UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas

FQF
Facultad de
Química y Farmacia

Departamento de Farmacia

TRABAJO DE DIPLOMA

Variación regional y estacional en el contenido total de fenoles y las propiedades antioxidantes de las hojas de *Mosiera bullata* (Britton & P. Wilson) Bisse

Autores del trabajo: Miriam Iliex Guirado López

Tutores del trabajo: Dra. C. María Elisa Jorge Rodríguez.

Santa Clara , Junio, 2018.
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual

Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

Exergo

“Si tú no trabajas por tus sueños, alguien te contratará para que trabajes por los suyos”

Steve Jobs

Dedicatoria

A mis abuelos ***Margot y Juan Manuel*** *porque sé que les hubiera encantado verme convertida en una profesional.*

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas sus bendiciones….

A mis padres por cambiar su vida y su forma de pensar por mí; por dar todas sus energías para sacarme adelante y enseñarme a vivir y a Luisy por ser simplemente él: mi hermano…

A mi abuela Consuelo por sus oraciones que tanta seguridad me transmitían en días de exámenes.

A mi familia la de sangre y la elegida: por todo el apoyo que me dieron en esta etapa y durante toda mi vida.

A Yeny y Leyo, gracias por su desprendimiento y por hacer mío todo lo suyo.

A los profes, técnicos de laboratorios y a Olgui: a unos por instruirme y a otros por educarme, muy en especial a mi tutora Elisa por su sabiduría, conducción y entrega en esta tarea y a Osmary por su vital ayuda en esta última etapa.

A Raddel, por estar cuando lo necesité y cuando no también.

A mis viejas amigas, esas con las que no han sido necesarias conversaciones diarias para mantener la amistad.

A todas mis amistades y amigos en general, que son tantos que sería imposible dejar de mencionar a alguno.

A Merme, Javi, Dani, Nelson y Leo; los últimos en llegar pero sin dudas llegaron para quedarse, gracias por todas las risas, momentos compartidos y por cuidar de mí.

A Adrio por toda la paciencia en esos días de estudio; a Adrianne por su buen trato; a Isela, principalmente por ayudarme durante el trabajo experimental de mi tesis.

A Claudia por hacernos reír en clases, en un aula siempre hace falta alguien como tú; a Yuliet Nieves, la mamá de los pollitos, sabes que te quiero...

A Elizabeth, Joe, Ale y Carlitos, me hubiera gustado que estuvieran hoy junto a nosotras.

A Jenni por su inocencia y por acompañarme en todas las sesiones de fotos que saben que me encantan.

A Bia: como siempre digo, gracias a ti llegamos a 5to año, como no echarte de menos a partir de hoy.

A mi Sol por ese carácter que tienes, que es único y por tus risas (a veces excesivas)

A Naylencita, por ser mi fiel compañera de equipo y por regalarme todos esos días de Mejunje y conciertos.

A Oly por sus consejos, por consentirme cuando me ponía vaga, y por adivinar mis pensamientos y ánimos.

Mis niñas recuerden que los amigos conocen todas tus historias, pero los mejores amigos han vivido contigo esas historias. Gracias por vivirlas!!!

A muchas personas que quizás no logran imaginar que en este momento yo los recuerde con gran afecto por haberme aportado algo, por pequeño que haya sido; por haber contado en mi vida durante estos cinco años.

A todos Muchas Gracias!!!

Resumen

RESUMEN

Las plantas medicinales son una fuente importante de antioxidantes y éstos permiten retrasar, prevenir o eliminar el daño oxidativo generado por las especies reactivas de oxígeno que se asocian al desarrollo de enfermedades crónicas y degenerativas. Teniendo en cuenta lo anterior y la política que Cuba ha establecido para el estudio de plantas cultivadas en el país, con especial atención en las plantas endémicas, se desarrolla el presente trabajo con la especie *Mosiera bullata* B., la cual es endémica de la región central, se encuentra en real peligro de extinción y se propone extender su cultivo por su endemismo. Se estudiaron los efectos del clima y la zona de crecimiento en el contenido de los compuestos fenólicos y los flavonoides, así como las actividades antioxidantes de las hojas de la planta, con el fin de proporcionar una base científica para una recolección óptima. Las hojas se recolectaron mensualmente de enero a junio de 2018 y en cinco zonas de recolección en la región central. Se preparó el extracto metanólico de cada muestra, aplicando una maceración con agitación. El contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides (CF) se determinaron espectrofotométricamente. La actividad antioxidante se evaluó a través de tres ensayos antirradicálicos y dos ensayos que miden la capacidad de potencia reductora. Como resultados se obtuvo que el CFT y CF resultó ser más alto en los meses de marzo a junio y en las zonas del Jardín Botánico y Los Güiros, lo que mostró correspondencia con el ensayo DPPH (siglas en inglés de radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazil) y la actividad antioxidante total. Por su parte, los ensayos que miden la capacidad reductora muestran un comportamiento inverso con respecto a la evaluación de la época del año, mientras que para la zonas de recolección los resultados fueron semejantes.

Abstract

ABSTRACT

Medicinal plants are an important source of antioxidants and these allow us to delay, prevent or eliminate the oxidative damage generated by reactive oxygen species associated with the development of chronic and degenerative diseases. Taking into account the above and the policy that Cuba has established for the study of plants cultivated in the country, with special attention to endemic plants, the present work with the species *Mosiera bullata* B., which is endemic to the central region, is in real danger of extinction and it is proposed to extend its cultivation due to its endemism. The effects of climate and growth zone on the content of phenolic compounds and flavonoids, as well as the antioxidant activities of plant leaves, were studied to provide a scientific basis for optimal harvesting. The leaves were collected monthly from January to June 2018 and in five harvesting areas in the central region. The methanolic extract of each sample was prepared by maceration with agitation. The content of total phenolic compounds (TFC) and flavonoids (FC) were determined spectrophotometrically. Antioxidant activity was evaluated through three anti-radical trials and two trials measuring reducing power capacity. As a result, TFC and FC were found to be higher in the months of March to June and in the areas of the Botanical Garden and Los Güiros, which showed correspondence with the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) assay and total antioxidant activity. On the other hand, the tests that measure the reducing capacity show an inverse behavior with respect to the evaluation of the time of year, while for the harvesting areas the results were similar.

Índice

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN **1**
CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA **4**
1.1. Las plantas medicinales como recurso terapéutico **4**
1.2. Estudios publicados de la planta en estudio Mosiera bullata **6**
1.2.1. Breve descripción de la especie 6
1.3. Antioxidantes y capacidad antioxidante **8**
1.3.1. Sistemas de defensa antioxidante 9
1.3.2. Capacidad Antioxidante 12
1.3.3. Mecanismos de reacción antioxidante 14
1.3.4. Métodos para evaluar la actividad antioxidante. 16
1.4. Compuestos fenólicos. Relación con la actividad antioxidante **21**
1.4.1. Importancia biológica de los compuestos fenólicos presentes en los compuestos vegetales 21
1.4.2. Métodos para su determinación 24
1.4.3. Relación de la actividad antioxidante y los compuestos fenólicos presentes en plantas 26
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS **28**
2.1. Recolección del material vegetal **28**
2.2. Extractos, equipos y reactivos **28**
2.3. Obtención de los extractos secos a partir de las hojas de Mosiera bullata **29**
2.3.1. Metodología de obtención y almacenamiento de los extractos 30
2.4. Determinación de la composición fenólica en los extractos obtenidos **30**
2.4.1. Determinación del contenido fenólico total (CFT) en los extractos evaluados. 30
2.4.2. Determinación del contenido de flavonoides totales en los extractos obtenidos 31
2.3. Evaluación in vitro de la actividad antioxidante **33**
2.3.1. Secuestro del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (Ensayo DPPH) 33
2.3.2. Determinación de la Actividad Quelante 35
2.3.3. Determinación del poder reductor/antioxidante férrico (FRAP) 36
2.3.4. Capacidad antioxidante total (TAOC) 37
2.3.5. Ensayo ABTS 39
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN **41**
3.1. Resultados de la composición fenólica de los extractos metanólicos obtenidos de las hojas de Mosiera bullata B **41**
3.1.1. Determinación del contenido fenólico total. 41
3.1.2 Determinación del contenido total de flavonoides 45
3.2. Resultados obtenidos en la evaluación in vitro de la actividad antioxidante. **49**
3.2.1. Secuestro del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (Ensayo *DPPH*) 50
3.2.2. Determinación de la Actividad quelante de Fe^{2+} 53
3.2.3. Fuerza antioxidante reducida del ión férrico (FRAP). 55
3.2.4. Capacidad antioxidante total. 57
3.2.5. Ensayo ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) 60
CONCLUSIONES **62**
RECOMENDACIONES **62**
BIBLIOGRAFÍA **63**

Introducción

INTRODUCCIÓN

La Medicina Tradicional se ha practicado desde los albores de la humanidad a través de tentativas y desaciertos, que comprenden la suma de todos los conocimientos y prácticas que pueden ser explicados o no, empleadas en la prevención, diagnóstico y eliminación de desbalances físicos, mentales o sociales, obtenidas exclusivamente sobre la experiencia práctica y observación transmitidas de generación a generación, de forma oral o escrita. 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, de residualidad o de disminución de los 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 múltiples afecciones, entre las que se destacan enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (1).

Un antioxidante es una molécula que previene la formación descontrolada de radicales libres o inhibe sus reacciones con estructuras biológicas y se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos. En los antioxidantes enzimáticos se encuentran, la superóxido dismutasa, la catalasa y el glutation peroxidasa. Los antioxidantes no enzimáticos constituyen un grupo heterogéneo de moléculas hidrófobas e hidrofílicas que atrapan radicales libres. Tales como las vitaminas, glutation, ergoteína y flavonoides polifenólicos, estos últimos pertenecientes al grupo de los compuestos fenólicos en donde también encontramos flavanoles, flavonoles (taninos o proantocianidinas) y no flavonoides (ácidos fenólicos, ácidos benzoicos y cinámicos, estibenos y reveratrol) (2).

El uso de antioxidantes sintéticos se está reconsiderando actualmente a causa de sus posibles riesgos toxicológicos (3). En consecuencia, los investigadores están buscando antioxidantes naturales que se originan en las plantas, que tienen un mayor beneficio que los sintéticos (4). Los antioxidantes naturales son sustancias capaces de prevenir o retrasar el estrés oxidativo incluso a concentraciones relativamente pequeñas al actuar directamente sobre especies reactivas de oxígeno o al estimular sistemas de defensa endógenos. Cuando existe un desequilibrio entre los procesos de oxidación y antioxidación, puede acumularse un exceso de radicales libres que pueden causar daño oxidativo a las moléculas y tejidos biológicos, causando muchas enfermedades en los seres humanos (5).

Se ha informado que muchos principios bioactivos de las plantas muestran fuertes actividades antioxidantes. Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más numerosos y omnipresentes de los metabolitos secundarios y defienden las plantas contra una variedad de herbívoros o agresión por patógenos (6). Los investigadores exploraron que estos metabolitos pueden jugar un papel importante en la prevención de enfermedades inducidas por radicales libres actuando como hidrógeno y/o donadores de electrones, que sacian los radicales libres y luego se convierten en radicales antioxidantes. En este último sentido, son numerosos los trabajos que muestran su efecto protector frente a determinadas enfermedades como alteraciones cardiovasculares y enfermedades graves como el cáncer, la diabetes, enfermedades degenerativas, el envejecimiento y el asma (5, 7-10).

Actualmente existen antioxidantes sintéticos como butilhidroxitolueno (BHT) y el butilhidroxianisol (BHA) que se adicionan a los alimentos susceptibles a la oxidación lipídica, sin embargo, algunos estudios han demostrado que estos antioxidantes sintéticos poseen efectos citotóxicos en concentraciones de 890 mg/kg y 700 mg/kg de peso en ratas, aprobado por el Departamento de Alimentos y Medicamentos de EUA (FDA, por sus siglas en inglés) (11). Por lo que los antioxidantes naturales han despertado interés para emplearlos como sustitutos de los antioxidantes sintéticos (12).

Teniendo en cuenta lo anterior y la política del estado cubano, expresado en el lineamiento 129 del PCC, donde se expresa la necesidad de la realización de investigaciones que aseguren el cumplimiento del Plan de Acciones para garantizar el desarrollo y consolidación de la Medicina Natural y Tradicional, en el departamento de Farmacia de la Universidad Central de Las Villas, donde se desarrolló el presente trabajo, existe un grupo de investigación que tiene como objetivo fundamental el estudio de la composición química y la actividad farmacológica de extractos obtenidos de plantas aromáticas cultivadas en Cuba, con especial atención en las plantas endémicas de la región central, como es el caso de la especie *Mosiera bullata* B*.,* que se encuentra en real peligro de extinción, y se propone extender su cultivo por su endemismo. Sin embargo, si se tiene en cuenta que el contenido de metabolitos en las plantas y por ende sus acciones farmacológicas se ven afectados por muchos factores, como tipo de suelo, clima, tiempo de cosecha, proceso y

condiciones de almacenamiento y método de análisis, entre otros resulta de gran importancia su evaluación para elegir el tiempo de cosecha óptimo asociado (13).

Constituye, por tanto, el **problema científico** del presente trabajo que la especie *Mosiera bullata* B. no posee estudios reportados que describan las fluctuaciones en el contenido fenólico y la actividad farmacológica de sus hojas, ante cambios en el tipo de suelo y el clima, con vistas a su recolección para su uso en el campo farmacéutico y/o alimentario.

Atendiendo a ello, con el objetivo de buscar nuevas fuentes de antioxidantes naturales y resolver el problema planteado, este trabajo científico parte de la siguiente **hipótesis**: Si se realizan estudios que permitan conocer la composición fenólica y la actividad antioxidante en extractos obtenidos de la *Mosiera bullata* B, recolectada en diferentes épocas del año y diferentes zonas geográficas, se dispondrá de una información importante con base científica para el uso óptimo de esta planta.

Para fundamentar dicha hipótesis se trazaron los siguientes objetivos.

Objetivo general:

- Determinar la composición fenólica y la actividad antioxidante de extractos obtenidos de las hojas de *Mosiera bullata* B. recolectada en diferentes regiones y épocas del año.

Objetivos específicos:

1. Obtener extractos a partir de las hojas de *Mosiera bullata* B, aplicando la técnica de maceración con agitación.
2. Determinar el contenido fenólico y de flavonoides en los extractos obtenidos a partir de las hojas de *Mosiera bullata* B., empleando técnicas espectrofotométricas.
3. Evaluar la actividad antioxidante de los extractos, aplicando diferentes ensayos *in vitro*.

CAPÍTULO I

Revisión Bibliográfica

CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Las plantas medicinales como recurso terapéutico

La Medicina Tradicional se ha practicado desde los albores de la humanidad a través de tentativas y desaciertos, que comprenden la suma de todos los conocimientos y prácticas que pueden ser explicados o no, empleadas en la prevención, diagnóstico y eliminación de desbalances físicos, mentales o sociales, obtenidas exclusivamente sobre la experiencia práctica y observación transmitidas de generación a generación, de forma oral o escrita. 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, de residualidad o de disminución de los 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 en lo que se destaca el importante papel de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en cuanto a la utilización de la fitoterapia dentro de los programas de salud de los distintos países, a través de la validación de efectos etnobotánicos adjudicados a las plantas durante la existencia de la humanidad (14).

Existen numerosos avances en el conocimiento de los principios activos de las drogas vegetales y de sus mecanismos de acción. No debemos olvidar, no obstante, que la actividad de un fitofármaco no va a ser exactamente igual que la de su principio activo aislado, y que los efectos de ciertos fitofármacos pueden deberse a la coexistencia de varios de sus constituyentes químicos, que en conjunto serán responsables de su actividad. Recordemos aquí, como ejemplo, los terpenos y flavonoides, componentes del extracto de la hoja de *Ginkgo biloba* y los diversos grupos de ginsenósidos de la raíz de ginseng, además, se sabe también de la presencia de triterpenos pentacíclicos y alcoholes de cadena larga, aldehídos y esteres presentes en la chilca, la hierbamora posee alcaloides esferoidales empleados como drogas antimuscarínicas. En cuanto a la seguridad, el conocimiento que llevó al logro de muchos fitofármacos proviene de la Medicina Tradicional y basado en el conocimiento etnomédico acumulado durante siglos, lo que proporciona cierta garantía de su inocuidad, principalmente en lo que a toxicidad aguda se refiere. No debe descartarse de forma general, sin embargo, la posible aparición de toxicidad o de

efectos secundarios indeseables para fitofármacos por el solo hecho de ser de origen natural (15).

¿Usar vegetales tiene riesgos? En cualquier actividad humana existen diversos riesgos, pero éstos pueden minimizarse con el conocimiento adecuado de los procesos y materiales que se manejan. Siempre hay que tener presente la afirmación: ***"nada es veneno, todo es veneno, todo depende de la dosis"***. Para poder adaptar satisfactoriamente esta afirmación es necesario conocer bien las plantas en su descripción, usos y limitaciones, de manera que siempre se tenga la certeza de que la planta es la adecuada, pues no hay que olvidar el gran parecido entre algunas especies. Además, es fundamental el reconocimiento médico de la dolencia, para que el tratamiento sea el adecuado y no se trate la enfermedad equivocada mientras que la real causa estragos en el organismo del paciente, eso sí, sin dejar de lado el tipo de aplicación de la planta y fundamentalmente, su dosificación y período de aplicación. Es fundamental recordar que en muchos casos son los principios tóxicos los que inducen curación. Aunque es cierto que en la actualidad muchas de las plantas usadas y aceptadas por los organismos de control son expedidas en lugares de reconocida responsabilidad, es obligatorio efectuar un control médico del paciente y una verificación de los tratamientos que van a aplicarse. Por otra parte, es de notoria importancia el hecho de que el uso de las plantas medicinales presenta muy pocos efectos colaterales negativos, aunque esta situación no implica dejar de lado el control y vigilancia de la acción del medicamento sobre el paciente (16).

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 en lo que se destaca el importante papel de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en cuanto a la utilización de la fitoterapia dentro de los programas de salud de los distintos países, a través de la validación de efectos etnobotánicos adjudicados a las plantas durante la existencia de la humanidad (14, 17).

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. Muchos de los fármacos empleados como el opio, la quinina, la aspirina o la digital, se replican sintéticamente o se aíslan los principios activos de remedios vegetales tradicionales (18)**.**

1.2. Estudios publicados de la planta en estudio *Mosiera bullata* B.

1.2.1. Breve descripción de la especie

El género *Mosiera* pertenece a la familia de las *Mirtáceas*, la cual posee las siguientes generalidades botánicas: Familia de árboles o arbustos perennifolios, ricos en aceites esenciales, perteneciente al orden *Myrtales*. Alrededor de 130 géneros y unas 2900 especies pertenecen a regiones tropicales y subtropicales, algunas en Europa (19). En cuanto al tratamiento supragenérico la familia *Myrtaceae* se ha segregado en 4 subfamilias: *Myrtoideae*, *Psiloxyloideae*, *Leptospermoideae*, *Chamaelaucioideae* (20). Los representantes cubanos de la familia *Myrtaceae* se incluyen en la subfamilia *Myrtoideae*, la cual agrupa plantas con hojas mayormente opuestas, epíginas, frutos carnosos, mayormente en baya y distribuida en regiones tropicales de todo el mundo. Comprende tres subtribus: *Myrciinae*, *Eugeniinace* y *Myrtinae* (20, 21).

La *Mosiera,* es un género con unas 40 especies de plantas con flores que pertenece a la familia *Myrtaceae*. Es originario del sur de Florida, Caribe, Centroamérica y sur de Brasil (21-23).

La especie *Mosiera bullata (Britton & P. Wilson) Bisse* es una planta endémica de Cuba que crece en la región central del país, comprendiendo desde la provincia Villa Clara hasta Camagüey. Se puede constatar la existencia en la provincia de Camagüey, en la Sabana de Caja de Agua, Caobilla, Florida, La Ciega, (Caobilla, Florida) y sabanas camino de Sierra de Cubitas, colectada también en Magantillas, Minas y en Villa Clara, Santa Clara (24).

Crece en el matorral xeromorfo espinoso sobre serpentina (cuabal degradado). Se desconoce su utilización, aunque estudios desarrollados con gran número de *Mirtáceas* sugieren que la especie posee potencialidades como agente antinflamatorio (23, 25).

El género *Mosiera* fue descrito por John Kunkel Small y publicado en Manual of the Southeastern Flora 936–937, 1506, f. s.n. [p. 937]. 1933. La especie tipo es: *Mosiera*

longipes (O. Berg) Small y la especie bullata (Britton & P.Wilson) *Bisse*, se reportó en la Revista del Jardín Botánico Nacional de la Universidad de la Habana, 1986 (26). No se conoce que sea susceptible a plagas y enfermedades, que tenga problemas con la germinación, ni que sea objeto de explotación, comercio o coleccionismo, su principal amenaza está dada por: alteración, fragmentación y/o destrucción total del hábitat, actividades agrícolas (preparación de tierras, pastoreo, pisoteo, atenciones silviculturales y labores de cultivo), construcciones civiles (carreteras, caminos y trochas, presas, líneas de alta tensión, asentamientos humanos), minería, maniobras militares, competencia interespecífica con especies exóticas invasoras y eventos catastróficos (incendios, huracanes, sequía) (24).

No se precisan agentes polinizantes, aunque deben ser con toda seguridad insectos (en la familia son usuales las hormigas). Se han encontrado ejemplares de herbario tomados de plantas florecidas en los meses de marzo y abril y fructificadas en junio (los restantes aspectos de la fenología ni siquiera se han estudiado). Las vías de diseminación no son precisadas, en la familia es generalmente endozoócora y en ocasiones barócora. La forma de multiplicación más efectiva es por semillas, se desconocen aspectos relativos a la posibilidad de hibridación, la regeneración natural, la efectividad de la germinación y condiciones necesarias para que ocurra (24).

Clasificación botánica (22)

- Reino: *Plantae*
- División: *Magnoliophyta*
- Clase: *Magnoliopsida*
- Subclase: *Rosidae*
- Orden: *Myrtales*
- Familia: *Myrtaceae*
- Género: *Mosiera*
- Especie: *M. bullata*
- Nombre binomial: *Mosiera bullata (Britton & P. Wilson) Bisse*
- Nombre vulgar: Soldado
- Nombre científico actual: *Mosiera bullata (Britton & P. Wilson) Bisse*

- Sinónimos más utilizados en Cuba: *Myrtus* anómala; *Myrtus bullata*; *Psidium bullatum*.

Descripción Botánica

La especie *Mosiera* se presenta como arbustos o árboles hasta 15 m de altura. Con tricomas de hasta 0.5 mm, unicelulares, simples, blanquecinos, amarillentos o pardo rojizo. Hojas persistentes, coriáceas, la nervadura broquidódroma, con pocos a 10 pares de nervaduras laterales unidas por una nervadura marginal que se arquea entre ellas cerca del margen foliar. Inflorescencias unifloras, axilares (poco frecuentemente un dicasio de 3 flores) o en un brote axilar bracteado con 1-3 pares decusados de flores. Flores cuatrómeras; lobos del cáliz oblongos a semiorbiculares, el cáliz generalmente no fusionado o sólo ligeramente fusionado pasando la punta superior del ovario, rompiéndose ligeramente o no entre los lobos en la antesis; pétalos submembranáceos, blancos; bractéolas generalmente pequeñas, ovado-triangulares, foliosas en una especie, caducas cerca o antes de la antesis; estambres 60-200, doblados hacia adentro en el botón, las anteras 0,3-0,7 mm, globosas, generalmente con una glándula terminal en el conectivo; ovario bilocular; óvulos 3-40 por lóculo, la placenta no marcada, los lóculos algunas veces conectados por una apertura. Frutos en bayas, subglobosos; semillas pocas, subreniformes, la testa dura, brillante o en una especie coriácea y glandular, la pared externa de una a varias células de grosor, las células superficiales redondeadas a alargadas, la parte central de la semilla algunas veces suave; embrión aceitoso, en forma de "C", blanquecino, los cotiledones reflexos o derechos, menos de 1/4 de la longitud del embrión (27).

Después de haber realizado una exhaustiva búsqueda en bases de datos especializadas no se encontraron reportes de esta planta en relación a su composición química y posibles usos en el campo farmacéutico, por lo que los estudios realizados en el presente trabajo resultan novedosos para la especie.

1.3. Antioxidantes y capacidad antioxidante

En este subcapítulo se describe de manera particular el origen de los radicales libres y los factores que promueven la generación de estos, así como los daños que causan la presencia de los mismos en los sistemas biológicos. También, se hace un análisis de la

importancia biológica de los antioxidantes, la función que tienen en los alimentos y en los sistemas biológicos en general. Adicionalmente, se señala la relación que aguarda esta actividad con los compuestos fenólicos presentes en las plantas, como los metabolitos que mayor contribución realizan en esta acción.

1.3.1. Sistemas de defensa antioxidante

En nuestro planeta existe una gran cantidad de oxígeno y, por tanto, en la naturaleza casi todos los materiales se oxidan: las grasas se enrancian, los tornillos se cubren de óxido, la goma pierde elasticidad, el papel se amarillea, la fruta madura y se pudre, etc. Estas reacciones de óxido-reducción son muy importantes ya que los seres vivos obtienen la mayor parte de su energía a partir de ellas, por ejemplo, en la fotosíntesis y en el metabolismo aeróbico (21). A pesar de que para los organismos aerobios la oxidación es esencial en la obtención de la energía necesaria para realizar procesos biológicos, la producción descontrolada de radicales libres derivados del oxígeno es hostil y dañina para las células y sus funciones; y es el origen de una reacción en cadena que da lugar a la generación de nuevos radicales libres que causan cambios o transformaciones oxidativas (28).

Un radical libre (RL) es cualquier especie, cargada o no, que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado en su orbital más externo, lo que les confiere un carácter de moléculas inestables y altamente reactivas. Entre los RL se encuentran las especies reactivas de oxígeno (EROs), que dañan las macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc.) (29, 30). Estas EROs son iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Físicamente, son moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a sus electrones desapareados. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular, pero en épocas de estrés ambiental sus niveles pueden aumentar mucho, rompiendo el equilibrio y provocando daños significativos a las estructuras celulares, provocando una situación conocida como **estrés oxidativo** que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales ocasionan el deterioro y muerte celular. Este desequilibrio en favor de los oxidantes conduce a un potencial daño oxidativo sobre biomoléculas (31, 32).

Los radicales libres cuya actividad es considerada como bilógicamente relevante son los derivados del oxígeno. La figura 1.1 representa un esquema simplificado de la actividad antioxidante natural, mostrando los principales RL: el radical peroxilo, $RO^{\bullet}_2$; el anión superóxido, $O^{\bullet\ 2}$; el radical hidroxilo, $OH^{\bullet}$. También existen especies reactivas con nitrógeno, como el peroxinitrito (ONOO), formado por la reacción entre el óxido nítrico y el superóxido o el dióxido de nitrógeno (NO_2), y con cloro como el triclorometilo ($CCl_3^{\bullet}$). El anión superóxido, puede producirse en múltiples reacciones intracelulares. Esta especie reactiva de oxígeno, se transforma en otras especies destructivas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o peróxidos lipídicos ($LOO^{\bullet}$) que pueden, en su momento, causar daño celular.(33-35).

La producción del ion superóxido ocurre principalmente en la mitocondria celular. Por otra parte, el radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$) es la forma neutra del ion hidróxido; este ión es altamente reactivo, lo que lo hace peligroso, por eso cuando es producido *in vivo* el ión $^{\bullet}OH$ reacciona cerca de su sitio de formación (36).

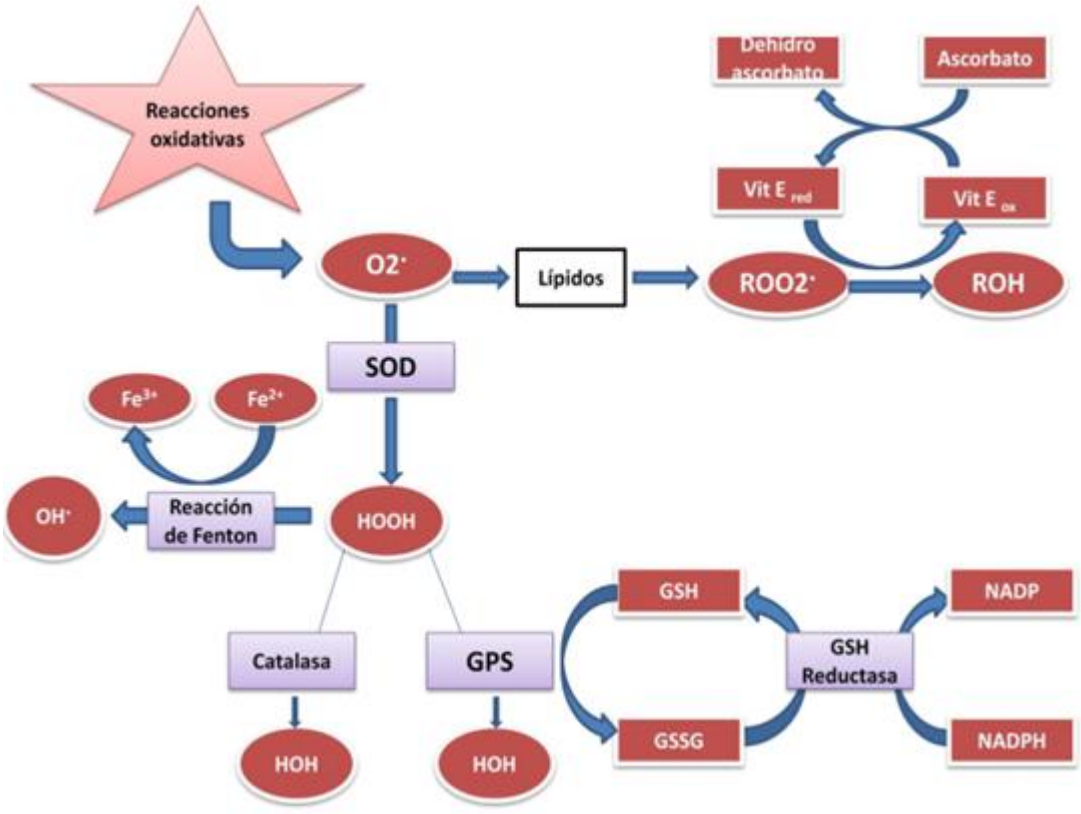


Figura 1.1. Esquema simplificado de la teoría antioxidante tradicional (Extraído de un artículo de revisión publicado en la literatura (37).

Por otra parte, bajo condiciones de estrés, el $O^{\bullet}{}^{2}$ actúa como oxidante ya que favorece a que el Fe^{2+} contenido en diversas moléculas quede disponible para la reacción de Fenton facilitando, finalmente, la producción de $^{\bullet}OH$ a partir H_2O_2. El radical superóxido también participa en la reacción de Haber-Weiss produciendo el radical hidroxilo (38). Otros radicales reactivos derivados del oxígeno que se pueden formar en sistemas vivientes son los radicales peroxilo ($ROO^{\bullet}$), el peroxilo más simple es $HOO^{\bullet}$, llamados radical hidroperoxil o perhidroxil que es la forma protonada del ión superóxido $O^{\bullet}{}^{2}$ (39); el radical hidroperoxilo inicia la peroxidación lipídica.

Cuando hay un exceso en la producción de radicales libres, estos pueden afectar a las enzimas protectoras, causando efectos de destrucción y muerte celular por oxidación de la membrana lipídica, proteínas, DNA y enzimas que intervienen en la respiración celular; esta serie de efectos está asociada a la aparición de condiciones patológicas como cáncer (16-19), ateroesclerosis (20), enfermedades cardiovasculares (21), desórdenes neurodegenerativos (22-24), diabetes (25) y envejecimiento (26-27) entre otros. La oxidación también afecta a los alimentos, siendo la causa principal del deterioro químico, originando enranciamiento y reducción de la calidad nutricional, color, sabor, textura e inocuidad (40).

Para contrarrestar las especies de oxígeno reactivo y prevenir el daño que ocasionan a las moléculas biológicas, especialmente al DNA, lípidos y proteínas, todos los organismos aerobios están dotados con **sistemas de defensa antioxidante**. Los antioxidantes biológicos se definen como “aquellas moléculas que cuando están presentes en bajas concentraciones respecto a las biomoléculas que protegen, pueden prevenir o reducir la destrucción oxidativa de las biomoléculas” (34). Las defensas antioxidantes son de tipo enzimático y no enzimático. La primera defensa antioxidante es intracelular y es principalmente del tipo enzimático; está controlada genéticamente por un sistema de retroalimentación en el que participan pequeñas concentraciones de radicales libres de origen endógeno (41).

Las enzimas antioxidantes requieren de la presencia de metales como Cu, Fe, Mg, Zn o Se para su acción, por esto se le llama en ocasiones metales antioxidantes. Las más importantes son la catalasa, la superóxido dismutasa y el glutatión peroxidasa. La segunda barrera antioxidante es de tipo no enzimática y viene dada por compuestos antioxidantes

que actúan tanto a nivel celular como extracelular. Son los responsables de la capacidad antioxidante (CA) de los fluidos biológicos, como el plasma y de la protección frente al daño oxidativo de las distintas partículas y macromoléculas circulantes (42).

A diferencia de las enzimas antioxidantes, las sustancias antioxidantes se notifican al reaccionar con los radicales libres y necesitan ser reabastecidas; es decir se agota su concentración. Algunos de origen endógeno, como el glutatión, bilirrubina, hormonas sexuales estrogénicas, ácido úrico, coenzima Q, melanina, melatonina, ubiquinol y ácido lipóico son reemplazados por síntesis. Si son de origen exógeno, requieren ser reabastecidos a través de la dieta una vez que se agotan; estos compuestos antioxidantes, denominados como "antioxidantes alimentarios" son fundamentales para la prevención de enfermedades ya que son fácilmente modificables (40).

La actividad de algunos antioxidantes alimentarios está bien establecida como en el caso de la vitamina C, la vitamina E y de los carotenoides y el Selenio; y la de otros compuestos, particularmente los polifenoles, aún siguen siendo objeto de estudios (28).

1.3.2. Capacidad Antioxidante

Un antioxidante es una molécula que previene la formación descontrolada de radicales libres o inhibe sus reacciones con estructuras biológicas (2).

Los antioxidantes presentes en productos vegetales consumidos en la dieta disminuyen los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno (sustancias químicamente inestables que se producen en el envejecimiento normal) en el cuerpo humano; como el ácido ascórbico también llamado vitamina C que es un compuesto hidrosoluble que actualmente es considerado como un nutriente antioxidante. También existen antioxidantes sintéticos como butilhidroxitolueno (BHT) y el butilhidroxianisol (BHA) que se adicionan a los alimentos susceptibles a la oxidación lipídica, sin embargo, algunos estudios han demostrado que estos antioxidantes sintéticos poseen efectos citotóxicos en concentraciones de 890 mg/kg y 700 mg/kg de peso en ratas, aprobado en por el Departamento de Alimentos y Medicamentos de EUA (FDA, por sus siglas en inglés). La Norma Oficial mexicana de la Secretaría de Salud mexicana (SSA) permite 200 mg/kg de BHT en humanos, lo cual significa que, una persona de 50 kg necesita 222 kg de BHT para que el producto sea tóxico. Por lo que los antioxidantes naturales han despertado interés para emplearlos como sustitutos de los antioxidantes sintéticos (12, 43).

En función de cómo interaccionan con los agentes oxidantes, los antioxidantes pueden ser:

- **Antioxidantes primarios:** impiden la formación de radicales libres, especialmente las EROs. Algunos ejemplos de estos, son: la vitamina E (44), polifenoles como resveratrol (45) o enzimas antioxidantes, con lo que indirectamente reducen el daño en el ADN y en las membranas (46, 47).

- **Antioxidantes secundarios:** interrumpen la propagación de radicales libres (ejemplos: α-tocoferol, ácido ascórbico) o desplazan las ROS (ejemplos: ácido ascórbico, carotenoides, glutatión y enzimas antioxidantes), inhibiendo la generación de ROS, e impidiendo la activación metabólica de carcinógenos (48, 49).

- **Antioxidantes terciarios:** reparan el daño causado por los radicales libres o eliminan moléculas que se han estropeado, modificando el potencial redox mejorando la reparación del ADN (50, 51). Algunos ejemplos son: la vitamina C, polifenoles, selenio o N-acetilcisteína.

Cuando en el organismo aumenta la producción de radicales libres, debido a causas exógenas (contaminantes ambientales o alimentarios, radiación) o endógenas (ejercicio excesivo, estrés psicológico o hipermetabolismo) las enzimas antioxidantes y algunas de las sustancias endógenas antioxidantes como la ferritina y ceruloplasmina (antioxidantes primarios) previene la formación de nuevos radicales libres. Pero cuando ocurre superproducción de radicales libres y los antioxidantes primarios son desbordados, son los antioxidantes secundarios los encargados de prevenir las reacciones en cadenas; entre estos últimos se incluyen sustancias antioxidantes endógenas como el ácido úrico, bilirrubina y albúmina y exógenos como la vitamina E, C y el β-caroteno; todos ellos son extracelulares, presentan el menor peso molecular y en su mayoría provienen de la dieta (52).

Este hecho ha provocado que, en las últimas décadas, el número de publicaciones científicas relacionadas con antioxidantes, especialmente los de origen natural, haya experimentado un crecimiento exponencial. Este gran interés se debe fundamentalmente a tres razones (53):

1) El poder antioxidante de una amplia variedad de agentes fitoquímicos.

2) Los beneficios del consumo de antioxidantes naturales frente a las enfermedades crónico-degenerativas y el proceso de envejecimiento.

3) La inseguridad que suscita en las personas el consumo de antioxidantes sintéticos.

Para caracterizar la acción antioxidante de un compuesto, lo primero que se debe concretar es cómo el antioxidante ejerce su actividad, ¿actúa directamente?, es decir, mediante el secuestro de ROS o inhibiendo su generación, o ¿está actuando de forma indirecta?, es decir, por "up-regulation" de las defensas antioxidantes endógenas. Para evaluar la acción directa de los antioxidantes, que es probablemente la más común *in vivo*, es importante plantearse y responder a ciertas preguntas ¿A qué biomolécula está protegiendo el antioxidante? y ¿es suficiente la cantidad de antioxidante que alcanza a esa diana *in vivo*? ¿Cómo ejerce su actividad protectora el antioxidante, por el secuestro de ROS, previniendo su formación, o reparando el daño que han producido? Si el mecanismo de actuación del antioxidante es por secuestro de ROS ¿es posible que los radicales derivados de la actividad del propio antioxidante causen algún tipo de daño por sí mismos? ¿Puede el antioxidante causar daños en otros sistemas biológicos? (54).

Otros dos puntos importantes en la evaluación de la actividad antioxidante son: que el compuesto debe utilizarse a concentraciones "reales", es decir, alcanzables *in vivo* y que se deben usar ROS biológicamente relevantes como el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$), radicales peroxilo ($ROO^{\bullet}$), peroxinitritos y el oxígeno singulete ($^1O_2$) (54).

1.3.3. Mecanismos de reacción antioxidante

Los antioxidantes engloban un grupo de sustancias que presentan estructuras químicas y mecanismos de acción muy variados. Así que no hay una definición internacional para el mejor antioxidante (55). Los antioxidantes pueden inactivar los radicales a través de dos vías principales: reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno (Hidrogen Atom Transfer, HAT) o de transferencia de un electrón (Single Electron Transfer, SET).

El resultado final es el mismo, pero difieren en la cinética y en las reacciones colaterales. Ambos tipos de reacciones pueden ocurrir paralelamente, y el mecanismo dominante tendrá que ser determinado a través de la estructura y propiedades del antioxidante; la solubilidad, el coeficiente de partición, el solvente del sistema, la energía de disociación y el potencial de ionización (34). Los dos últimos factores, son los más importantes para

determinar el mecanismo de reacción y la eficacia. Ya que la CA de un alimento está determinada por una mezcla de diversas sustancias con diferentes mecanismos de acción, entre las cuales puede haber interacción sinérgica, es necesario combinar más de un método para determinar la CA *in vitro* (17).

Las reacciones HAT son del tipo:

$$X^{\bullet} + AH \longrightarrow XH + A^{\bullet}$$

En donde $X^{\bullet}$ es el radical libre y AH el antioxidante.

Estas reacciones vienen determinadas por la entalpía de disociación del grupo donador de H en la molécula antioxidante. La capacidad de reacción se basa en una cinética en la que el antioxidante y el sustrato compiten por radicales peroxilo térmicamente generados a través de la descomposición de azo-compuestos (34).

Son reacciones dependientes del pH y el solvente, usualmente son muy rápidas (minutos o segundos). La presencia de agentes reductores, incluidos los metales, complica la reacción y pueden dar lugar a una sobrestimación de la reactividad.

Entre estos ensayos se incluyen el de la inhibición de la autoxidación de lipoproteínas de baja densidad, el ORAC (siglas en inglés de *Oxigen Radical Absorvance Capacity*) (56), CBA (siglas en inglés de *Crocin Bleaching Assays*) (57), CARS (Capacidad Captadora de Radicales Superoxido) (58), TOSC (siglas en inglés de *Total Oxidant Scavenging Capacity*) (59), TBARS (siglas en inglés de *Tiobarbituric Acid Reactive Species*) (60), β-caroteno (siglas en inglés de *β-carotene bleaching test*) (61), PHOTOCHEM (siglas en inglés de *photochemioluiminiscence*) (62, 63)

En las reacciones SET el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto incluyendo metales, carbonilos y radicales; serían reacciones como las que se describen enseguida, siendo de nuevo $X^{\bullet}$ es el radical libre y AH el antioxidante.

$$X^{\bullet} + AH \longrightarrow X^{-} + AH^{\bullet+}$$
$$AH^{\bullet+} + H_2O \rightleftharpoons A^{\bullet} + H_3O^{+}$$
$$X^{-} + H_3O^{+} \longrightarrow XH + H_2O$$
$$M(III) + AH \longrightarrow AH^{+} + M(II)$$

La reactividad en las reacciones SET se basa principalmente en la desprotonación y el potencial de ionización del grupo funcional reactivo, en general son reacciones

dependientes del pH, son lentas y pueden requerir largos tiempos para completarse, por ello los cálculos de la capacidad antioxidante se basan en el porcentaje de reducción del producto más que la cinética.

Cuando $HA^{\bullet+}$ tiene suficiente tiempo de vida, las reacciones secundarias representan una interferencia significativa para el ensayo, también son muy sensibles a la presencia de trazas de contaminantes y otros componentes (particularmente metales) que pueden convertirse en la causa de una alta variabilidad, pobre reproducibilidad y poca consistencia de los resultados.

Entre los ensayos basados en reacciones SET están, la determinación de fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu (64), ABTS/TEAC (siglas en inglés de *Trolox Equivalence Antioxidant Capacity*) (65), FRAP (siglas en inglés de *Ferric Reducing Antioxidant Power*) (66), llamado también ensayo el DPPH (siglas en inglés de radical *2,2difenil-1-picrilhidrazil*) (67) y el DMPD (N,N-dimetil-p-fenilendiamina) (68) y la PHOTOCHEM (Fotoquimioluiminiscencia) (62, 63).

1.3.4. Métodos para evaluar la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante es ampliamente utilizada como parámetro para caracterizar diferentes materiales vegetales y está relacionada con compuestos capaces de proteger un sistema biológico del efecto potencialmente dañino de procesos que causan excesiva oxidación, involucrando especies reactivas del oxígeno (26).

Esta actividad no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. Según Clarkson, (1995) para la medición de una muestra oxidante pueden usarse productos intermediarios o finales y nunca puede ser determinada basándose solo en un ensayo de prueba. En la práctica se realizan muchos modelos de test *in vitro* para evaluar la actividad antioxidante de la muestra de interés; sin embargo, es necesario considerar que los modelos presenten diferentes variaciones puede dificultar un poco la comparación de los resultados entre un método y otro (69).

Los métodos para evaluar la capacidad antioxidante de una sustancia se clasifican en dos grandes grupos. Se conocen como “métodos indirectos” a aquellos generalmente usados para medir la capacidad de una molécula de reducir un radical libre artificial y estable (por

transferencia de hidrógeno o electrones), o un metal de transición (por transferencia de electrones). Algunos ejemplos de estos métodos son el DPPH, y los ensayos de poder antioxidante por reducción del hierro férrico, así como la voltametría cíclica. Por otro lado, la evaluación por "métodos directos" involucra un sustrato oxidable; se basan en la evaluación del efecto inhibitorio de una sustancia potencialmente antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sustrato en un sistema de prueba sujeto a condiciones naturales o aceleradas de oxidación. Este tipo de aproximación parcialmente modelada se combina con una estrategia de medición basada en la detección de los productos de oxidación (40).

Los métodos de cuantificación de uso más extendido son el ensayo DPPH, el ensayo ABTS y el ensayo de FRAP para medir el poder antioxidante del hierro reductor. Estos ensayos se complementan con otros muchos entre los cuales se citan el de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, siglas en ingles de *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), el ensayo de la actividad quelante y el ensayo para medir la capacidad antioxidante total (TAOC, siglas en inglés de *total antioxidant capacity*) (17). A continuación, se describen con mayor detalle los métodos utilizados en este estudio.

1.3.4.1. Ensayo del DPPH

Este método fue propuesto por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre $DPPH^{\bullet}$ para aceptar un átomo de hidrógeno ($H^{\bullet}$) proveniente de una molécula de cisteína. La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm (70). Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno como se muestra en la figura 1.2, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes. Después de aproximadamente tres décadas este ensayo comenzó a utilizarse rutinariamente para la caracterización de las propiedades antioxidantes. El procedimiento original para el ensayo $DPPH^{\bullet}$ ha sido adoptado por muchos laboratorios y a pesar de que existen modificaciones a conveniencia,

una revisión detallada de la literatura ha revelado que la mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox (71).

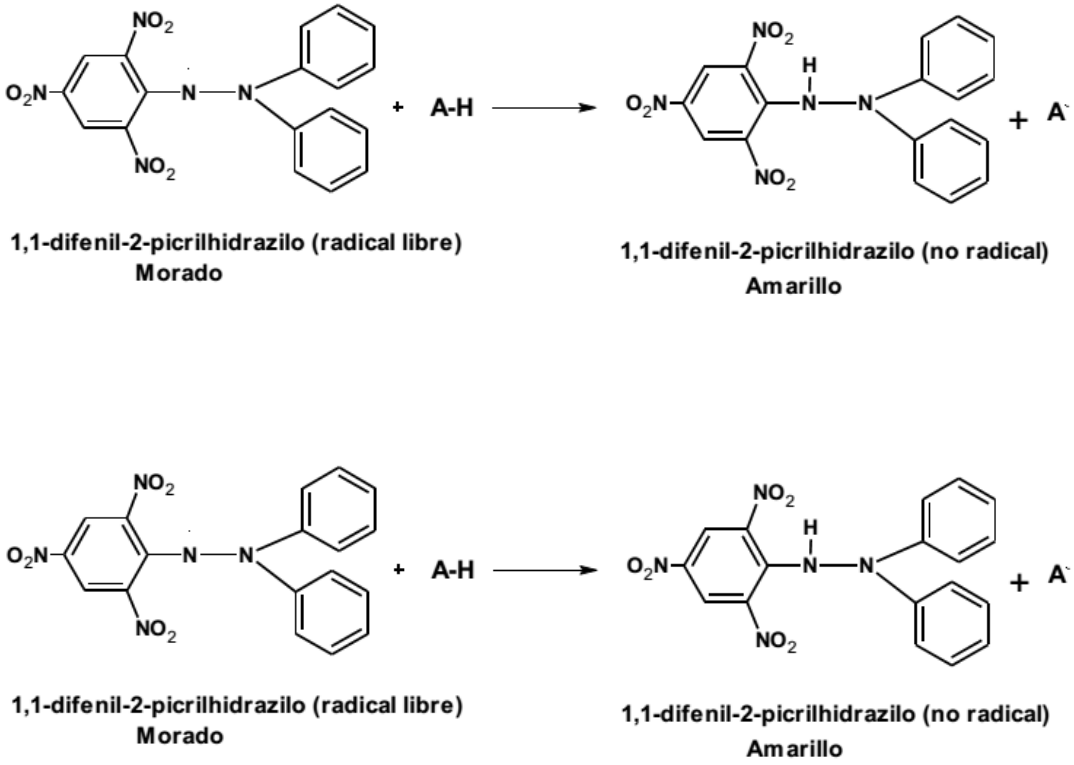


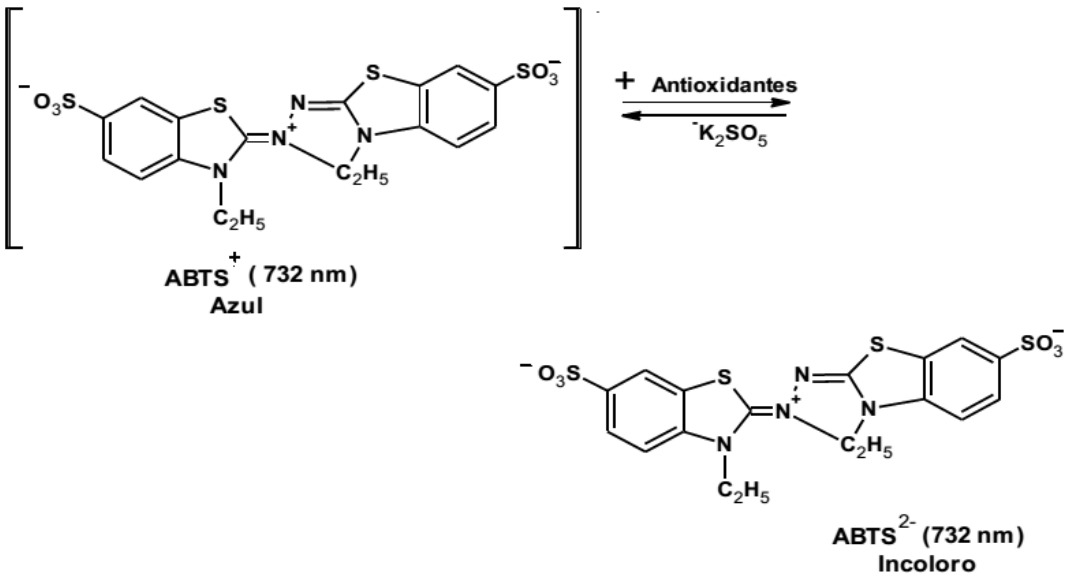
Figura 1.2. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (72)

Los resultados del ensayo DPPH$^{\bullet}$ se han presentado de diferentes maneras. La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC_{50}), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor IC_{50} cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH$^{\bullet}$ usado (73).

1.3.4.2. Ensayo ABTS$^{\bullet+}$

La generación del radical ABTS$^{\bullet+}$ constituye la base de uno de los métodos espectrométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de

soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. El ensayo original de $ABTS^{\bullet+}$ estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes. Este fue criticado debido a que la reacción rápida de los antioxidantes, contribuye a la reducción del radical ferrilmioglobina. Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes (74).



.

Figura 1.3. Estructura del $ABTS^{\bullet+}$ antes y después de la reacción con el antioxidante (74).

La técnica mejorada para la generación del radical catión $ABTS^{\bullet+}$, implica la producción directa del cromóforo $ABTS^{\bullet+}$ verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$). La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión $ABTS^{\bullet+}$ está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones. Como resultado se obtienen tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 815 nm y 734 nm cuyo cromóforo está descrito figura 1.3. (74).

1.3.4.3. Ensayo para medir la fuerza antioxidante reducida del ión férrico (FRAP).

Este ensayo clasifica como un método antioxidante que utiliza mecanismo SET. Su metodología está basada en la reducción del complejo de la tripiridiltriazina (TPTZ) férrica al complejo ferroso por la acción de un antioxidante en medio ácido (66). El complejo de TPTZ y el hierro II actúan con las sustancias antioxidantes obteniéndose como producto un ion complejo de hierro II, TPTZ y sustancias oxidadas (33). La reacción provoca un cambio de intensidad de color proporcional a la actividad reductora de la muestra antioxidante que se monitoriza midiendo la absorbancia máxima a 595 nm durante 30 minutos (Figura 1.4) (75). Los resultados se expresan en equivalente de Antioxidante Patrón (AP) µmol AP/g o µmol AP/L), tras previa realización de la curva de calibración del mismo.

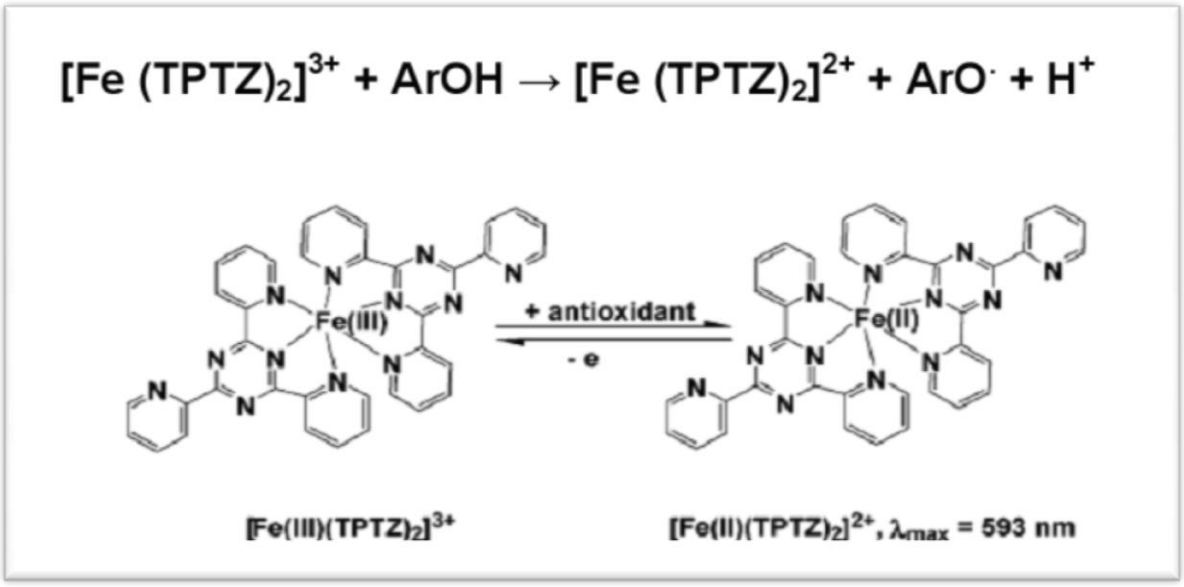


Figura 1.4. Fundamento del método FRAP (Gao and Prior, 1997), mostrando la reducción del TPTZ (75).

1.3.4.4. Actividad Quelante

En el ensayo para determinar la capacidad antioxidante de un compuesto basándose en la propiedad de quelación de metales, la Ferrozina al unirse al hierro (Fe^{2+}) produce un complejo de color violeta. En presencia de un agente quelante (compuesto antioxidante), la formación de este complejo se ve interrumpida y como consecuencia de ello el color violeta del complejo disminuye hasta tomar un tono rojizo. En este ensayo se suele emplear como compuesto de referencia el etilen diamin tetra ácido acético (EDTA). Con un máximo de

652 nm donde un incremento de la absorbancia indica la significancia de la capacidad antioxidante del compuesto en cuestión (34, 66, 76, 77).

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

En la determinación de la actividad antioxidante de un compuesto natural ha sido empleado en múltiples ocasiones el método del fosfomolibdato. Este ensayo refleja la capacidad de un sistema de defensa antioxidante no enzimático. Este es un método espectrofotométrico que se ha desarrollado para la determinación cuantitativa de capacidad antioxidante total de un compuesto. Está basado en la reducción de molibdeno VI (Mo^{6+}) a fosfato/Mo^{5+} con la consiguiente formación de un complejo de color verde y un pH ácido. Con un máximo de absorción a los 695 nm y empleando como patrones a la vitamina E o al ácido ascórbico (vitamina C) (78). En él, un incremento en los valores de la absorbancia indica que la muestra posee una significativa capacidad antioxidante (79, 80).

1.4. Compuestos fenólicos. Relación con la actividad antioxidante

Las plantas vasculares sintetizan una gran cantidad de moléculas orgánicas, como consecuencia de su metabolismo secundario. Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente. Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol (81, 82).

1.4.1. Importancia biológica de los compuestos fenólicos presentes en los compuestos vegetales

Los compuestos fenólicos son la fuente más importante de compuestos bioactivos de la dieta humana y se encuentran principalmente formando parte de las frutas, bebidas como el té, café, vino y zumos de fruta, chocolate, y aunque en menor proporción de verduras, legumbres y cereales. A lo largo de los años se han identificado más de 8000 compuestos

fenólicos (83, 84). Esta familia de compuestos puede definirse como aquella en la que sus componentes poseen al menos un anillo aromático unido al menos a un grupo hidroxilo (–OH), y representa a una amplia variedad de sustancias que se puede dividir en diversos subgrupos: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos), flavonoides (antocianinas, prontocianidinas, flavonoles, flaconas, flavanonas, flavanoles, isoflavonas), estilbenos y lignanos. De entre ellos, los grupos de compuestos de mayor importancia desde la perspectiva de la salud humana son los ácidos fenólicos, flavonoides (flavonas, flavonoles, 3- flavanoles, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas) y lignanos (85).

La importancia de los compuestos fenólicos en la dieta se debe a las evidencias encontradas acerca de su capacidad antioxidante y del papel que juegan frente a la prevención de ciertas enfermedades (enfermedades cardiovasculares y cáncer, entre otras). Éstos pueden ayudar a limitar el daño producido por estas enfermedades actuando directamente sobre las especies reactivas de oxígeno o estimulando sistemas de defensa endógenos. Los grupos fenólicos de estos compuestos son capaces de aceptar un electrón para formar radicales fenoxilo relativamente estables deteniendo las reacciones oxidativas en cadena que se producen en las células (86, 87). 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 cicloxigenasa, lipooxigenasa y xantina oxidasa (75).

Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales (88):

Como captadores de radicales libres: Los compuestos fenólicos pueden actuar como donantes de hidrógeno o electrones en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres, deteniendo las reacciones en cadena en las que están implicados los radicales libres. El radical fenoxilo generado es menos reactivo ya que se estabiliza por resonancia con los electrones π del anillo aromático.

Como quelantes de metales: Esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilos cercanos en el anillo aromático. De este modo, los o-dihidroxifenoles son secuestradores

efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres por la reacción de Fenton.

Además de las características estructurales anteriormente mencionadas, existen otros factores que afectan la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Así, el número y posición de grupos hidroxilo, el grado de polimerización o la presencia de azúcares unidos determinarán propiedades de los compuestos fenólicos tales como la solubilidad y la tendencia a ceder electrones o átomos de hidrógeno (24).

El grado de polimerización de los compuestos fenólicos tiene un marcado efecto sobre la actividad antioxidante. Así, los compuestos poliméricos son más potentes como antioxidantes que los monómeros. Por ejemplo, los taninos son más efectivos frente a los radicales peroxilo que los fenoles simples. La actividad para captar $O_2^{\bullet-}$ aumenta con el grado de polimerización de los flavanoles y los dímeros de ácido ferúlico inhiben la peroxidación lipídica en mayor extensión que los monómeros (89). La eficacia antioxidante de las teaflavinas aumenta cuando se unen con ácido gálico o sus polímeros. Compuestos fenólicos con un elevado número de grupos hidroxilo en sus estructuras moleculares muestran una mayor actividad antioxidante *in vitro*. Es el caso de las teaflavinas y catequinas del té (88). Además, en los flavonoles, los hidroxilos en las posiciones 2', 3' y 4' incrementan la estabilidad de los radicales permitiendo la deslocalización de electrones en los dobles enlaces del anillo benceno. La presencia de sustituyentes voluminosos en los anillos, que inducen la donación de electrones, aumenta la efectividad como antioxidantes de los compuestos fenólicos al disminuir la fuerza de los enlaces O-H. Por otro lado, el impedimento estérico generado por los sustituyentes en la región del radical, disminuye la velocidad de las reacciones de propagación en la que está implicado el propio radical fenoxilo, contribuyendo a su estabilización (90).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos varía además en función de su solubilidad relativa en fase acuosa o lipofílica. Los flavonoides y los ácidos cinámicos poseen coeficientes de partición intermedios, que dependen en gran medida de su estructura química precisa y de los sustituyentes asociados (grupos hidroxilo, metoxilo, azúcares, etc.). Generalmente, los compuestos hidrofóbicos entran en las células más rápido que los hidrofílicos por procesos de difusión simple. Una vez en el organismo, los compuestos fenólicos más hidrofóbicos tendrán su destino en ambientes lipídicos y los más

hidrofílicos quedarán en medios más acuosos (91). Así, la unión de azúcares hace a los compuestos fenólicos más hidrosolubles, pero disminuye su actividad antioxidante (88). Por ello, los compuestos fenólicos con más afinidad por los ambientes lipídicos del organismo podrían tener una mayor relevancia en la prevención de enfermedades. De hecho, los compuestos fenólicos de carácter liposoluble y capaces de unirse a lípidos previenen la oxidación de las LDL *ex vivo* de forma directa y/o mediante la preservación de otros antioxidantes liposolubles como α-tocoferol (92).

Lo anterior presupone que, no todos los compuestos fenólicos son iguales. Hoy en día, todavía es difícil discernir qué polifenol tiene mayor capacidad frente a determinadas enfermedades. Hay que tener en cuenta que las propiedades biológicas de los compuestos fenólicos dependen en gran medida de su biodisponibilidad, ya que los compuestos fenólicos presentes en mayor proporción en los vegetales, como fuente fundamental, no son necesariamente aquellos que presentan mayor actividad en el ser humano. Las causas de esta menor actividad pueden ser debidas a una menor actividad intrínseca del compuesto, a su menor absorción por parte del intestino o a que se metabolicen o eliminen con mucha rapidez del organismo. La estructura química de los compuestos fenólicos es un factor que determina el grado y la velocidad por la que estos compuestos van a ser capaces de ser absorbidos por el intestino, además de la naturaleza de los metabolitos que circulan en el plasma (93).

1.4.2. Métodos para su determinación

1.4.2.1. Contenido de fenoles totales por el reactivo de Folin- Ciocalteu (F- C)

El ensayo de F-C es un método comúnmente utilizado en el área de agroquímica e industrias alimenticias, por su simplicidad, por la disponibilidad comercial del reactivo y por ser un procedimiento ya estandarizado (94)**.** Inicialmente, fue aplicado al análisis de proteínas tomando como ventaja la actividad del reactivo frente al residuo de proteína, tirosina (que contiene un grupo fenol). Muchos años después este ensayo se extendió al análisis de fenoles totales en vino y desde entonces se le ha encontrado muchas aplicaciones. El reactivo de F-C utiliza un mecanismo de reacción de oxidación/reducción, que no es específico para fenoles. De hecho, el ensayo de F-C mide la capacidad para reducir el reactivo de ácido fosfomolibdico/fosfotungstico a un complejo azul que es monitoreado espectrofotométricamente, donde el molibdeno es reducido en el complejo y

se da la reacción de transferencia de electrones entre el Mo(iv) y el reductor según la siguiente reacción (34).

Mo (VI) e (reductor) ⟶ **Mo (V)**

El método implica la oxidación de fenoles en solución alcalina por el heteropolianión molibdotungstofosfórico amarillo y la medición colorimétrica del molibdotungstofosfato azul resultante. Este complejo azul tiene su máxima absorción dependiendo de su composición fenólica, además del pH de las soluciones implicadas (95).

En el ensayo F-C original, se usa el buffer de carbonato para ajustar el pH y el punto final de reacción se alcanza a los 120 min aproximadamente a temperatura ambiente. Aunque es un tiempo demasiado extenso y dificulta la implementación de un análisis de rutina, aún es utilizado por algunos investigadores. En diferentes trabajos se ha variado concentración del reactivo, alcalinidad y temperatura, buscando una reducción significativa del tiempo necesario para llegar a un estado estacionario. Magalhães et al., (2010) (96) adaptó el método, en el cual se varía la alcalinidad, al reemplazar el buffer de carbonato por una solución de hidróxido de sodio logrando disminuir el tiempo de reacción a 4 min y conseguir resultados altamente confiables. Al final se debe tener muy presente la concentración alcohólica en la mezcla, puesto que según Singleton et al., (1999) (94) el incluir solventes diferentes al agua en las muestras, algunas veces puede interferir la formación de la solución azul.

Esta técnica es ampliamente utilizada para determinar el contenido fenólico presente en plantas medicinales con el uso de diferentes sustancias estándares, siendo uno de los más utilizados el ácido gálico, esta metodología es considerada incluso como norma en algunas plantas como el té (97). Múltiples reportes en la última década dan fe del uso de la técnica, a continuación, se enumera una breve representación de estos trabajos: Serreli et al., (2017) (98) realizaron determinaciones en los extractos de *Myrtus communis* L. var. Leucocarpa, Toma y col. (2015) (99), determinaron los fenoles en *Nigella sativa L. (Black Cumin) and Nigella* damascena L; Kohoudea y col (2017) (100) aplicaron la técnica con el mismo fin en *Boswellia dalzielii* Hutch. (Burseraceae), mientras que investigadores chinos reportan el ensayo para determinar el contenido fenólico en múltiples *plantas: A. senticosus and A. koreanum* (101), Rahman y col (2018) (102) determinaron los fenoles totales en *Camelina sativa y Descurainia sophia.*

1.4.2.2. Contenido de flavonoides totales

A **los flavonoides** se les brinda una atención especial cuando se evalúa la actividad antioxidante, por el gran aporte que brindan estos metabolitos a la misma, lo que ha sido demostrado en múltiples publicaciones. Para la determinación del contenido total de estos compuestos en base a uno de ellos, la literatura propone como la técnica de mayor uso: la espectrofotometría. Esta técnica se aplica para la determinación del contenido total de estos metabolitos en una matriz vegetal a través de dos métodos colorimétricos. El método tricloruro de aluminio es usado para determinar el contenido de flavonas y flavonoides y está basando en la formación de un complejo entre ion aluminio (III) y los grupos hidroxilo y carbonilo de los flavonoides. La muestra disuelta en metanol se hace reaccionar con tricloruro de aluminio, se espera 30 min y se lee en la absorbancia a 425 nm. Para cuantificar flavonones y dihidroflavonoles es usado el método 2,4-dinitrofenilhidracina que posibilita formar en el medio básico la fenihidrazona coloreada cuya solución resultante se mide a 486 nm (103). Esta técnica se encuentra reportada en un gran número de publicaciones actuales que fueron consultados para el desarrollo del presente trabajo, con énfasis en el primer método (104).

1.4.3. Relación de la actividad antioxidante y los compuestos fenólicos presentes en plantas

En la actualidad los compuestos fenólicos presentan 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. Así, muchos de los efectos beneficiosos asociados al consumo de alimentos de origen vegetal se atribuyen en gran medida a los compuestos fenólicos (87, 88). La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se le asigna 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 (90). 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 (88).

La relación del contenido fenólico con la actividad antioxidante en extractos de plantas ha sido objeto de investigación en múltiples plantas medicinales en todo el mundo. La tabla 1.1 refleja una representación de trabajos publicados en los últimos cinco años, empleando como vía de determinación de la actividad ensayos *in vitro*.

Tabla 1.1. Ejemplos de investigaciones que muestran el estudio de la actividad antioxidante en extractos de plantas.

Plantas (Extractos)	**Actividad antioxidante**		**Referencia**
	Métodos utilizados	**Resultados**	
Onosma heterophyllum (Griseb) Extracto metánolico	DPPH CUPRAC FRAP ABTS TAOC Efecto quelante	Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.999 ($p < 0,05$) entre el contenido de fenoles y los tests de actividad antioxidante: DPPH, CUPRAC y FRAP.	(105)
Coronopus didymus Extracto etanólico	DPPH ABTS FRAP	Se obtuvo una correlación positiva entre el contenido fenólico y el método de FRAP ($R^2 = 0,989$)	(106)
Oenocarpus distichus Extracto hidroalcohólico	Contenido de fenoles totales, flavonoides totales y flavonas totales DPPH ABTS	Contenido total de flavonoides se correlacionó positivamente con la capacidad antioxidante mostrada para el método ABTS (R = 0,88)	(107)
Cocos nucifera L. Extracto alcohólico	Contenido de fenoles totales y flavonoides totales DPPH ABTS FRAP CUPRAC	Fenoles totales se correlacionaron positivamente con: CUPRAC (R = 0,985) FRAP (R=0,967) DPPH (R=0,935) ABTS (R=0,899)	(108)
Pistacia lentiscus L	Fenoles totales	Correlación positiva para el ensayo	(109)

Extracto metanólico	TAOC DPPH	DPPH (R2 = 0,8742) y TAOC (R^2 = 0,968), en relación con el contenido de fenoles.	
Lupinus albus L. Extracto metanólico	Fenoles totales ABTS DPPH FRAP	Los extractos mostraron una alta correlación con el ABTS (r=0.993, P < 0,01) y FRAP (r=0,999, P < 0,01).	(110)

Como se puede apreciar el método utilizado en todos para determinar los fenoles es el método de Folin-Ciocalteau y los estudios suelen realizarse en extractos alcohólicos, en menor medida en medio acuoso y en solventes apolares. Los ensayos antioxidantes más utilizados son el ensayo DPPH, FRAP y ABTS y estos ejemplos muestran una buena correlación con el contenido de fenoles y flavonoides totales en las plantas evaluadas.

CAPÍTULO II

Materiales y Métodos

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Recolección del material vegetal

Para el presente estudio se realizaron dos estrategias de recolección de las hojas de la *Mosiera bullata* B: por un lado se realizó recolección en las 5 regiones donde se ha localizado esta especie endémica en la región central del país: Jardín Botánico de la Universidad Central de Las Villas, vegetación sobre serpentina cerca de la cooperativa Camilo Cienfuegos (Callejón de Los Patos), vegetación sobre serpentina entre el Reparto José Martí y Hotel Los Caneyes, en las sabanas alrededor del Cerro de Pelo Malo y en el reparto Los Güiros. Esta recolección se realizó en el mes de febrero de 2018, fecha de inicio del trabajo experimental.

Por otra parte, se realizaron recolectas mensuales de la planta cultivada en el Jardín Botánico de la UCLV, en el período comprendido entre los meses de enero y junio de 2018.

El estudio experimental se desarrolló en el Departamento de Farmacia, Facultad Química – Farmacia de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas y comprendió tres etapas:

1°. Obtención del material vegetal y determinación del contenido fenólico.

2°. Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante.

3°. Relación del contenido fenólico con la actividad antioxidante.

2.2. Extractos, equipos y reactivos

- **Equipos, instrumentos de medición.**

Balanza analítica digital (Sartorius, BS–124S, Alemania)
Balanza técnica digital (Sartorius TE 12000, 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
Micropipetas de 5, 20, 100, 1000 µL, EPENDORF, Alemania.
Micropipetas de 5 mL, EPENDORF, Alemania.
Molino de cuchilla de 5 pulgadas (Chisty&Norris)
Zaranda MLV-THYS2, Alemania.

- **Reactivos más utilizados:**

Metanol, Lichrosolv, Merck
Ácido Sulfúrico, Panreac.
Agua desionizada y destilada.
Carbonato de sodio, MERCK.

2,2-difenil-picril-hidracilo(DPPH), SIGMA- ALDRICH.
2,4,6 Tripiridil-s-triazina, ACROSS-ORGANICS 10 M.
Ácido acético UNI-CHEM
Acido AscórbicoUNI-CHEM
Ácido gálico SIGMA- ALDRICH
Acetato de sodio, UNI-CHEM
Ácido clorhídrico, UNI-CHEM
Ácido sulfúrico, UNI-CHEM.
Quercetina, ACROS-ORGANICS.
ABTS, ROCHE
Cloruro férrico, MERCK.
Carbón activado UNI-CHEM.
EDTA, UNI-CHEM
Eugenol MERCK
Ferrozine, SIGMA- ALDRICH
Fosfato sódico, RIEDEL-de Haën.
Molibdato de Amonio, REACHIM.
Hidróxido de potasio, Panreac.
Rutina, ACROS-ORGANICS.
Reactivo Folin-Ciocalteau (FCR), SIGMA –ALDRICH.
Tricloruro de aluminio, MERCK.
Persulfato de potasio MERCK

2.3. Obtención de los extractos secos a partir de las hojas de *Mosiera bullata*

Los extractos objetos de análisis se obtuvieron a partir de las hojas de *Mosiera bullata* B.; la identificación taxonómica del material vegetal se realizó en el lugar de colecta por el DrC. Alfredo Noa Monzón y el MSc. Osmel Cárdenas García, ambos del Centro de Estudios del Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Los ejemplares de la planta se compararon con muestras identificadas en el herbario Universidad de Las Villas (ULV) localizado en la citada institución, bajo el número 3879.

Las hojas de *Mosiera bullata B.* fueron recolectadas en horas de la mañana en las 5 zonas de la región central donde fueron identificadas: Jardín Botánico de la Universidad Central de Las Villas, vegetación sobre serpentina cerca de la cooperativa Camilo Cienfuegos, vegetación sobre serpentina entre el Reparto José Martí y Hotel Los Caneyes, en las sabanas alrededor del Cerro de Pelo Malo y en el reparto Los Güiros en la provincia de Villa Clara, Cuba. Cada lugar de procedencia en el mes de febrero de 2018. Además, a la planta cultivada en el Jardín Botánico se le realizó una recolecta mensual durante los primeros 6 meses del año 2018.

El material recolectado fue trasladado en bolsas de nylon al Laboratorio de Química-Farmacéutica y lavado con abundante agua potable. Se sometió a un proceso de secado en la estufa a 30°C y posteriormente se trituró con un molino de cuchillas con un tamiz de talla 3 mm a 4500 rpm.

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.

2.3.1. Metodología de obtención y almacenamiento de los extractos

Los extractos se obtienen utilizando las hojas de *Mosiera bullata* previamente molinadas. Se pesaron 10 g de muestra (polvo seco de las hojas) y se realizaron extracciones con 100 mL de metanol, a temperatura ambiente, con agitación en Zaranda durante 24h, realizándose separadamente 2 extracciones bajo las mismas condiciones. Los extractos se combinaron y se eliminó la clorofila por tratamiento con carbón activado 1% (1 g por 100 mL de extracto). Posteriormente los extractos se filtraron utilizando filtros de papel 0,45 µm y el solvente se evaporó por un rotoevaporador en vacío a 40 ºC hasta la sequedad.

2.4. Determinación de la composición fenólica en los extractos obtenidos

2.4.1. Determinación del contenido fenólico total (CFT) en los extractos evaluados.

El contenido total de compuestos fenólicos en los extractos de *Mosiera bullata B.* se determinó empleando la reacción de *Folin-Ciocalteau*, según el método de Nurmi (1996), utilizando ácido gálico como el compuesto fenólico de referencia (111).

- ✓ **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 H_2O 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 µL y se adicionó a continuación 200 µL del reactivo de Folin-Ciocalteau y 2 mL de Na_2CO_3 7%. Se completó con H_2O destilada hasta un volumen de 5 mL. Transcurridos 30 minutos en la oscuridad y 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 *Mosiera bullata* B.:

Los extractos obtenidos de las hojas molinadas de la *Mosiera bullata* B. fueron preparados a partir de las soluciones madres, de la cual se tomó la alícuota correspondiente para desarrollar el procedimiento del ensayo. Dichas soluciones y alícuotas aparecen descritas para todas las muestras evaluadas en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Preparación de las muestras (extractos) para el desarrollo del ensayo CFT

Extracto (Mes/Zona Geográfica)	Peso (mg)/Volumen(mL) de la solucion madre inicial	Concentración de la solución madre (mg/mL)	Alícuota tomada (µL)
Mes de Enero	50/5	10	100
Mes de Febrero	50/5	10	50
Mes de Marzo	25/5	5	50
Mes de Abril	50/5	10	50
Mes de Mayo	50/5	10	50
Mes de Junio	50/5	10	50
Zona Los Güiros	25/5	5	50
Zona Los Caneyes	50/5	10	50
Zona Cerro de Pelo Malo	50/5	10	50
Cooperativa Camilo Cienfuegos (Los Patos)	50/5	10	50
Jardín Botánico de la UCLV	50/5	10	50

Procedimiento: A cada alícuota tomada se le adicionó 200 µL del reactivo de *Folin-Ciocalteau*, 2 mL de Na_2CO_3 7% y finalmente se completaron a un volumen de 5 mL con H_2O destilada. Luego de transcurrir 30 minutos se midió la absorbancia de cada uno a 765 nm contra el blanco metanol. 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.

2.4.2. Determinación del contenido de flavonoides totales en los extractos obtenidos

El contenido total de flavonoides en los extractos de *Mosiera bullata* B*.* se determinó empleando el reactivo $AlCl_3$, según el método de Messaoud C. CH, y col. (2011) con algunas modificaciones, utilizando la rutina como el compuesto flavonoide patrón (112).

- ✓ **Desarrollo de la técnica**

Preparación de la curva de calibración de rutina:

Solución madre de rutina: Se pesó 2 mg de rutina, se disolvió en H_2O destilada y se enrasó a un volumen de 10 mL, para obtener una solución madre con concentración 0,2 mg/mL.

Solución de $AlCl_3$ (20 mg/mL): Se pesó 500 mg de $AlCl_3$ 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 1mL con metanol 70%. Se adicionó a continuación 1 mL de $AlCl_3$ 20mg/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 *Mosiera bullata* B.*:*

Los extractos obtenidos de las hojas molinadas de la *Mosiera bullata* B. fueron preparados a partir de las soluciones madres, de la cual se tomó la alícuota correspondiente para desarrollar el procedimiento del ensayo. Dichas soluciones y alícuotas aparecen descritas para todas las muestras evaluadas en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Preparación de las muestras (extractos) para el desarrollo del ensayo CFVT.

Extracto (Mes/Zona Geográfica)	Peso (mg)/Volumen(mL) de la solucion madre inicial	Concentración de la solución madre (mg/mL)	Alícuota tomada (µL)
Mes de Enero	50/5	10	400
Mes de Febrero	50/5	10	400
Mes de Marzo	25/5	5	400
Mes de Abril	50/5	10	100
Mes de Mayo	50/5	10	200
Mes de Junio	50/5	10	200
Zona Los Güiros	25/5	5	400
Zona Los Caneyes	50/5	10	200
Zona Cerro de Pelo Malo	50/5	10	200
Cooperativa Camilo Cienfuegos (Los Patos)	50/5	10	200
Jardín Botánico de la UCLV	50/5	10	400

Procedimiento: A partir de las alícuotas tomadas de cada extracto de las hojas se completaron a 1 mL con metanol 70%, se adicionó a continuación 1 mL del reactivo de $AlCl_3$ preparado. 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.

2.3. Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de *Mosiera bullata* B. fueron aplicados cinco test *in vitro* que incluyen los dos mecanismos recomendados para esta actividad:

2.3.1. Secuestro del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (Ensayo DPPH)

La actividad secuestradora del radical DPPH fue determinada por el método de Singh, 2015 (113), con ligeras modificaciones.

Preparación de la disolución de DPPH:

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

Preparación de las disoluciones de referencia:

Los antioxidantes eugenol, rutina y quercetina fueron usados como controles positivos. En cada caso se obtuvo la curva de calibración correspondiente según el rango de concentraciones evaluadas: eugenol 2 a 10 µg/mL, rutina 5 a 20 µg/mL y quercetina 2,5 a 12,5 µg/mL. A partir de las ecuaciones de regresión se determinó el valor de IC_{50} en cada caso. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Preparación de los extractos de *Mosiera bullata* B.*:*

Los extractos obtenidos de las hojas molinadas de la *Mosiera bullata* B. fueron preparados a partir de las soluciones madres, a partir de la cual diferentes y variadas diluciones permitieron obtener una solución final, de la cual se tomó la alícuota para desarrollar el procedimiento del ensayo. Dichas soluciones aparecen descritas para todas las muestras evaluadas en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. Preparación de las muestras (extractos) para el desarrollo del ensayo DPPH.

Extracto (Mes/Zona Geográfica)	Peso (mg)/Volumen(mL) de la solucion madre inicial	Concentración de la solución final (mg/mL)	Alícuota tomada (µL)
Mes de Enero	50/5	5	10, 20, 30, 40 y 50
Mes de Febrero	50/5	10	10, 20, 30, 40 y 50
Mes de Marzo	25/5	1	10, 20, 30, 40 y 50
Mes de Abril	50/5	2	10, 20, 30, 40 y 50
Mes de Mayo	50/5	1	10, 20, 30, 40 y 50
Mes de Junio	50/5	1	10, 20, 30, 40 y 50
Zona Los Güiros	25/5	1	10, 20, 30, 40 y 50
Zona Los Caneyes	50/5	1	25, 50,75,100, 125
Zona Cerro de Pelo Malo	50/5	1	25, 50,75,100, 125
Cooperativa Camilo Cienfuegos (Los Patos)	50/5	1	25, 50,75,100, 125
Jardín Botánico de UCLV	50/5	1	10, 20, 30, 40 y 50

Procedimiento: A 1 mL de cada muestra evaluada, se le adicionó 3 mL de la solución preparada de DPPH. Después se colocaron durante 30 minutos en la oscuridad y se midió la absorbancia a 517 nm frente a un blanco (metanol) Nishi S. R., (2015) (113). Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Se calculó el porcentaje de inhibición de la formación del radical libre DPPH utilizando la expresión:

$$\text{Inhibición de la formación del radical libre DPPH}\bullet\ (\%) = \frac{\quad}{\quad}$$

Donde:

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

A_S: absorbancia de la muestra.

Se calculó el valor de IC_{50} (concentración de muestra que se requiere para reducir el 50% de los radicales libres) para cada muestra utilizando la ecuación de regresión obtenida a partir de concentraciones de extractos y de sustancias de referencia y el porcentaje de inhibición de la formación del radical libre DPPH.

2.3.2. Determinación de la Actividad Quelante

La actividad quelante se determinó por el método propuesto por Deckery Welch en 1990 (114), con algunas modificaciones, donde se observa la habilidad quelante de extractos de plantas sobre el Fe^{2+}.

Preparación de los extractos de *Mosiera bullata B.:*

Los extractos obtenidos de las hojas molinadas de la *Mosiera bullata* B. fueron preparados a partir de las soluciones madres, de la cual se tomó la alícuota correspondiente para desarrollar el procedimiento del ensayo. Dichas soluciones y alícuotas aparecen descritas para todas las muestras evaluadas en la tabla 2.4.

Tabla 2.4. Preparación de las muestras (extractos) para la determinación de la actividad quelante.

Extracto (Mes/Zona Geográfica)	Peso (mg)/Volumen(mL) de la solucion madre inicial	Concentración de la solución madre (mg/mL)	Alícuota tomada (µL)
Mes de Enero	50/5	10	100, 200, 300, 400 y 500
Mes de Febrero	50/5	10	50, 100, 150, 200 y 250
Mes de Marzo	25/5	5	100, 200, 300, 400 y 500
Mes de Abril	50/5	10	100, 150, 200, 250 y 300
Mes de Mayo	50/5	10	100, 200, 300, 400 y 500
Mes de Junio	50/5	10	50, 100, 150, 200 y 250
Zona Los Güiros	25/5	5	100, 200, 300, 400 y 500
Zona Los Caneyes	50/5	10	50, 100, 150, 200 y 250
Zona Cerro de Pelo Malo	50/5	10	50, 100, 150, 200 y 250
Cooperativa Camilo Cienfuegos (Los Patos)	50/5	10	50, 100, 150, 200 y 250
Jardín Botánico de la UCLV	50/5	10	50, 100, 150, 200 y 250

Procedimiento: Se tomó cada alícuota se adicionó 50 µL de $FeCl_2$ (0.2 M) y 100 µL de ferrozina (0.5 M) y se completó volumen a 2 mL con metanol. Se esperó 10 minutos y se midió la absorbancia a 562 nm frente a un blanco de solución de ferrozina en agua destilada.

El control negativo se preparó por el mismo procedimiento sin la adición del extracto. EDTA se utilizó como control positivo. Se partió de una disolución de EDTA 1 mg/mL y se tomaron alícuotas de 50, 100, 150, 200 y 250 µL y se realizó el mismo procedimiento de los extractos. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Donde:

$A_{control}$: Absorbancia del control

$A_{muestra}$: Absorbancia de la muestra

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

La determinación del poder reductor/antioxidante férrico (FRAP) en los extractos de *Mosiera bullata* B. fue determinado por el método del 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) según el método de Benzie y Strain, (1996) (66), utilizando sulfato ferroso como sustancia de referencia.

Preparación del reactivo (FRAP):

10 volúmenes de acetato de sodio (CH_3COONa) 0.3M (pH = 3.6), 1 volumen de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 0.1M disuelto en HCl 0.4M, 1 volumen de cloruro férrico ($FeCl_3$) 0.2M y 1 volumen de agua destilada.

Preparación de los extractos de *Mosiera bullata B.:*

Los extractos obtenidos de las hojas molinadas de la *Mosiera bullata* B. fueron preparados a partir de las soluciones madres, a partir de la cual diferentes y variadas diluciones permitieron obtener una solución final, de la cual se tomó la alícuota para desarrollar el procedimiento del ensayo. Dichas soluciones aparecen descritas para todas las muestras evaluadas en la tabla 2.5.

Tabla 2.5. Preparación de las muestras (extractos) para el desarrollo del ensayo FRAP.

Extracto (Mes/Zona Geográfica)	Peso (mg)/Volumen(mL) de la solucion madre inicial	Concentración de la solución final (mg/mL)	Alícuota tomada (µL)
Mes de Enero	50/5	0,025	100
Mes de Febrero	50/5	0,025	100
Mes de Marzo	25/5	0,025	100
Mes de Abril	50/5	0,1	200
Mes de Mayo	50/5	0,1	200
Mes de Junio	50/5	0,05	200
Zona Los Güiros	25/5	0,025	100
Zona Los Caneyes	50/5	1	200
Zona Cerro de Pelo Malo	50/5	0,05	200
Cooperativa Camilo Cienfuegos (Los Patos)	50/5	1	200
Jardín Botánico de la UCLV	50/5	0,025	100

Procedimiento: Se tomaron las alícuotas correspondientes y se completó a 2 mL con el reactivo de FRAP. Transcurrido 10 minutos se realizó la lectura a 595 nm frente a un blanco de solución del reactivo de FRAP en agua destilada.

2.3.4. Capacidad antioxidante total (TAOC)

La capacidad antioxidante total (TAOC) en los extractos metanólicos obtenidos de las hojas de *Mosiera bullata*, en diferentes meses y áreas geográficas fue determinada por el método del molibdato de amonio según el método de Umamaheswari M, (2008), utilizando ácido ascórbico como sustancia de referencia (115).

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 3 mL de la mezcla de los siguientes reactivos (1 mL de ácido sulfúrico 0,6 M, 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 ºC, se enfriaron y se midió la absorbancia a 695 nm, utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como blanco.

Preparación de los extractos de *Mosiera bullata B.:*

Los extractos obtenidos de las hojas molinadas de la *Mosiera bullata* B. fueron preparados a partir de las soluciones madres, de la cual se tomó la alícuota correspondiente para desarrollar el procedimiento del ensayo. Dichas soluciones y alícuotas aparecen descritas para todas las muestras evaluadas en la tabla 2.6.

Tabla 2.6. Preparación de las muestras (extractos) para el desarrollo del ensayo TAOC

Extracto (Mes/Zona Geográfica)	Peso (mg)/Volumen(mL) de la solucion madre inicial	Concentración de la solución madre (mg/mL)	Alícuota tomada (µL)
Mes de Enero	250/5	50	100
Mes de Febrero	50/5	10	300
Mes de Marzo	25/5	5	300
Mes de Abril	50/5	10	150
Mes de Mayo	50/5	10	300
Mes de Junio	50/5	10	150
Zona Los Güiros	25/5	5	300
Zona Los Caneyes	50/5	10	300
Zona Cerro de Pelo Malo	50/5	10	300
Cooperativa Camilo Cienfuegos	50/5	10	300
Jardín Botánico de la UCLV	25/5	5	300

***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 ºC, 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.

2.3.5. Ensayo ABTS

Este ensayo se realizó siguiendo la metodología descrita por Pannala et al., (2001) (116) en la cual el radical $ABTS^{\bullet+}$ se produce utilizando una mezcla de reacción que contiene ABTS (3,5 mM) y persulfato de potasio (1 ,25 mM) en agua destilada. La mezcla de reacción se prepara 12 h antes de su uso y se mantiene a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Se ajusta la absorbancia de la disolución $ABTS^{\bullet+}$ a 0,7 unidades a 730 nm con tampón fosfato pH 7,4. La actividad antioxidante se evalúa midiendo el cambio de absorbancia a 732 nm de la solución de $ABTS^{\bullet+}$ cuando se alcanza el estado estacionario Arnao, (1999) (117). La capacidad captadora de radicales libres se calcula según la fórmula:

Siendo Ac = media aritmética de la absorbancia del control, y Am la media aritmética de la absorbancia de la muestra.

Preparación de la curva de calibración de Trolox

Solución madre de Trolox: *Se* pesó 2 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 2mg/mL (Disolución A). Se pipetearon a partir de la disolución. A las siguientes alícuotas: 10, 20, 30, 40, 50 µL y se completaron a 1mL con H_2O destilada para completar la curva de calibración de 20-100µg/Ml.

Preparación de los extractos de *Mosiera bullata* B*.:*

Tabla 2.7. Preparación de las muestras (extractos) para el desarrollo del ensayo ABTS

Extracto (Mes/Zona Geográfica)	Peso (mg)/Volumen(mL) de la solucion madre inicial	Concentración de la solución final (mg/mL)	Alícuota tomada (µL)
Mes de Enero	250/5	0,1	200
Mes de Febrero	50/5	0,1	200
Mes de Marzo	25/5	0,1	200
Mes de Abril	50/5	0,1	200
Mes de Mayo	50/5	0,1	200
Mes de Junio	50/5	0,1	200
Zona Los Güiros	25/5	0,1	200
Zona Los Caneyes	50/5	0,1	200
Zona Cerro de Pelo Malo	50/5	0,1	200

Cooperativa Camilo Cienfuegos (Los Patos)	50/5	0,1	200
Jardín Botánico de la UCLV	50/5	0,1	200

***Procedimiento*:** Se tomó la totalidad de las disoluciones madre de cada muestra y se adicionó 1, 8 mL del reactivo ABTS. Transcurrido 6 minutos se realizó la lectura a 734 nm, utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como blanco.

CAPÍTULO III

Resultados y Discusión

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados de la composición fenólica de los extractos metanólicos obtenidos de las hojas de *Mosiera bullata B.*

Muchas especies vegetales presentan metabolitos secundarios, como taninos, saponinas, compuestos fenólicos y alcaloides: estas sustancias son elaboradas por la planta y cumplen funciones que tienen que ver con la defensa ante hongos, bacterias y virus y la protección ante la radiación ultravioleta, además, sirven como mecanismo para evitar la deshidratación de sus tejidos. El reconocimiento de las propiedades biológicas de estos metabolitos ha alentado el desarrollo de este campo, por ejemplo en la búsqueda de principios activos para la el desarrollo de nuevos fármacos (105).

Según reportes encontrados en la literatura muchos principios bioactivos muestran fuertes actividades antioxidantes, entre los cuales destacan los compuestos fenólicos, constituyendo uno de los grupos más numerosos y omnipresentes dentro de los metabolitos secundarios (6). Numerosos son los valores que se les atribuye a estos compuestos: color y olor de las plantas o frutos, valores nutricionales y por supuesto, el potencial antioxidante de ellas. Estos compuestos regulan muchas propiedades biológicas, por ello, sobre la base de los beneficios sobre la salud que les han sido atribuidos, los compuestos fenólicos y sus derivados han sido tomados en consideración de manera tal que el interés sobre ellos se ha visto incrementado(118).

3.1.1. Determinación del contenido fenólico total.

El contenido total de compuestos fenólicos fue calculado empleando la curva de calibración del ácido gálico como patrón (figura 3.1), los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramos de extracto seco (mgEAG/gES).

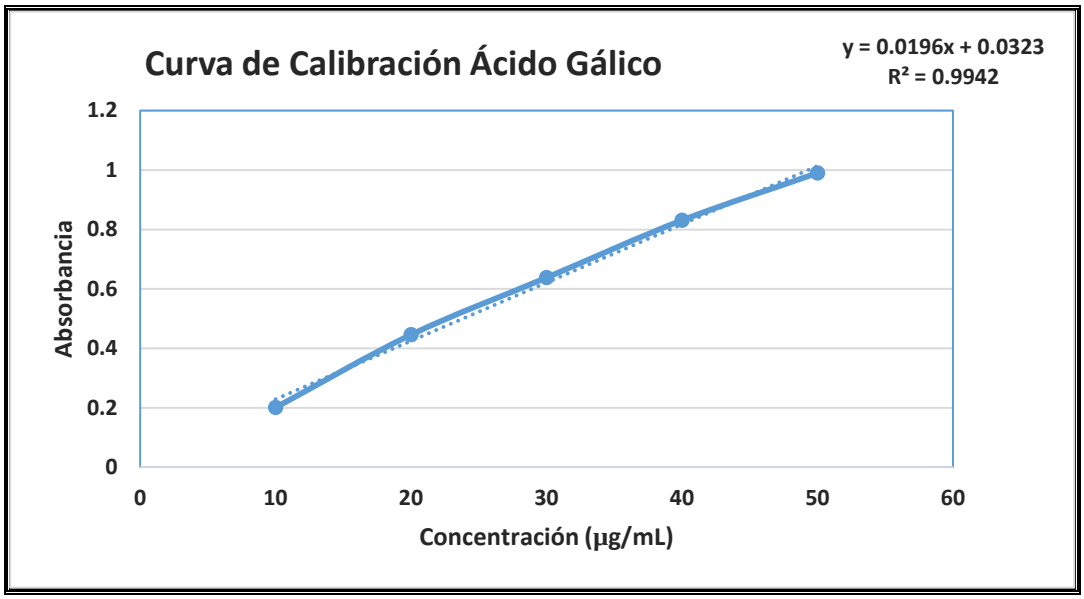


Figura 3.1. Curva de calibración de ácido gálico, para la determinación del contenido total de compuestos fenólicos.

Los valores obtenidos en el contenido fenólico para las cinco zonas de recolección evaluadas resultaron similares (figura 3.2). Esto se puede explicar, entre muchas razones, teniendo en cuenta que el contenido de metabolitos secundarios en la planta puede estar influenciado por el genotipo de ella (la especie y la variedad), las características ambientales (la radiación solar y la disponibilidad de agua), la velocidad de crecimiento, la condición nutricional del suelo, entre otros factores (119). Las cinco zonas de recolección poseen suelos de serpentinas caracterizados por una composición nutricional mayoritaria en Fe, Mg, Ni, Cr y otros metales, mientras que las concentraciones de Ca, K, N y P son bajas, lo cual los hace suelos con cierto grado de infertilidad capaces de soportar una vegetación determinada como es el caso de la planta en estudio. Las plantas, en los diferentes lugares de recolección, han estado expuestas a similares radiaciones solares y disponibilidad de agua debido a la cercanía de las zonas (afueras de la ciudad de Santa Clara) en las que se encuentra la misma (120).

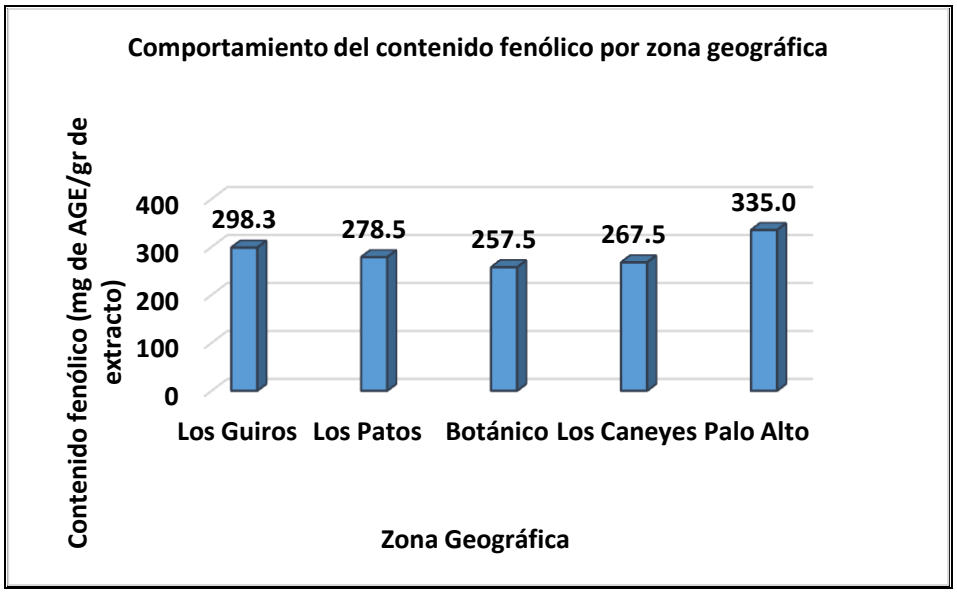


Figura 3.2. Comportamiento del contenido fenólico en las cinco regiones evaluadas.

Con el fin de evaluar los cambios estacionales en el contenido fenólico total, se llevó a cabo un análisis sistemático mensual mediante la recolección de las hojas entre los meses de enero a junio, como se describe en el epígrafe 2.2. En la figura 3.3. se observa el comportamiento del contenido de fenoles totales durante el período en estudio. Los resultados muestran un incremento marcado del contenido fenólico a partir del mes de marzo, alcanzándose los niveles máximos en el mes de mayo. Estos meses se corresponden con los meses lluviosos y con un incremento de las temperaturas. Este resultado posee total correspondencia con lo descrito por múltiples reportes encontrados en la literatura donde se afirma que las condiciones climáticas tienen una influencia directa en el contenido de metabolitos en las plantas medicinales (13, 121). Cabe destacar que en el mes de abril se observa una leve disminución del contenido de estos metabolitos, que pudiera atribuirse a que durante este mes hubo una ligera disminución de los mm de agua acumulados con respecto a los meses anteriores (Tabla 3.1), lo que pudiera deducir una relación negativa entre el estrés hídrico de la planta y la producción de compuestos fenólicos(119).

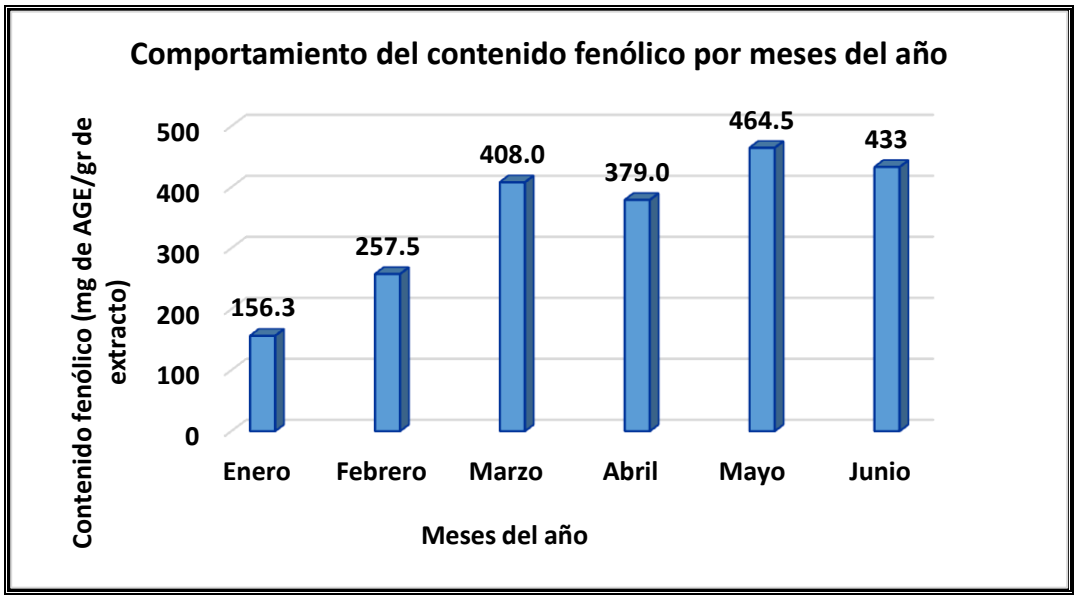


Figura 3.3. Variación en el contenido mensual del contenido fenólico

Tabla 3.1 Comportamiento de las condiciones climáticas en el primer semestre del año para la provincial de Villa Clara, Cuba. Datos tomados del Instituto de Meteorología de la República de Cuba. 2018.

Mes de recolección	**Temperatura promedio (°C)**	**Precipitación promedio (mm de lluvia acumulada)**
Enero	25	100
Febrero	28	25
Marzo	28,5	125
Abril	31	100
Mayo	30	164
Junio/15	31	155

Aunque el contenido total de compuestos fenólicos para la especie no aparece reportado en la literatura, los valores obtenidos superan considerablemente lo reportado para otras plantas medicinales, consideradas muy antioxidantes, como los extractos acuosos obtenidos de diferentes variedades de té (*Camellia sinensis*) que posee entre 7 y 26.3 mg GA/g extracto, por solo citar un ejemplo entre tantos (97). Además es importante señalar que al comparar con valores de este parámetro en otras especies pertenecientes a géneros de la familia *Myrtaceae,*

a la cual pertenece la planta medicinal objeto de estudio, como la *Metasequoia glyptostroboides* que posee 184.8±0.4mg GA/g extracto (122) y la *Gardenia jasminoides* con 190.97 mg GA/g extracto , (123) se observa que los valores obtenidos para la *Mosiera bullata* son superiores, lo que permite afirmar que la planta en estudio constituye una buena fuente de compuestos antioxidantes.

3.1.2 Determinación del contenido total de flavonoides

El CTFV para los extractos metanólicos obtenidos de las hojas de la planta en diferentes meses del año y diferentes áreas geográficas fue calculado empleando la curva de calibración de la rutina (figura 3.4).

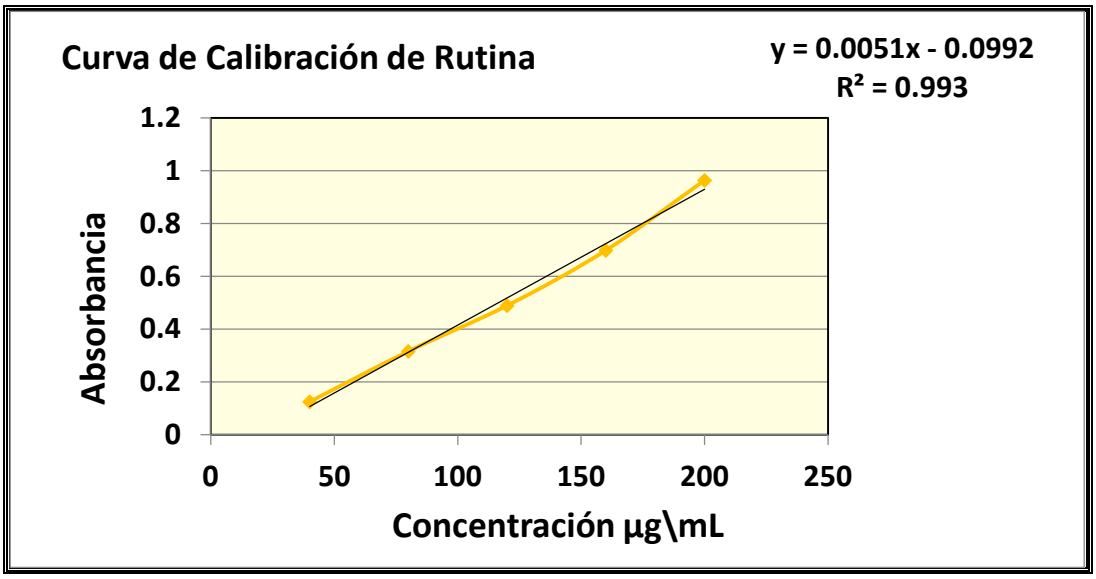


Figura 3.4. Curva de calibración de la rutina para la determinación de flavonoides totales.

Los resultados obtenidos para las cinco regiones donde se recolectó el material vegetal se expresaron como miligramos equivalentes de rutina por gramos de extracto seco (mgER/gES) y se representan en la figura 3.5. En esta se observa, para los extractos obtenidos de la planta recolectada en Los Güiros, una ligera disminución de la concentración con respecto a las cuatro zonas restantes, para las cuales se observan valores similares. Teniendo en cuenta que la cantidad de metabolitos secundarios en una planta es el resultado de un proceso que comprende la biosíntesis de la molécula y su acumulación en la planta, proceso que puede verse influenciado por la recolección en diferentes etapas del crecimiento y en diferentes fechas y horas, por factores ambientales como la temperatura y el estrés hídrico y por la edad de la planta, entre otros aspectos (124); estas pequeñas variaciones pudieran explicarse dado

que la distancia de la zona de recolección obligó a colectar en diferentes días, lo que introduce ligeros cambios de los factores citados.

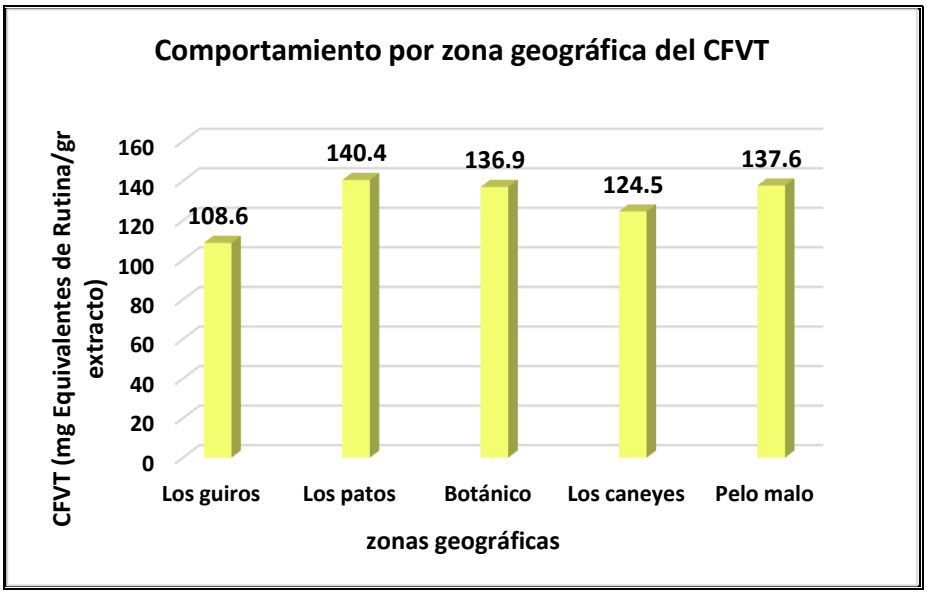


Figura 3.5. Comportamiento del contenido de flavonoides en las cinco regiones evaluadas.

Además, es necesario considerar, la influencia del tipo suelo y su aporte al proceso de producción de este tipo de metabolitos. La planta *Mosiera bullata*, en todas las zonas de recolección, crece en un suelo sobre serpentina; a pesar de esta similitud se observa cierta heterogeneidad en el desarrollo de la vegetación en ellas, que puede estar relacionada con la variabilidad de los elementos nutritivos y/o metales pesados como el Ni y Cr (125). En un estudio llevado a cabo por Taboada y colaboradores en el año 1997 se midió la capacidad de intercambio catiónico en suelos sobre serpentinas de una parcela de 4 has cuyos resultados mostraron una alta variabilidad (18 - 44,5 cmol/kg). Este indicador es uno de los factores que influyen directamente sobre la conductividad eléctrica de este tipo de suelo, que a su vez tiene importante contribución en la producción de metabolitos secundarios (fenoles totales, taninos condensados y taninos totales) en diferentes especies, según reportan en el año 2014 Santacoloma y Granados (126).

Por su parte, el comportamiento de la concentración de flavonoides en los diferentes meses evaluados (figura 3.6) resultó ser similar al comportamiento obtenido para el contenido fenólico total, con valores muy superiores a partir del mes de marzo, correspondiéndose con los meses más lluviosos de los meses evaluados.

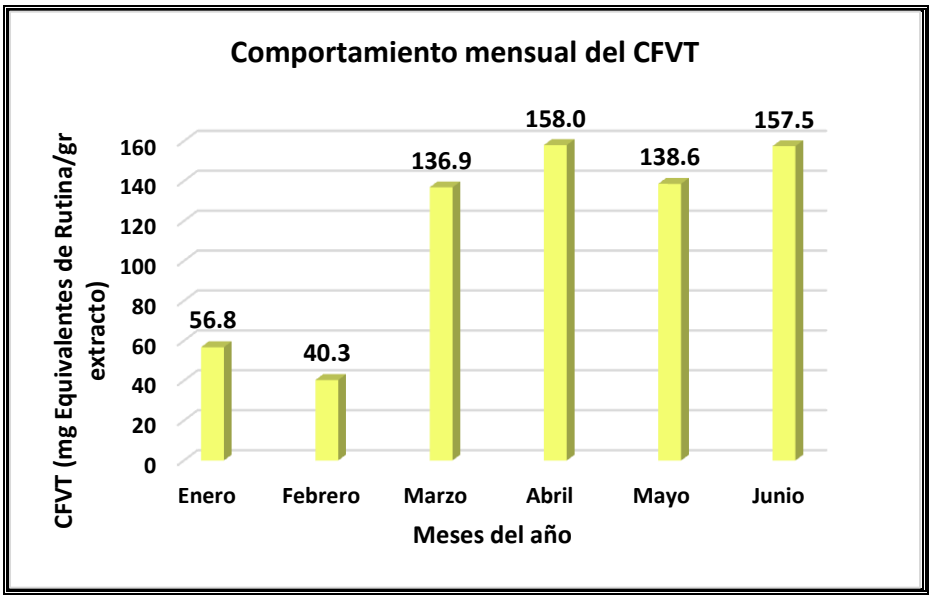


Figura 3.6. Comportamiento del contenido de flavonoides en los extractos evaluados.

Al analizar de forma comparativa el comportamiento de los resultados del contenido de fenoles y de flavonoides, realizado en los seis primeros meses del año, (figura 3.7) se observa que este resultó similar, con un incremento de dichos valores a partir del mes de marzo para ambos grupos de metabolitos. Si se considera lo explicado anteriormente con respecto a la influencia de los factores ambientales y que los flavonoides como grupo están considerados compuestos fenólicos, el resultado se considera muy adecuado.

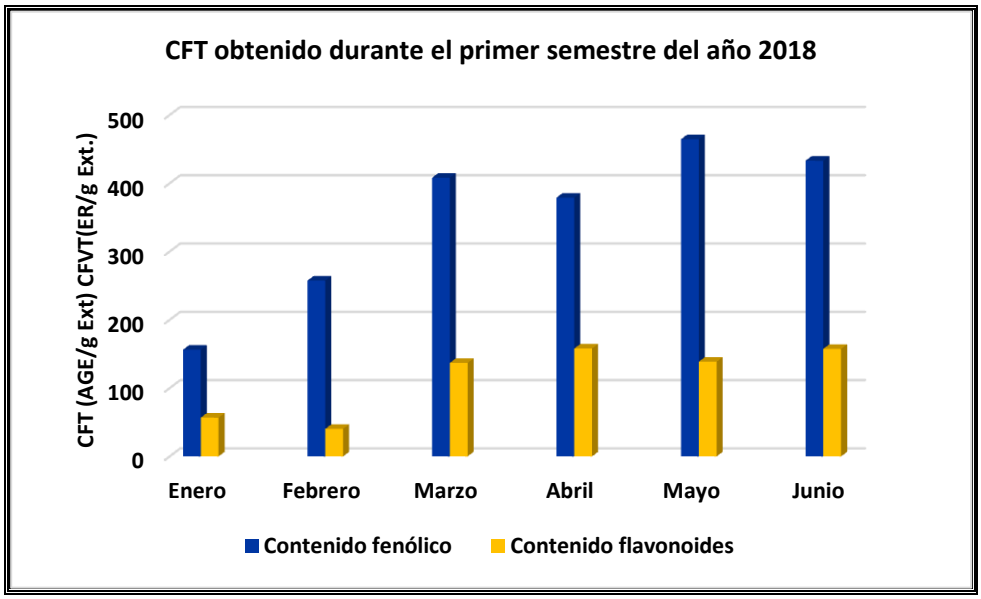


Figura 3.7. Comportamiento del contenido de Fenoles y Flavonoides totales durante el primer semestre del año.

La confirmación cuantitativa de la presencia de estos metabolitos reviste una gran importancia para la planta medicinal en estudio al no encontrarse reportes sobre el tema en la literatura científica. Además, un gran número de autores relacionan la presencia de éstos, en múltiples especies de plantas medicinales, con propiedades farmacológicas, entre las cuales se destaca la actividad antioxidante(109, 110).

Finalmente, 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 de la planta estudiada es muy superior a los valores reportados en otras plantas. Lo anterior permite inferir que este extracto pudiera tener una alta actividad antioxidante, si se tiene en cuenta que estos metabolitos están considerados como los que más aportan a esta actividad farmacológica.

Tabla 3.2. Contenido total de flavonoides de extractos de algunas plantas medicinales publicados en la literatura.

Nombre de la planta	**Contenido total de fenoles ((mg EAG/gES)**	**Contenido total de flavonoides publicado (mgER/gES)**	**Referencia**
Citrus reticulata Blanco	Cáscaras: 22,80 – 32,76 Residuos de pulpa: 8,25 – 15,15 Semilla:1,09– 2,81	Cáscaras: 23,29-56,52 Residuos de pulpa: 6,38-16,74 Semilla: 5,96 – 18,23	(127)

Camellia sinensis	Té verde: 26,33	Té verde: 50,1	(97)
A. senticosus (Hojas)	56,08	41,23	(101)
A. koreanum (Hojas)	40,61	38,21	(101)

3.2. Resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante.

El uso de antioxidantes sintéticos se está reconsiderando actualmente a causa de sus posibles riesgos toxicológicos (3). En consecuencia, los investigadores están buscando antioxidantes naturales que se originan en las plantas, que tienen un mayor beneficio que los sintéticos (4). Los antioxidantes naturales son sustancias capaces de prevenir o retrasar el estrés oxidativo incluso a concentraciones relativamente pequeñas al actuar directamente sobre especies reactivas de oxígeno o al estimular sistemas de defensa endógenos. Cuando existe un desequilibrio entre los procesos de oxidación y antioxidación, puede acumularse un exceso de radicales libres que pueden causar daño oxidativo a las moléculas y tejidos biológicos, causantes de los procesos de envejecimiento y otras enfermedades tales como: arterioesclerosis, artritis, demencia, cáncer, entre otras. (5, 128, 129).

Son diversos los métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* que consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical (130). En el presente trabajo la actividad antioxidante de los extractos fue evaluada por cinco métodos diferentes dado que los antioxidantes pueden actuar por múltiples mecanismos, dependiendo del sistema de reacción o la fuente radicalaria u oxidante (131): ensayo de actividad secuestradora del radical *DPPH*, el ensayo con el radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$, el ensayo para medir la actividad quelante del ion ferroso, el ensayo para medir la fuerza antioxidante reducida del ión férrico (*FRAP*) y el ensayo de la capacidad antioxidante total.

Estos ensayos abarcan dos mecanismos de acción que aparecen descritos en la literatura por los cuales se desarrolla la acción antioxidante; la actividad secuestradora o antiradicálica y las propiedades de quelación o transición de metales (usualmente del hierro). Indistintamente en estos ensayos son empleados compuestos, de origen natural o sintético, con actividad antioxidante reconocida (eugenol, rutina, quercetina, trolox, ácido ascórbico, EDTA y sulfato ferroso) que permiten establecer comparaciones con la actividad mostrada por los extractos que son evaluados. Es importante destacar que en el análisis de los resultados se tuvo en cuenta que, se ha demostrado que la planta colectada en diferentes regiones muestra

diferencias en su composición química (132-134), por lo que las variaciones obtenidas en las cinco regiones deben ser interpretadas adecuadamente para declarar similitud o diferencias entre ellas.

3.2.1. Secuestro del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (Ensayo *DPPH*)

Existen varios ensayos de actividad antioxidante rápidos y consistentes, cada uno de ellos con sus ventajas y desventajas, siendo de los métodos más comunes y fiables, utilizado para estudios preliminares, el ensayo que utiliza como radical el DPPH (131). Es una técnica ampliamente utilizada debido a su simplicidad y a la ventaja de emplear un radical libre estable disponible comercialmente. Es altamente reproducible y comparable con otros métodos como ABTS, reducción de anión superóxido e inhibición de peroxidación lipídica (131).

Para el análisis de los resultados se procesaron las curvas de calibración correspondientes a cada uno de los patrones utilizados, entre los cuales se seleccionó un componente volátil por ser la especie *Mosiera bullata* B. una planta aromática, y dos flavonoides (rutina y quercetina) por el contenido de estos metabolitos determinado en la planta. Además, fueron procesadas las curvas para cada extracto evaluado, obteniéndose las ecuaciones de las rectas y el coeficiente de correlación para cada una de ellas que se recogen en la tabla 3.3.

Cada curva mostró 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 el radical *DPPH*. La ecuación de la recta obtenida en cada una permitió determinar el valor de IC_{50} para cada muestra, siguiendo la metodología de Litchfield y Wilcoxon (34) donde bajos valores de IC_{50} son indicativos de buena actividad antioxidante (Antirradicalaria) (135).

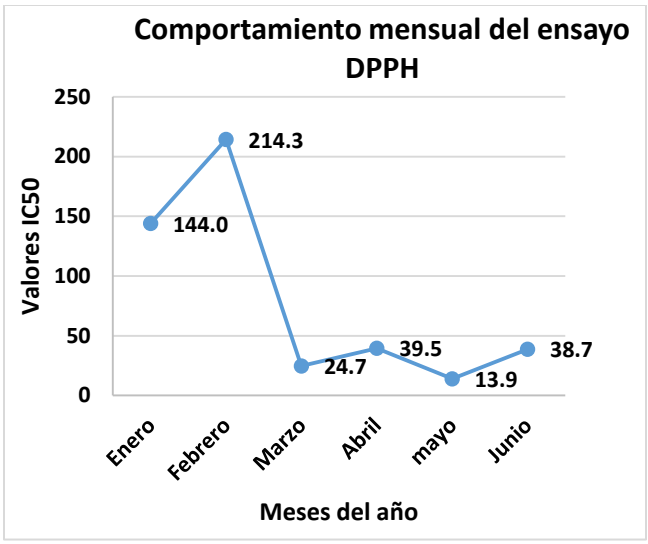
Tabla 3.3. Resultados obtenidos para el ensayo DPPH para todos los extractos evaluados y los patrones antioxidantes seleccionados.

Extracto (zona geográfica/mes)	**Ecuación de la recta**	**R^2**	**IC_{50} (µg/mL)**
Los Güiros	Y=0,477X+31,44	0,953	11,30±0,96
Los Patos	Y=0,554X+34,32	0,979	28,50±1,45
Jardín Botánico	Y=0,553X+28,67	0,978	38,78±2,3
Los Caneyes	Y=0,334X+27,72	0,983	67,51±1.56
Pelo Malo	Y=0,454X+25,04	0,988	54,96±0.86

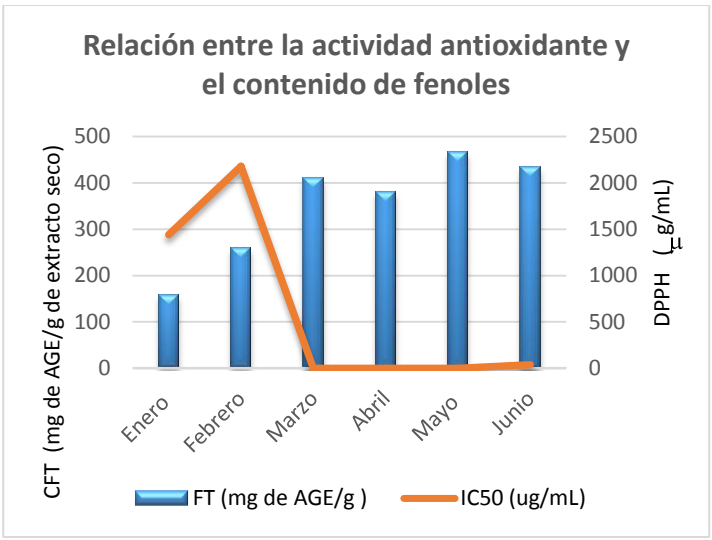
Enero	Y=0,013X+31,28	0,945	144±1,24
Febrero	Y=0,009X+29,48	0,979	214±1,23
Marzo	Y=0,587X+35,71	0,985	24,65±2,5
Abril	Y=0,539X+28,67	0,987	39,52±2,1
Mayo	Y=0,782X+39,16	0,998	13,81±0,24
Junio	Y=0,605X+26,81	0,994	38,7±1,21
Patrones	**Ecuación de la recta**	**R^2**	**IC_{50}**
Eugenol	Y=0.908X+17,5	0,994	29,00±0,29
Rutina	Y=2,126X+28,2	0,971	10,63±0,87
Quercetina	Y=0,013X+31,28	0,983	10,11±0,92

Al observar el comportamiento de los valores de IC_{50} en los diferentes extractos evaluados (valorando indistintamente las zonas geográficas y los diferentes meses del año) en la figura 3.8 A se observa que para los meses de invierno y sequía (enero y febrero) los valores de IC_{50} son muy superiores, lo que denota menor actividad antioxidante. Para los meses de marzo a junio se obtuvieron valores de IC_{50}, que, aunque poseen cierta variabilidad entre ellos, se encuentran entre 10 y 40 µg/mL, lo que denota similitud para estos cuatro meses al compararlos con los meses restantes.

Estos resultados poseen una total correspondencia con los resultados obtenidos al determinar el contenido fenólico (Figura 3.8 B), lo que corrobora, una vez más, la relación que existe entre estos metabolitos y la actividad antioxidante que se evalúa.



A



B

Figura 3.8. Comportamiento de los valores IC_{50} para el ensayo DPPH en los extractos obtenidos durante los seis meses evaluados (A) y relación con el contenido de fenoles en estas (B).

Por su parte los resultados en cuanto a los valores de IC_{50} obtenidos para los extractos de las distintas áreas geográficas (tabla 3.3 y figura 3.9) muestran que todos los valores de IC_{50} se encuentran entre 38 y 67 µg/mL, lo que denota similitud en la actividad si se tiene en cuenta que se expuso anteriormente se ha demostrado que la planta colectada en diferentes regiones muestra ligeras diferencias en su composición química (136). Los mejores resultados en dicha actividad fueron obtenidos en el Jardín Botánico y Los Güiros con valores muy similares, siendo ligeramente inferior en los extractos de Pelo Malo y Los Patos y el peor resultado se obtuvo para los extractos de la zona Los Caneyes lo que pudiera estar atribuidos al estado silvestre de esta última zona, a la cual se le atribuye un estado de abandono que provoca que las plantas recolectadas tengan la peor calidad botánica. Además es un lugar que se encuentra más expuesto a la incidencia de radiaciones solares y el viento unido a una mayor escasez de agua los que ratifica la relación negativa que existe entre el estrés hídrico y la producción de metabolitos que pueden estar contribuyendo a dicha actividad farmacológica.

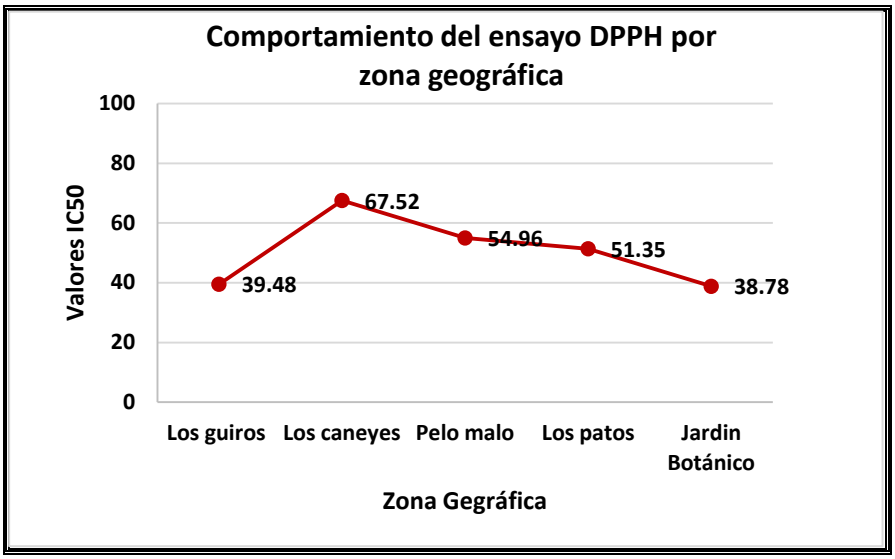


Figura 3.9 Relación de la actividad antioxidante por el método del secuestro del radical DPPH con el contenido de fenoles totales en los extractos de las hojas de *Mosiera bullata*.

Al comparar los valores obtenidos para el extracto con los valores de los patrones antioxidantes seleccionados se puede plantear que los valores de IC_{50} correspondientes a los meses de primavera-verano resultaron similares a los obtenidos para los patrones, lo cual es un resultado positivo para la valoración de esta especie como fuente de antioxidante.

El ensayo DPPH es empleado en numerosos estudios de evaluación de la actividad antioxidante de extractos obtenidos a partir de diversas especies de plantas medicinales, en éstos se realizan comparaciones con diversos patrones antioxidantes y los resultados son variables en relación a la capacidad antioxidante que manifiestan los extractos. Al comparar los resultados alcanzados para el extracto metanólico con los valores de otras plantas medicinales reportadas en la literatura consultada se destaca que el valor obtenido supera a plantas reconocidas como antioxidantes, entre tantos se pudieran citar como ejemplos las hojas de *Ruta Chalepensis* con un valor de IC_{50} = 151.10 µg/mL (137) y de la *Pistacia lentiscus* L con un valor de IC_{50} = 220 µg/mL (109).

3.2.2. Determinación de la Actividad quelante de Fe^{2+}

Evaluar la capacidad quelante sobre iones metálicos es de suma importancia debido a que los metales, especialmente el Fe^{2+}, son capaces de iniciar las reacciones de peroxidación lipídica de ácidos grasos insaturados; algunos polifenoles poseen la capacidad de quelar diferentes

iones metálicos con lo que evitan el deterioro de los lípidos. En este ensayo el Fe^{2+} forma un complejo con ferrozina de color púrpura que tiene una absorbancia máxima a 562 nm.

Para este fin se midió la actividad quelante de los extractos evaluados a través de la determinación del valor de IC_{50}. La figura 3.10 muestra los resultados obtenidos en este ensayo para las muestras evaluadas (meses de enero-junio y las áreas geográficas).

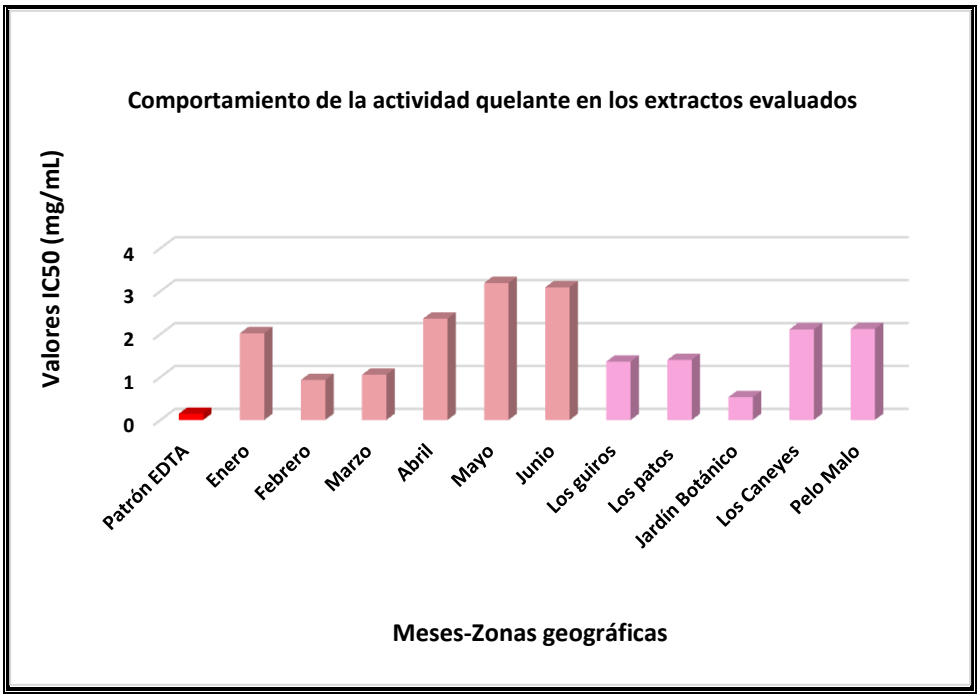


Figura 3.10. Resultados del comportamiento de la actividad quelante evaluada para los extractos estudiados.

En la gráfica se observa que los valores de IC_{50} para los extractos son muy superiores al patrón EDTA lo cual es indicativo de menor actividad antioxidante. Este resultado es adecuado si se tiene en consideración que el compuesto utilizado como patrón no es un producto natural sino sintético, cuya actividad antioxidante es la máxima posible, mientras que los extractos poseen los metabolitos de la actividad que se evalúa en bajas concentraciones y la misma se debe al efecto sinérgico de todos los componentes.

Un análisis detallado de los resultados obtenidos para el comportamiento de los valores de IC_{50} en los diferentes meses evaluados, permite afirmar que los extractos de enero a marzo poseen valores más bajo de este parámetro, indicativo de que poseen la mejor actividad quelante. Sin embargo, los meses de abril a junio con valores superiores, muestran la menor actividad

antioxidante por este método. Por otra parte, al analizar las zonas de recolección, se observa el mejor comportamiento para los extractos del Jardín Botánico, Los Patos y Los Güiros. Estos resultados poseen concordancia con los obtenidos para el ensayo que se describe a continuación y por la similitud en la fundamentación de ambos el análisis se realiza de forma conjunta después de mostrar los resultados del ensayo de FRAP.

3.2.3. 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 3.11) y se expresa en mmol/L de $FeSO_4$ equivalentes por gramo de extracto. El mecanismo del FRAP es de transferencia de electrones, a diferencia de otros métodos donde se produce captura de radicales libres, por lo cual puede ser útil, en combinación con otros métodos, en la determinación de la capacidad antioxidante de productos que contengan distintos tipos de antioxidantes. Además, es un método sencillo, fácilmente automatizable y rápido, dado que generalmente la reacción se completa entre 4 y 8 minutos (129).

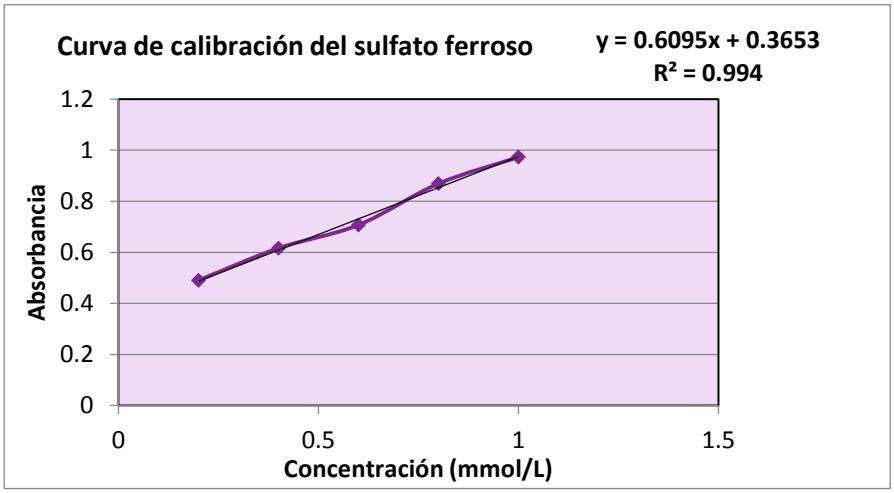


Figura 3.11. Curva de calibración del sulfato ferroso para desarrollar el ensayo de FRAP.

Los resultados obtenidos para este ensayo se reflejan en la figura 3.12. Al realizar un análisis por separado de los meses evaluados y las zonas geográficas se observa lo siguiente:

- Los valores obtenidos para los tres primeros meses del año resultaron ser muy similar (rango entre 58 y 68 mol/L equivalente de FeSO4/g extracto), mientras que, en los tres meses restantes que se corresponden con los meses lluviosos, hay una disminución brusca de estos valores en el rango de 14 a 21 mol/L equivalente de FeSO4/g extracto.

- Con respecto a los resultados obtenidos para este ensayo en las zonas geográficas evaluadas los valores son mejores para las zonas Los Güiros, el Jardín Botánico y Los Patos, que alcanzan valores entre 45 y 80 mol/L equivalente de FeSO4/g extracto, mientras que en las dos zonas restantes hay una disminución brusca de los valores.

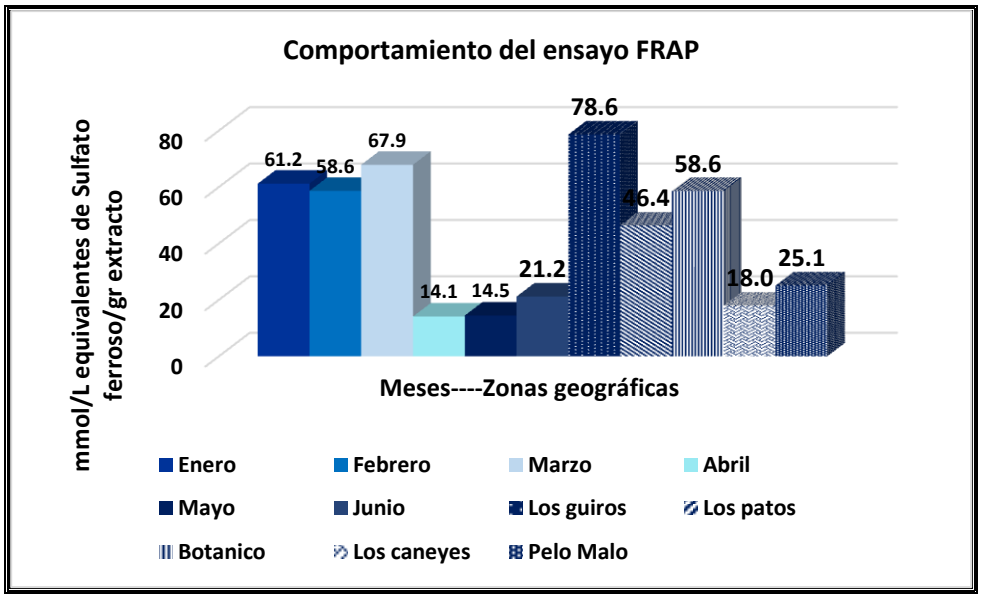


Figura 3.12. Resultados del comportamiento del poder reductor/antioxidante para los extractos evaluados.

Estos resultados son similares a los obtenidos en el ensayo referido anteriormente para la actividad quelante, lo que se considera lógico si se tiene en cuenta que ambos ensayos poseen el mismo mecanismo de acción en cuanto a la actividad evaluada (habilidad para reducir Fe(III)). En estos ensayos las reacciones que transcurren son conocidas como reacciones de transferencia de electrones (SET, del inglés *Single Electron Transfer*) (56) y en las mismas se da la transferencia de un electrón para reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales. La reactividad relativa de un antioxidante que involucra este tipo de reacciones está basada fundamentalmente en la desprotonación y, por consiguiente, está gobernada por el potencial de ionización (PI), (138) de manera que los valores disminuyen con el aumento del pH, reflejando un incremento en la capacidad electrodonador con la desprotonación.

Sin embargo, dicho comportamiento no posee coincidencia con los ensayos referidos anteriormente, por el contrario, resultó ser inverso lo que pudiera estar atribuido al tipo de metabolito que contribuye a la acción antioxidante; es decir los metabolitos que intervienen en

la actividad antioxidante a través de la quelación de los metales presentes en la planta, aparecen en la misma en mayor concentración en los períodos de sequía y cuando la planta se encuentra expuesta a condiciones de estrés de diferente naturaleza.

Al comparar los resultados obtenidos en el ensayo con los reportados en la literatura para extractos de naturaleza similar a los evaluados en el presente trabajo, de otras plantas medicinales (tabla 3.4), se observa que los valores obtenidos superan los resultados reportados para las plantas citadas, consideradas con potencial antioxidante.

Tabla 3.4. Ejemplos del poder reductor\antioxidante férrico (FRAP) de extractos de plantas medicinales publicados en la literatura como mmol/L de $FeSO_4$ equivalentes por gramo de extracto seco.

Nombre de planta y Extracto evaluado	**Poder reductor\antioxidante férrico (FRAP) mmol Equiv de FeSO4/g de extracto**	**Referencia**
B.javanica semillas (EAE) *B.javanica semillas* (EH)	1,64 0,14	(139)
Altramuz blanco	0,0636	(110)
C. didymus	Fracción 1: 1,538 Fracción 2: 1,555	(106)
Frutas comunes	Fresa: 3,29 mmol/L Limón: 4,64 Uva 67,05	(140)

3.2.4. Capacidad antioxidante total.

En los organismos los sistemas antioxidantes se integran en un sistema amortiguador lo cual garantiza hacer frente a cualquier agresor oxidativo y no agotar un solo sistema, sino compartir y combinar los efectos. Este sistema puede ser evaluado indirectamente como la capacidad antioxidante total; parámetro que ofrece una idea de cómo se encuentra el conjunto de la respuesta antioxidante ante cada agresor oxidativo en cada sistema (129).

La capacidad antioxidante total se puede calcular utilizando el método del molibdato de amonio, este es un método espectrofotométrico utilizado para la determinación cuantitativa de la capacidad antioxidante mediante la investigación de las tasas de reacciones de reducción entre el antioxidante, el oxidante y el ligando molibdato proporciona una estimación directa de la capacidad reductora del antioxidante, por lo tanto, muestra singularidad entre los ensayos

antioxidantes *in vitro*. Es considerado un ensayo útil y simple para estimar la actividad antioxidante de muestras de extractos de plantas, suplementos nutricionales y/o compuestos puros (141).

La capacidad antioxidante total fue calculada empleando la curva de calibración del Ácido ascórbico **(Figura 3.12).**

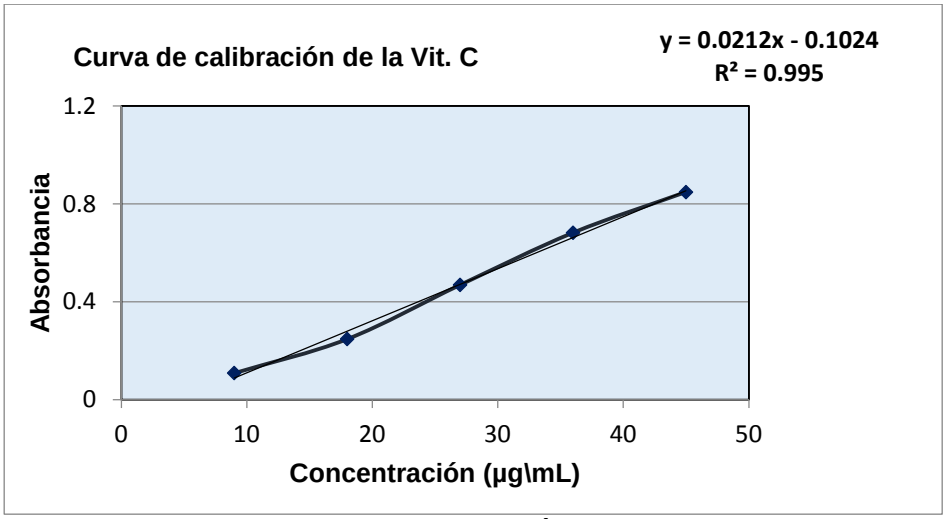


Figura 3.12. Curva de calibración del Ácido Ascórbico o Vitamina C

A partir de la ecuación de la recta se determinó la capacidad antioxidante total obtenida para cada extracto **(Tabla 3.4, Figura 3.12)**

Tabla 3.4. Resultados obtenidos en el ensayo de la actividad antioxidante total (expresado en mg equivalentes de Vit.C/g de extracto)

Extracto	Capacidad Antioxidante total (mg/g extracto)
Enero	42,0±1,23
Febrero	24,9±0,95
Marzo	76.0±1,45
Abril	129,4±1,3
Mayo	117,1±2,4
Junio	157,0 ± 0,63
Los Güiros	66,3±1,56
Los Patos	47,2±2,26
Jardín Botánico	76,7±0.36
Los Caneyes	33,7±1.72
Pelo Malo	46,7±2.5

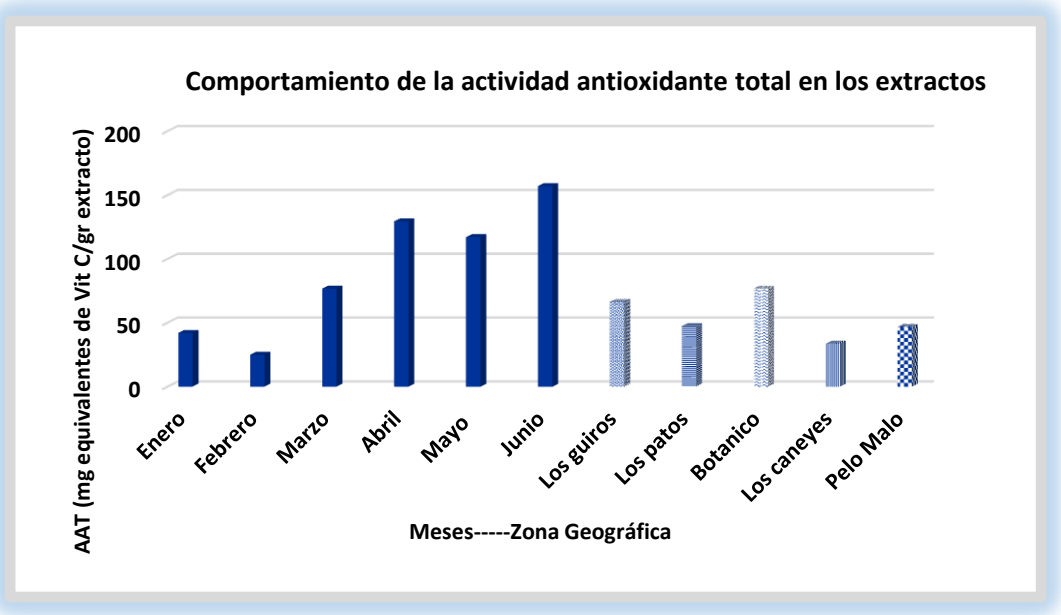


Figura 3.12. Comportamiento de la actividad antioxidante total para los extractos evaluados

En el gráfico se observa el comportamiento de la actividad antioxidante total en relación a fecha de recolección de la planta (seis meses de estudio), observándose un incremento significativo de la actividad a partir del mes de marzo, lo que se corresponde con el período de primavera-verano, en el cual las lluvias pueden provocar un incremento en la acumulación de metabolitos responsables de la acción antioxidante, resultado que se corresponde con los obtenidos para la evaluación de la actividad secuestradora del radical DPPH y con el contenido de fenoles y flavonoides determinado en esta investigación (91).

Como en ensayos anteriores, al analizar la influencia de la zona geográfica sobre la actividad antioxidante de las muestras, los resultados reflejan que los mejores valores fueron los obtenidos para las muestras provenientes del Jardín Botánico y Los Güiros. Estos resultados pueden atribuirse a que las condiciones del hábitat en estas zonas son mejores, con un suelo más desarrollado, es decir, con mayor contenido de materia orgánica y mayor disponibilidad de agua; razón por la cual la calidad botánica de la planta recolectada debe ser mejor (91).

Al comparar estos resultados con los obtenidos por Thi Dung et al. (2008) (142), para el extracto alcohólico de *Cleistocalyx operculatus* (62,40 ± 3,16 mg de ácido ascórbico equivalentes /g de extracto) se puede afirmar que los resultados obtenidos en el presente trabajo son cercanos a valores obtenidos para este autor, pudiendo considerarse la planta como antioxidante. Estos resultados se corresponden con los resultados obtenidos en los

ensayos del contenido fenólico, ratificándose así la relación directa que existe entre la actividad evaluada y los compuestos fenólicos presentes en la planta. Los valores son específicos para cada extracto y no se encuentran reportados en la literatura para esta planta.

3.2.5. Ensayo ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

El ensayo $ABTS^{\bullet+}$ es un método basado en la transferencia de electrones, de fácil realización, no requiere de equipamiento de alta sensibilidad y puede ser usado para determinar la capacidad antioxidante tanto de compuestos aislados como de mezclas de extractos de matrices complejas como es el caso del extracto obtenido de las hojas de *Mosiera bullata*.

Como antioxidante de referencia fue utilizado el 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (trolox) que es un análogo del α-tocoferol soluble en agua, conocido por su alta capacidad antioxidante y la actividad antioxidante es expresada como equivalentes trolox/g planta (143). El descenso producido por el trolox, fue comparado con el producido por el antioxidante que se está analizando al mismo tiempo (Miller et al., 1993)(65). Se obtuvo una curva de calibración con este patrón que una vez procesada aportó como ecuación de la recta Y= -0.1304X+0.7252, la cual permitió determinar la concentración en µmol equivalente de trolox/ g extracto como medida de la actividad antioxidante.

Los resultados obtenidos para ambos grupos de muestras (meses y zonas geográficas) se pueden observar en las figuras 3.13 A y B. En el primer grupo se obtuvo que durante los seis meses evaluados la actividad obtenida es similar con valores entre 3 y 4 mg de trolox/g de extracto, mientras que en el grupo de las zonas geográficas hay un comportamiento también similar entre 2.5 y 3.5 µmol equivalentes de trolox/g de extracto.

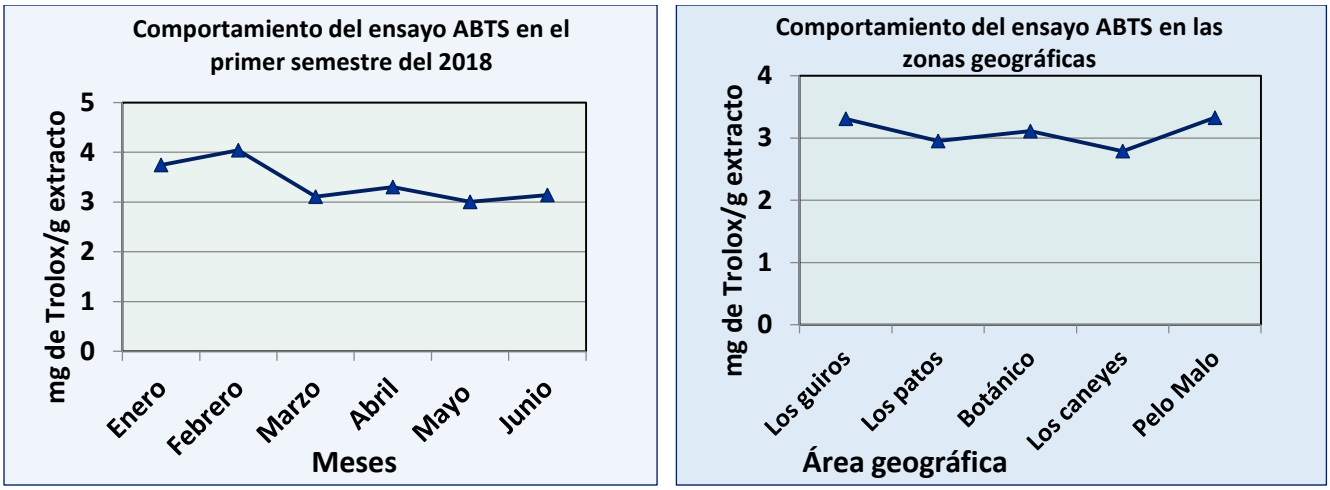


Figura 3.13. Comportamiento de la actividad antioxidante determinada como concentración en equivalentes trolox/g de extracto, de los extractos evaluados por el método $ABTS^{\bullet+}$.

Para analizar si los resultados obtenidos en el ensayo son considerados adecuados en el análisis de la actividad que se evalúa, se consideró una estimación realizada por Saura-Calixto and Goñi, (2006) en cuyo trabajo se determinó por esta técnica la capacidad antioxidante de la dieta española (incluido alimentos y bebidas consumidos diariamente), obteniéndose un valor promedio de 3.5 µmol equivalentes de trolox/ g de extracto. Si se considera este valor como un valor representativo de buena actividad entonces pudiéramos asegurar que los extractos evaluados poseen, según el rango en que se encuentran, valores indicativos de que la planta aporta la actividad antioxidante, según el mecanismo representado en este ensayo(84).

Un análisis integral de los resultados obtenidos en el presente trabajo permite revelar que en la planta en estudio el contenido fenólico y la actividad antioxidante evaluada poseen relación con ligeros cambios en función del área de recolección, pero con variaciones acentuadas en las recolecciones realizadas en los meses lluviosos, con respecto a los meses de sequía, donde los resultados son mucho más favorables para ambos aspectos.

Conclusiones y Recomendaciones

CONCLUSIONES

1- Se obtuvieron extractos metanólicos, aplicando la técnica de maceración con agitación, a partir de las hojas de *Mosiera bullata* (Urb. & Ekman) Borhidi recolectada durante los seis primeros meses del año y en cinco zonas de la región central del país.

2- El contenido fenólico y flavonoides de la planta resultó muy superior en la planta recolectada en los meses marzo a junio y similar en las cinco zonas geográficas estudiadas.

3- La actividad antirradicálica, determinada por los ensayos DPPH, ABTS y TAOC, resultó ser superior en los meses de marzo a junio y similar en las cinco zonas geográficas estudiadas, coincidente con los resultados obtenidos en los ensayos de fenoles y flavonoides.

4- La actividad antioxidante por medio de la quelación de metales fue superior en los meses de enero a marzo y en las zonas geográficas del Jardín Botánico y Los Güiros.

5- Los resultados obtenidos no permiten sugerir las condiciones óptimas para la recolección del material vegetal, lo que queda pendiente hasta ampliar el número de muestras y realizar el análisis estadístico correspondiente.

RECOMENDACIONES

1. Realizar la separación, caracterización y evaluación de compuestos del extracto metanólico de las hojas de *Mosiera bullata,* con vistas a encontrar los metabolitos responsables de la actividad antioxidante

2. Ampliar la cantidad de muestras a evaluar en los ensayos evaluados que permitan sugerir las condiciones óptimas para la recolección del material vegetal.

3. Realizar estudios antioxidantes *in vivo*, que permitan corroborar los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Dávalos EG, Jiménez TV, Almanza RL. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de ocho especies del género Baccharis: B. Articulata, B. Dracunculifolia, B. Salicifolia, B. Ulcina, B. Latifolia, B. Pentlandii, B. Obtusifolia, B. Subalata. Revista Boliviana de Química. 2007;24(1):41-4.
2. Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. Veterinaria México. 2002;33(3).
3. Nieva-Echevarría B, Manzanos MJ, Goicoechea E, Guillén MD. 2, 6-Di-tert-butyl-hydroxytoluene and its metabolites in foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2015;14(1):67-80.
4. Adhami VM, Mukhtar H. Human cancer chemoprevention: hurdles and challenges. Natural Products in Cancer Prevention and Therapy: Springer; 2012. p. 203-20.
5. Liu S, Huang H. Assessments of antioxidant effect of black tea extract and its rationals by erythrocyte haemolysis assay, plasma oxidation assay and cellular antioxidant activity (CAA) assay. Journal of Functional Foods. 2015;18:1095-105.
6. Brunetti C, Guidi L, Sebastiani F, Tattini M. Isoprenoids and phenylpropanoids are key components of the antioxidant defense system of plants facing severe excess light stress. Environmental and Experimental Botany. 2015;119:54-62.
7. Nyanhongo GS, Sygmund C, Ludwig R, Prasetyo EN, Guebitz GM. An antioxidant regenerating system for continuous quenching of free radicals in chronic wounds. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2013;83(3):396-404.
8. Lee K-G, Shibamoto T. Toxicology and antioxidant activities of non-enzymatic browning reaction products. Food Reviews International. 2002;18(2-3):151-75.
9. Stintzing FC, Schieber A, Carle R. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. European Food Research and Technology. 2001;212(4):396-407.
10. Proestos C, Chorianopoulos N, Nychas G-J, Komaitis M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005;53(4):1190-5.
11. Lewis RJ. Food additives handbook: Springer Science & Business Media; 1989.
12. Tomás-Barberán F, Llorach R, Espín J, Ferreres F. Agri-food residues as a source of phytochemicals. Total Food: Exploiting Co-products Minimising Waste: Institute of Food Research, Norwich, UK; 2004. p. 42-8.
13. Vagiri M, Conner S, Stewart D, Andersson SC, Verrall S, Johansson E, et al. Phenolic compounds in blackcurrant (Ribes nigrum L.) leaves relative to leaf position and harvest date. Food chemistry. 2015;172:135-42.
14. Organization WH. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. 2000.
15. 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):453-9.

16. Contrera E. Retorno a las Plantas Medicinales., Madrid-España. Ciencia y Técnica. 2004:56-8.
17. Pérez-Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, Díaz-Rubio ME, Serrano J, Goñi I, et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. Food Research International. 2008;41(3):274-85.
18. Berdonces JL. Principios activos y preparaciones farmacéuticas de las plantas medicinales. Natura Medicatrix: Revista médica para el estudio y difusión de las medicinas alternativas. 1994(37):42-8.
19. McVaugh R. The genera of American Myrtaceae: an interim report. Taxon. 1968:354-418.
20. Cruz AJU, González-Oliva L, Ramos ZA, Carbó RN. La subtribu Myrtinae (Myrtaceae) en la flora de Cuba. Revista del Jardín Botánico Nacional. 2011:5-10.
21. Cruz AJU, Ramos ZA. Los géneros Mosiera Small, Psidium L., Calycolpus Berg y Pimenta Lindl.(MyrtinaeMyrtaceae) para la Flora de la República de Cuba. Diversidad y estado de conservación. Revista ECOVIDA. 2008;1(1):56-70.
22. Bisse J. El género Mosiera Small (Myrtaceae-Myrtoideae) en Cuba I. Revista del Jardín Botánico Nacional. 1985:3-6.
23. Stefanello MÉA, Pascoal AC, Salvador MJ. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. Chemistry & biodiversity. 2011;8(1):73-94.
24. Avilés R, Mariano, M. A. Estado actual de conservación de la familia Myrtaceae en la provincia de Camagüey. Rev Jardín Botánico Nacional Universidad de La Habana. 2011;6(3).
25. García Bacallao L, Rojo Domínguez DM, García Gómez LV, Hernández Ángel M. Plantas con propiedades antiinflamatorias. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2002;21(3):214-6.
26. Armas Mesa YD. Composición química y actividad antioxidante del aceite esencial y extractos orgánicos de las hojas de Mosiera bullata: Universidad Central" Marta Abreu" de Las Villas; 2014.
27. Garden MB. Tropicos. org. http://www tropicos org/Name/27800017. 2015.
28. Li J-w, Ding S-d, Ding X-l. Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube. Process Biochemistry. 2005;40(11):3607-13.
29. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. The Journal of physiology. 2003;552(2):335-44.
30. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochemical Journal. 2009;417(1):1-13.
31. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea (Concepción). 2006(494):161-72.

32. Membrillo Ortega A, Córdova Izquierdo A, Hicks Gómez JJ, Olivares-Corichi IM, Martínez Torres VM, Méndez V, et al. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: Una revisión. Interciencia. 2003;28(12):699-704.
33. Roginsky V, Lissi EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food chemistry. 2005;92(2):235-54.
34. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of agricultural and food chemistry. 2005;53(6):1841-56.
35. Sanchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food science and technology international. 2002;8(3):121-37.
36. Finley JW, Kong A-N, Hintze KJ, Jeffery EH, Ji LL, Lei XG. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011;59(13):6837-46.
37. Ramírez Anaya JdP. Influencia de las técnicas culinarias sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante en hortalizas de la dieta Mediterránea: minoría religiosas en Granada y su área metropolitana. 2014.
38. Valko M, Morris H, Cronin M. Metals, toxicity and oxidative stress. Current medicinal chemistry. 2005;12(10):1161-208.
39. de Grey AD. HO2•: The forgotten radical. DNA and cell biology. 2002;21(4):251-7.
40. Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Progress in lipid research. 2007;46(5):244-82.
41. Gonchar O, Mankovska I. Antioxidant system in adaptation to intermittent hypoxia. J Biol Sci. 2010;10(6):545-54.
42. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international journal of biochemistry & cell biology. 2007;39(1):44-84.
43. Al-Mamary MA. Antioxidant activity of commonly consumed vegetables in Yemen. Malaysian journal of nutrition. 2002;8(2):179-89.
44. Woodcock N, MacFie J. Optimal nutrition support (and the demise of the enteral versus parenteral controversy). Elsevier; 2002.
45. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan. Nature. 2003;425(6954):191.
46. Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. Biochemical and biophysical research communications. 1998;247(1):60-4.
47. O'Brien RC, Luo M, Balazs N, Mercuri J. In vitro and in vivo antioxidant properties of gliclazide. Journal of Diabetes and its Complications. 2000;14(4):201-6.
48. Babich H, Visioli F. In vitro cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil. Il Farmaco. 2003;58(5):403-7.

49. Mukhtar H, Ahmad N. Green tea in chemoprevention of cancer. Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology. 1999;52(suppl_1):111-7.
50. Brash DE, Havre P. New careers for antioxidants. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002;99(22):13969-71.
51. Owuor ED, Kong A-NT. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. Biochemical pharmacology. 2002;64(5-6):765-70.
52. Poljsak B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. Oxidative medicine and cellular longevity. 2011;2011.
53. González González L. Composición fenólica y actividad antioxidante de las hojas de Mosiera crenulata: Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Facultad de Química Farmacia. Departamento de Farmacia; 2015.
54. Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. Free Radical Biology and Medicine. 1995;18(1):125-6.
55. Gordon MH, editor El desarrollo del enranciamiento oxidativo en los alimentos. Antioxidantes de los alimentos: aplicaciones prácticas; 2004: Acribia.
56. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of agricultural and food chemistry. 2005;53(10):4290-302.
57. Bors W, Michel C, Saran M. Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin a rapid test for quantifying antioxidant activity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism. 1984;796(3):312-9.
58. Benov L, Sztejnberg L, Fridovich I. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. Free Radical Biology and Medicine. 1998;25(7):826-31.
59. Winston GW, Regoli F, Dugas Jr AJ, Fong JH, Blanchard KA. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. Free Radical Biology and Medicine. 1998;24(3):480-93.
60. Fernández J, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López JA. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. Food Chemistry. 1997;59(3):345-53.
61. Velioglu Y, Mazza G, Gao L, Oomah B. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of agricultural and food chemistry. 1998;46(10):4113-7.
62. Lewin G, Popov I. Photocheluminescent detection of antiradical activity; III: a simple assay of ascorbate in blood plasma. Journal of biochemical and biophysical methods. 1994;28(4):277-82.
63. Popov I, Lewin G. Antioxidative homeostasis: characterization by means of chemiluminescent technique. Methods in enzymology. 300: Elsevier; 1999. p. 437-56.
64. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American journal of Enology and Viticulture. 1965;16(3):144-58.

65. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical science. 1993;84(4):407-12.
66. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry. 1996;239(1):70-6.
67. Brand-Williams W, Cuvelier M-E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology. 1995;28(1):25-30.
68. Fogliano V, Ritieni A, Monti SM, Gallo M, Della Medaglia D, Ambrosino ML, et al. Antioxidant activity of virgin olive oil phenolic compounds in a micellar system. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1999;79(13):1803-8.
69. Clarkson PM. Antioxidants and physical performance. Critical Reviews in Food Science & Nutrition. 1995;35(1-2):131-41.
70. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 1958;181(4617):1199.
71. Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food chemistry. 2012;130(4):1036-43.
72. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal. 2013;21(2):143-52.
73. Deng J, Cheng W, Yang G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. Food Chemistry. 2011;125(4):1430-5.
74. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical biology and medicine. 1999;26(9-10):1231-7.
75. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. Free Radical Biology and Medicine. 1997;22(5):749-60.
76. Herrera Sánchez Y. Actividad antioxidante in vitro y toxicidad frente a Artemia salina de extractos hidroalcohólicos de cinco especies de cítricos: Universidad Central´´ Marta Abreu´´ de Las Villas; 2011.
77. Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. Analytica chimica acta. 2008;613(1):1-19.
78. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical biochemistry. 1999;269(2):337-41.
79. Pan Y, Wang K, Huang S, Wang H, Mu X, He C, et al. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (Dimocarpus Longan Lour.) peel. Food Chemistry. 2008;106(3):1264-70.
80. 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(10):2689-96.

81. Robbins RJ. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. Journal of agricultural and food chemistry. 2003;51(10):2866-87.
82. Kähkönen MP, Hopia AI, Heinonen M. Berry phenolics and their antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001;49(8):4076-82.
83. Orzechowski A, Ostaszewski P, Jank M, Berwid SJ. Bioactive substances of plant origin in food-impact on genomics. Reproduction Nutrition Development. 2002;42(5):461-77.
84. Saura-Calixto F, Goñi I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. Food Chemistry. 2006;94(3):442-7.
85. Hooper L, Cassidy A. A review of the health care potential of bioactive compounds. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2006;86(12):1805-13.
86. Kehler J, Smith C. Free radical in biology: Sources, reactivities and roles in the etiology of human disease. Natural Antioxidants in Human Health and Disease; Academie Press: San Diego, CA, USA. 1994:25-62.
87. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical reviews in food science and nutrition. 2005;45(4):287-306.
88. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in plant science. 1997;2(4):152-9.
89. uez H, et al. Natural antioxidants from residual sources. Food chemistry. 2001;72(2):145-71.
90. Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food chemistry. 1999;66(4):401-36.
91. Parr AJ, Bolwell GP. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000;80(7):985-1012.
92. Zhu QY, Huang Y, Chen Z-Y. Interaction between flavonoids and α-tocopherol in human low density lipoprotein. The Journal of nutritional biochemistry. 2000;11(1):14-21.
93. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. 2003.
94. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in enzymology. 299: Elsevier; 1999. p. 152-78.
95. Cicco N, Lanorte MT, Paraggio M, Viggiano M, Lattanzio V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. Microchemical Journal. 2009;91(1):107-10.
96. Magalhães LM, Santos F, Segundo MA, Reis S, Lima JL. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. Talanta. 2010;83(2):441-7.

97. Nibir YM, Sumit AF, Akhand AA, Ahsan N, Hossain MS. Comparative assessment of total polyphenols, antioxidant and antimicrobial activity of different tea varieties of Bangladesh. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2017;7(4):352-7.
98. Serreli G, Jerković I, Gil KA, Marijanović Z, Pacini V, Tuberoso CIG. Phenolic Compounds, Volatiles and Antioxidant Capacity of White Myrtle Berry Liqueurs. Plant Foods for Human Nutrition. 2017;72(2):205-10.
99. Toma C-C, Olah N-K, Vlase L, Mogoș an C, Mocan A. Comparative studies on polyphenolic composition, antioxidant and diuretic effects of Nigella sativa L.(black cumin) and Nigella damascena L.(lady-in-a-mist) seeds. Molecules. 2015;20(6):9560-74.
100. Kohoude MJ, Gbaguidi F, Agbani P, Ayedoun M-A, Cazaux S, Bouajila J. Chemical composition and biological activities of extracts and essential oil of Boswellia dalzielii leaves. Pharmaceutical biology. 2017;55(1):33-42.
101. Kim Y-H, Cho ML, Kim D-B, Shin G-H, Lee J-H, Lee JS, et al. The antioxidant activity and their major antioxidant compounds from Acanthopanax senticosus and A. koreanum. Molecules. 2015;20(7):13281-95.
102. Rahman MJ, de Camargo AC, Shahidi F. Phenolic profiles and antioxidant activity of defatted Camelina and Sophia seeds. Food chemistry. 2018;240:917-25.
103. Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of food and drug analysis. 2002;10(3).
104. Guimarães R, Barros L, Carvalho AM, Ferreira IC. Studies on chemical constituents and bioactivity of Rosa micrantha: An alternative antioxidants source for food, pharmaceutical, or cosmetic applications. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010;58(10):6277-84.
105. Ozer MS, Kirkan B, Sarikurkcu C, Cengiz M, Ceylan O, Atılgan N, et al. Onosma heterophyllum: Phenolic composition, enzyme inhibitory and antioxidant activities. Industrial Crops and Products. 2018;111:179-84.
106. Noreen H, Semmar N, Farman M, McCullagh JS. Measurement of total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant Coronopus didymus. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2017;10(8):792-801.
107. de Sousa SHB, de Andrade Mattietto R, Chisté RC, Carvalho AV. Phenolic compounds are highly correlated to the antioxidant capacity of genotypes of Oenocarpus distichus Mart. fruits. Food Research International. 2018;108:405-12.
108. Arivalagan M, Roy T, Yasmeen A, Pavithra K, Jwala P, Shivasankara K, et al. Extraction of phenolic compounds with antioxidant potential from coconut (Cocos nucifera L.) testa and identification of phenolic acids and flavonoids using UPLC coupled with TQD-MS/MS. LWT. 2018;92:116-26.
109. Barbouchi M, Elamrani K, El Idrissi M, Choukrad Mb. A comparative study on phytochemical screening, quantification of phenolic contents and antioxidant properties of

different solvent extracts from various parts of Pistacia lentiscus L. Journal of King Saud University-Science. 2018.
110. Karamać M, Orak HH, Amarowicz R, Orak A, Piekoszewski W. Phenolic contents and antioxidant capacities of wild and cultivated white lupin (Lupinus albus L.) seeds. Food chemistry. 2018;258:1-7.
111. 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 Chemical Ecology. 1996;22(11):2023-40.
112. 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. 2012;26(21):1976-84.
113. Singh R, Kumari N. Comparative determination of phytochemicals and antioxidant activity from leaf and fruit of Sapindus mukorrossi Gaertn.–A valuable medicinal tree. Industrial Crops and Products. 2015;73:1-8.
114. Decker EA, Welch B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. Journal of Agricultural and food Chemistry. 1990;38(3):674-7.
115. Umamaheswari M CT. 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.
116. Pannala AS, Chan TS, O'Brien PJ, Rice-Evans CA. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2001;282(5):1161-8.
117. Arnao MB, Cano A, Acosta M. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. Free Radical Research. 1999;31(sup1):89-96.
118. Al-Qassabi JSA, Weli AM, Hossain MA. Comparison of total phenols content and antioxidant potential of peel extracts of local and imported lemons samples. Sustainable Chemistry and Pharmacy. 2018;8:71-5.
119. Varón LES, Granados JE. Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies Gliricidia sepium y Tithonia diversifolia y algunas propiedades físicoquímicas del suelo/Interrelation between the content of secondary metabolites of species Gliricidia sepium and Tithonia diversifolia and some physicochemical properties of soil. Revista de Investigación Agraria y Ambiental. 2012;3(1):53.
120. Peña W. Los suelos desarrollados sobre serpentinitas y su relación con la flora endémica: Universidade de Santiago de Compostela; 2004.
121. Ben Ahmed Z, Yousfi M, Viaene J, Dejaegher B, Demeyer K, Mangelings D, et al. Seasonal, gender and regional variations in total phenolic, flavonoid, and condensed tannins contents and in antioxidant properties from Pistacia atlantica ssp. leaves. Pharmaceutical biology. 2017;55(1):1185-94.

122. Chen F, Zhang L, Zong S, Xu S, Li X, Ye Y. Antioxidant capacity and proanthocyanidin composition of the bark of Metasequoia glyptostroboides. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2014;2014.
123. Uddin R, Saha MR, Subhan N, Hossain H, Jahan IA, Akter R, et al. HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Gardenia jasminoides and determination of antioxidant activity by using free radical scavenging assays. Advanced pharmaceutical bulletin. 2014;4(3):273.
124. Acosta de La Luz L, Hechevarría Sosa I, Rodríguez Ferradá C. Influencia de las condiciones de cultivo y del momento óptimo de cosecha en Artemisia annua L. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2011;16(1):105-14.
125. Paz González A, Taboada Castro MT, Gómez Suárez MJ. Relación entre textura, pH, materia orgánica y complejo de cambio en el horizonte superior de un suelo sobre serpentinas. 1997.
126. Castro MT, Suárez MG, González AP, editors. Extractabilidad de metales pesados en un suelo de monte sobre serpentinas. Congresos-CARGA FINAL; 1997.
127. Hua Z, Zhi-qin YY-fZ. Phenolic and flavonoid contents of mandarin (C. reticulata Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods.
128. Ana E, Haydelba DA, Nubia-Lisbeth M-L, Carmita J, Luisa R-d-A, Ricardo B. Evaluation of antioxidant capacity and secondary metabolites of sixteen medicinal plants extracts. CIENCIA UNEMI. 2016;9(20):29-35.
129. Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas MA, Verde-Star MJ. Investigación en plantas de importancia médica: OmniaScience; 2016.
130. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Food Science and Technology. 2005;25(4):726-32.
131. GIL JH, ROJANO BA. Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from Antioquia (Colombia). Vitae. 2009;16(3):388-95.
132. Wang P, Yu Z. Species authentication and geographical origin discrimination of herbal medicines by near infrared spectroscopy: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. 2015;5(5):277-84.
133. Lee S, Hwang J, Lee H, Chung H. Exploring supervised neighborhood preserving embedding (SNPE) as a nonlinear feature extraction method for vibrational spectroscopic discrimination of agricultural samples according to geographical origins. Talanta. 2015;144:960-8.
134. Chung I-M, Kim J-K, Lee J-K, Kim S-H. Discrimination of geographical origin of rice (Oryza sativa L.) by multielement analysis using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy and multivariate analysis. Journal of Cereal Science. 2015;65:252-9.
135. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. Analyst. 2002;127(1):183-98.

136. Xu N, Zhou G, Li X, Lu H, Meng F, Zhai H. Geographical classification of Epimedium based on HPLC fingerprint analysis combined with multi-ingredients quantitative analysis. Biomedical Chromatography. 2017;31(5).
137. Gali L, Bedjou F. Antioxidant and anticholinesterase effects of the ethanol extract, ethanol extract fractions and total alkaloids from the cultivated Ruta chalepensis. South African Journal of Botany. 2018.
138. Siquet C, Paiva-Martins F, Lima JL, Reis S, Borges F. Antioxidant profile of dihydroxy-and trihydroxyphenolic acids-A structure–activity relationship study. Free radical research. 2006;40(4):433-42.
139. Ablat A, Mohamad J, Awang K, Shilpi JA, Arya A. Evaluation of antidiabetic and antioxidant properties of Brucea javanica seed. The Scientific World Journal. 2014;2014.
140. Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutrition Research. 2003;23(12):1719-26.
141. Mahomoodally MF, Vlaisavljevic S, Berezni S, Abdallah HH, Zengin G, Atanasov AG, et al. Lotus aegaeus (Gris.) Boiss and Iberis sempervirens L.: Chemical fingerprints, antioxidant potential, and inhibition activities and docking on key enzymes linked to global health problems. Industrial Crops and Products. 2018;120:271-8.
142. Dung NT, Kim JM, Kang SC. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of Cleistocalyx operculatus (Roxb.) Merr and Perry buds. Food and chemical Toxicology. 2008;46(12):3632-9.
143. Oehlke K, Heins A, Stöckmann H, Sönnichsen F, Schwarz K. New insights into the antioxidant activity of Trolox in o/w emulsions. Food chemistry. 2011;124(3):781-7.