10 % de ellas, considerándose como medicinales alrededor de 12,000 especies en total⁽¹⁰⁾.



Al menos un 25% de los productos farmacéuticos modernos se derivan de las plantas, y los ingredientes de muchos otros son reemplazos sintéticos creados a partir de compuestos obtenidos de las plantas. Un número estimado de aproximadamente 70,000 especies de plantas se utilizan en medicina popular en todo el mundo, una cifra que ha sido confirmada recientemente por diferentes estudios. Como consecuencia, existe una enorme demanda de productos obtenidos de estas plantas tanto para su uso doméstico como para el comercio a nivel local, regional, nacional e internacional ⁽⁶⁾.

La OMS ha promovido el estudio de las plantas como fuente de medicamentos, dentro del programa "Salud para todos en el año 2000" ⁽¹¹⁾. Durante la conferencia de Alma-Ata, celebrada en 1978, se acordó impulsar la documentación y evaluación científica de las plantas utilizadas en la medicina tradicional, abriendo las puertas al diálogo entre la medicina tradicional y la moderna, sobre la base de que las prácticas peligrosas se eliminarían y sólo se promovería lo que fuese seguro y eficaz ⁽⁹⁾.

Existen otras razones que justifican la investigación sobre plantas medicinales: en primer lugar, aunque menos del 10% de las especies de angiospermas existentes en el mundo han sido evaluadas para determinar su composición química y sus propiedades farmacológicas, el valor potencial de los medicamentos derivados de plantas tropicales es considerable. En algunos países se han desarrollado programas de prospección para investigar la actividad farmacológica de los componentes de plantas tropicales, tales como el Convenio Merck-INBio en Costa Rica, el programa de búsqueda de compuestos activos contra el Cáncer y el SIDA del Instituto Nacional del Cáncer en EEUU y el proyecto de prospección bioquímica del bosque tropical de Yutajé, en Venezuela, entre otros ⁽¹²⁾.

En la Figura 1.1 se muestra el comportamiento de la distribución en el mercado mundial de plantas aromáticas y medicinales. En todos los segmentos (excluidos los de soja y algas), en la actualidad aporta cerca de 83,000 millones de dólares. Dependiendo del segmento, el crecimiento es constante, oscilando entre 3% y el 12% anual. La relación entre los diferentes subsectores que agrupan a las plantas aromáticas y medicinales hace difícil realizar una separación entre ellos, pues a menudo ocurre que materias primas de especies determinadas, son utilizadas en diferentes áreas de mercado. Los suplementos de especies para dieta (11,000

millones de dólares) y los alimentos funcionales a base de plantas (14,000 millones de dólares), representan más de un tercio del mercado. El mercado mundial de la industria farmacéutica, (incluyendo medicamentos a partir de precursores a base de plantas y registrados como plantas medicinales) contribuye con 44,000 millones de dólares. Los productos herbarios de belleza componen los restantes 14,000 millones de dólares del mercado⁽¹³⁾.

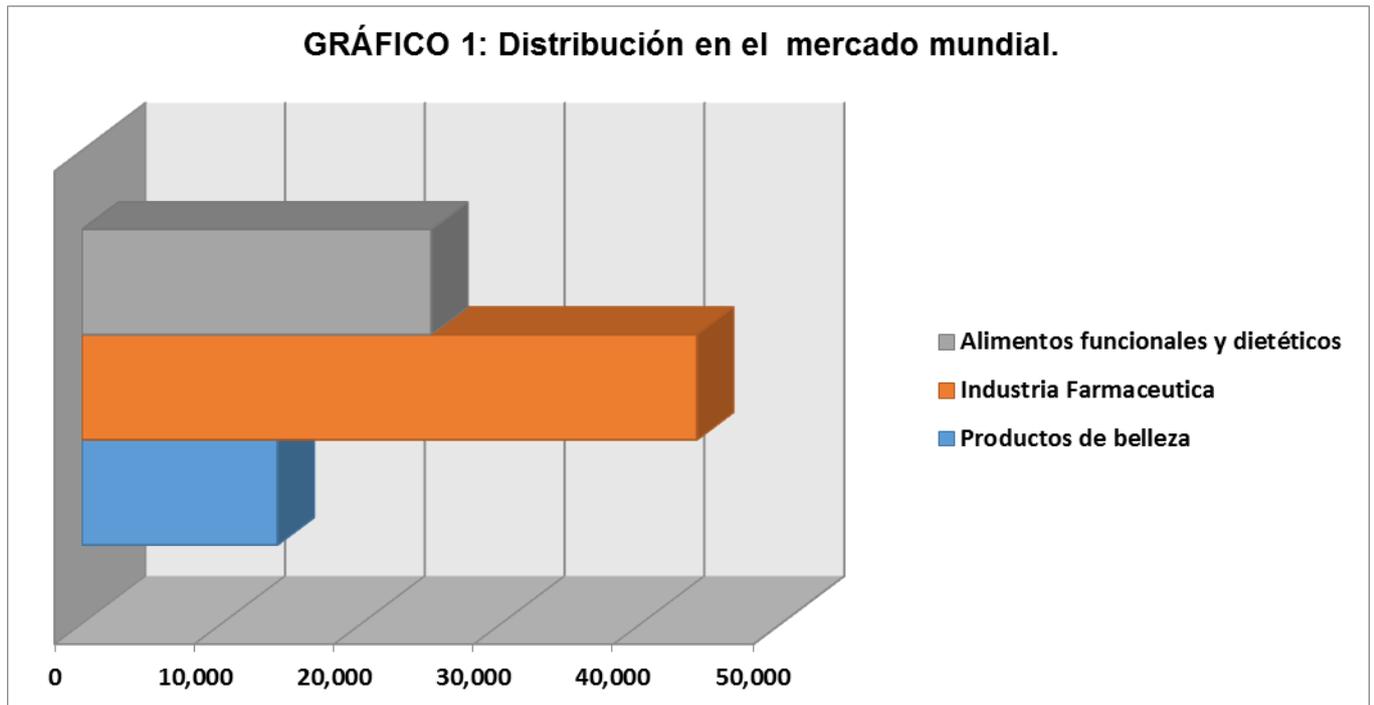


Figura 1.1. : Distribución en el mercado mundial.

Fuente: The Global Herbs & Botanicals Market; Dr. Joer Gruenwald (2010).

En términos geográficos, el mercado mundial de los suplementos de medicamentos a base de hierbas está liderado por Alemania (26%), Asia (19%), Japón (17%), Francia (13%), resto de Europa (12%) y norteamérica (11%) (Figura 1.2)

Principales productores de extractos a nivel mundial.

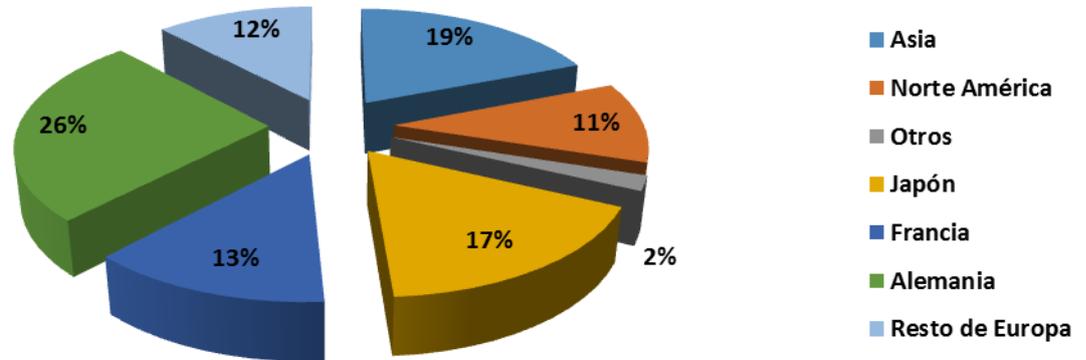


Figura 1.2: Principales productores de extractos a nivel mundial.
(Fuente: Dr. Joerg Gruenwald, 2010).

Teniendo en cuenta que el presente trabajo tiene como objeto de estudio evaluar la composición y actividad antioxidante de extractos obtenidos de las hojas y los frutos de *Pittosporum pentandrum*, a continuación se relacionan aspectos reportados en la literatura sobre esta planta y los grupos de metabolitos estudiados en la misma.

1.2. Estudios reportados de la planta

La planta *Pittosporum pentandrum* pertenece a un género de cerca de 200 especies de plantas con flores de la familia Pittosporaceae. El género es probablemente de origen Gondwana, y su zona de distribución actual se extiende desde Australia, Oceanía, Asia Oriental y algunas partes de África. Se les conoce comúnmente como pitóspero o, más ambigua, "cheesewoods".⁽¹⁴⁾

Aspectos taxonómicos

Nombre científico: *Pittosporum pentandrum*

Nombre común: Taiwanese Cheesewood, Clavo verde

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Apiales

Familia: Pittosporaceae

Género: Pittosporum



Especie: pentandrum

Descripción:

Un arbusto grande o pequeño árbol, posee una altura de 6-9 m, nativo de la parte tropical del este de Asia, con hojas de color verde brillante, flores blancas y perfumadas y pequeños frutos amarillos. Es una planta ornamental muy popular en la zona asiática, considerada invasiva en ciertas regiones. Las hojas están dispuestas en espiral o verticiladas, simple, con un margen entero u onduladas. Las flores se producen solas o en umbelas o corimbos de flores, cada una con cinco sépalos que a menudo son dulcemente perfumadas. El fruto es una cápsula leñosa de semillas, que irrumpe en la maduración liberando a numerosas semillas. Las semillas se recubren con una sustancia resinosa pegajosa. El género lleva el nombre de sus semillas pegajosas, del significado "pitch-semilla" grieg.⁽¹⁴⁾

El *Pittosporum pentandrum* está distribuido en Indonesia(N Sulawesi) y en las filipinas. En Japón el *Cheesewood* es ampliamente cultivado como planta ornamental en regiones subtropicales; los pitósporos también pueden ser cultivadas en interior como *bonsái*⁽¹⁵⁾.

1.2.1. Estudios científicos reportados de la planta estudiada

En la literatura consultada solo existe un reporte científico, en el campo de interés para el presente trabajo para la planta y existen pocos reportes de la familia. Consolacion y col., (1997) determinaron glicósidos sesquitérpenicos presentes en las hojas del *Pittosporum pentandrum*. Se trabajó con el extracto clorofórmico que proporcionó una mezcla de dos glicósidos sesquiterpénicos del tipo eudesmanólidos y se caracterizó la conocida betulina triterpénica. Las estructuras de estos componentes fueron elucidadas por métodos espectroscópicos.⁽¹⁶⁾

Una de las especies de *Pittosporum* más estudiada en el campo farmacéutico es el *Pittosporum undulatum*, y por la similitud botánica que posee esta especie con la estudiada en el presente trabajo, a continuación se resumen los trabajos de mayor importancia que fueron tomados en consideración. Las pocas investigaciones existentes acerca del *P. undulatum* se centran en varios estudios de composición y acción farmacológica del aceite esencial obtenido de las hojas de esta especie, cultivada en Portugal; el primer reporte fue publicado por Medeiros y col., (2003), quienes refieren que el aceite esencial tiene un componente mayoritario (40%)



llamado calameneno y posee actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis* y *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que Barbosa y col., (2010) y Teixeira y col., (2012) evaluaron las actividades nematocidas y moluscocidas de este aceite esencial con resultados satisfactorios^{(17),(18),(19)}. Recientemente fue evaluada por investigadores australianos la actividad antibacteriana del aceite esencial y los extractos obtenidos de las hojas de esta planta con resultados muy favorables (Sadgrove y Jones, 2013); mientras que Mendes, (2013), evaluó la actividad antiinflamatoria de un sesquiterpeno tipo guaiano obtenido de los frutos de esta especie obteniéndose buenos resultados (Mendes y col. 2013)^{(20), (21)}.

1.3. Extractos. Métodos de extracción.

Los extractos vegetales son la forma más usada como ingrediente farmacéutico activo de las plantas medicinales. Se define como extracto vegetal el producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con varios solventes. Mezcla compleja de compuestos con actividad farmacológica, formada por un principio activo (con la supuesta actividad) dentro de una matriz, en principio, sin actividad terapéutica⁽¹³⁾.

El proceso de extracción para la obtención de dichos extractos se define como: la separación de porciones medicinales activas a partir de los tejidos de plantas y animales, mediante el empleo de disolventes selectivos, utilizando procedimientos establecidos. Entre los procesos extractivos más empleados en las plantas medicinales para separar los componentes presentes en el material vegetal se encuentran los procesos extractivos más convencionales, como los de arrastre de vapor, los de extracción por solución y los de extracción por centrifugación, etc. Existen diversas técnicas de extracción consideradas “clásicas u oficiales”, siendo las más utilizadas en el campo de los productos naturales la maceración, la extracción por Soxhlet, la percolación y la hidrodestilación⁽²²⁾. También están las consideradas “modernas” como es el caso del ultrasonido: extracción asistida por microondas, extracción por fluido supercrítico y la extracción acelerada por disolvente (conocida también como extracción por fluido automatizado o extracción por líquido presurizado)⁽²³⁾; estas nuevas técnicas de extracción a pesar de ser más rápidas, utilizan menos cantidad de disolvente y en algunos casos son



automatizadas, por lo general tienen como inconveniente el elevado costo de los equipos empleados.

La extracción sólido-líquido constituye el método más utilizado actualmente para obtener un extracto compuesto por los principales metabolitos de la planta. En múltiples investigaciones, las plantas fueron previamente secadas y molidas para su posterior análisis^(24, 25). Luego de secadas las plantas, se realiza una extracción, la cual se han llevado a cabo con disolventes tanto polares como no polares; predominando el metanol. Según Jayasinghe y col., (2003)⁽²⁶⁾; este es el disolvente de extracción más eficiente respecto a otros como el etanol, acetona, hexano y acetato de etilo. Shi y col., (2005)⁽²⁷⁾, afirmaron que con el metanol son extraídos derivados fenólicos del tipo hidroxinámicos, flavonoles y catequinas. La gran cantidad de referencias que dan fe de lo anterior reafirman lo planteado por Shi y colaboradores. Por citar algunos ejemplos Ju-Sung y col., (2010)⁽²⁸⁾ estudiaron los extractos metanólicos de *Lespedeza cuneata*, mientras que Messaoud y col., (2010)⁽²⁹⁾ estudiaron la composición de extractos metanólicos de tres especies de *Lavandula* y Mar y col., (2011)⁽³⁰⁾ evaluaron extractos metanólicos de diferentes partes de plantas en Pakistán. En todos los casos se relacionó el contenido fenólico de dichos extractos con la actividad antioxidante evaluada, aspecto que se repite en un número alto de artículos que abordan esta temática.

1.4. Metabolitos de plantas medicinales evaluados en el presente trabajo. Su relación con la actividad antioxidante.

Casi siempre en la planta se encuentran varios principios activos, de los cuales uno de ellos determinaría la importancia de la especie para alguna aplicación. Estos principios activos, no se distribuyen en forma homogénea por todo el cuerpo de la planta, sino preferentemente en las flores, las hojas o las raíces y a veces en las semillas, los frutos o en la corteza. Además, es muy importante tener en cuenta que estos principios oscilan, según el hábitat de la planta, la recolección y la preparación, son las sustancias responsables de la acción farmacológica, las que le confieren valor terapéutico y por tanto las que le dan el valor curativo de la planta.

Muchos de los principios activos son sumamente complejos y ocasionalmente aún se desconoce su naturaleza química, otros han sido aislados purificados e incluso, sintetizados. Por lo general pertenecen a estas categorías: alcaloides, glucósidos,



gomas y resinas, sustancias antibióticas, ácidos grasos y otros metabolitos secundarios. Estos últimos juegan un rol muy importante en la adaptación de la planta con su medio ambiente, presentando sus actividades como antibióticos, antifúngicos, antiviral, antimicrobianos, protección de patógenos, luz UV, mientras que los ácidos grasos son componentes de marcadas importancias por el rol que juegan en la nutrición humana⁽³¹⁾. A continuación se profundiza en la información de dos de estos grupos de compuestos fenólicos que constituyeron los de mayor interés en el presente trabajo.

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de 8,000 compuestos distintos. Químicamente, esta familia de compuestos puede definirse como aquella en la que sus componentes poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidróxidos (OH). Estas sustancias orgánicas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se sintetizan como metabolitos secundarios con funciones de defensa y son en gran medida, responsables de propiedades como: el color, la astringencia y el flavor (sabor y aroma) de los vegetales. Los compuestos fenólicos incluyen una amplia variedad de sustancias que se puede dividir en diversos subgrupos: Ácidos fenólicos (hidroxibenzóicos e hidroxicinámicos), flavonoides (antocianinas, proutocianidinas, flavonoles, flaconas, flavononas, flavonoles, isoflavononas), estilbenos y lignanos⁽³²⁾.

La importancia de estos compuestos se debe a las evidencias encontradas acerca de su capacidad antioxidante y del papel que juegan frente a la prevención de ciertas enfermedades cardiovasculares, cáncer e inflamación^(32, 33), ya que pueden ayudar o limitar el daño producido por estas enfermedades actuando directamente sobre las especies reactivas del oxígeno o estimulando los sistemas de defensa endógenos^(29, 30, 34).

Entre los grupos de compuestos fenólicos de mayor importancia, desde la perspectiva de salud humana, se encuentran: los ácidos fenólicos, los taninos y los flavonoides, que poseen como compuestos biológicamente activos más comunes al ácido cumárico, la quercetina y la epicatequina, respectivamente; entre los cuales los flavonoides se citan como los metabolitos de mayor interés. En el presente trabajo resultó de interés la determinación de taninos y flavonoides en la planta estudiada, motivado por los potenciales beneficios de estos metabolitos en la salud

humana, que aparecen reflejados en las numerosas publicaciones existentes acerca de su actividad biológica⁽³⁵⁾.

Los flavonoides constituyen componentes mayoritarios en un gran número de plantas medicinales, estos participan en el metabolismo celular, actúan como inhibidores enzimáticos y en procesos de transferencia de energía y; también, poseen la importante capacidad de fijar metales como hierro y cobre^(35, 36). Además, otras de sus funciones, no menos importante, consiste en sus efectos antimicrobianos y bactericidas en el organismo^(37, 38), así como el poseer reportadas un gran número de actividades farmacológicas como antiinflamatorios^(39, 40), antivirales o anticarcinogénicos⁽³¹⁾, antidepresivos^(31, 41), vasodilatadores^(31, 40, 42).

Los flavonoides están compuestos de los anillos fenilos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (C). En la **Fig. 1.3** se muestra el esqueleto de difenilpiranos: C6 – C3 – C. Se clasifican en diversas familias de acuerdo al grado de insaturación y sustituyentes en el heterociclo central, dentro de cada familia pueden presentarse gran variedad de compuestos, que se diferencian entre sí según el número y posición de grupos hidroxilo en la molécula y los distintos sustituyentes que éstos pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos)⁽⁴³⁾.

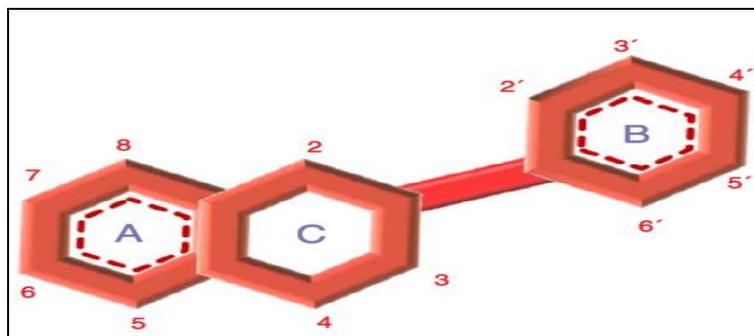


Figura 1.3: Estructura de flavonoide con numeración y especificación de cada heterociclo.

Los flavonoides tienen capacidad para actuar como antioxidantes y captar radicales, en virtud de las propiedades reductoras de los múltiples grupos hidroxilos sustituyentes de sus anillos aromáticos y su capacidad para deslocalizar el radical resultante dentro de su estructura, al generar un radical fenoxilo relativamente estable. Entre las características estructurales con mayor influencia sobre la eficacia



antioxidante y captadora de radicales de los flavonoides se encuentran las siguientes⁽⁴³⁾ :

Presencia de un grupo hidroxilo en posición 3 en el heterociclo insaturado, que contribuye activamente a la deslocalización electrónica. Cuando este grupo no existe o está sustituido disminuye sustancialmente la actividad antioxidante.

Existencia de un doble enlace en posición 2,3 junto con los grupos ceto en 4 e hidroxilo en 3 del anillo C. Todos ellos aumentan la posibilidad de deslocalización electrónica a través de la estructura y, por tanto, la capacidad antioxidante.

Estructura o-dihidroxi en el anillo aromático B. En los flavonoides con el anillo C saturado (como los flavanoles), el sitio para la formación del radical es el anillo B. La existencia de un solo grupo hidroxilo en este anillo no contribuye a la actividad antioxidante.

La existencia de grupos hidroxilo libres en 5 y 7 del anillo A puede también contribuir a la actividad antioxidante. Además de presentar actividad antioxidante, los polifenoles que poseen grupos o-dihidroxifenil son excelentes quelantes de metales de transición, como Fe(III), Al(III) o Cu(II), que juegan un papel fundamental en la formación de radicales e influyen sobre la peroxidación lipídica. De este modo, la complejación de metales por parte de los polifenoles contribuye a la protección frente al daño ejercido por estos procesos. Asimismo, la presencia de ácido ascórbico, que favorece la formación de Fe (II), reducirá la captación del hierro por los polifenoles.

El interés en la aplicación de los flavonoides y las evidencias clínicas de sus ventajas en la salud, determinó su importancia en la prevención⁽⁴⁴⁾ de enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson)⁽⁴⁵⁾, accidentes cerebro-vasculares, hepatitis, hipertensión, lupus, diabetes mellitus, fallo renal crónico, artritis reumatoidea⁽⁴⁶⁾, y retardo del envejecimiento⁽⁴⁴⁾. Aparte de sus propiedades biológicas, poseen actividades farmacológicas y médicas⁽⁴⁷⁾ antiinflamatorias, antialérgicas⁽⁴⁸⁾ y bactericidas, vasodilatadores, entre otras⁽⁴⁷⁾.

Otro grupo de compuestos polifenólicos presentes en las plantas son los taninos, los cuales son un grupo de metabolitos con pesos moleculares entre 500 y 30000 Da, estos se encuentran profundamente distribuidos en casi la totalidad de plantas, alimentos y bebidas. En general los taninos son extraídos a partir del material de la planta con etanol, agua, metanol, acetona o mezclas de estos solventes con agua y



sus efectos biológicos dependen usualmente de su grado de polimerización y solubilidad; los taninos altamente polimerizados exhiben baja biodisponibilidad en el intestino delgado y baja fermentabilidad por la microflora intestinal⁽⁴⁹⁾. Sin embargo, taninos de bajo peso molecular exhiben actividad cicatrizante y antioxidante, y ambas actividades relacionadas con estos metabolitos poseen múltiples reportes en la literatura. Como ejemplo se puede citar el trabajo realizado por Toda y col., 2005 en Asia con las hojas de *Houltturnia cordata*, que han sido tradicionalmente utilizadas como medicinales en varias afecciones; en este trabajo se determinó el contenido total de polifenoles, el contenido condensado de taninos que fue de 2,46 %, la prueba de vainillina y la prueba de prontocianidina, estudiándose la relación de estos metanolitos con los ensayos antioxidantes *in vitro*, con lo que se demostró que las hojas de *Houltturnia cordata* poseían un efecto antioxidante por el alto contenido de taninos presentes⁽⁵⁰⁾.

1.5. Métodos para evaluar la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante es ampliamente utilizada como parámetro para caracterizar diferentes materiales vegetales. Esta actividad se relaciona con compuestos capaces de proteger un sistema biológico del efecto potencialmente dañino de procesos que causan excesiva oxidación, involucrando especies reactivas del oxígeno. Existen diversos métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante de muestras biológicas.

Algunos de ellos utilizan la producción de un radical orgánico o especies reactivas del oxígeno y otros se basan en la oxidación-reducción de iones metálicos. Un ensayo universal de la actividad antioxidante *in vitro* no existe, debido a que la actividad anti-radical depende fundamentalmente de la naturaleza del radical y del método de generación del mismo. La elección de un sistema químico para generar especies reactivas es un punto crítico en el desarrollo de cualquier ensayo antioxidante con el fin de obtener resultados relevantes⁽⁵¹⁾.

Los métodos que se utilizarán en este trabajo son ampliamente empleados por diferentes investigadores, el potencial antioxidante de los extractos de plantas, debido a su compleja composición química, debe evaluarse por dos o más métodos que den fe del efecto antioxidante total de los vegetales⁽⁵²⁾. Las pruebas



seleccionadas para el estudio de la actividad antioxidante se describen a continuación:

I. Cuantificación de los compuestos fenólicos – método de Folin-Ciocalteu.

El ensayo espectrofotométrico desarrollado por Folin-Ciocalteu se utiliza para determinar los compuestos fenólicos totales. Se fundamenta en una reacción de oxidación / reducción que es el mecanismo básico; gracias al carácter reductor del reactivo Folin-Ciocalteu ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$): Heteropolianión molibdofoswolfrámico) en el cual el Mo (VI) es reducido a Mo (V) con un e- donado por un antioxidante. Mo (VI) (amarillo) + e- (de AH) \rightarrow Mo (V) (azul)⁽⁵³⁾.

La absorbancia del color azul desarrollado se mide a una longitud de onda de 765 nm y los resultados se expresan en μg de ácido gálico/mL de aceite esencial o mg de muestra, utilizando ácido gálico como un estándar⁽⁵⁴⁾.

La reacción anterior también es aplicada para determinar la capacidad antioxidante total (TAOC, por sus siglas en inglés) en la técnica conocida también por el método del molibdato de amonio. Este ensayo refleja la capacidad de un sistema de defensa antioxidante no enzimático. En este método, llamado también método del fosfomolibdeno, el molibdeno VI (Mo^{6+}) se reduce para formar un complejo de color verde de fosfato/ Mo^{5+} a pH ácido. Valores altos de absorbancia indican que la muestra posee actividad antioxidante significativa⁽⁵⁵⁾.

Método basado en la reacción de transferencia electrónica.

1.5.1. Actividad secuestradora del radical libre DPPH

El fundamento de esta técnica consiste en la medición a 517nm de la reducción del radical estable DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo). La absorbancia característica de este radical, que posee un color violeta intenso, disminuye en presencia de un antioxidante (AH) u otro radical (R). Por tanto, es posible cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que poseen determinados compuestos mediante la determinación del grado de decoloración que provocan a una disolución metanólica de DPPH⁽⁵⁶⁾.





1.5.2. Determinación de la capacidad antioxidante total por el método del molibdato de amonio (TAOC).

Este ensayo refleja la capacidad de un sistema de defensa antioxidante no enzimático. En el método, llamado también método del fosfomolibdeno, el molibdeno VI (Mo6+) se reduce para formar un complejo de color verde de fosfato/ Mo5+ a pH ácido. Valores altos de absorbancia indican que la muestra posee actividad antioxidante significativa⁽⁵⁷⁾.

1.5.3. Ensayo de la fuerza antioxidante reducida del ión férrico (FRAP)

Este método es mayormente conocido por sus siglas en inglés FRAP, fue desarrollado como metodología por Benzie y Strain (1996)⁽⁵⁸⁾, con el objetivo de estimar la capacidad de reducir el ion férrico que contiene el plasma, como medida de su estado antioxidante. En este método se determina la cantidad del catión férrico que se reduce a ferroso en presencia de un agente acomplejante, el denominado TPTZ (2,4,6-tri(pyridyl)-1,3,5-triazine). El complejo de TPTZ y el hierro III actúan con las sustancias antioxidantes obteniéndose como producto un ion complejo de hierro II, TPTZ y sustancias oxidadas. Este ion complejo $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ resultante es de color azul intenso y tiene una absorción máxima a 595 nm. Este ensayo es llevado a cabo a pH ácido (pH 3,6)⁽⁵⁹⁾.

II. *Evaluación de habilidad de los antioxidantes para inhibir o suspender la oxidación lipídica en el sistema adecuado.*

1.5.4. Determinación de la actividad antioxidante total por método de tiocianato férrico (FTC, por sus siglas en inglés)

La peroxidación lipídica es un proceso en cadena mediado por radicales libres que causa la degradación de los lípidos, transcurre en tres fases: iniciación, propagación y terminación⁽⁶⁰⁾. Durante la oxidación de ácido linoleico^(4, 61), los peróxidos se forman en que los cuales oxidan el Fe^{2+} al Fe^{3+} (Figura 3). La última forma iónica establece un complejo con tiocianato de potasio dando el color rojo y presenta una absorbancia máxima a longitud de onda 500nm. Mayor absorbancia indica la oxidación mayor de la emulsión de ácido linoleico^(4, 61).

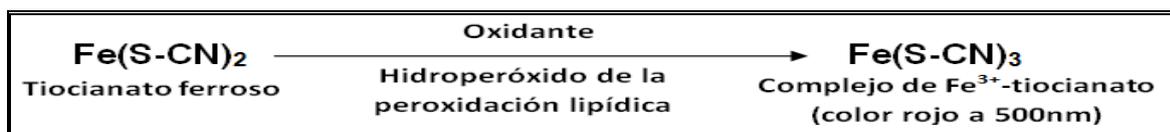




Figura 1.2. Formación del complejo Fe^{3+} -tiocianato desde el complejo Fe^{2+} -tiocianato por hidroperóxido.

El porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica en la emulsión de ácido linoléico se calcula por la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición de peroxidación lipídica} = 100 - \left(\frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

Donde:

A_{sample} : es la absorbancia en presencia de la muestra o compuesto estándar.

A_{control} : es la absorbancia de reacción control.

1.5.5. Ensayo de ácido tiobarbitúrico (TBA, por sus siglas en inglés)

Los productos finales de la peroxidación lipídica son muy variados: alcanos, alquenes, hidroxialquenes, malondialdehído (MDA), epóxidos de ácidos grasos, etc., algunos de los cuales también contribuyen al daño celular.

Uno de los productos secundarios formados en este proceso es el MDA, que se puede evaluar por el método TBA. El TBA se usa como un indicador en el mecanismo químico más usado para determinar la extensión de la peroxidación. Una molécula de MDA reacciona con 2 moléculas de TBA produciendo aductos coloreados (rosa) y dando un máximo de absorción a 532 nm. La intensidad de color proporciona con la concentración de MDA y mayor sea el nivel de MDA indica un incremento de peroxidación lipídica⁽⁶⁰⁾.

1.6. Relación de la actividad antioxidante con el contenido de fenoles presente en la planta.

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Entre otras, intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas y en procesos defensivos frente a patógenos, predadores o radiación ultravioleta. Los compuestos fenólicos presentan un anillo benceno hidroxilado como elemento común en sus estructuras moleculares, las cuales pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc^(4, 61). Aunque existe una gran variedad de compuestos fenólicos en las plantas (se conocen más de 8000), la mayor parte



de ellos tienen como origen metabólico común la ruta del ácido siquímico y el metabolismo de los fenilpropanoides. Los fenilpropanoides simples poseen un esqueleto básico de 9 carbonos (C6-C3) y derivan de los aminoácidos fenilalanina y tirosina producidos en la ruta del ácido siquímico. Las distintas familias de compuestos fenólicos se caracterizan principalmente por el número de átomos de carbono de su esqueleto básico molecular.

Ácidos cinámicos (C6-C3)

Ácidos benzoicos (C6-C1 o C6-C2)

Flavonoides (C6-C3-C6)

Proantocianidinas o taninos condensados ((C6-C3-C6)_n)

Estilbenos (C6-C2-C6)

Cumarinas (C6-C3)

Lignanós (C6-C3-C3-C6)

Ligninas ((C6-C3)_n)

Así, los compuestos fenólicos comprenden desde moléculas simples como los ácidos benzoicos hasta polímeros complejos como las ligninas. Dentro de cada familia, el número de compuestos fenólicos existentes será más o menos variado. Por ejemplo, se conocen más 4000 flavonoides diferentes, distribuidos en varias subfamilias. Los compuestos fenólicos están presentes en todo el reino vegetal y sus cantidades y tipos varían en función de la especie vegetal y variedad, parte de la planta considerada (frutos, semillas, hojas, tallos, etc.), horas de exposición solar, grado de madurez, condiciones de cultivo, procesado y almacenamiento, etc. En los alimentos, los compuestos fenólicos habitualmente se presentan conjugados con azúcares como la glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, o los ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden unirse a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas y lípidos⁽⁶²⁾.

En la actualidad este grupo de compuestos de origen vegetal presenta gran interés nutricional por su contribución al mantenimiento de la salud humana. De hecho, desde 1990, varias organizaciones internacionales en el ámbito de la nutrición recomiendan un consumo diario de al menos 5 raciones de frutas y/o verduras para asegurar una adecuada ingesta de antioxidantes y prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo^(63, 64). Así, muchos de los efectos beneficiosos asociados al consumo de alimentos de origen vegetal se atribuyen en gran medida a



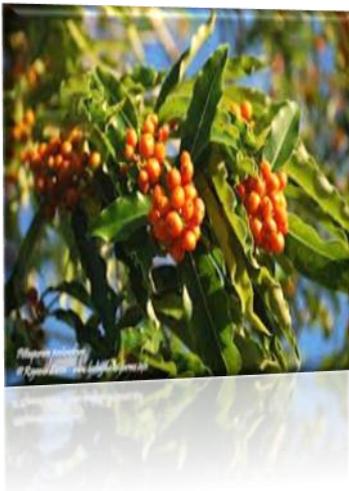
los compuestos fenólicos⁽⁶⁵⁾. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se atribuye a su facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre y a la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático⁽⁶²⁾. Los compuestos fenólicos poseen además una estructura química ideal para captar iones metálicos (principalmente hierro y cobre) y por tanto para inhibir la formación de radicales libres a través de reacciones de Fenton⁽⁶⁶⁾. Además de las propiedades antioxidantes, a estos compuestos se les atribuyen actividades biológicas beneficiosas para salud. Entre estas destacan sus efectos vasodilatadores, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, bactericidas, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales, efectos estrogénicos, o inhibidores de enzimas prooxidantes, como ciclooxigenasa, lipooxigenasa y xantina oxidasa⁽⁶⁷⁾.

1.7. Consideraciones finales de la revisión bibliográfica:

No se encontraron estudios fitoquímicos ni reportes del uso de la *Pittosporum pentandrum*, ni siquiera en la medicina tradicional, por lo que las investigaciones realizadas en el presente trabajo resultaran completamente novedosas para esta planta. Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se estudia la composición de las hojas de la *Pittosporum pentandrum* y sus propiedades antioxidantes.

Después de realizarse una exhaustiva revisión de la literatura especializada se puede resumir lo siguiente:

- (I)- No existen estudios científicos en el campo farmacéutico reportados sobre la planta evaluada.
- (II)- Existe una relación estrecha entre la composición fenólica y de flavonoides en la planta y la actividad antioxidante.
- (III)- La actividad antioxidante transcurre por diferentes mecanismos de acción, siendo las técnicas más empleadas para su evaluación la actividad secuestradora de radical libre DPPH, FRAP, el método de tiocianato férrico y método de ácido tiobarbitúrico.



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS



CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Extractos, equipos y reactivos.

La presente investigación se realizó en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química y Farmacia, durante la etapa comprendida desde febrero 2014 hasta mayo de 2014. Los extractos objetos de análisis se obtuvieron a partir de las hojas y los frutos del *Pittosporum pentandrum*, procedentes del Jardín botánico de la Universidad Central de Las Villas, Villa Clara, Cuba.

La identificación taxonómica del material vegetal se realizó en el lugar de colecta por el especialista Dr C. Alfredo Noa Monzón, cuyo número de ficha es JBVC 19720004, se secó el material vegetal de las hojas en la estufa durante 3 días a 40°C para su evaluación analítica.

Se utilizó, en todos los procedimientos desarrollados, cristalería específica de laboratorio, previamente descontaminada, empleando reactivos de calidad analítica y equipos certificados como aptos para el uso.

Reactivos, equipos, instrumentos de medición.

Autoclave, RAYPA modelo AES-28 España.

Balanza digital, BOECO, Alemania.

Baño ultrasónico, BRANSON 1510, México.

Cristalería de laboratorio.

Roto evaporador, EYELAN 1000, Japón.

Espectrofotómetro UV-VIS, Termo electrón, Genesys 10UV, Estados Unidos.

Estufa, BINDER

Filtro miliporo de 0,45 µm, MILLEX-HA

Incubadoras, HERAEUS modelo IP-20 Klasse 3.1. Alemania

Lámpara UV, CAMAG.

Micropipetas de 5, 20, 100, 1000 µL, EPENDORF, Alemania.

Termostato, MLW. Alemania.

Vórtex mecánico, GILSON, Alemania

Reactivos y disolventes utilizados

- 2,2- difenil-picril-hidracilo (DPPH), SIGMA- ALDRICH.
- 2,4,6 Tripiridil-s-triazina, ACROSS-ORGANICS10 M.
- Acetato de sodio, UNI-CHEM.
- Ácido clorhídrico, UNI-CHEM.



- Ácido Linoleico, MERCK.
- Ácido tiobarbitúrico, SIGMA-ALDRICH.
- Ácido tricloroacético, EPB “Carlos Finlay”.
- Ácido ascórbico, UNI-CHEM.
- Ácido sulfúrico, UNI-CHEM.
- Agua desionizada y destilada.
- Bicarbonato de potasio, UNI-CHEM.
- Buffer fosfato (0,02M, pH 6,6) y (0,04M, pH 7).
- Carbonato de sodio, MERCK.
- Cloruro de metileno, MERCK.
- Cloruro de sodio, UNI-CHEM.
- Cloruro férrico, MERCK.
- Cloruro ferroso, MERCK.
- Etanol, UNI- CHEM.
- Fosfato sódico, RIEDEL-de Haën.
- Heptano, RIEDEL-de Haën.
- Hidróxido de potasio, Panreac.
- Metanol, Lichrosolv, Merck.
- Molibdato de Amonio, REACHIM.
- N-hexano, MERCK.
- Reactivo Folin-Ciocalteau (FCR), SIGMA –ALDRICH.
- Sulfato de sodio anhidro, UNI-CHEM.
- Tiocianato de amonio, MERCK.
- Tiosulfato de sodio, MERCK.
- Tolueno, Scharlau.
- Tricloruro de aluminio, MERCK.
- Tocoferol, SIGMA.
- Quercetina, ACROS-ORGANICS.
- Rutina, ACROS-ORGANICS.
- Polvo de piel, SIGMA- ALDRICH
- Pirogalol, ACROS-ORGANICS.



2.2. Obtención y determinación del rendimiento de extractos secos obtenidos a partir de las hojas y los frutos del *Pittosporum pentandrum*.

Las hojas secas de *Pittosporum pentandrum* se pulverizaron en forma de polvo, mientras que los frutos se procesaron frescos, recién recolectados y cortados manualmente.

2.2.1. Metodología de obtención y almacenamiento de los extractos

Se pesaron 10 g de cada muestra (polvo seco de las hojas y los frutos cortados) y se realizaron extracciones con 100 mL de metanol y n- hexano, a temperatura ambiente, con agitación en Zaranda durante 24h, realizándose separadamente 2 extracciones bajo las mismas condiciones. Los extractos se combinaron y en el caso de los extractos de las hojas se eliminó la clorofila por tratamiento con carbón activado 10% (10 g por 100 mL de extracto)⁽⁶⁸⁾. Los extractos se filtraron y se evaporó el solvente por rotoevaporación. Los extractos secos obtenidos se redisolviaron en 5 mL de metanol y se colocaron en el refrigerador a 4°C hasta su próximo análisis⁽⁶⁹⁾.

2.2.2. Determinación del rendimiento de extractos secos.

Tras el secado, se pesaron los balones (previamente tarados) con extractos secos y se calculó el contenido, expresado en gramo, a través de la siguiente expresión de cálculo:

$$M = \frac{M_2 - M_1}{M_3} \times 100$$

Dónde: **M:** Peso del extracto obtenido.

M₁: Peso del balón vacío.

M₂: Peso del balón con extracto.

M₃: Peso de la muestra (g)

2.3. Determinación del contenido total de compuestos fenólicos en los extractos obtenidos.

El contenido total de compuestos fenólicos en los extractos de *Pittosporum pentandrum* se determinó empleando la reacción de *Folin-Ciocalteu*, según el método de Nurmi (1996), utilizando ácido gálico como el compuesto fenólico de referencia⁽⁷⁰⁾.



Desarrollo de la técnica.

Preparación de la curva de calibración de ácido gálico:

Solución madre de ácido gálico: Se pesó 2 mg del mismo y se disolvió en H₂O destilada y se enrasó a un volumen de 10 mL para obtener una solución madre con concentración 0,2 mg/mL.

Procedimiento: Se pipetearon a partir de la disolución madre de ácido gálico las siguientes alícuotas: 50, 100, 150, 200, 250 μ L y se adicionó a continuación 200 μ L del reactivo de *Folin-Ciocalteu* y 2 mL de Na₂CO₃ 7%. Se completó con H₂O destilada hasta un volumen de 5 mL. Transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia a 765 nm, utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como blanco.

Preparación de los extractos de *Pittosporum pentandrum*:

Solución madre de cada extracto de las hojas: Se pipetearon 100 μ L del extracto metanólico de las hojas, y se disolvieron hasta un volumen de 1 mL con metanol.

Solución madre de cada extracto de los frutos: Se pipetearon 100 μ L del extracto metanólico de los frutos, y se disolvieron hasta un volumen de 1 mL con metanol.

Procedimiento: A partir de las disoluciones madres del extracto, se tomaron 100 μ L del extracto metanólico de las hojas y 25 μ L del extracto metanólico de los frutos, se transfirieron separadamente a un volumétrico de 5 mL, se adicionó a continuación 20 μ L del reactivo de *Folin-Ciocalteu*, 1 mL de Na₂CO₃ 7% y finalmente se completaron a un volumen de 5 mL con H₂O destilada. Luego de transcurrir 30 minutos se midió la absorbancia de cada uno a 765 nm contra el blanco preparado de igual forma sin la muestra. La cantidad de compuestos fenólicos en cada extracto se determinó en mg de contenido fenólico equivalentes de ácido gálico/g de extracto, utilizando la ecuación obtenida en la curva de calibración del ácido gálico.

2.4. Determinación del contenido total de flavonoides en los extractos obtenidos.

El contenido total de flavonoides en los extractos de *Pittosporum pentandrum* se determinó empleando el reactivo AlCl₃, según el método Messaoud y col., (2011) ⁽⁷¹⁾ con algunas modificaciones, utilizando la rutina como el compuesto flavonoide patrón.

Desarrollo de la técnica.

Preparación de la curva de calibración de rutina:

Mey Lyn Díaz Pérez



Solución madre de rutina: Se pesó 2 mg de rutina, se disolvió en H₂O destilada y se enrasó a un volumen de 10 mL, para obtener una solución madre con concentración 0,2 mg/mL.

Solución de AlCl₃ (20 mg/mL): Se pesó 500 mg de AlCl₃ y se disolvió en 25 mL de disolución de ácido acético 5 % (en metanol).

Procedimiento: Se pipetearon a partir de la disolución madre de rutina las siguientes alícuotas: 200, 400, 600, 800, 1000 µL, se enrasaron a 1 mL con metanol 70 %. Se adicionó a continuación 1 mL de AlCl₃ 20 mg/mL. Transcurridos 15 minutos se midió la absorbancia a 430 nm. Se utilizó como blanco la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra.

Preparación de los extractos de *Pittosporum pentandrum*:

Procedimiento: A partir del extracto metanólico de las hojas se tomaron 300 µL, y a partir del extracto metanólico de los frutos se tomó 100 µL y se completaron a 1 mL con metanol 70%, se adicionó a continuación 1 mL del reactivo de AlCl₃ 20 mg/mL. Se esperó 15 minutos y se midió la absorbancia de cada uno a 430 nm, contra un blanco preparado de igual forma sin la muestra. La cantidad de compuestos flavonoides en cada extracto se determinó en mg de flavonoides equivalentes a rutina/g de extracto, utilizando la ecuación obtenida de la curva de calibración de rutina.

2.5. Determinación del contenido total de taninos en los extractos obtenidos.

El contenido total de taninos en los extractos de *Pittosporum pentandrum* se determinó aplicando la técnica descrita por la Farmacopea Europea (2005), con ajustes en las diluciones realizadas, utilizando el pirogalol como el patrón de referencia⁽⁷²⁾.

Desarrollo de la técnica.

Preparación de la muestra: Se Introdujo 10 g de droga pulverizada procedente de las hojas y 10 g de los frutos procesados frescos, recién recolectados y cortados manualmente de *Pittosporum pentandrum* en un frasco de fondo redondo de 250 mL y se añadió 100 mL de agua destilada. Se calentó en un baño de agua a 40°C durante 30 min. Se enfrió en agua corriente y se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL. Se Lavó el frasco de fondo redondo y se reunieron los líquidos de lavado en el matraz aforado, luego se diluyó hasta 100 mL con agua destilada. Se decantaron los sólidos y se filtró el líquido a través de un filtro de papel



de 125 mm de diámetro. Se desecharon los primeros 50 mL del filtrado. Se realizaron todas las operaciones de extracción y dilución protegidas de la luz.

Determinación de polifenoles totales: Se diluyó 5 mL del filtrado hasta 25 mL con agua destilada. Se mezcló 100 μ L de esta disolución con 250 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu y 10 mL de agua destilada y se diluyó hasta 25 mL con una disolución de 290 g/L de carbonato de sodio. Se dejaron transcurrir 30 min y se midió la absorbancia a 650 nm (A_1), utilizando agua destilada como líquido de compensación.

Determinación de polifenoles no adsorbidos sobre polvo de piel: A 10 mL del filtrado, se añadió 0,50 g de polvo de piel y se agitó en baño ultrasónico durante 60 min. Se filtró y se diluyó 5 mL del filtrado hasta 25 mL con agua destilada. Se mezcló 100 μ L de esta disolución con 250 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu y 10 mL de agua y se diluyó hasta 25 mL con una disolución de 290 g/L de carbonato de sodio. Se dejaron transcurrir 30 min y se midió la absorbancia a 650 nm (A_2), utilizando agua como líquido de compensación.

Referencia: Se disolvió inmediatamente antes del uso 20 mg de pirogalol en agua y se diluyó hasta 10 mL con el mismo disolvente. Se diluyó 2 mL de la disolución hasta 10 mL con agua. Se mezclaron 400 μ L de esta disolución con 250 μ L reactivo Folin-Ciocalteu y 10 mL de agua y se diluyó hasta 25 mL con una disolución de 290 g/L de carbonato de sodio. Se dejaron transcurrir 30 min y se midió la absorbancia a 650 nm (A_3), utilizando agua como líquido de compensación.

Se calculó el contenido en porcentaje de taninos expresado como pirogalol utilizando la expresión:

$$\% = \frac{4 \times 10^3 (A_1 - A_2) M_2}{A_3 \times M_1}$$

Dónde: A_1 : Absorbancia de polifenoles totales.

A_2 : Absorbancia de polifenoles no absorbidos sobre polvo de piel.

A_3 : Absorbancia de sustancia de referencia.

2.6. Actividad antioxidante de los extractos obtenidos de *Pittosporum pentandrum*.

La actividad antioxidante de los extractos de *Pittosporum pentandrum* fue comparada con los antioxidantes naturales: quercetina, rutina, tocoferol y vitamina C y por diferentes métodos: Actividad secuestradora del radical libre o DPPH,



capacidad antioxidante total por el método de molibdato de amonio, fuerza antioxidante del ión férrico (FRAP), actividad antioxidante total por el método del tiocianato férrico (FTC), método del ácido tiobarbitúrico (TBA).

2.6.1. Actividad secuestradora del radical libre DPPH.

Preparación de la solución de DPPH:

Para una disolución de DPPH 0,004% (p/v), se pesó 0,004g de DPPH, se disolvió con metanol y se completó el volumen a 100 mL con el mismo solvente (solución de DPPH de 0,01mM).

Preparación de las disoluciones de referencia:

Los antioxidantes naturales: Quercetina, rutina, tocoferol y vitamina C fueron usados como controles positivos. Para cada uno de estos se realizó una curva de calibración en el rango de concentraciones 2,5 a 12,5 $\mu\text{g/mL}$ para la Quercetina y para la Rutina se utilizaron concentraciones: 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$; para la vitamina C: 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ y 25 $\mu\text{g/mL}$ y para el tocoferol se utilizaron concentraciones de: 2 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 6 $\mu\text{g/mL}$ y 8 $\mu\text{g/mL}$; con el objetivo de determinar el valor de IC_{50} a partir de la ecuación de regresión obtenida en cada caso. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Preparación de los extractos de *Pittosporum pentandrum*:

Disolución madre de cada extracto: Se tomó 100 μL de los extractos metanólicos y se disolvieron en un volumen de 2 mL con metanol.

A partir del extracto metanólico de los frutos se tomaron alícuotas de 100, 200, 300 y 400 μL y se disolvieron en un volumen de 1 ml de metanol.

A partir del extracto metanólico de las hojas se tomaron 25 μL , 50 μL , 75 μL y 100 μL y se disolvieron en un volumen de 1 ml de metanol. A partir de las soluciones madres se realizaron las curvas de calibración correspondientes para cada muestra evaluada.

Procedimiento:

A 3 mL de una solución de DPPH (concentración 0,004 % (p/v)) se le adicionó 1mL de cada muestra evaluada. Después se colocaron durante 30 minutos en la oscuridad y se midió la absorbancia a 517 nm frente a un blanco ⁽⁷³⁾. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Cálculo:

Mey Lyn Díaz Pérez



El por ciento de inhibición del radical libre DPPH fue calculado por:

$$\% \text{ Efecto secuestrador} = \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100$$

Dónde: A_{DPPH} : es la absorbancia del control (contiene todos los reactivos excepto la muestra).

A_{S} : es la absorbancia de la muestra.

El valor de IC_{50} (concentración de muestra que se requiere para reducir el 50 % los radicales libres) fue calculado para cada muestra a partir de la ecuación de regresión, preparada a partir de concentraciones de extractos y de los antioxidantes sintéticos y vegetales y el porcentaje de inhibición de la formación de radicales libres. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

2.6.2. Capacidad antioxidante total (TAOC).

La capacidad antioxidante total (TAOC) en los extractos de *Pittosporum pentandrum* fue determinado por el método del molibdato de amonio según el método de Umamaheswari y Chatterjee (2008)⁽⁷⁴⁾, utilizando ácido ascórbico como sustancia de referencia.

Preparación de la curva de calibración de ácido ascórbico

Solución madre de ácido ascórbico: Se pesó 5 mg del compuesto se disolvió en H_2O destilada y se enrasó a un volumen de 1 mL para obtener una solución madre con concentración 5mg/mL (Disolución A). Se pipetearon a partir de la disolución A las siguientes alícuotas: 20, 40, 60, 80, 100 μL y se completaron a 1mL con H_2O destilada para completar la curva de calibración.

Procedimiento: Se tomó 300 μL de cada disolución de la curva, se adicionó 3mL de la mezcla de los siguientes reactivos (1 mL de ácido sulfúrico 0,6M, 1 mL de fosfato de sodio 28mM y 1 mL de molibdato de amonio 4mM). Las muestras se calentaron durante 90 minutos a 95°C , se enfriaron y se midió la absorbancia a 695nm, utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como blanco.

Preparación de los extractos de *Pittosporum pentandrum*:

Solución madre de cada extracto: Se pipeteó 50 μL de del extracto metanólico de las hojas (concentración 146,12 mg/mL) y se disolvió en 1 mL con agua. Se pipeteó



25 μL del extracto metanólico de los frutos (concentración 302 mg/mL) y se disolvió en 1 mL con agua.

Procedimiento: Se tomó la totalidad de las disoluciones madre de cada muestra y se adicionó 3mL de la mezcla de los siguientes reactivos (1 mL de ácido sulfúrico 0,6M, 1 mL de fosfato de sodio 28 mM y 1 mL de molibdato de amonio 4 mM). Las muestras se calentaron durante 90 minutos a 95°C, se enfriaron y se midió la absorbancia a 695nm, utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como blanco.

La capacidad antioxidante total en cada extracto se determinó en mg equivalente de ácido ascórbico/g de extracto, utilizando la ecuación obtenida de la curva de calibración de ácido ascórbico.

2.6.3. Determinación del poder reductor/antioxidante férrico (FRAP).

La determinación del poder reductor/antioxidante férrico (FRAP) en los extractos de *Pittosporum pentandrum* fue determinado por el método del 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) según el método de Benzie y Strain, (1996) ⁽⁷⁵⁾, utilizando sulfato ferroso como sustancia de referencia.

Preparación del reactivo (FRAP): 10 volúmenes de acetato de sodio 300 mM, 1 volumen de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM y 1 volumen de cloruro férrico 20 mM.

Preparación de las muestras: Se toman 200 μL del extracto metanólico de los frutos, 250 μL del extracto metanólico de las hojas y se diluyen en 1 mL de agua destilada.

Procedimiento: Se toman 200 μL de cada muestra, se le adiciona 3,8 mL del reactivo FRAP. Transcurrido 5 minutos se realiza la lectura a 593 nm.

2.6.4. Método del tiocianato férrico (FTC).

La actividad antioxidante de los extractos fue determinada, además, empleando el método del tiocianato férrico (FTC) en la emulsión del ácido linoleico con algunas modificaciones al método propuesto por Haraguchi (1992) ⁽⁷⁶⁾.

Preparación de cada muestra:

Se prepararon disoluciones madres de quercetina, rutina, vitamina C y tocoferol (como patrones) y los extractos de las hojas y de los frutos de *Pittosporum pentandrum* con concentración 10 mg/mL (p/v), utilizando el etanol absoluto como solvente (Disolución A).



Se pesó 0,25 g de ácido linoleico, se disolvió en etanol absoluto y se enrasó a un volumen de 10 mL en matraz aforado (solución obtenida 2,5%).

Procedimiento:

En este método cada muestra fue colocada en un medio de reacción con la siguiente composición: 0,04 mL de disolución A de cada muestra, 0,4 mL de ácido linoleico 2,51%, 0,8 mL de buffer fosfato 0,04 M, pH=7 y 0,38 mL de agua destilada. Las muestras fueron incubadas a 40°C en la oscuridad. La disolución de ácido linoleico se empleó como el control negativo.

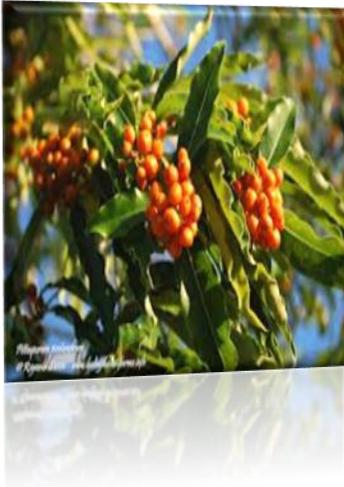
Se realizó una determinación espectrofotométrica de cada muestra cada 24 horas y se siguió el siguiente procedimiento: Se tomó 0,05 mL de cada muestra, se diluyó con 2,85 mL de etanol 75% y se adicionó 0,05 mL de FeCl₂ 0,02M en HCl 3,5%. Se esperó 3 minutos y se añadió 0,05 mL de tiocianato de amonio al 30%. Se midió la absorbancia a 500 nm teniendo etanol 75% como blanco hasta alcanzar un valor de absorbancia máximo para el patrón utilizado.

2.6.5. Método del ácido tiobarbitúrico (TBA).

Se determinó el valor TBA de cada muestra, el cual se realiza en la última hora del ensayo FTC, utilizando la misma disolución preparada e incubada para este ensayo.

Procedimiento:

Se tomó 0,5 mL de cada disoluciones muestra preparadas para el ensayo FTC. Se adicionó 1 mL de ácido tricloroacético 20% y 1 mL de disolución de TBA acuosa 0,67%. Las mezclas se sumergieron en un baño de agua 95°C durante 10 minutos, se enfriaron. La actividad antioxidante se mide por la absorbancia a 532 nm contra el blanco preparado sin la muestra.



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN



CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Determinación del rendimiento de los extractos obtenidos

Los valores del rendimiento de los extractos obtenidos se muestran en la **tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Rendimiento obtenido para los extractos de *Pittosporum pentandrum*.

Extractos	Peso del polvo (g)	Extractos secos obtenidos (g)	Rendimiento (%)
Ext. Hojas	10	1.52	15,2
Ext. Frutos	10	1.32	13,2

Como se observa el extracto de los frutos tuvo un mayor rendimiento que el extracto de las hojas, aunque la diferencia no es grande.

3.2. Resultados del contenido fenólico total en los extractos evaluados.

La determinación del contenido fenólico total en extractos obtenido de plantas medicinales han sido reportado en múltiples investigaciones, justificado por la relación directa de estos compuestos una variedad de efectos biológicos que incluyen, entre otras, la actividad antioxidante⁽⁷⁷⁾. El contenido total de compuestos fenólicos fue calculado empleando la curva de calibración del Ácido Gálico (**Figura 3.1**).

Como resultados se obtuvo que el contenido total de compuestos fenólicos para cada extracto fueron: para el extracto de los frutos de 5 mg de ácido gálico equivalentes/g de extracto, cinco veces superior al obtenido para el extracto de las hojas, cuyo valor fue 1.5 mg de ácido gálico equivalentes/g de extracto. Estos resultados sugieren que el extracto de los frutos debe mostrar mayor actividad antioxidante. Estos valores son específicos para cada extracto y no se encuentran reportados en la literatura para esta planta.

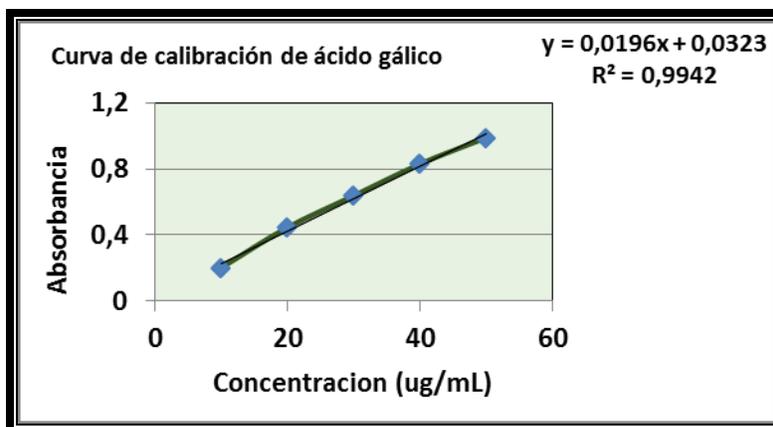


Figura 3.1. Curva de calibración del Ácido Gálico.

3.3. Resultados del contenido de flavonoides en los extractos.

Los flavonoides son distribuidos extensamente en los productos derivados de origen natural y tienen demostrada su actividad antioxidante. Además, muchos estudios han reportado que un incremento del contenido de flavonoides en la dieta podría reducir ciertas enfermedades. En el presente trabajo el contenido total de flavonoides fue calculado como la cantidad equivalente de rutina sobre el peso del extracto, utilizando una curva de calibración de la Rutina como referencia (figura 3.2).

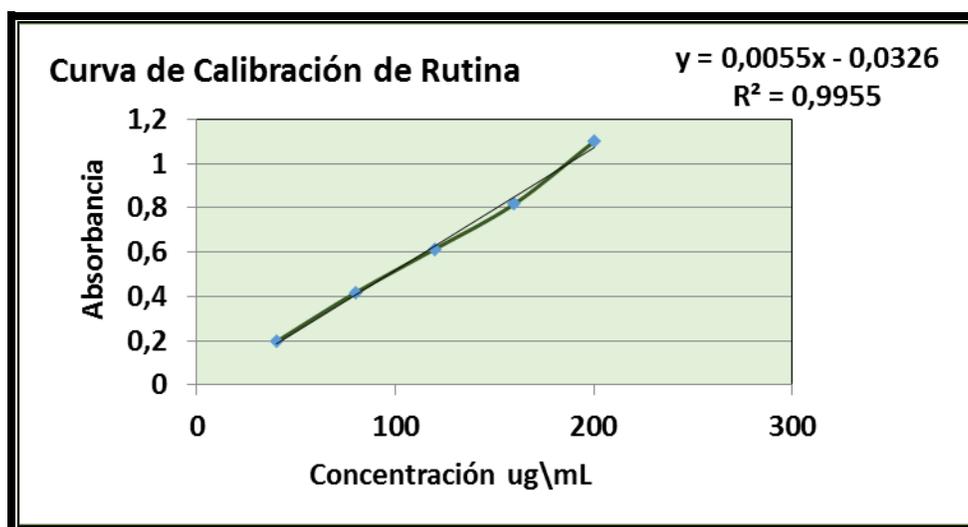


Figura 3.2. Curva de calibración del rutina, para la determinación del contenido de flavonoides.

El contenido de flavonoides totales en los extractos evaluados, de las hojas y los frutos se expresa como la cantidad (mg) equivalente a rutina por gramo del extracto. El resultado indica que el extracto de los frutos posee cantidades significativamente superiores de flavonoides con respecto al extracto de las hojas (Frutos: 4,15 mg; hojas: 1,35 mg de rutina equivalentes/g de extracto). Estos valores se encuentran en total correspondencia con los resultados obtenidos en el contenido fenólico e igualmente debe tener relación directa con la actividad antioxidante de los mismos.

Al comparar los valores obtenidos con el contenido de flavonoides presente en otros extractos de plantas medicinales reportados en la literatura (**tabla 3.2**), se observa que el valor de flavonoides obtenido tanto para los frutos como para las hojas quedó por debajo, lo que constituye un aspecto a considerar al valorar la actividad antioxidante de ambas partes de la planta.

Tabla 3.2. El contenido total de flavonoides del extracto de algunas plantas medicinales publicado en la literatura.

Nombre de planta	Contenido total de flavonoides publicado (mg/g)	Bibliografía
<i>L. multifida</i>	12,3	(78)
<i>L. stoechas</i>	10,1	
<i>V. agnus castus fruta</i>	10,8	(79)

3.4. Resultados del contenido del contenido de taninos en la planta.

La determinación del contenido de taninos en la planta se realizó siguiendo la metodología descrita en las farmacopeas vigentes para las hojas y los frutos de forma independiente. Para las hojas de *Pittosporum pentandrum* se obtuvo un porcentaje de taninos de 4% y para los frutos 0,28%. Al analizar estos resultados, por comparación con valores de este parámetro reportado en las monografías analíticas de plantas medicinales en la Farmacopea Europea, (2005), consideradas plantas ricas en estos metabolitos al ser seleccionados los mismos como trazadores para realizar su control de calidad (*Vaccinium myrtillus* L (1%), *Agrimonia eupatoria* (2%), *Hamamelis virginiana* (3%), *Quecus robor* (3%),

Lythrum salicaria (5%)) se observa claramente que las hojas del *P. pentandrum* son ricas en taninos, mientras que sus frutos poseen valores despreciables; ⁽⁷²⁾. Este aspecto resulta importante para proponer posibles usos de las hojas de la planta en la medicina tradicional cubana si se tiene en cuenta que conocidas plantas con estas características (Ej. Mangle rojo) están incluidas en el Programa de Medicina Tradicional por sus amplias potencialidades como cicatrizantes.

3.5. Actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de las hojas de *Pittosporum pentandrum*.

La actividad antioxidante de los extractos de las hojas de *Pittosporum pentandrum* fue evaluada comparando con los antioxidantes sintéticos y vegetales Vitamina C, Vitamina E, Rutina y Quercetina, por diferentes métodos: actividad secuestradora del radical libre DPPH, Fuerza antioxidante reducida del ión férrico (FRAP), capacidad antioxidante total (TAOC), método del tiocianato férrico (FTC) y valor de ácido tiobarbitúrico (TBA). La selección de estos métodos obedece a incluir ensayos que abarquen los dos grupos de agentes antioxidantes, clasificados según el mecanismo de reacción: Los que miden la habilidad secuestradora a los radicales libres y los que evalúan la peroxidación lipídica⁽⁷³⁾. En el primer caso se incluyeron los ensayos, DPPD, FRAP y TAOC, mientras que en el segundo caso se incluyó el estudio en ácido linoleico desarrollando los ensayos de FTC y TBA.

A continuación se exponen los resultados de dichos ensayos:

3.5.1. Actividad secuestradora del radical libre DPPH.

En este ensayo se procesaron las curvas de calibración correspondientes a cada uno de los patrones utilizados (Vitamina C, Vitamina E, Rutina y Quercetina) y los extractos evaluados en el estudio, de las cuales se obtuvo las ecuaciones de las rectas y el coeficiente de correlación para cada caso. La **Figura 3.2** muestra las curvas obtenidas para los patrones antioxidantes (A: Vitamina C; B: Vitamina E; C: Rutina y D: Quercetina), mientras que la **Figura 3.3** muestra las curvas

obtenidas para los extractos evaluados (E: Hojas; F: Frutos). Estas curvas permitieron determinar el valor de IC₅₀ para cada muestra, valores que aparecen descritos en la **Tabla 3.1**.

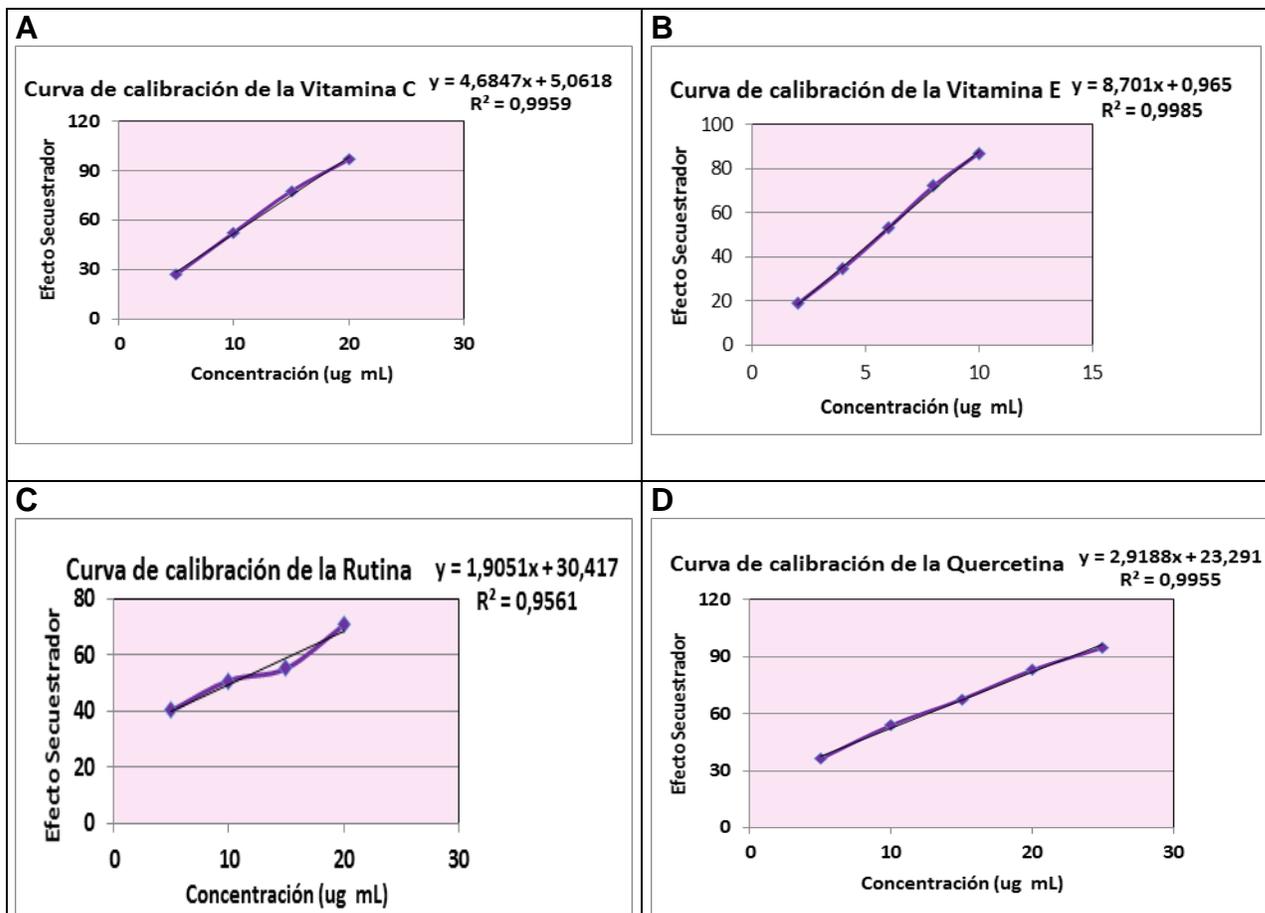


Figura 3.2. Curvas de calibración obtenidas para los patrones estudiados en el ensayo de la actividad secuestradora del radical libre DPPH (A: Vitamina C; B: Vitamina E; C: Rutina y D: Quercetina).

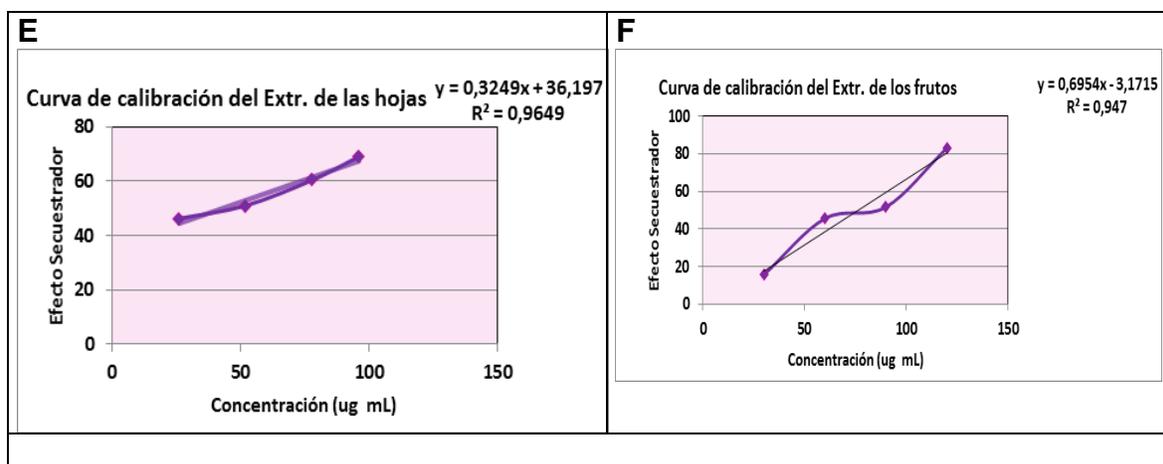


Figura 3.3.Curvas de calibración obtenidas para los extractos estudiados en el ensayo de la actividad secuestradora del radical libre DPPH (E: Hojas; F: Frutos).

Cada curva muestra que la actividad secuestradora se incrementa con el aumento de la concentración de la muestra debido a la reacción de donación de electrones entre las moléculas de antioxidante y los radicales libre⁽⁵⁹⁾. Ellas también permitieron determinar el valor de IC₅₀ para cada muestra, siguiendo la metodología de Litchfield y Wilcoxon. Los valores de IC₅₀ obtenidos para las muestras evaluadas aparecen descritos en la **tabla 3.2**.

Tabla 3.2. Resultados de la actividad secuestradora del radical DPPH de los patrones de antioxidantes y los extractos evaluados.

Muestras	Concentraciones (µg/mL)	Inhibición (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
Vitamina C	5	27,20	8,5
	10	52,63	
	15	77,74	
	20	96,91	
Vitamina E	2	18,77	5,6
	4	34,78	
	6	53,02	
	8	72,22	
	10	87,06	
Quercetina	2,5	36,22	9,17
	5	53,95	
	7,5	67,52	

	10	83,01	
	12.5	94,66	
Rutina	5	40,26	10,28
	10	50,90	
	15	55,19	
	20	70,58	
Extracto Frutos	30	15,60	43,15
	60	45,57	
	90	51,65	
	120	83,11	
Extracto Hojas	26	46,25	76,7
	52	51,00	
	78	60,42	
	96	69,00	

Si se tiene en cuenta que los bajos valores de IC₅₀ obtenidos para los patrones de antioxidantes son representativos de una marcada actividad antioxidante se puede inferir que la actividad antioxidante de los dos extractos evaluados no es muy buena para las concentraciones estudiadas, por este mecanismo de acción antioxidante. El valor obtenido de IC₅₀ para el extracto del fruto es superior al de las hojas y resulto ser aproximadamente unas cuatro veces inferior a los patrones quercetina y rutina. Este resultado se puede considerar adecuado si se valora que el extracto posee una variada composición de metabolitos, pero en muy baja concentración. Además, al comparar los valores obtenidos de IC₅₀ para otros extractos de plantas medicinales referidos en la literatura (**tabla 3.3**), se observa que los valores de los extractos evaluados se encuentran por debajo de los obtenidos para los patrones de antioxidantes, sin embargo, superan considerablemente los reportados para extractos de igual naturaleza de otras plantas medicinales.

Tabla 3.3. Valores de IC₅₀ de plantas medicinales publicados en la literatura.

Nombre de planta (Extractos Metanólicos)	IC ₅₀ (µg/mL)	Bibliografía
<i>L. coronopitofolia</i>	162,2	(80)
<i>L. multifida</i>	201,6	
<i>L. stoechas</i>	2327,7	

El efecto secuestrador del radical DPPH de las muestras estudiadas se resume en el siguiente orden:

Vitamina E > Vitamina C > Quercetina > Rutina > Extracto Frutos > Extracto Hojas.

3.5.2. Fuerza antioxidante reducida del ión férrico (FRAP).

La determinación del poder reductor/antioxidante férrico (FRAP) fue calculado empleando la curva de calibración de Sulfato ferroso (**Figura 3.4**) y se expresa en mmol/L de FeSO₄ equivalentes por gramo de extracto. Los resultados obtenidos para este ensayo se reflejan en la **Figura 3.5** donde se observa con claridad que los mejores resultados fueron obtenidos para el extracto metanólico, seguido por el extracto de acetato de etilo y etanólico.

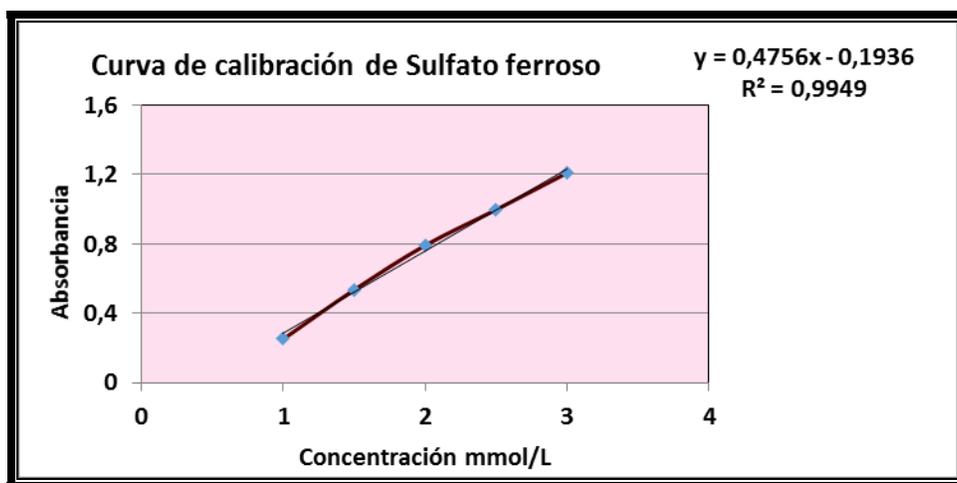


Figura 3.4. Curva de calibración del ión férrico

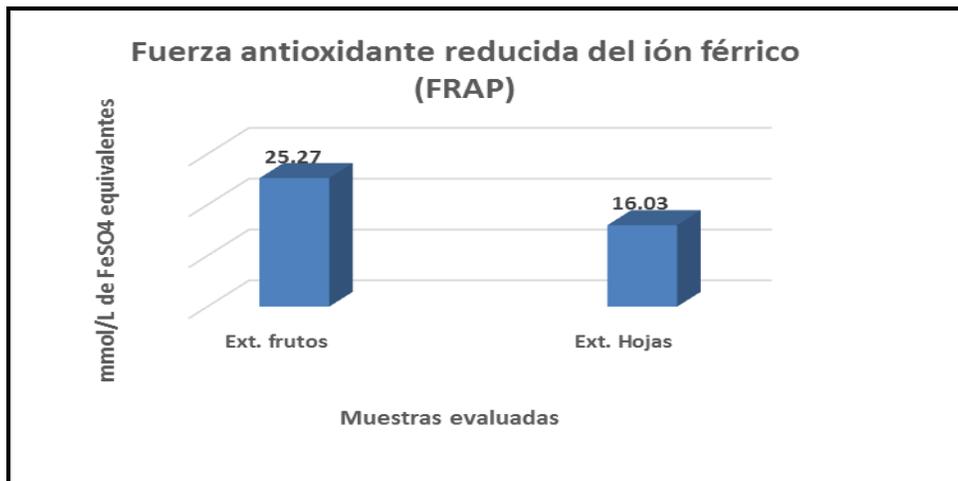


Figura 3.5. Resultados del comportamiento del poder reductor/antioxidante para los extractos evaluados.

Al comparar los resultados obtenidos en el ensayo con los reportados en la literatura para extractos de otras plantas medicinales (Tabla 3.3) se observa que los resultados obtenidos para los extractos evaluados en el presente trabajo superan lo reportado para las plantas *Salvia lanígera* y *Zingiber officinale*, siendo similar para *Rosmarinus officinalis*, avalando la actividad antioxidante de los mismo, por este mecanismo. La habilidad para reducir Fe(III) podría ser atribuida a la donación de hidrógeno de los compuestos fenólicos presentes, lo cual está también relacionada a la presencia de agentes reductores, así como al número y la posición de grupos hidroxilos que juegan un rol importante en la actividad antioxidante que manifiesta cualquier compuesto⁽⁵⁹⁾.

Tabla 3.3. Ejemplo del poder reductor\antioxidante férrico (FRAP) de extractos de plantas medicinales publicado en la literatura como mmol/L de FeSO₄ equivalentes por gramo de extracto seco para otras plantas medicinales.

Nombre de planta	Poder reductor\antioxidante férrico (FRAP)	Bibliografía
<i>Salvia lanigera</i>	6,44 ± 0,4 mmol/L	(77)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	16,53 – 21,77 mmol/L	(81)
<i>Zingiber officinale</i>	0,806 mmol/L	(82)

3.5.3. Capacidad antioxidante total.

La capacidad antioxidante total fue calculada empleando la curva de calibración del Ácido ascórbico (**Figura 3.6**).

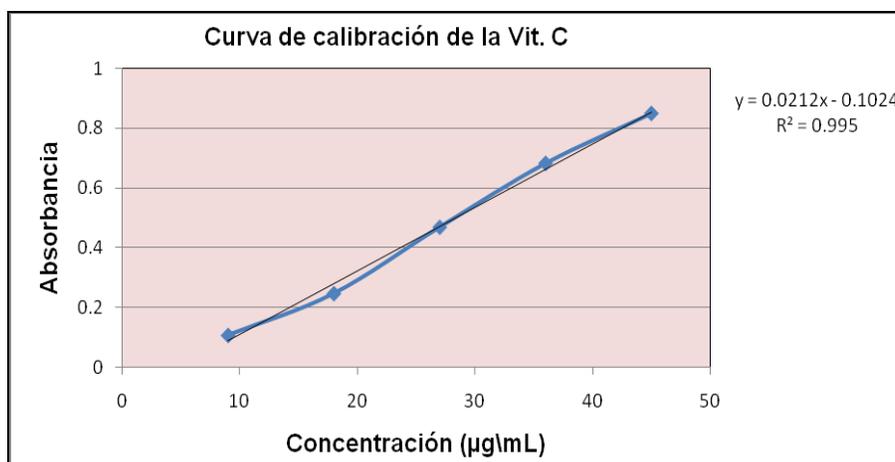


Figura 3.6. Curva de calibración del Ácido Ascórbico o Vitamina C

A partir de la ecuación de la recta se determinó la capacidad antioxidante total obtenida para cada extracto (Figura 3.7) como se observa el extracto de los frutos mostró el doble de la actividad antioxidante con un valor de 21,9 mg de ácido ascórbico equivalentes/g de extracto, mientras que para el extracto de las hojas se obtuvo 11,1 mg de ácido ascórbico equivalentes/g de extracto, respectivamente. Estos resultados se corresponden totalmente con los resultados obtenidos en los ensayos de DPPH y FRAP. Estos valores son específicos para cada extracto y no se encuentran reportados en la literatura para esta planta.

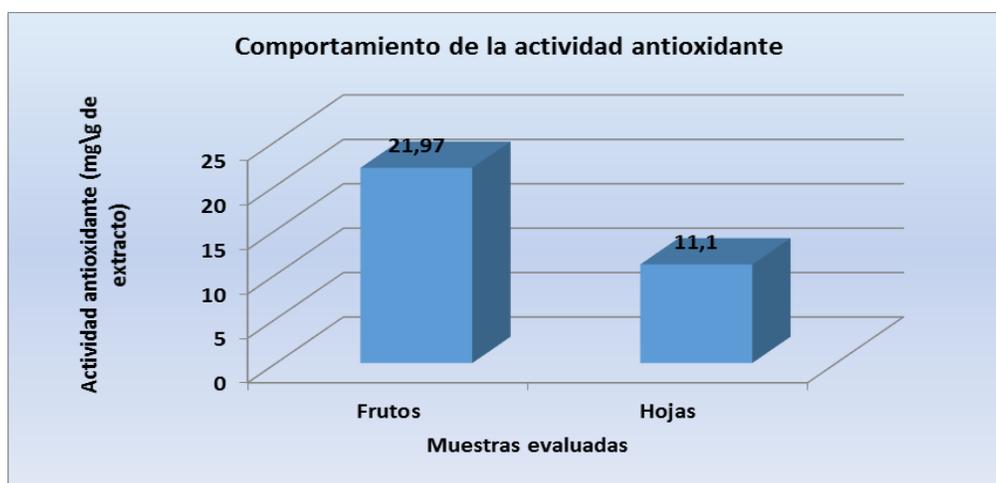


Figura 3.7. Actividad antioxidante total de los extractos obtenidos de las hojas de *Pittosporum pentandrum*.

3.5.4. Actividad antioxidante por el método FTC.

Es un método simple que se desarrolla en un período de tiempo largo (siete días). Bajos valores de absorbancia son indicativos de una baja concentración de peróxidos formados en la etapa inicial de la peroxidación lipídica del ácido linoleico y por tanto de una alta actividad antioxidante. Los valores obtenidos sin aditivos fueron tomados por un 100% de peroxidación lipídica. La **tabla 3.4** muestra los valores de absorbancia en el tiempo con los diferentes aditivos.

Tabla 3.4. Valores de absorbancia del aceite esencial y antioxidantes sintéticos en el sistema primario de oxidación del ácido linoleico por el método FTC durante 7 días.

Muestras estudiadas	Valores de absorbancia							
	0 día	1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	6 día	7 día
Extr.Frutos	0,503	0,654	0,563	0,496	0,454	0,476	0,365	0,27
Extr.Hojas	0,316	0,619	0,582	0,345	0,369	0,469	0,286	0,181
Rutina	0,302	0,593	0,456	0,272	0,266	0,472	0,469	0,306
Quercetina	0,416	0,457	0,389	0,27	0,323	0,386	0,319	0,234
Vitamina C	0,386	0,923	0,869	0,808	0,622	0,476	0,388	0,186
Vitamina E	0,543	0,506	0,456	0,383	0,665	0,576	0,456	0,492
Control	0,37	0,997	0,998	0,976	0,976	0,616	0,669	0,696

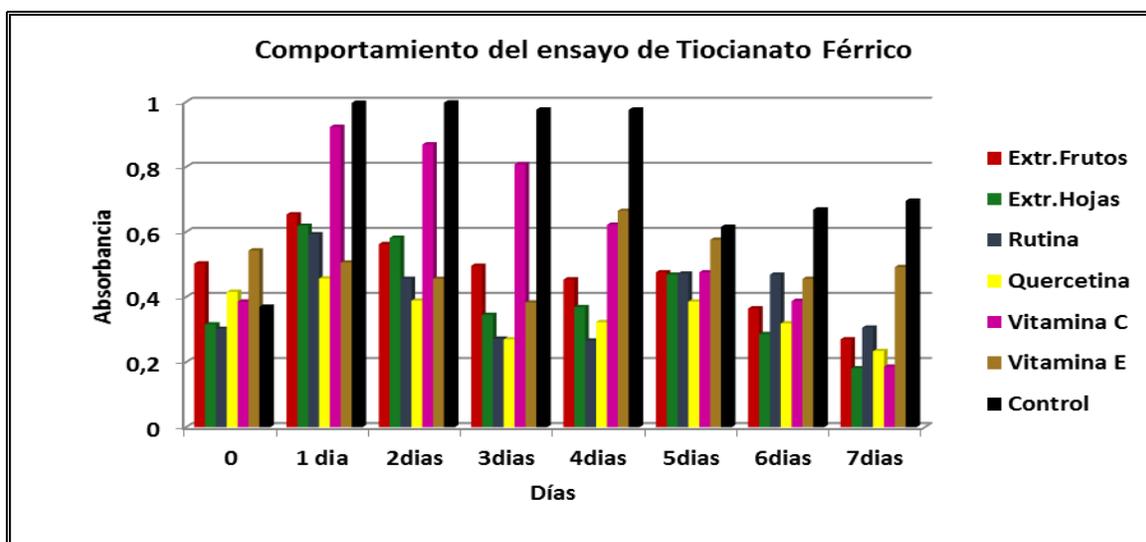


Figura 3.7. Comportamiento del efecto inhibitorio de los patrones de antioxidantes y los extractos en el sistema primario de oxidación del ácido linoleico por el método FTC.

En la **figura 3.7** se observa que ambos extractos muestran un efecto inhibitorio similar a los patrones de antioxidantes rutina, quercetina y vitamina E, ligeramente mejor que la vitamina C (evaluados simultáneamente), durante los primeros cinco. A partir del sexto día se observa un mejor comportamiento para el extracto de las hojas logrando valores similares a la vitamina C, teniendo en cuenta lo anterior se deduce que a partir del quinto día ocurre una disminución brusca de sus valores de absorbancia, lo que es indicio de una mayor incidencia en la eliminación de los hidroperóxidos. A partir de este tiempo los extractos mantienen un comportamiento estable, logrando disminuciones de los valores de absorbancia con respecto al control. Lo anterior permite asegurar que, por este mecanismo, los extractos evaluados muestran un comportamiento antioxidante, que pudiera compararse con los resultados obtenidos para la rutina y quercetina, por este mecanismo de acción.

3.5.5. Actividad antioxidante por el método TBA.

Mientras que el FTC mide la cantidad de los peróxidos formados en la etapa inicial de la peroxidación lipídica de ácido linoleico, el valor TBA estima la producción de los productos de oxidación secundarios (malonaldehído, MDA) para determinar la extensión de la peroxidación. Por eso, el ensayo se hace al finalizar el ensayo de FTC. En la **figura 3.8 y tabla 3.5** se muestran los valores de TBA en las diferentes muestras evaluadas.

Tabla 3.5. Valores de TBA de los patrones de antioxidantes y los extractos en el sistema del ácido linoleico.

Muestras	Absorbancia
Extr.Frutos	1,79
Extr.Hojas	2,577
Rutina	2,711
Quercetina	2,041
Vitamina C	1,834
Vitamina E	2,963
Control	2,646

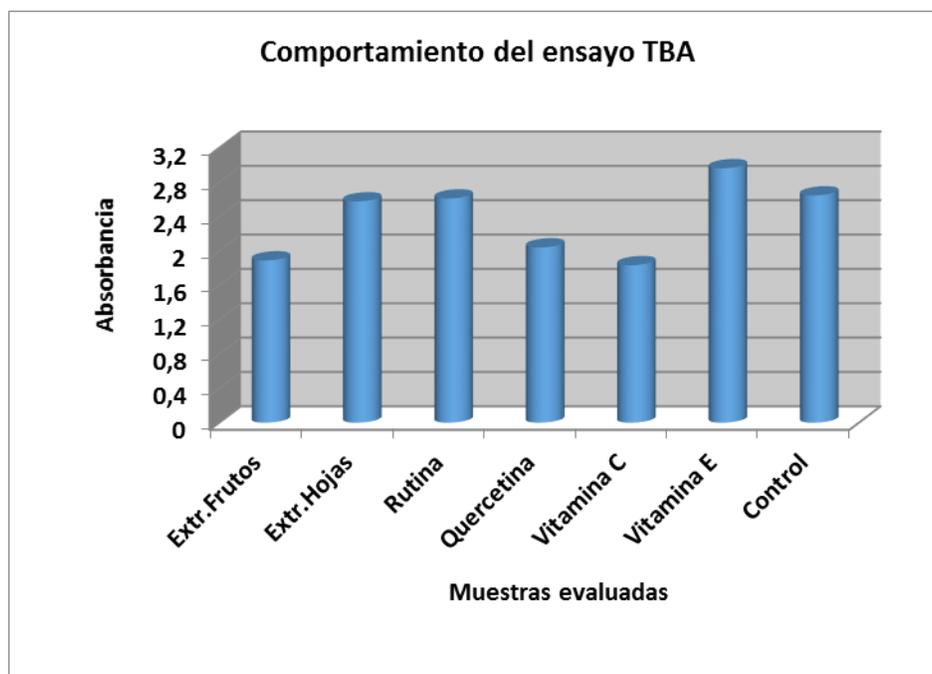
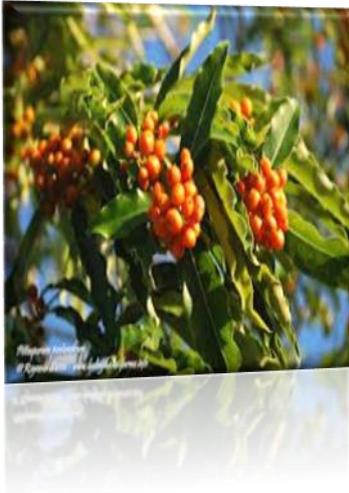


Figura 3.8. Efecto antioxidante de los patrones de antioxidantes y los extractos en término de valores de TBA.

Los resultados obtenidos se corresponden completamente con el ensayo anterior, el extracto de los frutos resultó similar a la quercetina, mientras que el extracto de las hojas se acerca más a los resultados obtenidos para la rutina. La similitud en el comportamiento para estos dos últimos ensayos resulta muy importante ya que permite afirmar que los extractos ejercen acción antioxidante en las dos etapas de oxidación, es decir, los extractos muestran actividad antioxidante ante la peroxidación lipídica primaria y secundaria, comparada con los patrones rutina y quercetina.



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES



CONCLUSIONES

1. El rendimiento obtenido para los dos extractos metanólicos evaluados fue de: 15,2% y 13,2%, para el extracto de los frutos y las hojas, respectivamente.
2. El extracto de los frutos tiene un contenido fenólico y de flavonoides superior al extracto de las hojas, aunque los valores obtenidos en ambos casos son bajos con respecto a otras plantas medicinales.
3. Las hojas poseen un alto contenido de taninos (4%), superior al de un gran número de plantas reportadas en las farmacopeas vigentes, mientras que los frutos posee un porcentaje cuatro veces inferior (0,68%).
4. El extracto de los frutos mostró una actividad antioxidante superior al de las hojas, en el mecanismo de la captación de radicales y similar en el mecanismo de la peroxidación lipídica.
5. El contenido fenólico y de flavonoides mostró un comportamiento similar a los ensayos antioxidantes *in vitro* aplicados para ambos extractos.

RECOMENDACIONES

1. Continuar los estudios de la composición de los extractos de ambas partes de la planta, hasta lograr identificar los componentes mayoritarios presentes en las mismas.
2. Realizar otros ensayos antioxidantes *in vitro e in vivo*, que permitan llegar a conclusiones más definitivas con respecto a esta actividad en la planta.

REFERENCIAS



BIBLIOGRÁFICAS



REVISION BIBLIOGRAFICA

1. Plantas medicinales. Research.php.pageno all Available from: [HTTP://www.pharma.univas.ch/bio/4](http://www.pharma.univas.ch/bio/4).
2. Bandoni A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Argentina: Editorial Universidad de la Plata; 2000.
3. Arctander S. Perfume and flavour materials of natural origin. Allured E, editor 1960.
4. Singh G, Kapoor I, Singh P, Heluani S, Lampasona P, Catalan C. Chemistry, antioxidant, antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of Zingiber officinale. Food and Chemical Toxicology. 2008;46:3295-302.
5. APIFÁRMACOS. GTDDFY, editor. Ed. Pueblo y Educación. ed. Ciudad de la Habana 1992.
6. De la Torre- Carreras R, López Gonzalez J. Las plantas aromáticas y medicinales. Futuro y potencialidad en Extremadura. La agricultura y la ganadería extremeñas 2010.
7. Marinoff M. Las plantas medicinales desde la Biblia a la actualidad. Chaco, Argentina: Universidad Nacional del Nordeste.; 2006.
8. Navarro C. Uso racional de las plantas medicinales. Pharmaceutical Care España. 2000;2:9-19.
9. Akerele O. Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. Foro Mundial de la Salud. 1993;14:390-5.
10. Alonso O. Planta medicinales: Del uso tradicional al criterio científico. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2004.
11. Akerele O. The WHO traditional medicine program: policy and implementation. Int. Trad. Med. Newslett. 1985;1:1-3.
12. Bermúdez A, Oliveira-Miranda MA, Velázquez D. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. Interciencia. 2005;30(8).
13. Gruenwald S. The global herbs: Botanical Market; 2010.
14. Little J, Elbert L, Roger G. Common Forest Trees of Hawaii (Native and Introduced). In: Service USF, editor. 2010-02-07 ed 1989.
15. Imp. Univ. Tokyo. Pittosporum formosanum Hayata in Matsumura & Hayata. In: Li HL, editor. P formosanum var hainanense Gagnepain; P pentandrum var hainanense (Gagnepain): J.Coll.Sci; 1906. p. 32.
16. Consolacion Y, Ragasa J, Rideout A, Tierra D, Coll JC. Sesquiterpene glycosides from Pittosporum pentandrum. . Phytochemistry. 1997;45(3):545-54.
17. Teixeira T, Rosa J, Rainha N, Baptista J, Rodrigues A. Assessment of molluscicidal activity of essential oils from five Azorean plants against Radix peregra. Chemosphere. 2012;3(87):1-6.
18. Medeiros J, Campos L, Mendonça S, Davin L, Lewis N. Composition and antimicrobial activity of the essential oils from invasive species of the Azores, Hedychium gardnerianum and Pittosporum undulatum. Phytochemistry. 2003;64(2):561-5.
19. Barbosa P, Lima A, Vieira P, Dias L, Tinoco M, Barroso J, et al. Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, Bursaphelenchus xylophilus. J Nematol. 2010 42(1):8-16.
20. Mendes S, Mansoor T, Rodrigues A, Armas J, MJ F. Anti-inflammatory guaiane-type sesquiterpenes from the fruits of Pittosporum undulatum. . Phytochemistry. 2013;Nov(95):308-14.



21. Sadgrove N, Jones G. Chemical and biological characterization of solvent extracts and essential oils from leaves and fruit of two Australian species of Pittosporum (Pittosporaceae) used in aboriginal medicinal practice. *Ethnopharmacol.* 2013 145(3):813-21.
22. Miranda M, Cuéllar A. *Farmacognosia y productos naturales*. La Habana: Editorial Félix Varela; 2001. 135-58. p.
23. Giergielewicz-Mozajska H, Browksi L, J N. Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples some aspects of theory and practice. . *Critical Review in analytical Chemistry.* 2001;31(3):149-65.
24. Pripdeevech P, Chukeatirote E. Chemical compositions, antifungal and antioxidant activities of essential oil and various extracts of *Melodorum fruticosum* L. flowers. . *Food and Chemical Toxicology.* 2010;48:2754–8.
25. Sun L, Zhang J, Lu X, Zhang L, Zhang Y. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology.* 2011;49:2689–96.
26. Jayasinghe C, Gotoh N, Aoki T, Wada S. Phenolic composition and antioxidant activity of sweet basil. *J Agric Food Chem.* 2003;54:4442 – 9.
27. Shi J, Nawaz H, Pohorly J, Mittal G, Kakuda Y, Jiang Y. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods – Engineering and technology. *Food Reviews International.* 2005;21:139 – 66.
28. Ju-Sung K, Myong-Jo K. In vitro antioxidant activity of *Lespedeza cuneata* methanolic extracts. *Journal of Medicinal Plants Research.* 2010;4(8):674-79.
29. Messaoud C, Chograni H, Boussaid M. Chemical composition and antioxidant activities of essential oils and metanol extracts of three wild *Lavandula* L. species. *Food and Chemical Toxicology.* 2010;48:2754–58.
30. Mar M, Azizah A-H, Bablishah S, Farooq A, Mandumpal C, Mohd S. Phenolic compounds and antioxidant activity of peanut's skin, hull, raw kernel and roasted kernel flour. *Pak J Bot.* 2011;43(3):635-42.
31. Paydar M, Wong Y, Moharam B, Wong W, Lool C. In vitro anti-oxidant and anti-cancer activity of methanolic extract from *Sanchezia speciosa* leaves. *Pak J Biol Sci.* 2013;16:1212-5.
32. Hopper L, Cassidy A. A review of the health care potential of bioactive compounds. *Journal of the Science of food and agriculture.* 2006;86:1805-13.
33. Barnham K, Masters C, Bush A. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discovery.* 2004;3:205-14.
34. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C. Dietary polyphenols and the prevention of disease *Food Sciences and nutrition.* 2005;45:287-306.
35. Tereschuk M, De Figueroa L, Abdala L, editors. *Flavonoids with antimicrobial activity form argentine species of Tagetes*. Tolowa, Canadá: In Press; 2002.
36. Martínez -Florez S, Gonzalez-Gallego J, Culebras J, Tuñón MA. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *España XVII.* 2002;6:271-8.
37. Miceli N, Trovato A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Marino A, et al. Comparative Analysis of Flavonoid Profile, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *J Agric Food Chem.* 2009;57:6570-7.
38. Manzoor M, Anwar F, Sultana B, Mushtaq M. Variation in antioxidant and antimicrobial activities in *Lantana camara* L. flowers in relation to extraction methods. . *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2013(12): 283-94.



39. Mei-Lin T, Chih-Chien L, Wei-Chao L, Chao-Hsun Y. Antimicrobial, antioxidant and antiinflammatory activities of essential oils from five selected herb. *BiosciBiotechnolBiochem*. 2011;75:1977-83.
40. Julie S, Jurenka M. Antiinflammatory properties of Curcumin, a major constituent of *Curcumin longa*: A review of preclinical and clinical research. *Alternative Medicine Review*. 2009;14.
41. Liu J, Fang Y, Wei Z, Yang X, Zeng L. Synergic antidepressive effect of quercetin and *Hypericum perforatum* extract in mice. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2013;42:615-9.
42. Ziberna L, Kim J, Auger C, Passamonti S, Schini K. Role of endothelial cell membrane transport in red wine polyphenols-induced coronary vasorelaxation: involvement of bilitranslocase. *Food Func*. 2013;4:1452-6.
43. Celestino - Santos B. Implicaciones en la salud de los polifenoles de la dieta. In: Salamanca Ud, editor. *Nutrición y Dietética; V Congreso Internacional. Alimentación, nutrición y dietética*. Campus Miguel de Unamuno, 37007-Salamanca: Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia
44. Institute of food technologists (IFT). *Antioxidantes: beneficios funcionales y nutraceuticos*. La Alimentación Latinoamericana 1998.
45. Romero - Ramos M. Efecto de la disminución de la capacidad de protección frente a oxidaciones sobre el sistema dopaminérgico nigro-estriado [Tesis doctoral]. España: Universidad de Sevilla; 1999.
46. Jiménez M. Radicales libres, amigos del envejecimiento. 2001; Available from: http://www.saludpr.com/radicales_libres_amigos_del_envejecimiento.htm.
47. Guohua C, Sofic E, Ronald L. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids. structure activity relationships. *Free radical biology and medicine*. 1997;22 (5):749 - 60.
48. Borrego- Ros F. Propiedades de los flavonoides cítricos. 2001; Available from: <http://www.ediho.es/horticom/news/22.html>.
49. Serrano J, Puupponen P, Dauer R, Aura A, Saura-Calixto F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53:310 –29.
50. Toda S. Antioxidative effects of polyphenols in leaves of *Houttuynia cordata* on protein fragmentation by copper-hydrogen peroxide in vitro. *J Med Food*. 2005;8(2):266-8.
51. Aruoma O. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Res*. 2003:523 – 4.
52. Maestri D, Nepote V, Lamarque A, Zygadlo J. Natural products as antioxidants. *Phytochemistry*. 2006:105-35.
53. Boveris A, Oshino N. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemistry*. 1972;128(3):617-30.
54. Slinkard K, Singleton V. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American journal of tecnology and viticulture*. 1977;28(1):49-55.
55. Lijun S, Jianbao Z, Xiaoyun L, Liyu Z, Yali Z. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki L.*) leaves. *Food and Chemical Toxicology*. 2011:2689-96.
56. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. se of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss U-Technol* 1995;28:25 - 30.
57. Lijun S, Jianbao Z, Xiaoyun L, Liyu Z, Yali Z. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki L.*) leaves. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;49:2689-96.



58. Benzie I, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *T Anal Biochem.* 1996;239:70 - 6.
59. Huang D, Ou B, Prior R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2005;53:1841-56.
60. Fereidoon S, Ying Z. *Lipid Oxidation: Measurement Methods.* Bailey's Industrial Oil and Fat Products. 2005:6.
61. Gulcin I, Elmastas M, Aboul-Enein H. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum* L. family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phytother Res.* 2007;21(4):354-61.
62. Duthie G, Crozier A. Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11:43-7.
63. Organization WH. *Diet, nutrition and the prevention of chronic disease.* Geneva: World Health Organization, 1990.
64. Research WCRFaAIfC. *Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective.* Washington DC: AICR, 1997.
65. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:727-47.
66. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 1997;2:152-9.
67. Cao G, Sofic E, Prior R. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids. Structure activity relationships. *Free Rad Biol Med.* 1997;22:749-60.
68. Paula-Castillo C, Savluchinske-Feio S, Tatiana S, Sandra C. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. *Food Control.* 2012;23:552 - 8.
69. Paula C, Savluchinske-Feio S, Weinhold T, Gouveia S. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. *Food Control* 2012;23 552 a 8.
70. Nurmi K, Ossipov V, Haukioja E, Pihlaja K. Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* ssp. *tortuosa*). *Journal of Chemistry and Ecology.* 1996;22:2023-40.
71. Messaoud C, Chograni H, Boussaid M. Chemical composition and antioxidant activities of essential oils and metanol extracts of three wild *Lavandula* L. species. *Natural Product Research.* 2011:1-9.
72. *European Pharmacopeia.* 2 ed. France: Council of Europe; 2005.
73. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on auto oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 1992;40:945-8.
74. Umamaheswari M, Chatterjee TK. In vitro antioxidant activities of the fractions of *Coccinia randis* L. leaf extract. *African Journal of Traditional, Complimentary and Alternative Medicine* 2008;5(1):61-73.
75. Benzie I, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power" The FRAP assay. *Analytical Biochemistry.* 1996;239:70 - 6.
76. Haraguchi H, Hashimoto K, Yagi A. Antioxidant substances in leaves of *Polygonum hydropiper*. *J Agric Food Chem.* 1992;40(1349-1351).
77. Rice-Evans C, Miller N, Bolwell P, Bramley P, Pridham J. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res.* 1995;23:375-83.
78. Peyman S, Sonboli A, Pooneh K, Fateme M. Essential oil composition and antioxidant activity of different extracts of *Nepeta betonicifolia* C.A. Meyer and *Nepeta saccharata* Bunge. *Natural Product Research.* 2011.



79. Masoumeh F, Zahra T, Ali S. Essential oil composition and antioxidant activities of the various extracts of *Tanacetum sonbolii* Mozaff. (Asteraceae) from Iran. *Natural Product Research*. 2011.
80. Messaoud C, Chograni H, Boussaid M. Chemical composition and antioxidant activities of essential oils and methanol extracts of three wild *Lavandula* L. species. *Natural Product Research*. 2011:1-9.
81. Tenore G, Ciampaglia R, Apostolides N, Piozzi F, Napolitano F, Rigano D. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;49:238-43.
82. Tenore G, Ciampaglia R, Apostolides N, Piozzi F, Napolitano F, Rigano D, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;49:238-43.

