

UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS



FACULTAD QUÍMICA – FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

Tesis para optar el título de Máster en “Desarrollo de Medicamentos de Origen Natural”

**“EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA HOJA Y DEL
FRUTO DE *Swinglea Glutinosa*”**



Autora: Tú Le Thi Cam

Tutoras: Dra. C. María Elisa Jorge Rodríguez
Dra. C. Yanelis Saucedo Hernández

[*Santa Clara 11-2012*]

EXERGO



"Saber y saberlo mostrar, es valer dos veces."

--- Baltasar Gracián y Morales ---

DEDICATORIA



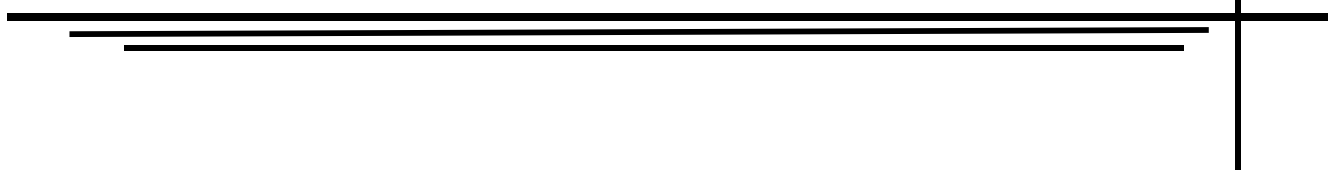
DEDICATORIA

A toda mi familia, a quienes agradezco de todo corazón por su amor, cariño y comprensión y porque siempre, aún lejos, han estado en mi lado.

A mis tutoras Elisa y Fanelis por sus disposiciones y ayudas brindadas.

A Boni por estar al mi lado y enseñarme que "es necesario aprender lo que necesitamos, no únicamente lo que queremos"

AGRADECIMIENTOS



AGRADECIMIENTOS

Realizar este trabajo ha supuesto un reto personal que no habría sido posible si durante todos estos años no hubiese estado rodeada de personas maravillosas que me han apoyado, me han animado, me han reñido y me han retado. Por este motivo, me gustaría expresarles mi agradecimiento a todas ellas:

A toda mi familia por sus confianzas, sus consejos, su preocupación incesante, su bondad y su apoyo que me han brindado.

A todos mis profes no sólo de la carrera sino de toda la vida, mil gracias porque de alguna manera forman parte de lo que ahora soy. Especialmente a mis tutoras de tesis, Elisa e Yanelis, el dejarme ser una “alternativa”, por brindarme todo su tiempo en todo momento sin tener en cuenta la noche o fin de semana, por atenderme y animarme siempre, por darme su confianza, y por ser más amigas que jefas.

A mi Boni, a mis amigas queridas, Le Thi Hoang Lan, Nguyen Thi Thu Hong, a mis hermanitas, Nguyen Thi Thanh Hoa, Tran Thi Quynh Anh, por confiar en mí, por hacerme la existencia más fácil, por tener siempre un hombro preparado para mis lágrimas, por aguantarme pues sé que a veces es difícil tratar conmigo y muchas gracias por siempre estar al lado mío. Boni, gracias por compartir conmigo tu compañerismo, tu optimismo y tu carácter y por hacerme cada día mejor, tengo suerte de tenerte!

A todos mis amigos, sin excluir a ninguno. En especial, a mi grupo de 2005-2011 Kien, Tung, Truong, Phuong, Trong, Nhung, Tram, Huyen, Mai, Huy, Hang, Quynh y otras amigas Ha, Tami, Tieu, Thuong, Huong, Maria; a todos mis compañeros del aula Steven, Samuelito, Ryan, Leidy, Lien, Lisi, Nani, Yamiris... mil gracias por ayudarme de una forma u otra y por todos los momentos que hemos pasado juntos.

Al profesor Luis Romero y Amelita de Atención Estudiantes extranjeros por ayudarme y apoyarme en todo el momento que estoy en UCLV.

A la Revolución Cubana y a la mitad entre Cuba y Viet Nam por brindarme la oportunidad de estudiar y aprender muchas cosas de mi vida.

A todos, muchas gracias!!!!

RESUMEN

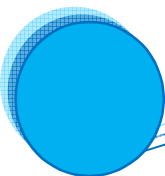


RESUMEN

En el presente trabajo se estudiaron los aceites esenciales y extractos obtenidos de las hojas y los frutos de la *Swinglea glutinosa*, recolectada en el Jardín botánico de la Universidad Central de Las Villas. Los aceites fueron obtenidos por hidrodestilación y los extractos por extracción sólido-líquido, con metanol como solvente. Fue evaluada la composición química de los aceites, empleando la cromatografía gaseosa acoplada a masa, y se obtuvo 11 componentes en el aceite esencial de la hoja y 10 componentes en el aceite esencial del fruto, que representan el 65,48 y 71,86%, respectivamente; de los cuales fueron identificados como componentes mayoritarios el B-Pineno en el aceite del fruto y el Nerolidol para el aceite de la hoja. Además se determinó el contenido fenólico en ambos aceites obteniéndose 1,06 para la hoja y 0,32 para el fruto. En el análisis de los extractos se identificaron y se cuantificaron los ácidos grasos presentes, empleando la cromatografía gaseosa, obteniéndose la presencia de los ácidos grasos Omega 3 y 6 en ambos extractos, siendo mayor el porcentaje para el fruto. Por su parte el contenido de fenoles y flavonoides resultó ser dos veces superior para el extracto de la hoja que para el fruto. Estos valores se encuentran en total correspondencia con los resultados obtenidos al evaluar la actividad antioxidante en extractos y aceites, para lo cual se emplearon diferentes métodos “*in vitro*”, que a su vez incluyen dos mecanismos de acción descritos en la literatura: la evaluación de la peroxidación lipídica y la habilidad secuestradora a los radicales libres. Ambos aceites mostraron un potencial antioxidante menor que los patrones de antioxidantes sintéticos y vegetales utilizados aunque el aceite de las hojas presentó un mayor potencial que el de los frutos en tres de los cuatro ensayos evaluados. Los extractos presentan una actividad apreciable, similar a los patrones utilizados, siendo esta superior en el extracto de la hoja.

ÍNDICE





ÍNDICE

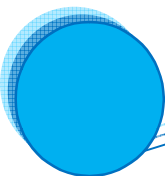
RESUMEN

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
1.1 CONSIDERACIONES GENERALES ACERCA DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS.	6
1.2. ESTUDIOS REPORTADOS DE LA PLANTA	8
1.2.1 Aspectos generales.....	8
1.2.2. Estudios reportados de la planta estudiada	9
1.3. COMPONENTES DE LAS PLANTAS AROMÁTICAS DETERMINADOS EN EL PRESENTE TRABAJO.	10
1.3.1 Aceites esenciales.....	11
□ Obtención de los aceites esenciales (AE)	11
□ Composición de los aceites esenciales.	12
□ Control de calidad.	13
□ Acciones farmacológicas más importantes.	13
1.3.2. Compuestos fenólicos. Flavonoides.	14
□ Propiedades y obtención de los flavonoides.	14
□ Determinación analítica de los flavonoides.	16
□ Acciones farmacológicas más importantes de los flavonoides.....	17
1.3.3. Ácidos grasos.	17
□ Clasificación	17
□ Determinación analítica de los ácidos grasos.....	17
□ Importancia biológica de los AG	18
1.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	19
1.4.1. Generalidades de los radicales libres.	19
1.4.2 Mecanismo de acción de los antioxidantes.	20
I. Cuantificación de los compuestos fenólicos – método de Folin-Ciocalteu.....	22
II. Método basado en la reacción de transferencia electrónica.	22
III. Evaluación de habilidad de los antioxidantes para inhibir o suspender la oxidación lipídica en el sistema adecuado.	24
1.5. CONSIDERACIONES FINALES DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:	25
MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1. LA PLANTA, EQUIPOS Y REACTIVOS ESTUDIADOS EN EL PRESENTE TRABAJO.	27
2.2. METODOLOGÍA DE OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL Y DEL EXTRACTO A PARTIR DE LAS HOJAS Y LOS FRUTOS DE SWINGLEA GLUTINOSA Y LOS RENDIMIENTOS.	28
2.2.1. Obtención del aceite esencial, utilizando la Trampa de Clevenger.	28
2.2.2. Obtención de los extractos.	30
2.3. EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA SWINGLEA GLUTINOSA.	30
2.3.1. Evaluación de los aceites esenciales obtenidos de las hojas y frutos de la Swinglea glutinosa.	30
2.3.1.1. Evaluación físico-química de los aceites esenciales evaluados.....	30
2.3.1.2 Caracterización química de los ambos aceites esenciales.	30

Tú Le Thi Cam - Viet Nam (2012)

“EVALUACIÓN DEL CONTENIDO, LA CALIDAD Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS Y LOS FRUTOS DE SWINGLEA GLUTINOSA”

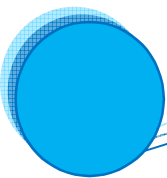


ÍNDICE

2.3.1.3 Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos.	32
2.3.2. <i>Evaluación de los extractos obtenidos de las hojas y frutos de la Swinglea glutinosa.</i>	33
2.3.2.1. Identificación y determinación cuantitativa de los ácidos grasos en los extractos.	33
2.3.2.2. Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos	35
2.3.2.3 Determinación del contenido de flavonoides en los extractos.	36
2.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LOS ACEITES ESENCIALES Y LOS EXTRACTOS.....	36
2.4.1. <i>Cuantificación de la actividad secuestradora de radical- El método basado en la transferencia electrónica</i>	36
2.4.1.1 Actividad secuestradora del radical libre DPPH de los aceites esenciales y los extractos:	37
2.4.1.2 Fuerza reducida de los aceites esenciales y los extractos:.....	38
2.4.2 <i>Evaluación de habilidad de los antioxidantes para inhibir o suspender la oxidación lipídica en el sistema adecuado.</i>	39
2.4.2.1 Método del tiocianato férrico.	39
2.4.2.2. Método del ácido tiobarbitúrico (TBA).	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1. RENDIMIENTO DE LOS ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS OBTENIDOS DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA SWINGLEA GLUTINOSA.	42
3.2. EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LAS HOJAS Y FRUTOS DE LA SWINGLEA GLUTINOSA.	42
3.2.1. <i>Aceites esenciales obtenidos de las hojas y frutos de la Swinglea glutinosa.</i>	42
3.2.1.1 Evaluación físico-química de los aceites esenciales evaluados.	42
3.2.1.2. Composición química de los aceites esenciales.	43
3.2.1.3. Contenido fenólico de los aceites esenciales.	46
3.2.2. <i>Composición química de los extractos.</i>	48
3.2.2.1. Determinación de los ácidos grasos en los extractos.	48
3.2.2.2. Contenido fenólico en los extractos	52
3.2.2.3. Cuantificación del contenido de flavonoides en los extractos	53
3.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS ACEITES ESENCIALES Y LOS EXTRACTOS DE SWINGLEA GLUTINOSA.....	54
3.3.1. <i>Métodos basados en la transferencia electrónica.</i>	54
I. Cuantificación de la actividad secuestradora de radical libre DPPH:	54
II. Fuerza reducida de ión férrico (Fe^{3+})	58
3.3.2. <i>Evaluación de habilidad de los antioxidantes para inhibir o suspender la oxidación lipídica en el sistema adecuado.</i>	60
I. Determinación de la actividad antioxidante total por método de tiocianato férrico (FTC).....	60
II. Ensayo de ácido tiobarbitúrico (TBA).....	62
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
BIBLIOGRAFÍA	69

INTRODUCCIÓN





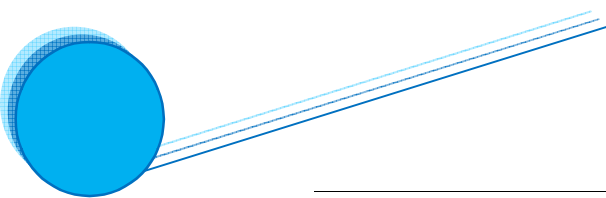
INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos, principalmente las plantas, han constituido la fuente principal de productos naturales de uso medicinal. Las plantas tienen la característica común de poseer un elevado contenido en sustancias o principios activos, con propiedades químicas, bioquímicas u organolépticas muy específicas, que permiten su utilización con fines terapéuticos (plantas medicinales), aromáticos (plantas aromáticas o esencias) y dietéticos o gastronómicos (plantas condimentarias)¹. La organización mundial de la salud estima que en muchos países desarrollados el 70-80% de la población ha usado de alguna forma la medicina tradicional; además, en algunos países asiáticos y africanos el 80% de la población depende de la medicina tradicional para la atención primaria de su salud².

Por otra parte la oxidación de los productos alimenticios, cosméticos y medicinales produce un deterioro muy significativo en los mismos, haciendo que pierdan la mayoría de las veces las propiedades para las cuales fueron elaborados. Las grasas y aceites presentes en estos productos pueden deteriorarse fácilmente debido a la oxidación, produciéndose una serie de reacciones con participación de radicales libres que se propagan y finalmente se convierten en compuestos estables oxigenados que conllevan a la pérdida de aroma y sabor, así como otras características indeseables que degradan la calidad del producto³.

Para prevenir tales reacciones se utilizan compuestos con propiedades antioxidantes, en su amplia mayoría sintéticos, como es Butilhidroxitolueno (BHT), Butilhidroxianisol (BHA), Etilhidroxibenzoato (EHB), Propilgalato (PG), por mencionar algunos. Últimamente ha crecido la demanda de “productos de origen natural”, libres de aditivos químicos sintéticos, y se ha incrementado el estudio y el uso de sustancias que contengan antioxidantes naturales. Además, está en auge el mercado de complementos dietéticos y nutraceuticos que contengan compuestos capaces de inhibir o inactivar radicales libres, ya que estos compuestos han sido relacionados con enfermedades crónicas y degenerativas, como cáncer, enfermedades neuronales y

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



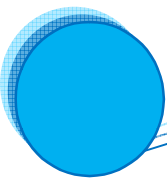
INTRODUCCIÓN

cardiovasculares⁴. Por ello, el descubrimiento y el suministro de antioxidantes exógenos podría ser una alternativa importante y segura en la prevención, tratamiento de diferentes enfermedades y aplicación en la industria alimentaria⁵. Algunos autores han informado sobre las características antioxidantes de distintos aceites esenciales crudos (AEC), como ser los de *Rosmarinus officinalis* L.⁶, de *Thymus vulgaris* L. (Tomillo), de *Origanum vulgare* L. (Orégano)⁷ y *Lippia graveolens* Kunth (Orégano mexicano)⁸. Los AEC presentan gran variabilidad en su composición química según la ubicación geográfica de la especie vegetal de la cual se los extrae, ya que inciden las características del clima, tipo del suelo, época de cosecha, ect⁹.

Entre las plantas medicinales utilizadas en todo el mundo a lo largo de la Historia, y aun de la prehistoria del hombre, se encuentran las **plantas aromáticas** y sus componentes olorosos que ocupan un lugar especial. Desde que Homo sapiens discriminó el alimento tóxico, el aire limpio del contaminado, o reconoció las virtudes del aroma de una flor o un fruto, comenzó a familiarizarse con gustos y olores que determinaron su habitat, su comportamiento, sus costumbres, sus medicinas, hasta sus placeres y sus vicios, hasta sus recuerdos y deseos. La vida era para él, entre otras cosas, una experiencia que se genera desde el olfato y el paladar. Desde entonces, su memoria se enriquecía con sabores y olores, que fueron formando parte de su cultura y de su idiosincrasia¹⁰.

En **Cuba**, esta rama de la medicina tradicional se ha comenzado a renovar revalorizando el uso y producción de las plantas medicinales. Los profundos avances científicos alcanzados a partir de la segunda mitad del presente siglo XX, han ido confirmando la vigencia del retorno a la tierra, al campo, no sólo para la producción de alimentos, sino también para la obtención de medicamentos, de actividades en las cuales la síntesis química irrumpió con avasalladora fuerza, pero obviando la idea de que cuanto más se aleje el hombre de la naturaleza más sufrirá su salud física y mental. Este nuevo estadio de la cultura humana, unido en Cuba a condiciones económicas excepcionales, ha provocado el auge de la medicina alternativa, en la cual el cultivo, estudios y procesamiento de las plantas con fines terapéuticos ocupan una

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



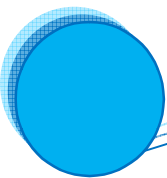
INTRODUCCIÓN

posición cimera. Esta labor iniciada hace ya muchos años, ya más de cien enriquecida por la cultura popular se reincorpora a los ministerios de agricultura y salud pública con renovada fuerza. Sin embargo, resulta importante tener en cuenta el conocimiento empírico acumulado por la población en cuanto el manejo y uso de estas especies de plantas, aspecto que aborda la etnobotánica y que permiten incorporar a su cultivo la racionalidad de los pobladores en cuanto al cuidado de las mismas y que han favorecido la conservación de estos importantes recursos fitogenéticos¹¹.

Las plantas aromáticas insertadas en el programa de medicina verde del Ministerio de Salud Pública en Cuba son muchas pero cada día se realizan estudios a nuevas especies de plantas para determinar si pueden incluirse en este programa pues constan con investigaciones anteriormente realizadas donde se reportan posibles propiedades terapéuticas que podrían ser de muy buena utilización en el país, tales como antiparasitarias, antiespasmódicas, antirreumáticos etc. Teniendo en cuenta esto en el Departamento de Farmacia de la Universidad Central de Las Villas existe un grupo de investigación que tiene como objetivo fundamental el estudio de las plantas medicinales, particularmente los aceites esenciales y extractos presentes en las plantas aromáticas. El presente trabajo se desarrolló en este grupo de investigación que para la selección de la planta tuvo en consideración el interés mostrado por el grupo de botánicos del Jardín botánico de la universidad, el cual incluye entre su riqueza vegetal la *Swinglea glutinosa*, planta que posee muy poca información en la literatura y ha sido utilizada tradicionalmente en algunos países latinoamericanos por su actividad antiparasitaria¹² y evaluada por su actividad citotóxica¹³. Constituye, por tanto, el **problema científico** del presente trabajo que la *Swinglea glutinosa*, cultivada en Cuba, posee escasos estudios reportados que describan la composición y la actividad farmacológica de sus hojas y frutos, lo que limita justificar el uso de sus aceites esenciales y extractos en el campo farmacéutico y 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 los metabolitos de mayor interés que

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



INTRODUCCIÓN

podrían estar relacionados con la posible actividad antioxidante de la *Swinglea glutinosa* se contribuirá a disponer de la información necesaria para proponer su uso como antioxidante en el campo farmacéutico y alimentario. Para fundamentar dicha hipótesis se trazaron los siguientes objetivos.

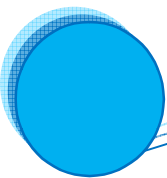
Objetivo general:

- ✦ Evaluar la composición del aceite esencial y extractos obtenidos de hojas y frutos de *Swinglea glutinosa* y su posible relación con la actividad antioxidante en el mismo.

Objetivos específicos:

1. Obtener extractos y el aceite esencial a partir de las hojas y el fruto de *Swinglea glutinosa*, aplicando la técnica de extracción sólido-líquido e hidrodestilación, respectivamente.
2. Determinar la composición del aceite esencial obtenido a partir de las hojas y el fruto de *Swinglea glutinosa*, empleando la Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masa (GC/MS).
3. Determinar el contenido de ácidos grasos en las muestras evaluadas, empleando la Cromatografía Gaseosa.
4. Determinar el contenido de fenoles y flavonoides en las muestras evaluadas, empleando técnicas espectrofotométricas.
5. Evaluar la actividad antioxidante de ambos aceites esenciales y extractos, aplicando diferentes ensayos *in vitro*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

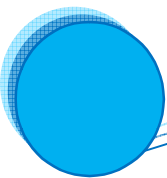
1.1 Consideraciones generales acerca de las plantas aromáticas.

Los problemas de salud y el elevado costo de los medicamentos sintéticos han llevado al aumento del uso de la medicina tradicional para tratar enfermedades principalmente en países en vías de desarrollo; es así, como el conocimiento de las plantas medicinales ocupa un lugar preponderante como una de las medicinas alternativas del futuro que garantiza eficacia, seguridad y bajos costos, siempre y cuando sean usadas en forma adecuada y por personal calificado. Una planta medicinal se define como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos puedan servir de precursores para la hemisíntesis de nuevos fármacos².

El uso de plantas y de preparados de hierbas con propósitos medicinales es una forma común de atender problemas de salud a nivel mundial, su empleo ha sido documentado desde la antigüedad y mantiene su popularidad por razones históricas y culturales, aunque la medicina moderna esté disponible, con el fin de acercar al profesional en salud con el uso de este tipo de recurso por parte de los pacientes¹⁴. Cada día se presta más atención al estudio de las plantas medicinales, de forma tal que la etnobotánica y la fitoterapia están tomando un gran auge en el mundo actual, tanto en la medicina aplicada como en la investigación experimental¹⁵.

En Cuba el uso de muchas plantas medicinales se realiza de forma empírica, por lo que si se logra una estandarización de sus propiedades es posible obtener un mejor aprovechamiento en estudios farmacológicos posteriores y lograr mejores resultados al utilizarla. Actualmente se estima que unas 20000 especies de plantas son utilizadas como medicamento a nivel mundial¹⁶, sobre todo en aquellos países en que gran parte de la población no tiene acceso a fármacos y continúan acudiendo al uso de la medicina tradicional, principalmente basada en plantas, para tratar muchas enfermedades tropicales, incluida la malaria ^{15, 17}.

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



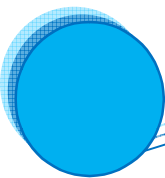
CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los avances existentes en el campo de la investigación, ponen hoy en día a disposición de todos medicamentos de plantas medicinales desarrollados bajo los criterios de calidad, seguridad y eficacia, que debe cumplir todo medicamento. La publicación de monografías de plantas con criterios científicos (ESCOP, OMS, Comisión E, Farmacopeas herbales, Farmacopea Europea, revisión de monografías en farmacopeas oficiales de distintos países, etc.), la farmacovigilancia sobre la seguridad de las mismas que nos alerta de los posibles efectos secundarios, contraindicaciones e interacciones que, como todo medicamento, en mayor o menor grado puedan tener, y los cada vez más abundantes ensayos clínicos controlados contra placebo e incluso contra otros medicamentos de síntesis, que prueban su eficacia, convierten la fitoterapia en una herramienta utilísima en el campo de la terapéutica¹⁸.

Entre las plantas medicinales las plantas aromáticas juegan un rol muy importante. Existen desde plantas superiores hasta algas con propiedades aromáticas, para un total aproximado de 60 familias botánicas reconocidas con tales propiedades, entre ellas: Compuestas, Labiadas, Umbelíferas, Pináceas, Verbenáceas, Mirtáceas, Lamiáceas, Rutáceas, Lauráceas, Piperáceas, Apiáceas y Asteráceas. Constituyen, por tanto, un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global, la OMS ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para satisfacer las necesidades de atención primaria de salud y gran parte de estos tratamientos implica el uso de extractos o sus principios activos¹⁹.

No todos los componentes químicos elaborados por la planta, poseen igual interés para la fitoquímica. Los denominados "principios activos" son frecuentemente alcaloides o heterósidos y ambos merecen, por ello, especial atención. Ellos son sustancias que han de servir como droga o medicamento que alivie una enfermedad, entre los cuales se destacan los conocidos aceites esenciales y los flavonoides, a los que se les adjudica múltiples acciones como antioxidantes, antimicrobianos, estimulantes en la piel, expectorantes, laxantes, etc...²⁰.

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La riqueza de un país en plantas medicinales solo alcanza su verdadero valor cuando se da una correcta utilización de las mismas. Teniendo en cuenta que el presente trabajo tiene como objeto de estudio evaluar la composición y actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos obtenidos de las hojas y los frutos de *Swinglea glutinosa*, a continuación se relacionan aspectos reportados en la literatura sobre esta planta y los grupos de metabolitos estudiados en la misma.

1.2. Estudios reportados de la planta

1.2.1 Aspectos generales

La planta tropical pequeña *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr. Es un miembro de la familia Rutáceas. Esta especie es de origen asiática y es cultivada como cerco de protección y ornamental. Originalmente fue traída del América del Sur desde Sudeste Asiática²¹.

✓ Aspectos taxonómicos²²

Nombre científico: *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr.

Nombre común: Swinglea.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Rutaceae.

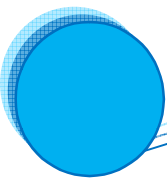
Subfamilia: Aurantioideae.

Género: *Swinglea*

Epíteto Específico: *Glutinosa*.

El árbol es pequeño o mediano; las ramitas se inclinan cuando son jóvenes y finamente pubescentes, pronto se convierte en el terete adecuado y la pubescencia se pierde; las hojas son de foliadas, con impresas terminales de 8-12 x 3-5 centímetro, bruscamente apuntadas o a veces redondeada el ápice, que se estrechada gradualmente. Las flores solitarias o en los racimos en el axilas de las hojas, ó a veces terminales en las ramitas

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

cortas, árbol frondoso en la base y los frutos de la *Swinglea glutinosa* muestran unas estructuras notables los cuales se llamaron glándulas del mucílago que parecen originar el lisógeno, posee glándulas de aceite en la cáscara, las hojas, etc. Estas glándulas mucílagos de forma elipsoide aparecen bastante pegadas a las paredes dorsal y radial.

1.2.2. Estudios reportados de la planta estudiada

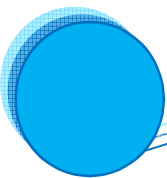
Los estudios reportados de esta planta son muy escasos. Desde el punto de vista fitoquímico en 1970 Dreyer y col. estudiaron la presencia de alcaloides y triterpenos en el fruto²³ y más recientemente Bernard Weniger y col. aislaron y determinaron 4 alcaloides acridonas con actividad antimalárica Los alcaloides acridonas son un grupo de compuestos nitrogenos heterociclicos naturales que muestran un espectro largo de actividades biologicas, incluyendo antiparasitarios antiviral y citotóxico^{12, 24}.

Posteriormente se evaluaron extractos de acetato de etilo de las raíces, las frutas, y el tallo de *Swinglea glutinosa*, obtenidos a temperatura ambiente durante 12 horas. Se comprobó la actividad anti-giardiasis contra *O. perornata*. Se encontraron que los extractos de los raíces tienen la toxicidad selectiva hacia *O. perornata* cuando se compararon con *S. capricornutum*. Además con previo fraccionamiento, se lograron aislar e identificar 11 compuestos activos con actividad anti-giardiasis²¹.

En Colombia fue realizado otro estudio sobre la actividad antituberculosis de 11 plantas aromáticas y medicinales en el cual se cita que el aceite esencial obtenido del fruto de la planta *S. glutinosa*, tiene entre sus componentes: β -Pinene (49.6%), α -Pinene (12%²⁵), Sabinene (11.0%), Bicyclosesquiphellandrene (8.1%), Limonene (4.4%), 1,8-Cineol (3.0%), Terpinen-4-ol (2.7%), trans- β -Caryophyllene (1.5%), γ -Terpinene (1.4%), α -Terpineol (1.2%) y son candidatos potenciales como fitoterapéuticos para el control de la tuberculosis²⁶.

Los estudios más recientes refieren que alcaloides acridonas aislados de los extractos metanólicos de la hoja, fruta, y raíces de *Swinglea Glutinosa* poseen características estructurales para la actividad antiproliferativa. Eso estimuló a hacer la prueba de estos alcaloides en muchas líneas de células de cáncer. Desafortunadamente, ninguno de los

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ensayos de las acridonas exhibió un nivel alto de citotoxicidad obteniéndose un rango de IC_{50} entre 47,5 a 93,3 mM. También en este trabajo se publicó, por primera vez, la actividad citotóxica de algunos derivados de N-Feniletilbenzamida en las líneas de células de cáncer aunque su escasa selectividad impide algunas aplicaciones clínicas. Sin embargo, se describe que es posible que los análogos pudieran mostrar dicha selectividad y por tanto serían de mayor interés¹³. Estos autores identificaron 8 alcaloides acridonas aisladas de sus extractos de la cáscara del tallo por método cromatográfico y espectral que resultaron ser inhibidores potentes y reversibles de Catepsina V., se conocen como las peptidasas cisteína lisosomal, que pueden estar relacionados con muchas patologías (cáncer, osteoartritis, osteoporosis, trastornos autoinmunes, e infección viral)¹³.

1.3. Componentes de las plantas aromáticas determinados en el presente trabajo.

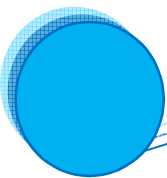
Casi siempre en la planta se encuentran varios principios activos, de los cuales uno de ellos determinaría la importancia de la especie para alguna aplicación. Estos principios activos, no se distribuyen en forma homogénea por todo el cuerpo de la planta, sino preferentemente en las flores, las hojas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

El valor medicinal de la planta curativa se debe a la presencia en sus tejidos de una sustancia química, el principio activo, que son las sustancias responsables de la acción farmacológica y las que le confieren valor terapéutico. Muchos de los principios activos son sumamente complejos y ocasionalmente aún se desconocen su naturaleza química, otros han sido aislados purificados e incluso, sintetizados. Por lo general pertenecen a estas categorías: alcaloides, glucósidos, gomas y resinas, sustancias antibióticas, ácidos grasos y otros metabolitos secundarios²⁷. Estos últimos juegan un rol muy importante en la adaptación de la planta con su medio ambiente, presentando sus actividades como antibióticos, antifúngicos, antiviral, antimicrobianos, protección de

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)

“EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
DE LA HOJA Y DEL FRUTO DE *Swinglea Glutinosa*”

Página 10



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

patógenos, luz UV, mientras que los ácidos grasos son componentes de marcadas importancias por el rol que juegan en la nutrición humana ²⁸.

Los metabolitos secundarios se suelen clasificar según su ruta biosintética. Se consideran 3 familias moleculares grandes: alcaloides, terpenoides y esteroides y compuestos fenólicos. Los terpenoides y los compuestos fenólicos forman la parte aromática volátil de la planta, presentes en el aceite esencial del mismo, los compuestos fenólicos están distribuidos extensamente en las plantas superiores ²⁹. Ambos grupos de metabolitos constituyen los más conocidos por ser recursos muy útiles para el desarrollo de muchas ramas de la ciencia ^{25, 30}. A continuación se profundiza en la información de tres grupos de compuestos (terpenoides, compuestos fenólicos, y ácidos grasos) que constituyeron los de mayor interés en el presente trabajo.

1.3.1 Aceites esenciales.

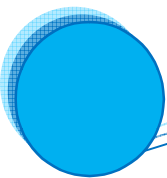
Los aceites esenciales constituyen la fracción volátil de estudio en plantas aromáticas y medicinales, pertenecientes a diferentes clases de compuestos, e.g. hidrocarburos, ésteres, alcoholes, aldehídos, algunos ácidos, fenoles y sus derivados, lactonas, etc.; todos, son productos de largas cadenas de biosíntesis vegetal, los llamados metabolitos secundarios de las plantas ³¹.

✓ **Obtención de los aceites esenciales (AE)**

Las plantas sintetizan y almacenan aceites esenciales en diversas partes como flores, hojas, brotes, tallos, madera, frutos, semillas, corteza, resinas, raíces y/o rizomas, y presentan estructuras secretoras especializadas que vierten la esencia al exterior, por tanto, se obtienen mediante técnicas de destilación, en la que se volatilizan estos principios por calor, se condensan en frío y se recogen ³².

Prácticamente todos los constituyentes de los aceites esenciales son algo inestables a altas temperaturas; Para obtener la mejor calidad del aceite es necesario asegurar que durante la destilación haya una baja temperatura o si es del caso tener altas temperaturas durante el menor tiempo posible ³³.

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

✓ **Composición de los aceites esenciales.**

Los aceites esenciales son productos naturales de gran valor e importancia económica. El valor económico y la aplicabilidad industrial de las esencias están relacionados con su composición química, que determina todas las otras propiedades macroscópicas (fisicoquímicas, olor, etc.) y los componentes mayoritarios determinan la actividad biológica de los aceites esenciales. Es por ello, que el establecimiento de la composición de los aceites esenciales es una tarea importante y requiere el uso de técnicas de separación, detección e identificación, sensibles y específicas, tales como la cromatografía de gases capilar acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Por medio de esta técnica analítica no solamente se cuantifican los componentes de la esencia, sino que simultáneamente se establece su identidad, gracias a la interpretación de su espectro de masas.³⁴.

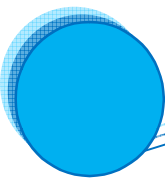
La mayor parte de los aceites esenciales, que también se llaman “esencias” o “aceites volátiles”, la forman los terpenos, en particular, monoterpenos, $C_{10}H_{16}$, y sesquiterpenos, $C_{15}H_{24}$ y la otra es constituyentes aromáticos^{31a}.

- Los monoterpenos son hidrocarburos que pueden verse como una combinación de numerosas unidades isopreno (C_5). La clasificación de los terpenos según su estructura química, es similar a la de los terpenos, los cuales son clasificados en base al número de unidades de isopreno presentes.
- Los sesquiterpenos - C_{15} son formados por la unión de 3 unidades de isoprenos. La estructura y la función de estos sesquiterpenos son similares a los de monoterpenos^{31a}

Los terpenos que contienen oxígeno como sus derivados oxigenados, alcoholes, aldehídos, ácidos, y ésteres terpénicos, que se denominan terpenoides.

- Los compuestos aromáticos que se producen menos frecuentes que los terpenos, son derivados de fenilpropano.

La composición de la esencia puede variar también con el procedimiento de la extracción (su duración, temperatura, tipo de agua, etc.), tratamiento previo de la planta



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

(secado, fermentación, trituración, empaque), la época de la recolección, el lugar geográfico o pequeños cambios genéticos ^{31b}.

✓ **Control de calidad.**

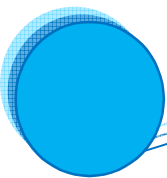
El control de calidad de un aceite esencial tiene como objetivo garantizar que posea determinadas características analíticas. Las características estudiadas deben ser suficientemente descriptivas del producto para que permitan detectar aquellas desviaciones por el tiempo o por falta de condiciones de almacenamiento adecuadas que se consideren significativamente definidas para ese aceite. Se utilizan diferentes parámetros analíticos y los valores obtenidos para una muestra se comparan con los establecidos en la correspondiente norma, que habrá sido dictada por algún organismo de normalización o, en su defecto, por el propio interesado. ³⁵. En la Tabla 1, se citan los parámetros analíticos empleados en el control de calidad de aceites esenciales, que forman parte de las monografías analíticas de aceites esenciales que se encuentran en las Farmacopeas vigentes.

Tabla 1.1. Parámetros analíticos empleados en el control de calidad de aceites esenciales.

Descripción	Parámetros
Características organolépticas	Olor
	Color
	Sabor
Determinaciones físicas	Densidad relativa
	Rotación óptica
	Índice de refracción
Índice químicos	Índice de acidez
	Índice de saponificación
Características espectroscópicas	Infrarrojo
	Ultravioleta – visible
Características cromatográficas	Perfil cromatográfico por CG

✓ **Acciones farmacológicas más importantes.**

Los aceites esenciales son las mezclas complejas de compuestos volátiles aislados de plantas aromática ³⁶. El uso más antiguo de tales compuestos es la aromaterapia, en la



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

cual se utilizan de acuerdo al tipo de padecimiento, para estimular, relajar o tranquilizar, tanto física, mental como espiritualmente. También se utiliza la aromaterapia ³⁷ en sinergia con otras terapias farmacológicas ³⁸, incluyendo propiedad antiinflamatoria ³⁹, antituberculosis ⁴⁰, antimicrobiano ⁴¹, antifúngico ⁴², antitumoral, protector del tracto gastrointestinal ⁴³, anticonvulsivante ⁴⁴, espasmolítica y anestésica ^{31a}. Además múltiples ensayos químicos *in vitro* han permitido evaluar estos compuestos como antioxidante, constituyendo así, junto a la acción antimicrobiana, la actividad farmacológica más estudiada en la actualidad ^{31a, 45}.

1.3.2. Compuestos fenólicos. Flavonoides.

El término «compuestos fenólicos» comprenden un amplio rango de sustancias que poseen uno o más anillos aromáticos con por lo menos un grupo hidroxilo ⁴⁶. Estos compuestos fenólicos o polifenoles constituyen uno de los grupos de sustancia más numeroso y distribuido extensamente en el reino de las plantas ⁴⁷. Entre ellos podemos mencionar a los flavonoides, isoflavonoides, antraquinonas, antocianidinas y xantonas, a los ácidos fenólicos y a los fenoles simples, a los ácidos hidroxicinámicos, a los fenilpropenos, a las ligninas, etc. Los mismos actúan generalmente como capturadores y estabilizadores de radicales libres ⁴⁸.

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos, un esqueleto C6-C3-C6 etiquetado A, C, B respectivamente, puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Varias clases de flavonoides se difieren en el nivel de oxidación y orden de sustitución del anillo C, mientras que los compuestos individuales dentro de una clase se diferencian en orden de sustitución de anillo A y B ^{30, 33b, 49}.

✓ **Propiedades y obtención de los flavonoides.**

Los flavonoides son sustancias sólidas cristalizadas de color blanco o amarillento y solubles en agua caliente, alcohol y disolventes orgánicos polares, siendo insolubles en

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)

CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

los apolares. Sin embargo, cuando están en estado libre, son poco solubles en agua, pero son solubles en disolventes orgánicos más o menos oxigenados, dependiendo de su polaridad ⁵⁰. Para su extracción, el solvente usado depende del tipo de flavonoide. La polaridad es una consideración muy importante. Se recomienda utilizar los solventes de menos polar (cloroformo, diclorometanol, dietiléter, etilacetato) hasta los más polares (alcohol, o mezcla de alcohol y agua) ⁵¹. Para aumentar el rendimiento y la velocidad del procedimiento de extracción, se lleva a cabo con movimiento magnético o agitación. La Figura 1 muestra algunas de las etapas generales para la obtención de extractos vegetales, aplicable a la mayoría de los metabolitos.

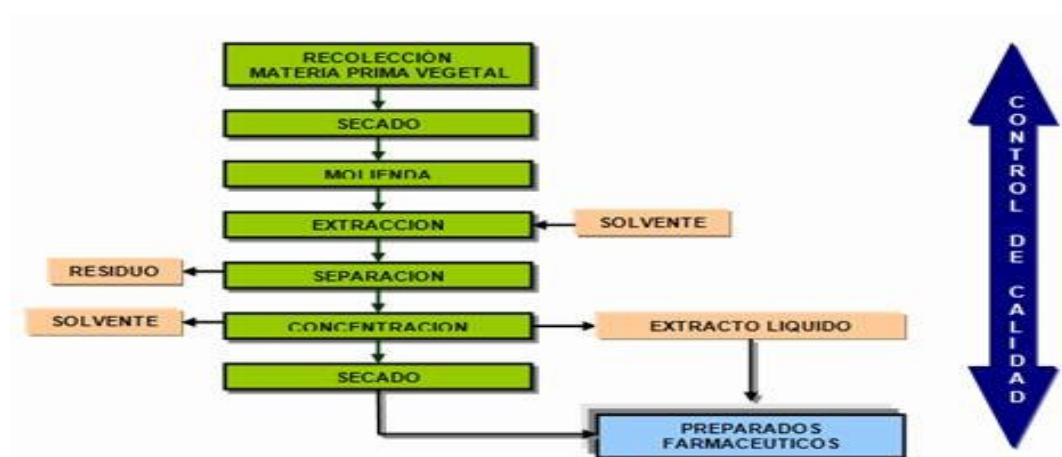
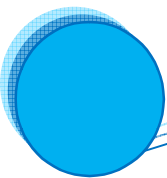


Figura 1.1. Proceso de obtención de extractos a partir de plantas medicinales.

El método de extracción utilizado depende del tipo de planta que se va a emplear, concentración de principios activos y de sus propiedades farmacológicas. Los procesos de **extracción** utilizados son de variado fundamento siendo la extracción sólido-líquido la de mayor uso ya que es una operación que está presente prácticamente en todos los procesos tecnológicos relacionados con la industria químico y médico-farmacéutica ⁵². Después de la extracción vendría el proceso de separación con el objetivo de retirar el residuo de la droga. En la industria se emplean procedimientos de sedimentación, filtración o centrifugación. Para la selección del equipo de separación adecuado hay que tener en cuenta el tipo de separación, tamaño de las partículas de los sólidos suspendidos, contenido de sólidos en la alimentación, densidad relativa de los



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

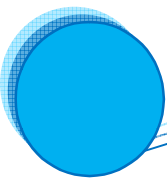
componentes, capacidad de procesamiento deseado y capacidad abrasiva, inflamable o explosiva ⁵³.

Toda vez que se ha realizado la etapa de extracción y separación, se procede a eliminar parte del solvente de extracción para aumentar el contenido de sólidos en el extracto (**Concentración**). Este proceso se realiza a presión reducida con lo que se disminuye la temperatura de calentamiento necesaria para la salida del solvente, el rotaevaporador es una buena alternativa para trabajos en el laboratorio y es ampliamente usado mientras que sistemas análogos se utilizan a escala industrial (evaporadores, condensadores).

✓ **Determinación analítica de los flavonoides.**

El estudio científico de las plantas potencialmente medicinales y aromáticas trajo un inusitado desarrollo de la fitoquímica; que estudian las plantas medicinales desde el punto de vista científico, para ello se desarrollan técnicas que van desde los simples tamizajes fitoquímicos y farmacológicos, hasta el uso de complejas técnicas analíticas que combinan la cromatografía y la espectroscopía que posibilitan caracterizar los componentes presentes en la planta ^{1c}.

La técnica espectrofotométrica ha sido utilizada en la cuantificación de flavonoides desde hace varias décadas. A continuación se citan algunos trabajos a modo de ejemplos: Hertog y col. ⁵⁴ proponen una técnica para la cuantificación de flavonoides totales expresado también como quercetina o rutina; Kostennikova ⁵⁵ también emplea un método espectrofotométrico para cuantificar flavonoides totales expresados como quercetina, basados en la investigación realizada por Hertog y col., cuyo uso se mantiene se reporta recientemente en el trabajos realizados por Gutiérrez y col. ⁵⁶. Este método no es el más específico para la determinación y cuantificación de flavonoides, pero si es uno de los métodos más rentables en cuanto a su economía, ya que no necesita de grandes gastos de reactivos ni es una técnica extremadamente tediosa para el análisis del metabolito o metabolitos de interés.



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

✓ **Acciones farmacológicas más importantes de los flavonoides.**

Son disímiles las propiedades que poseen los flavonoides entre las que se destacan sus propiedades anticancerosas, cardiotónicas, contra la fragilidad capilar, antitrombóticas, para la disminución del colesterol, vasodilatación, antialérgica, protección del hígado, protección del estómago, efecto estrogénico, antiinflamatorios y analgésicos, antimicrobianos, antioxidantes ^{30, 57}.

1.3.3. Ácidos grasos.

✓ **Clasificación**

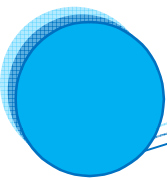
Dentro de la gran diversidad estructural que caracteriza a los lípidos, los ácidos grasos son quizás las estructuras de mayor relevancia. Los ácidos grasos se dividen en dos grandes grupos según sus características estructurales: ácidos grasos saturados (AGS) y ácidos grasos insaturados ⁵⁸. Estos últimos, dependiendo del grado de insaturación que posean se pueden clasificar como ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (Aluyor, 2009).

Ahora bien, dependiendo de la posición del doble enlace, contabilizando desde el carbono extremo al grupo funcional carboxílico, los AGMI y los AGPI pueden clasificarse en tres series principales: omega-9 (ácido oleico, primer doble enlace en el carbono 9), omega-6 (ácido linoleico, primer doble enlace en el carbono 6) y omega-3 (ácido linolénico, primer doble enlace en el carbono 3), siendo los dos últimos ácidos grasos esenciales por no son sintetizados endógenamente en cuerpo humano, mientras que el omega-9 no es esencial ya que los humanos pueden introducir una insaturación a un AGS en esa posición.

✓ **Determinación analítica de los ácidos grasos**

En la actualidad, gracias a los avanzados equipos de cromatografía de gases y al uso de columnas capilares que tienen gran poder de resolución, se conoce con detalle y precisión la composición de ácidos grasos en grasas y aceites. La cromatografía de gases permite determinar la composición de ácidos grasos en los aceites y en las

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

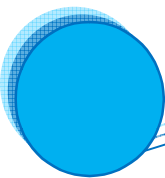
grasas, después de realizar la conversión de triglicéridos en ésteres metílicos, que son más volátiles ⁵⁹.

Los estudios analíticos reportados para la determinación cuantitativa de ácidos grasos en fuentes vegetales o animales incluyen un paso previo de derivatización. La literatura consultada muestra que la principal reacción de derivatización corresponde a la obtención de los metil ésteres de ácidos grasos. Esta reacción incluye una metodología para la preparación de los metil ésteres, empleando metanol a través de una catálisis ácida y básica, la cual ha sido la más empleada durante las últimos tres décadas ⁶⁰, con la posterior determinación por GC. Múltiples investigaciones dan fe de esta afirmación ^{43, 61}, son solo algunos ejemplos consultados en el presente trabajo.

✓ **Importancia biológica de los AG**

La dieta de AG es una fuente principal de energía y determina la composición principal de la membrana y tejidos, afectando sus estructuras y fluidez. Son sustancias importantes de energía consta de 30% de energía total consumida en humanos. La cantidad excesiva podría ser almacenada en el tejido adiposo, especialmente cuando incrementa el consumo de grasa, resultando la obesidad y incrementando riesgo de enfermedades cardiovasculares. Existen Múltiples beneficios e indicaciones que poseen los ácidos grasos Omega 6 y 3 para la salud humana, entre los que se destacan: Enfermedades cardiovasculares (los ácidos grasos omega-6 pueden ayudar a combatir el colesterol y los triglicéridos. Esto nos ayudaría a una circulación sanguínea más fluida y a prevenir distintas enfermedades cardiovasculares), caída del cabello (son muy eficaces cuando los aportes de hierro, zinc y otros nutrientes no dan resultado), enfermedades inflamatorias: (pueden ser de gran ayuda en caso de enfermedades como la artritis reumatoide ya que reducen los niveles de prostaglandinas que son las responsables de muchos procesos inflamatorios), diabetes (los ácidos grasos Omega 6 ayudan a tener unos niveles de insulina más estables a la vez que pueden compensar, un poco, los daños que esta enfermedad provoca (pérdida de visión, problemas de piel, daños en el sistema nervioso, etc.), problemas de la piel y desequilibrios hormonales en la mujer, entre

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

otros. Todo lo anterior justifica la necesidad de disponer de fuentes externas de estos ácidos grasos, como vía para suministrarlos ante la carencia de ellos en el organismo, ya sea a través de la dieta o en forma de medicamentos, así como conocer la proporción en que se encuentran en las fuentes naturales que lo contienen.⁶²

1.4. Actividad antioxidante

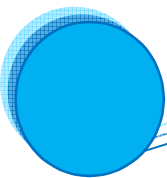
1.4.1. Generalidades de los radicales libres.

Se consideran radicales libres aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Esto lo hace muy inestable, extraordinariamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos⁶³.

Los RL son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de atrapamiento). Son componentes normales de células y tejidos, existiendo una poza de RL particular en cada estirpe celular y en algunos tipos celulares permiten la mejor adaptación a su hábitat. Al elevarse o disminuir las concentraciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno, puede acarrear importantes alteraciones funcionales^{63a},⁶⁴. El desbalance entre la producción de EROS y la defensa antioxidante provoca un daño orgánico conocido 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 biomoléculas⁶⁵.

El ser humano está protegido del estrés oxidativo gracias a la acción de estas sustancias antioxidantes que poseen diferentes funciones⁶⁶. Es difícil intentar definir los antioxidantes naturales, pero en general el término alude a aquellas sustancias que se presentan o pueden ser extraídas de los **tejidos de las plantas y los animales y**

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

aquéllos que se forman durante la cocción o el procesado de **compuestos** alimenticios de origen vegetal o animal. Los antioxidantes naturales se encuentran presentes en prácticamente todas las plantas, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animales ⁶⁷. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, y cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios RL ⁶⁸.

1.4.2 Mecanismo de acción de los antioxidantes.

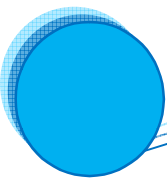
Los antioxidantes engloban un grupo de sustancias que presentan estructuras químicas y mecanismos de acción muy variados. Así que no hay una definición internacional para el mejor antioxidante ⁶⁹. En la realidad, las propiedades antioxidantes de diferentes extractos, aceites esenciales y compuestos puros se podrían ser evaluados utilizando varios ensayos in vitro que pueden ser divididos en dos grupos: Los que evalúan la peroxidación lipídica y los que miden la habilidad secuestradora a los radicales libres ⁷⁰.

➤ Evaluación de la peroxidación lipídica:

En este mecanismo de acción, la actividad antioxidante del sistema se evalúa midiendo el consumo de oxidantes y la formación de los productos intermedios y finales de la oxidación en diferentes substratos (aceites, grasas, ácido linoleico, ácidos grasos metilados, entre otros. Estas medidas se llevan a cabo en los ensayos como: Valor peróxido, valor de ácido tiobarbitúrico (TBA), contenido de ácidos grasos libres, formación de los dienos conjugados por la absorción a 232 y 268nm, composición de los ácidos grasos, proporción de los ácidos grasos insaturados y los ácidos saturados. La mayoría de estos ensayos basados en los sustratos lipídicos necesitan las condiciones de oxidación aceleradas: incrementando presión parcial de oxígeno y la temperatura, adicionando los catalizadores de la transmisión metálica, expuesto a la luz, varios fuentes de agitación y radicales libres ⁷¹.

➤ Evaluación de la habilidad secuestradora a los radicales libres ⁷²:

Esta evaluación se clasifica de acuerdo a las reacciones químicas involucradas:



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Método basado en la reacción de transferencia del átomo de hidrógeno: los antioxidantes pueden apaciguar los radicales libres dándole hidrógeno: $X^\bullet + AH \rightarrow XH + A^\bullet$

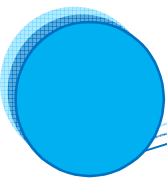
Las reacciones son rápidas, no dependen del solvente y pH. Ellos son: inhibición de la inducción de oxidación de LDL, capacidad absorbida de los radicales de oxígeno (ORAC).

2. Método basado en la reacción de transferencia electrónica: Esto detecta la habilidad de un antioxidante para transferir un electrón a reducir cualquier compuesto, incluyendo metales, grupos carbonilos y radicales.

Este método depende del valor de pH en incluye diferentes ensayos entre los cuales se encuentran: ensayo de fenólicos totales por reactivo Folin-Ciocalteu, capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC, siglas en inglés), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPD, siglas en inglés), la fuerza antioxidante reducida del ión férrico (FRAP, siglas en inglés), ensayo de potencial total antioxidante utilizando el complejo de Cu(II) como antioxidante. Los métodos basados en este principio incluyen que un oxidante (substrato) atrae un electrón desde el antioxidante, produciendo un cambio de color en el substrato. El grado del cambio de color es proporcional a la concentración del antioxidante. El punto final de la reacción se alcanza cuando se detiene el cambio de color. La pendiente de la curva obtenida entre la variación de absorbancia contra la concentración de antioxidante es un reflejo de la actividad antioxidante ⁷³.

Ambas transferencias pueden ocurrir simultáneamente y la reacción dominante en el sistema se puede determinar según las propiedades y la estructura de los antioxidantes, los coeficientes de partición y solubilidad, el solvente. Los resultados obtenidos por diferentes métodos no son comparables, debido a muchos factores: La estructura física del sistema del ensayo, la naturaleza de sustratos para oxidación, la presencia de la interacción de los componentes, el modo de iniciación de la oxidación, el método analítico para medir la oxidación ⁷⁴. Teniendo en cuenta esto último algunos autores ⁷⁴⁻⁷⁵ proponen para estudiar la actividad antioxidante una metodología que incluye tres etapas en la evaluación de la muestra, según el siguiente orden: **primero**,

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

la cuantificación de los compuestos fenólicos; **segundo**, métodos basados en la reacción de transferencia electrónica que incluyen la cuantificación de la actividad secuestradora de radical, utilizando más que un método y considerando el efecto del solvente en el mecanismo de antioxidante, y **por último**, la evaluación de habilidad de los antioxidantes para inhibir o suspender la oxidación lipídica en el sistema adecuado. Teniendo en cuenta que en el presente trabajo se sigue la metodología descrita anteriormente, a continuación se fundamentan estos ensayos recomendados.

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

El ensayo espectrofotométrico desarrollado por Folin-Ciocalteu se utiliza para determinar los compuestos fenólicos totales. Se fundamenta en una reacción de oxidación / reducción que es el mecanismo básico; gracias al carácter reductor del reactivo Folin-Ciocalteu ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$: Heteropolianión molibdofosfowolfrámico) en el cual el Mo (VI) es reducido a Mo (V) con un e⁻ donado por un antioxidante. Mo (VI) (amarillo) + e⁻ (de AH) → Mo (V) (azul) ⁷⁶.

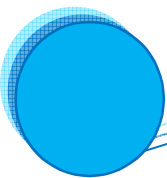
La absorbancia del color azul desarrollado se mide a una longitud de onda de 765 nm y los resultados se expresan en µg de ácido gálico/mL de aceite esencial o mg de muestra, utilizando ácido gálico como un estándar ⁷⁷.

II. Método basado en la reacción de transferencia electrónica.

Actividad secuestradora del radical libre DPPH

El ensayo DPPH es un método rápido y sencillo que no requiere un equipamiento sofisticado, sencillamente un espectrofotómetro. El DPPH se comercializa ya en la forma de radical y sencillamente requiere su disolución en metanol para el desarrollo del método. Por esta razón se trata de un método ampliamente utilizado para evaluación de la actividad antioxidante total ⁷⁸. El DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) es un radical estable en metanol con el color violeta característico a causa del electrón libre en todas partes de la molécula que da una absorbancia fuerte máximo a 517nm. Cuando se mezcla la solución de DPPH con una sustancia donadora de átomo de

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

hidrógeno, el DPPH-H reducido (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine) formado tiene un color amarillo. El resultado se determina la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debida a la cesión de electrones de la especie antioxidante ⁷⁹.

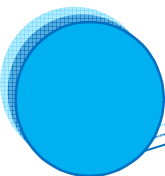
El grado de decoloración indica la capacidad secuestradora de DPPH. A mayor decoloración de la solución de DPPH, mayor será la actividad antioxidante y eso se refleja en el valor menor de IC₅₀ que es la concentración necesaria causante del 50% de la inhibición de la absorbancia ⁷⁹⁻⁸⁰.

Esta técnica analítica ha sido muy estudiada desde su surgimiento con vistas a optimizar las condiciones de la reacción. **Molyneux** ^{78a} resume un grupo de estas investigaciones y ofrece consideraciones sobre las consideraciones óptimas de medición e interpretación (Volumen de reacción, solvente y pH, concentración de los reactivos y tiempo de reacción entre otros, que fueron tomadas en consideración en el desarrollo del presente trabajo.

Los resultados se pueden presentar a través de diferentes parámetros, siendo los más utilizados el porcentaje de la actividad secuestradora de radical DPPH (I%) ⁸¹ y la concentración de sustrato necesario para secuestrar 50% de radical libre de DPPH (IC₅₀) ⁷⁹.

Fuerza reducida de ión férrico (Fe³⁺):

La fuerza reducida refleja la habilidad para terminar la reacción en cadena de los radicales y se puede considerar como un indicador significativo del potencial de la actividad antioxidante. La determinación de fuerza reducida de los compuestos presentes en la muestra se lleva a cabo en la reducción de Fe³⁺ a la forma Fe²⁺, el color amarillo de la solución examinada cambia en varios colores de verde tinto o azul prusiano dependiendo en la fuerza reducida de cada muestra. La cantidad de Fe²⁺ formado está destacado por la medición espectrofotométrica de la intensidad de color



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

obtenido, presentando la absorción máxima a 700nm. A mayor valor de la absorbancia, mayor será la fuerza reducida ⁸².

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

✚ Determinación de la actividad antioxidante total por método de tiocianato férrico (FTC)

La peroxidación lipídica es un proceso en cadena mediado por radicales libres que causa la degradación de los lípidos, transcurre en tres fases: iniciación, propagación y terminación ⁸³. Durante la oxidación de ácido linoleico, los peróxidos se forman en que los cuales oxidan el Fe^{2+} al Fe^{3+} (Figura 3). La última forma iónica establece un complejo con tiocianato de potasio dando el color rojo y presenta una absorbancia máxima a longitud de onda 500nm. Mayor absorbancia indica la oxidación mayor de la emulsión de ácido linoléico ^{78b, 84}.

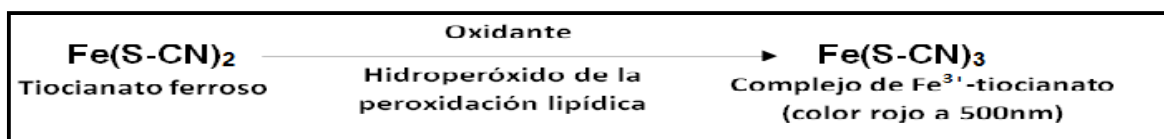


Figura 1.2. Formación del complejo Fe^{3+} -tiocianato desde el complejo Fe^{2+} -tiocianato por hidroperóxido.

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

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

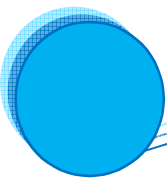
Donde: A_{sample} : es la absorbancia en presencia de la muestra o compuesto estándar.

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

✚ Ensayo de ácido tiobarbitúrico (TBA)

Los productos finales de la peroxidación lipídica son muy variados: alcanos, alquenes, hidroalquenes, malondialdehído (MDA), epóxidos de ácidos grasos, etc., algunos de los cuales también contribuyen al daño celular como se muestra en la figura 3 ⁸³.

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

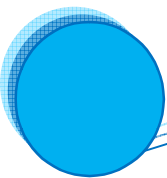
Uno de los productos secundarios formados en este proceso es el MDA, que se puede evaluar por el método TBA (ácido tiobarbitúrico). El TBA se usa como un indicador en el mecanismo químico más usado para determinar la extensión de la peroxidación. Una molécula de MDA reacciona con 2 moléculas de TBA produciendo aductos coloreados (rosa) y dando un máximo de absorción a 532nm. La intensidad de color proporciona con la concentración de MDA y mayor sea el nivel de MDA indica un incremento de peroxidación lipídica ⁸³.

1.5. Consideraciones finales de la revisión bibliográfica:

Los estudios fitoquímicos de la *Swinglea glutinosa* son escasos y no hay reportes de la relación del aceite esencial de sus hojas y frutos con la acción antioxidante. Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se estudia el contenido del mismo y sus propiedades antioxidantes. Después de realizarse una exhaustiva revisión de la literatura especializada se puede resumir lo siguiente: (I) - Las plantas medicinales aromáticas poseen una gran cantidad y variedad de componentes, entre ellos los más conocidos son los ácidos grasos, los aceites esenciales y los compuestos fenólicos; (II) – Las técnicas más empleadas para la obtención de estos componentes son la hidrodestilación y la extracción sólido – líquido; (III) – Los aceites esenciales tienen en su composición terpenos y sustituyentes aromáticos que se determinan por CG-MS; (IV) La técnica analítica de elección para la identificación de los ácidos grasos presentes en el extracto es CG; (V) - La actividad antioxidante transcurre por diferentes mecanismos de acción, siendo las técnicas más empleadas para su evaluación la actividad secuestradora de radical libre DPPH, la fuerza reducida, el método de tiocianato férrico y método de ácido tiobarbitúrico. (VI) - Los estudios reportados sobre la planta evaluada son muy escasos.

MATERIALES & MÉTODOS





MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. La planta, equipos y reactivos estudiados en el presente trabajo.

La presente investigación se realizó en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química y Farmacia, durante la etapa comprendida desde enero 2012 hasta mayo de 2012. Los aceites esenciales objeto de análisis se obtuvieron a partir de las hojas y los frutos de *Swinglea glutinosa* procedentes del Jardín botánico de la Universidad Central de Las Villas, Villa Clara, Cuba.

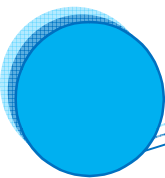
La identificación taxonómica del material vegetal se realizó en el lugar de colecta por el especialista Dr C. Alfredo Noa Monzón, se lavó con abundante agua potable y agua destilada previo a su evaluación analítica. En el caso del fruto, se utilizó el pericarpio verde para la extracción del aceite esencial, extracto y se empleó para su decortinado un cuchillo y guantes de laboratorio.

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

Reactivos y disolventes utilizados:

2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH), SIGMA- ALDRICH.	1,8 - Cineol, SAFC.
Acetona, UNI-CHEM.	Cloruro de metileno, Merck.
Ácido linoleico, Merck.	Cloruro férrico, Panreac.
Ácido tiobarbitúrico, SIGMA-ALDRICH.	Cloruro ferroso, Merck.
Ácido tricloroacético, EPB "Carlos J Finlay".	Etanol, UNI-CHEM.
Agua desionizada y destilada.	Éter, UNI-CHEM.
Buffer fosfato (0.2 M, pH 6.6)	Fenolftaleína, Merck.
Carbonato de sodio, Merck.	Ferricianuro de potasio, UNI-CHEM.
Ciclohexano, Merck.	Hidroxianisol butilado ^{78b} , SIGMA- ALDRICH.
Ciclohexanol, SAFC.	Hidróxido de potasio, Panreac.

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

Hidroxitolueno butilado (BHT), SIGMA-ALDRICH.

Metanol, Lichrosolv, Merck.

Propilgalato (PG), SAFC.

Reactivo Folin–Ciocalteu (FCR), SIGMA-ALDRICH

Sulfato de sodio anhidro, UNI-CHEM.

Terpineno, SAFC.

Timol, SAFC.

Tiocianato de amonio, Merck.

Tiosulfato de sodio, Merck.

Tolueno, Panreac.

Triclorometano, Merck.

Cloruro de aluminio, Merk.

Metanol, Lichrosolv, Merck.

Ácido Sulfúrico, Panreac.

Heptano, Panreac

Hidróxido de potasio, Panreac

Tiosulfato de sodio, Merck

Tolueno, Panreac.

Bicarbonato de potasio, Merck

Metil Tetradecanoato (miristato), PolyScience

Metil Hecadecanoato (palmitato), ACROS organics, Belgium

Metil Linoleato, SIGMA, EEUU

Metil Oleato, ACROS organics, Belgium

Metil Octadecanoato (estearato).

2.2. Metodología de obtención del aceite esencial y del extracto a partir de las hojas y los frutos de *Swinglea glutinosa* y los rendimientos.

2.2.1. Obtención del aceite esencial, utilizando la Trampa de Clevenger.

Para la obtención del aceite se utilizaron las hojas y pericarpio del fruto, ambos en estadio fresco de la planta *Swinglea glutinosa*. El aceite se extrajo utilizando el método de hidrodestilación empleando una Trampa tipo Clevenger (**Figura 2.1**).

➤ Aparato:

El método más tradicional utilizado es el que prescribe la (Farmacopea Europea, 2005). Se basa en efectuar una hidrodestilación de un peso conocido de material vegetal y recoger el aceite esencial en un tubo graduado (1mL dividido en 0,01mL) que se encuentra en un colector de destilación especialmente diseñado para este tipo de análisis (Trampa de tipo Clevenger) (Fig. 2.1). El colector se acopla a un matraz que contiene el material vegetal y un cierto volumen de agua, el cual se calienta mediante una manta calefactora de potencia regulable para provocar la destilación. Tras la

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

destilación, podemos medir el volumen de esencia destilado y fácilmente calcular el contenido, que se expresa en porcentaje volumen/peso (mL de aceite esencial por 100g de material vegetal).

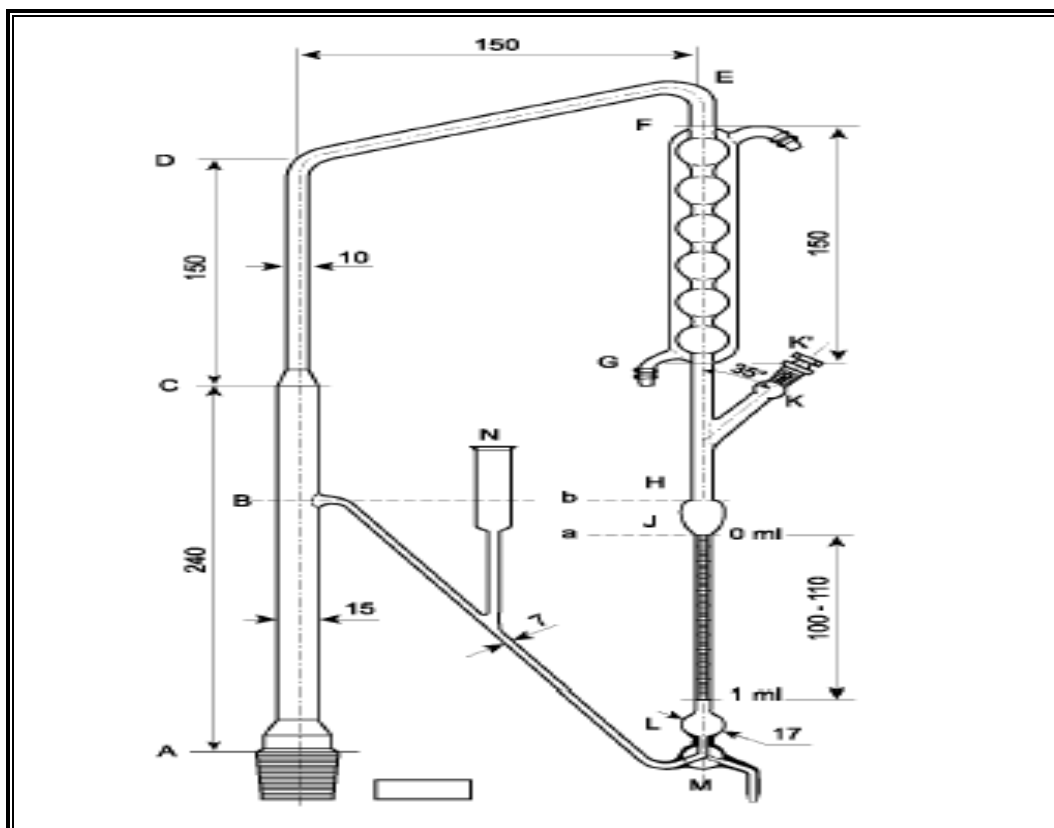
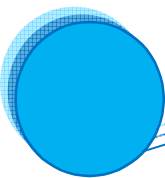


Figura 2.1. Equipo de destilación de aceite esencial (Trampa Clevenger)

➤ Procedimiento

Este método es prescrito por la **Farmacopea Europea, 2005** y consiste en usar el equipo de destilación que aparece en la Figura 2.1 (llamado **Trampa de tipo Clevenger**). La extracción se realizó pesando aproximadamente 80 gr. de hojas frescas y 150 gr del pericarpio fresco de la planta de forma separada y se adicionó una cantidad de agua que garantizara un cubrimiento total de la planta y hasta obtener un volumen constante de aceite (6 horas). El aceite esencial se colectó en el tubo graduado, se midió su volumen y se almacenó en un frasco ámbar a 4°C. Se calcula en rendimiento obtenido de aceite esencial en base de droga seca.

Tú Le Thi Cam - Viet Nam (2012)



2.2.2. Obtención de los extractos.

Los extractos se obtienen utilizando las hojas y pericarpio del fruto de *Swinglea glutinosa* previamente picado en trozo pequeño. Se pesaron 2g de las hojas y pericarpio del fruto por separado en un balón y añadiendo en los mismos 100ml de Metanol 70%. Fueron colocados en un agitador 24h a temperatura ambiente. Finalmente, se filtró el extracto utilizando filtros de papel 0,45µm y el solvente se evaporó por un rotoevaporador en vacío a 40°C hasta la sequedad. Las muestras obtenidas se almacenaron a 4°C hasta el próximo uso. Para obtener el rendimiento, se realiza el cálculo en base de extracto seco obtenido después de la rotoevaporación (%).

2.3. Evaluación de la composición de las hojas y frutos de la *Swinglea glutinosa*.

2.3.1. Evaluación de los aceites esenciales obtenidos de las hojas y frutos de la *Swinglea glutinosa*.

2.3.1.1. Evaluación físico-química de los aceites esenciales evaluados.

Se realizó una caracterización físico química de ambos aceites, empleando los parámetros físico químicos descritos en la farmacopea para tales compuestos (caracterización organoléptica, rotación óptica, densidad, índice de acidez, índice de refracción, espectro UV de ambos aceites obtenidos (**Europea Farmacopoeia, 2005**))

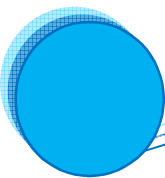
2.3.1.2 Caracterización química de los ambos aceites esenciales.

► **Perfil cromatográfico**: Se realizó empleando la cromatografía gaseosa con un detector de ionización por llama (GC-FID).

- **Desarrollo de la técnica**: Fue ejecutada en un Cromatógrafo gaseoso AGILENT, empleando el siguiente procedimiento.
- **Preparación de la muestra**:

Se realizó el perfil cromatográfico de los aceites esenciales de las hojas y los frutos de *Swinglea glutinosa* obtenidos por el método de hidrodestilación. Cada aceite esencial se diluyó 20µL AE en 2mL con acetona y se inyectó 1µl de cada muestra en el modo splitless.

Tú Le Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

▪ Condiciones cromatográficas:

La cromatografía se llevó a cabo utilizando las condiciones cromatográficas descritas en el trabajo por Luis ⁸⁵ que incluye la validación de la técnica analítica para ser utilizada para este fin:

- ✓ Columna capilar de sílice fundida de 30 m de longitud y 0,32 mm de diámetro interno.
- ✓ Nitrógeno para cromatografía como gas portador.
- ✓ Programa de temperatura: temperatura de la columna a 60°C durante 1 min, luego aumentándola a una velocidad de 2°C por minuto hasta 120°C por 40 min y aumentar nuevamente a razón de 10°C por minuto hasta 220°C.
- ✓ Inyectar aproximadamente 1 µL de la disolución de referencia y la muestra problema.
- ✓ Detector de ionización por llama, 250°C.

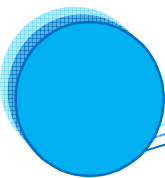
► Composición química de los aceites

La composición química de los aceites esenciales se realizó empleando la técnica de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Fue utilizado un GCMS-QP5050A Shimadzu, siguiendo las preparaciones y condiciones analíticas siguientes:

► Preparación de la muestra:

Se realizó la identificación a partir del aceite obtenido por el método de Hidrodestilación. Se realizaron las siguientes diluciones:

- 50 µL de aceite esencial fue diluido en 1 mL de acetona (Solución A).
- 20 µL de la Solución A fue diluido en 1 mL de acetona (muestra diluida).
- Los espectros obtenidos se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones cromatográficas:
 - Se utilizó una columna capilar DB-5MS.
 - Como gas portador se utilizó He.



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

- Programa de temperatura del horno: temperatura de la columna se mantiene a 60°C durante 1 min, luego aumentándola a razón de 4°C·min⁻¹ hasta 120°C y aumentar nuevamente a razón de 2°C por minuto hasta 150°C manteniéndolo durante 10min. Seguidamente se programa hasta 230°C a razón de 10°C·min⁻¹ manteniendo la temperatura de 230°C durante 10min y finalmente alcanza hasta 280°C a razón de 20°C por minuto manteniéndolo durante 5min.
 - Temperatura del detector: 280°C.
 - Temperatura del inyector de 250°C.
 - Flujo del gas a través de la columna de 1 mL/min.
 - Temperatura de la interface de 290°C.
 - La cantidad relativa de cada componente expresado en por ciento (%) fue calculado comparando su área media con el área total.
 - Espectrometría de masa: Intervalo de barrido de masas de 50-500amu registrado a 70 eV; una velocidad de barrido de 2000 y un voltaje de 0,80 kV.
- Índices de retención: fueron calculados para todos los componentes volátiles utilizando una serie homogénea de n-alcano C₈–C₂₀, empleando la ecuación de Van den Dool ang Kratz (1963) siguiente:

$$RI_x = 100n + 100 \times (t_x - t_n)/(t_{n+1} - t_n) \text{ donde:}$$

- **RI_x** es índice de retención de temperatura programada de interés.
- **t_n; t_{n+1}; t_x**: son tiempo de retención en minutos de dos n-alcanos estándares que contiene n y n+1 carbonos y de interés, respectivamente.

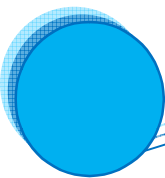
2.3.1.3 Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos.

El contenido total de compuestos fenólicos en los aceites esenciales de *Swinglea glutinosa* (hojas y frutos) fue determinado con reactivo Folin-Ciocalteu ⁸⁶, utilizando ácido gálico como el compuesto fenólico de referencia.

Desarrollo de la técnica.

1. Preparación de la curva de calibración de ácido gálico:

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

- Solución madre de ácido gálico (patrón): Se pesó 2 mg del mismo y disolver en H₂O destilada y se enrasó a un volumen de 10 mL para obtener una solución madre con concentración 0,2mg/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 200µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 2mL de Na₂CO₃ 7% y se enrasaron con H₂O destilada hasta un volumen de 5mL. Transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia a 765nm, utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como el blanco.

2. Preparación de los aceites esenciales y los extractos (Swinglea hojas y frutos):

- Se pipetearon 200 µL del aceite esencial de las hojas; 450 µL de los frutos de *Swinglea glutinosa* y se disolvieron a 1mL con acetona (disolución madre de cada aceite). A partir de las disoluciones madres de cada aceite esencial, se tomaron 100 µL de cada uno.

Procedimiento: Se tomaron 100 µL de cada muestra en un volumétrico de 5mL y se adicionó a continuación 200µL de reactivos de Folin-Ciocalteu, 2mL de Na₂CO₃ 7% y finalmente se completaron a un volumen de 5mL con H₂O destilada. Luego de transcurrir 30 minutos se midió la absorbancia de cada uno a 765nm contra el blanco preparado de igual forma sin la muestra. La cantidad de compuestos fenólicos en cada muestra se determinó en µg equivalentes a ácido gálico/mL de aceite esencial, utilizando la ecuación obtenido de la curva de calibración de ácido gálico.

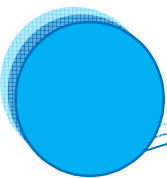
2.3.2. *Evaluación de los extractos obtenidos de las hojas y frutos de la Swinglea glutinosa.*

2.3.2.1. Identificación y determinación cuantitativa de los ácidos grasos en los extractos.

Se empleó el método de cromatografía gaseosa (GC-FID). La técnica fue validada previamente en el trabajo ⁸⁷.

- Preparación de la muestra

Tú Le Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

Derivatización de la muestra: Se pesó 50 mg de cada extracto previamente secado de las hojas y los frutos de *Swinglea glutinosa*, se transfirió a un balón aforado, disolviéndolo con 1 mL de tolueno y 2 mL del ácido sulfúrico al 1% en metanol. Se acopló a un condensador de reflujo y se hizo reflejar durante 2 horas; seguidamente se les incorporó 5 mL de cloruro de sodio al 5%, se transfirió a un embudo separador, y se realizaron dos lavados sucesivos con 5 mL de heptano se dejó en reposo hasta lograr una buena separación entre la dos fases (la acuosa y la orgánica), se desechó la fase acuosa y a la fase orgánica se le adicionó 4 mL de bicarbonato de potasio al 2 %, se recuperó y transfirió a un tubo de ensayo con sulfato de sodio anhidro, luego de dejarla en reposo se filtró y se rotoevaporó a 40 °C hasta llegar a sequedad. Se disolvió con heptano hasta a un volumen final de 2 mL en un matraz aforado y se procedió a inyectar en el cromatógrafo de gases.

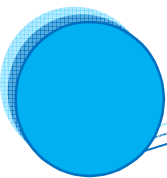
- Preparación de los patrones:

Para ello se pesó 10 mg de cada patrón y se enrasó a 2 ml heptano, constituyendo la solución madre para cada ácido graso (Solución A). Posteriormente se preparó una solución B mezclando 100µl de la solución A de cada ácido graso y se enrasó a 1 ml. Fue utilizado el metil miristato como estándar interna a las mismas concentraciones.

La cromatografía de gases se llevó a cabo empleando las siguientes condiciones cromatográficas:

- ✓ Columna capilar de sílice fundida de 30 m de longitud y 0,32 mm de diámetro interno.
- ✓ Nitrógeno para cromatografía como gas portador.
- ✓ Programa de temperatura: temperatura de la columna a 120°C durante 1 min, luego aumentándola a una velocidad de 10°C por minuto hasta 180°C por 60 min y aumentar nuevamente a razón de 20°C por minuto hasta 220°C.
- ✓ Inyectar aproximadamente 1 µL de la disolución de referencia y la muestra problema.
- ✓ Detector de ionización por llama, temperatura del detector 250°C.
- ✓ Tiempo de recorrida: 55 minutos.

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.2.2. Cuantificación del contenido total de compuestos fenólicos

El contenido total de compuestos fenólicos en los extractos de *Swinglea glutinosa* (hojas y frutos) también fue determinado con reactivo Folin-Ciocalteu ⁸⁶, utilizando ácido gálico como el compuesto fenólico de referencia.

Desarrollo de la técnica.

Preparación de la curva de calibración de ácido gálico:

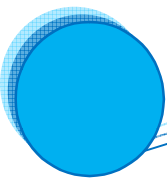
- Solución madre de ácido gálico (patrón): Se pesó 2 mg del mismo y disolver en H₂O destilada y se enrasó a un volumen de 10 mL para obtener una solución madre con concentración 0,2mg/mL.

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 200µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 2mL de Na₂CO₃ 7% y se enrasaron con H₂O destilada hasta un volumen de 5mL. Transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia a 765nm, utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como el blanco.

Preparación de los extractos (Swinglea hojas y frutos):

- Se pesaron por separado 30mg del extracto de hoja, fruto de *Swinglea glutinosa* y fueron disueltos directamente en 1mL de metanol 75% (disolución madre de cada extracto).

Procedimiento: Se tomaron 100 µL de cada muestra en un volumétrico de 5mL y se adicionó a continuación 200µL de reactivos de Folin-Ciocalteu, 2mL de Na₂CO₃ 7% y finalmente se completaron a un volumen de 5mL con H₂O destilada. Luego de transcurrir 30 minutos se midió la absorbancia de cada uno a 765 nm contra el blanco preparado de igual forma sin la muestra. La cantidad de compuestos fenólicos en cada muestra se determinó en µg equivalentes a ácido gálico/g de extracto seco, utilizando la ecuación obtenido de la curva de calibración del ácido gálico.



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.2.3 Determinación del contenido de flavonoides en los extractos.

Se cuantifican el contenido de flavonoides totales en base a rutina en los extractos, empleando la técnica espectrofotométrica indirecta con tricloruro de aluminio.

Desarrollo de la técnica.

1. Preparación de la curva de calibración de rutina:

- Solución madre de rutina: Se pesaron 2 mg del mismo y se disolvió en metanol y se enrasó a un volumen de 10 mL para obtener una solución madre con concentración 0,2mg/mL.

Procedimiento: Se pipetearon a partir de la disolución madre de rutina las siguientes alícuotas: 200, 400, 600, 800, 1000 μ L y se enrasaron a un volumen de 1mL con metanol 70%, y se adicionó a continuación 1mL de $AlCl_3$. Se esperó 15 minutos y se midió la absorbancia a 430nm, utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la solución de rutina como el blanco.

2. Preparación de los extractos (*Swinglea* hojas y frutos):

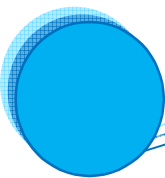
- Se pesaron 15mg del extracto seco de hoja y 30mg del extracto seco del fruto de *Swinglea glutinosa*, y se disolvieron a 1mL con MeOH 70%.

Procedimiento: Se transfirió 1mL de cada extracto a un tubo de ensayo, se le adicionó a cada uno 1mL solución de $AlCl_3$ preparada. Se incubó 15 minutos en la oscuridad y se midió la absorbancia a 430nm, utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como blanco. El contenido de los flavonoides en cada extracto se representa en μ g equivalentes a rutina/g de extracto, utilizando la ecuación obtenido de la curva de calibración de rutina anteriormente.

2.4. Evaluación de la actividad antioxidante en los aceites esenciales y los extractos.

2.4.1. Cuantificación de la actividad secuestradora de radical- El método basado en la transferencia electrónica

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1.1 Actividad secuestradora del radical libre DPPH de los aceites esenciales y los extractos:

➤ Preparación de la solución de DPPH:

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

➤ Preparación de las disoluciones problemas:

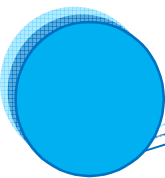
Los antioxidantes sintéticos: BHT, BHA, Timol y Eugenol fueron usados como controles positivos. Las disoluciones madres de los antioxidantes sintéticos y vegetales, los aceites esenciales y los extractos se prepararon en metanol y se realizaron las curvas de calibración correspondientes (Tabla 2.1)

Tabla 2.1. Rango de concentraciones de la curva de calibración de las muestras

Antioxidante (solución madre)	Alícuotas tomadas (µL)	Concentración (mg/mL)
BHT (1 mg/mL)	200; 320; 508; 648; 800; 928	0.05; 0.087; 0.125; 0.162; 0.2; 0.232
BHA (0.12 mg/mL)	100; 200; 300; 400; 500	0.003; 0.006; 0.009; 0.012; 0.015
Eugenol (0.4 mg/mL)	100; 200; 300; 400; 500; 600	0.01; 0.02; 0.03; 0.04; 0.05; 0.06
Timol (4 mg/mL)	100; 300; 500; 700; 900	0.1; 0.3; 0.5; 0.7; 0.9
Aceite esencial - <i>Swinglea</i> Hoja (96 mg/mL)	200; 300; 400; 500	4.8; 7.2; 9.6; 12
Aceite esencial - <i>Swinglea</i> Fruto (300 mg/mL)	400; 600; 800; 1000	15; 30; 45; 60
Extracto - <i>Swinglea</i> Hoja (0,125mg/mL)	250; 500; 750; 1000	0,0078; 0,0156; 0,0234; 0,0312
Extracto - <i>Swinglea</i> Fruto (0,15 mg/mL)	250; 500; 750; 1000	0,00937; 0,01875; 0,0281; 0,0375

➤ Procedimiento:

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

A 1 mL de cada disolución problema se le adicionó 3 mL de una solución de DPPH de concentración 0,004 % (p/v). Después las muestras fueron colocadas durante 30 minutos en la oscuridad y se midió la absorbancia de cada una a 517 nm, frente a un blanco⁸⁸. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

➤ Cálculo:

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

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

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

A_s es la absorbancia de la muestra.

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

2.4.1.2 Fuerza reducida de los aceites esenciales y los extractos:

La fuerza reducida de cada muestra analizada se determinó por el método descrito por Seneviratne⁸⁹, utilizando los antioxidantes sintéticos y vegetales como referencia: BHA, BHT, Timol, Carvacrol, Eugenol y Vitamina C.

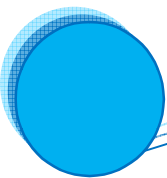
➤ Procedimiento:

Preparación de las disoluciones de referencia:

Se pesó de cada antioxidante de referencia 50 mg y se enrasó a 5 mL en un volumétrico aforado con etanol 75%. Se obtuvieron las disoluciones madres de cada muestra de referencia.

De cada disolución madre de referencia, se tomaron 4 alícuotas diferentes: 125 µL, 250 µL, 375 µL, 500 µL y se completó el volumen a 5 mL con etanol 75% en matraz volumétrico. De cada disolución se pipeteó 1 mL y se trasvasó a un tubo de ensayo y a continuación se añadió 1 mL de buffer fosfato 0.2M, pH=6,6 y 1 mL de ferricianuro de

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

potasio 1g/L. De forma inmediata, se incubaron estos tubos de ensayo a 50°C durante 20 minutos. Se enfriaron rápidamente y se mezclaron con 1mL de ácido tricloruro acético al 10%. Las disoluciones obtenidas, se centrifugaron a 3000rpm por 20 minutos si es necesario. Posteriormente, se tomaron 2,5mL del sobrenadante de cada tubo y se adicionó a cada uno 2,5mL de FeCl₃ 0,1%. Finalmente se midió la absorbancia a 700nm contra el blanco preparado de forma similar pero sin la muestra.

Preparación de las muestras (aceites esenciales y extractos):

Para obtener las disoluciones madres de las hojas y los frutos de *Swinglea glutinosa*, se prepararon los aceites esenciales en acetona y los extractos secados en metanol 70% a una concentración de 10mg/mL. A partir de las disoluciones anteriores se siguió un procedimiento similar al desarrollado para los antioxidantes sintéticos y vegetales. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Los valores de absorbancia obtenidos para los estándares de referencia y los aceites esenciales fueron graficados y se realizó una comparación de la actividad antioxidante de los antioxidantes sintéticos y vegetales con los aceites esenciales, los extractos y entre estos dos últimos.

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

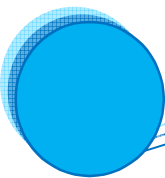
2.4.2.1 Método del tiocianato férrico.

La actividad antioxidante del aceite esencial fue determinada empleando el método del tiocianato férrico (FTC) en la emulsión del ácido linoleico con algunas modificaciones al método propuesto por Haraguchi ⁵⁸.

➤ Preparación de cada muestra:

Se pesaron 0,01gr de BHA, BHT, Eugenol, Timol, Carvacrol, los aceites esenciales y los extractos de la hoja y fruto de *Swinglea* y se disolvieron de forma independiente en etanol absoluto y se enrasaron a 1mL (Disolución A) (10mg/mL).

Se pesó 0,1255gr de ácido linoleico, se disolvió en etanol absoluto y se enrasó a un volumen de 5mL en matraz aforado (solución obtenida 2,51%).



CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

➤ Procedimiento:

En este método, el medio de reacción contiene 0,02mL de disolución A de cada muestra, 0,2mL de ácido linoleico 2,51%, 0,4mL de buffer fosfato 0,04M, pH=7 y 0,38mL de agua destilada. La mezcla de cada muestra fue mezclada e incubada a 70°C en oscuridad. El mismo medio de reacción, la disolución de ácido linoleico, se empleó como el control negativo.

Cada 3 horas, durante la incubación, 0,05mL de cada mezcla se diluyó con 2,85mL de etanol 75% y siguiendo por la adición de 0,05mL de FeCl₂ 0,02M en HCl 3,5%. Luego de transcurridos 3 minutos, se añadió 0,05mL de tiocianato de amonio al 30%. La absorbancia se midió a 500nm contra el etanol 75% como blanco.

Cálculo:

El porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica del ácido linoleico fue calculado por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición de la peroxidación lipídica} = 100 - \frac{A_s}{A_0} \times 100$$

Donde: **A₀** : Absorbancia del control negativo.

A_s : Absorbancia obtenida en presencia de la muestra de aceite esencial, extracto o control positivo.

2.4.2.2. Método del ácido tiobarbitúrico (TBA).

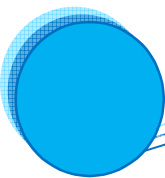
Se determinó el valor TBA de cada muestra en la última hora del ensayo FTC, utilizando la misma disolución preparada e incubada descrita con anterioridad.

➤ Procedimiento:

1mL de ácido tricloroacético 20% y 1mL de disolución de TBA acuosa 0,67% se añadieron a 0,5mL de las disoluciones de cada muestra preparada para el ensayo FTC. Las mezclas se sumergieron en un baño de agua 95°C durante 10 minutos, se enfriaron, se centrifugaron a 3000rpm durante 20 minutos. La actividad antioxidante se evalúa con los valores de absorbancia del sobrenadante a 532nm contra el blanco, preparado de forma similar sin muestra.

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)

RESULTADOS & DISCUSSIONES



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Rendimiento de los aceites esenciales y extractos obtenidos de las hojas y frutos de la *Swinglea glutinosa*.

La técnica de hidrodestilación para la obtención del aceite esencial de *Swinglea glutinosa*, es la técnica más usada a nivel laboratorio debido a que el sistema es relativamente fácil de usar y el rendimiento es aceptable. Además de que los costos de la destilación con este equipo son bajos. El contenido logrado para las hojas de *Swinglea glutinosa* fue 0,67% y los frutos fue 1,41%. Este valor no se encuentra reportado en la bibliografía consultada de la planta por lo que no fue posible compararlo y por tanto el mismo constituye un aporte del presente trabajo.

Los extractos de la hoja y fruto de la *Swinglea glutinosa* se obtuvieron utilizando metanol como solvente y el método de extracción sólido-líquido que es el más utilizado en todos los procesos tecnológicos relacionados con la industria química y médico-farmacéutica. El extracto obtenido de la hoja da lugar a un extracto de color verde ligero, característico de los extractos alcohólicos obtenidos a partir de la hoja, con una extracción de pigmentos clorofílicos. Mientras que la característica del extracto proveniente del fruto obtuvo un color blanco. El rendimiento obtenido del extracto de las hojas y del fruto de la *Swinglea glutinosa* fue 1,76% y 2,02%, respectivamente.

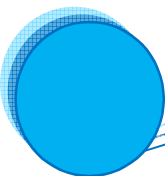
3.2. Evaluación de la composición de las hojas y frutos de la *Swinglea glutinosa*.

*3.2.1. Aceites esenciales obtenidos de las hojas y frutos de la *Swinglea glutinosa*.*

3.2.1.1 Evaluación físico-química de los aceites esenciales evaluados.

La tabla 3.1 muestra los índices de calidad que los valores obtenidos presentan similitud y se encuentran dentro del intervalo que se describe para otros aceites esenciales en las Farmacopeas vigentes. El índice de acidez indica la presencia de muchos grupos ácidos en ambos aceites en mayor medida que en el aceite de las hojas.

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3.1. Valores obtenidos para los índices de calidad de ambos aceites esenciales de hojas y frutos de *Swinglea glutinosa* obtenidos por hidrodestilación.

Índices de Calidad	Aceites esenciales de <i>Swinglea glutinosa</i>	
	Hojas	Frutos
Características organolépticas	Líquido translúcido y amarillo	Líquido translúcido e incoloro
Densidad relativa a 20°C	0,9600	0,9700
Índice de refracción a 20°C	1,508	1,476
Índice de Acidez	8,41	5,61

➤ Espectro ultravioleta - VIS de los aceites esenciales de *Swinglea glutinosa*.

Los aceites esenciales obtenidos de las hojas y los frutos de *Swinglea glutinosa* muestran similitud en su espectro UV-VIS; la presencia de una de una banda en la zona de los 290nm aproximadamente, indica la existencia de insaturaciones o grupos funcionales con pares de electrones libres que son capaces de conjugarse con dichas insaturaciones, como en los grupos carbonilo y nitro, entre otros.

3.2.1.2. Composición química de los aceites esenciales.

➤ Perfil cromatográfico del aceite esencial, análisis de CG-FID

El perfil cromatográfico de los aceites se realizó empleando la técnica de cromatografía gaseosa. Los perfiles obtenidos se muestran en las figuras 3.1 y 3.2 para los aceites obtenidos de las hojas y los frutos de *Swinglea glutinosa*, respectivamente.

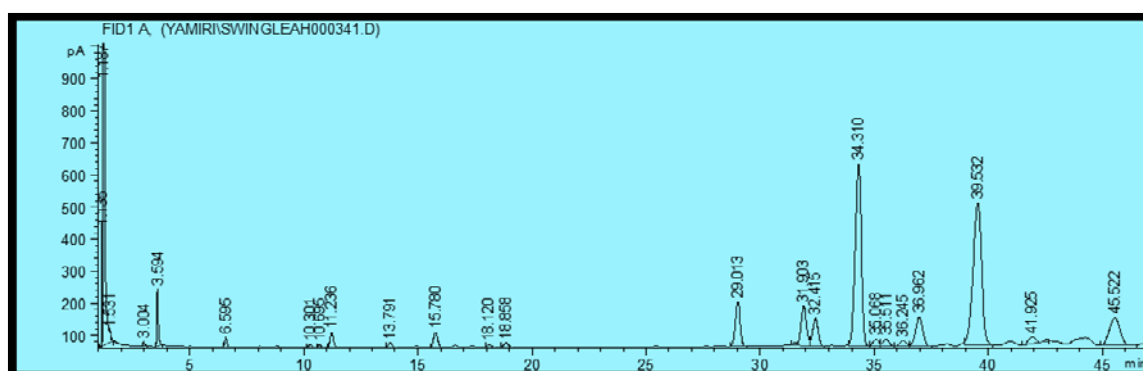


Figura 3.1. Cromatograma GC del aceite esencial de las hojas de la *Swinglea glutinosa*.

Tú Le Thi Cam - Viet Nam (2012)

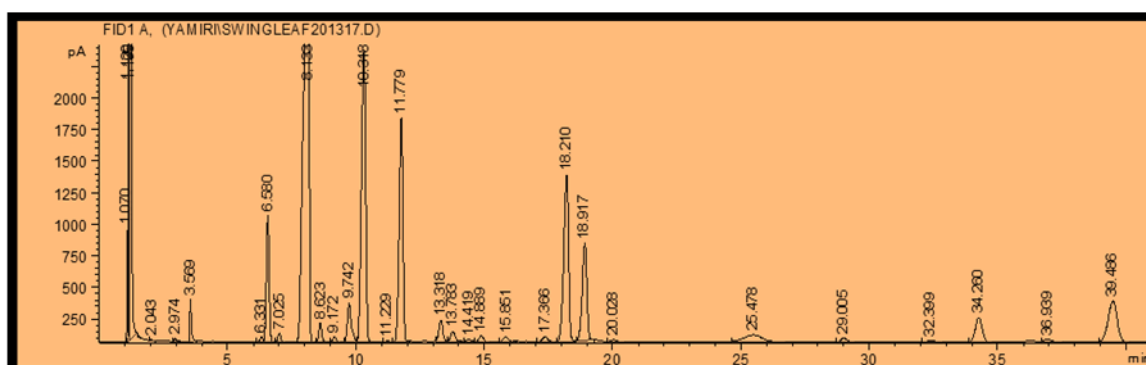


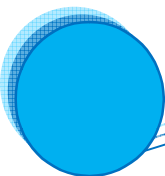
Figura 3.2. Cromatograma GC del aceite esencial del fruto de la *Swinglea glutinosa*.

Ambos cromatogramas representan todos los componentes químicos detectables presentes en cada aceite esencial, los cuales aparecen con una adecuada separación. Los perfiles cromatográficos de los aceites esenciales se conocen como huella digital cromatográfica para cada aceite esencial y son usados para identificar, caracterizar, evaluar cada aceite esencial, garantizando la autenticación, la calidad y la discriminación del mismo con el aceite esencial de otra planta medicinal, aunque con componentes similares. Se observa que el aceite esencial del fruto contiene más componentes que el de la hoja. Además, la mayoría de los componentes obtenidos del aceite esencial de la hoja son menos volátiles que los componentes obtenidos de aceite esencial del fruto.

➤ Composición química del aceite esencial, análisis de CG-MS

Los componentes del aceite esencial son identificados por el análisis de sus espectros de masa - el análisis de la propuesta dada en la librería disponible en el software del equipo que incluye la base de datos de Adams para el reconocimiento de los componentes de aceites esenciales, y por el cálculo de los índices de retención de Kóvats ⁹⁰. Como resultado se logró identificar 10 componentes en el aceite esencial obtenido de la hoja y 9 componentes en el aceite esencial obtenido del fruto, representando el 61,42 y 64,41%, respectivamente, del total de constituyentes presentes en cada aceite esencial (tabla 3.2). Se observa la coincidencia de 6 componentes en ambos aceites. En el aceite de la hoja se obtiene como componente

Tú Le Thi Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

mayoritario el Nerolidol que se encuentra en un 32%, mientras que en el fruto resultó ser el β -Pineno que está en un 24%. %. Estos resultados resultan novedosos para la hoja ya que la composición de la misma no aparece en la literatura consultada. Sin embargo, en el fruto al comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con lo obtenido en Colombia por Gabriel y col., 2009, se observa coincidencia en el componente mayoritario (β -Pineno) aunque no están en la misma proporción, así como en otros 3 compuestos (1,8-Cineol, Terpinen-4-ol, α -Terpineol) que representan los más abundantes en ambos aceites, los cuales a pesar de haber sido obtenidos en zonas geográficas diferentes muestran similitudes y las diferencias existentes podrían estar justificadas por las diferencias de suelo, clima, época de recolección del material vegetal, entre otros factores ⁹.

Tabla 3.2. Resultados de los componentes identificados por CG-MS de ambos aceites esenciales obtenidos de la hoja y del fruto de la *Swinglea glutinosa*.

#	Compuestos identificados		Índice de retención				Índice de retención en literatura
			AE fruto	% Área	AE hoja	% Área	
1	β -Pineno	M	979	24,19	-		978 ⁹¹ 980 ⁹²
2	Limoneno	M	-		1024	0,84	1025 ⁹²⁻⁹³
3	1,8-Cineol	MO	1030	9,49	-		1033 ⁹⁴ 1025 ⁹⁵
4	Terpinen-4-ol	MO	1174	5,48	-		1177 ^{82b, 93} 1164 ⁹⁶
5	α -Terpineol	MO	1188	4,20	-		1189 ⁹⁷ 1183 ⁹⁴
6	β -Cariofileno	SO	-		1419	1,18	1418 ⁹⁸ 1420 ⁹³
7	Germacreno D	S	1483	7,31	1480	5,30	1480 ^{97a} 1481 ⁹⁹ 1490 ¹⁰⁰
8	p-Menta-3-eno		1520	0,71	1520,7	1,82	
9	(-)-Nerolidol	SO	-		1551	32,89	1551 ¹⁰¹ 1557 ⁹¹
10	(-)-Espatuleno	SO	1575	1,23	1572	4,35	1578 ⁹⁹ 1576 ¹⁰²
11	Cariofileno oxido	SO	1582	7,69	1584	5,70	1585 ^{97a}
12	Deca 4,8-dienol	-			1771,6	2,28	

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

13	δ-Elemeno	S	1789,5	4,11	1789,2	6,27	
14	Fitol	Diterpeno	-		2250,1	0,79	
M. hidrocarburos (%)			24,19		0,84		
Oxidos monoterpenos (%)			19,17		0		
S. hidrocarburos (%)			11,42		12,36		
Oxidos sesquiterpenos (%)			8,92		44,12		

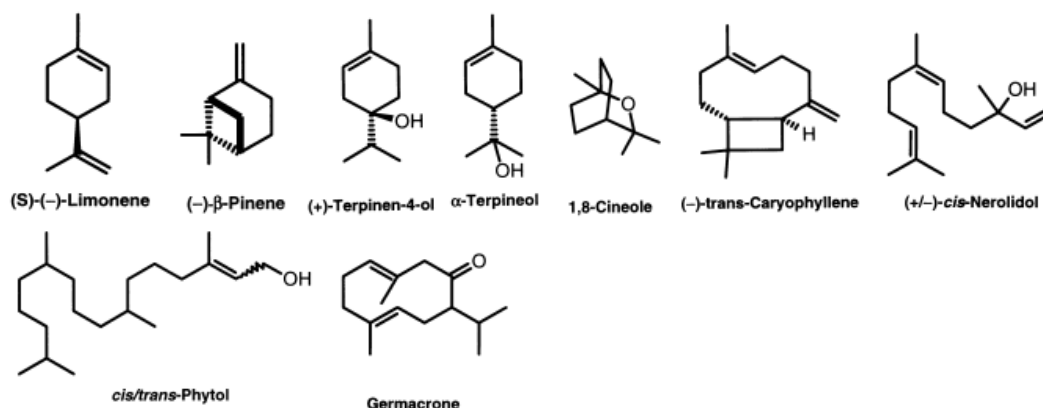


Figura 3.3. Estructura de algunos compuestos presentes en ambos aceites esenciales obtenidos de la hoja y del fruto de *Swinglea glutinosa*.

En la figura 3.3 se representa la estructura de algunos compuestos presentes en ambos aceites esenciales obtenidos de la hoja y del fruto de *Swinglea glutinosa*. Se han reportado que los componentes oxigenados de aceites esenciales poseen una actividad antioxidante más alta, considerando que además de los fenoles, los alcoholes alílico también manifiestan actividad apreciable ¹⁰³. Lo anterior hace suponer que el aceite esencial obtenido de las hojas, que contiene mayor porcentaje de compuestos oxigenados, debe poseer mayor actividad antioxidante previsible que el aceite esencial de los frutos, el cual posee mayor cantidad de los monoterpenos hidrocarburos.

3.2.1.3. Contenido fenólico de los aceites esenciales.

El contenido fenólico posee una gran importancia ya que se asocia directamente con la actividad antioxidante del aceite esencial y juega un papel importante en la estabilización de la peroxidación lipídica ¹⁰⁴. Para este ensayo, el contenido total de

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

compuestos fenólicos de los aceites esenciales obtenidos de *Swinglea glutinosa* fue calculado empleando la curva de calibración del ácido gálico (Figura 3.4).

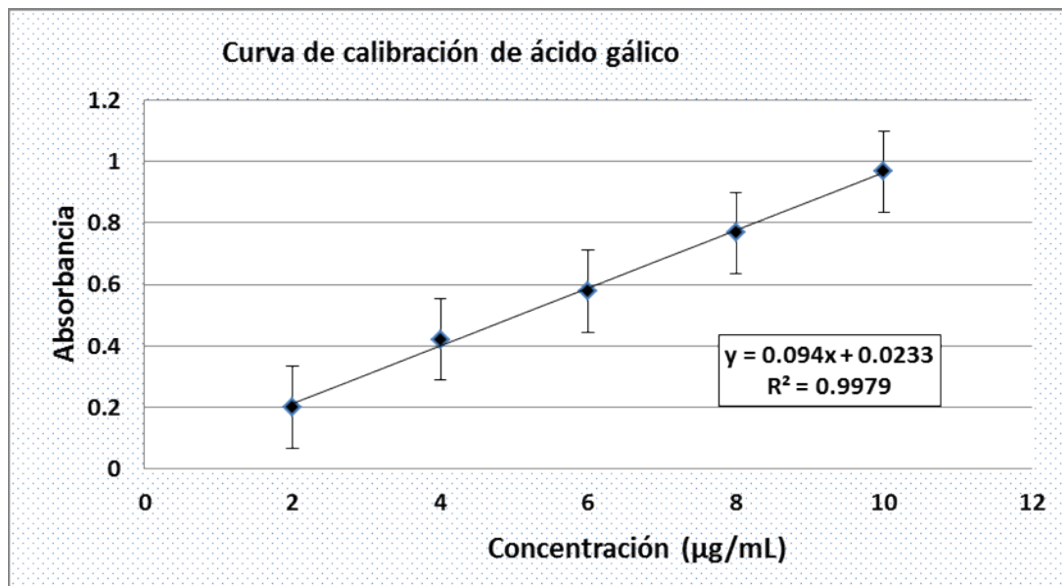
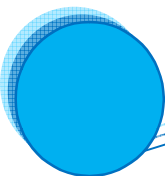


Figura 3.4. Curva de calibración del ácido gálico, para la determinación del contenido de compuestos fenólicos.

Como resultado se obtuvo el contenido fenólico total 1,06 y 0,32 (mg equivalente a ácido gálico por gramo de aceite esencial) del aceite de la hoja y del fruto, respectivamente. Lo anterior evidencia que el aceite obtenido de la hoja posee mayor contenido fenólico que el obtenido para el fruto, lo que pudiera inferir que el aceite esencial de las hojas debe mostrar mayor actividad antioxidante que el otro. Estos valores son específicos para cada aceite esencial y no se encuentran reportados en la literatura para esta planta.

Al comparar el contenido fenólico total obtenido en ambos aceites esenciales con valores reportados en la literatura para otros aceites esenciales (tabla 3.3) se observa que dicho parámetro posee una gran variabilidad, dependiendo de la especie, por lo que los resultados obtenidos en el presente trabajo se consideran aceptables para la planta.

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3.3. El contenido fenólico total de aceite esencial de algunas plantas medicinales publicado en la literatura.

Nombre de planta	Contenido fenólico total publicado (mg equivalente de ácido gálico/g muestra)	Bibliografía consultada
Anise	0,43	105
Bitter fennel fruta	0,22	106
Basil (<i>O. minimum</i>)	0,09	
Laurel	0,17	
Psammogeton canescens	34,20	
Bitter fennel flores	0,59	
Pickling herb	0,32	107
Piper auritum hoja	27,40	
Piper auritum tallo	19,80	

3.2.2. Composición química de los extractos.

3.2.2.1. Determinación de los ácidos grasos en los extractos.

Los ácidos grasos (AG) constituyen un grupo muy extenso, muy variado con múltiples aplicaciones en el ámbito biológico e industrial. El método de elección para identificar y cuantificar ácidos grasos es la cromatografía de gases con previa derivatización a ésteres volátiles. En el presente trabajo fueron utilizados 4 patrones de ácidos grasos metilados disponibles, que coinciden con ser de los AG más abundantes en aceites vegetales: palmítico, linoleico, oleico y esteárico, mientras que el Mirístico se utilizó con estándar interno. Este método fue previamente validado por Herrera ⁸⁷. La figura 3.5 muestra el cromatograma obtenido para la mezcla de estos 5 patrones. Los 5 picos, identificados, primeramente de forma individual, aparecen en el siguiente orden: el primer pico corresponde al metilmiristato, el segundo al metilpalmitato, que aparece a tiempos de retención 11 y 16 minutos, respectivamente. A continuación aparecen muy cercanos, por su similitud estructural, los dos AG insaturados el metiloleato a un $t_r=46.07\text{min}$ y el metilinoaleato a un $t_r=49.20\text{min}$ y finalmente aparece el metilestearato a un $t_r=60.1\text{min}$.

En las figuras 3.6 se presenta el perfil de ácidos grasos obtenidos para el extracto de la hoja y en la figura 3.7 el perfil correspondiente al extracto obtenido del fruto de

Tú Le Thi Cam - Viet Nam (2012)

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Swinglea glutinosa, obtenido para la muestra bajo las mismas condiciones de operación. Al analizar la superposición de los mismos con el cromatograma de la mezcla de patrones se observa que en el cromatograma de las hojas aparecen los picos correspondientes a los AG insaturados (oleico y linoleico), mientras que en el cromatograma del fruto aparece adicionalmente el pico correspondiente al palmítico. En ambos extractos aparecen un pico a $t_r=28\text{min}$ bien resuelto y en las flores aparecen dos picos pequeños a $t_r=26\text{min}$ y $t_r=36\text{min}$, los cuales no pudieron ser identificados por carencia de patrón.

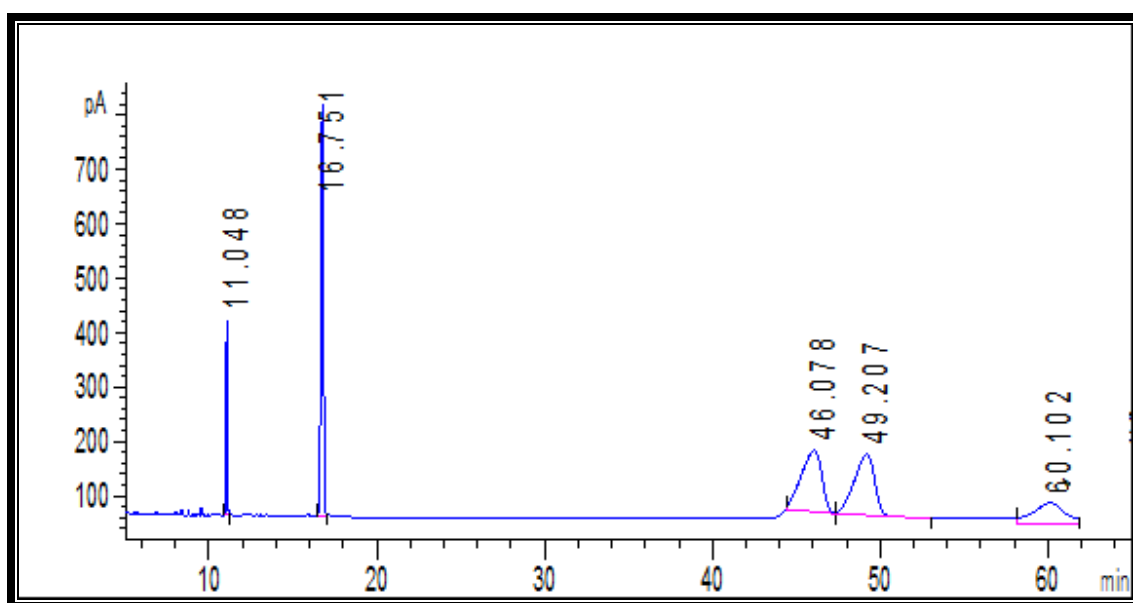


Figura 3.5. Cromatograma GC del patrón de los ácidos grasos.

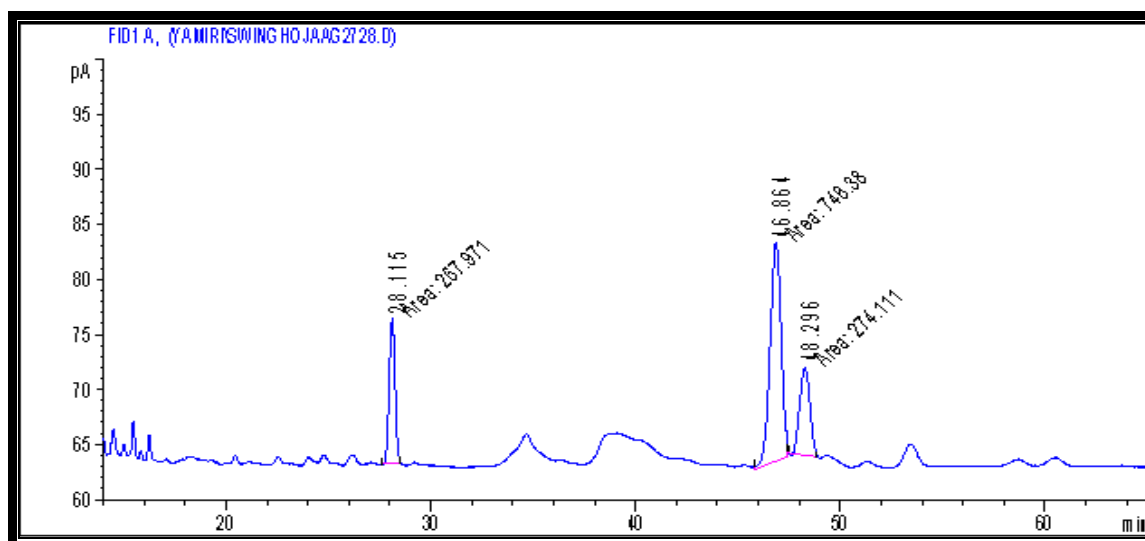


Figura 3.6. Cromatograma de los ácidos grasos en extracto de la hoja de *Swinglea glutinosa*.

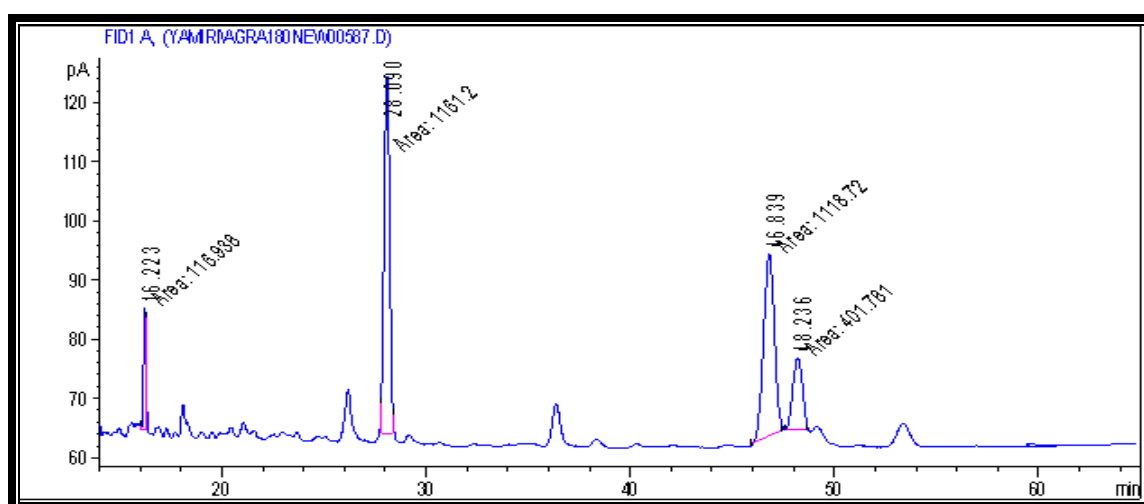
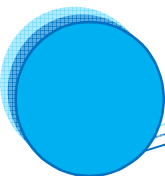


Figura 3.7. Cromatograma de los ácidos grasos en extracto del fruto de *Swinglea glutinosa*.

Una vez identificados los AG en ambos extractos se procedió a su cuantificación, aplicando la técnica validada previamente por Herrera ⁸⁷, en la cual fue obtenida una ecuación de la recta para cada AG. La tabla 3.4 muestra los porcentajes obtenidos para los AG presentes en cada extracto.

Tú Le Thi Cam - Viet Nam (2012)



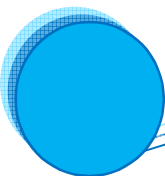
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3.4. Resultados obtenidos en la cuantificación de los AG identificados en los extractos evaluados.

Tiempo de retención		Ácido graso	Ecuación de la recta para cada patrón	% de AG presente en cada extracto	
Hoja	Fruto			Extracto hoja	Extracto fruto
-	16,22	Palmítico – saturado	$Y = 20.13X - 338.7$	-	0.09%
-	26,184	-	-	-	-
28.11	28,10	-	-	-	-
-	36,37	-	-	-	-
46.86	46,840	Linoleico – 2 doble enlaces	$Y = 16.46 X - 716.59$	0.19%	0.44%
48.28	48,26	Oleico – 1 doble enlace	$Y = 14.96X - 125.98$	0.05%	0.14%

Los resultados obtenidos muestran que el contenido de ácidos grasos insaturados presentes en el extracto del fruto es mucho mayor que en el extracto de la hoja, lo que se corresponde con las características de la muestra, el extracto del fruto fue obtenido a partir de la corteza en la cual se reconoce visualmente compuestos de origen oleoso donde podrían estar disueltos los AG. Es importante destacar que los ácidos grasos saturados están relacionados con varios efectos adversos de la salud, mientras que los AG insaturados, también llamados omega (ω), poseen grandes beneficios para la salud ya que favorecen la reducción del colesterol plasmático, en consecuencia favorecen la protección frente a las enfermedades cardiovasculares, resultando ser esencial en la prevención y en el tratamiento de estas enfermedades. De ahí el enorme interés existente por los productos ricos en ácidos grasos insaturados así como plantas ricas en aceites, que facilitan una dieta orientada a reducir el colesterol total y el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) ¹⁰⁸. Además estos AG son muy eficaces para combatir la caída del cabello, se recomiendan en la artritis reumatoide, la diabetes, los desequilibrios hormonales de la mujer etc. Es importante destacar que los AG insaturados aumentan la susceptibilidad a la lipoperoxidación, afectando la actividad antioxidante ¹⁰⁹.

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

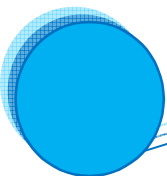
3.2.2.2. Contenido fenólico en los extractos

Múltiples reportes dan cuenta de la relación directa entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico total en los extractos de plantas medicinales ¹¹⁰. Para su cuantificación en los extractos se utilizó, al igual que en el aceite esencial, el método espectrofotométrico desarrollado por Folin-Ciocalteu, usando la curva de calibración de ácido gálico como referencia (Figura 3.4). Como resultado, se obtuvo 8,03 y 4,78 mg equivalente a ácido gálico por gramo del extracto para extracto de la hoja y fruto de *Swinglea glutinosa* respectivamente. Este resultado evidencia que tanto en los aceites esenciales como los extractos, el contenido fenólico de la hoja es mayor que la del fruto, lo que se complementa ya que muchos componentes volátiles del aceite esencial deben formar parte del extracto metanólico. Lo anterior debe conducir a que la hoja debe presentar una actividad antioxidante más fuerte que el fruto.

Al comparar el valor de contenido fenólico obtenido en ambos extractos (hoja y fruto) con los valores reportados para otros extractos de plantas medicinales (tabla 3.5), se observa que estos valores varían en gran medida para plantas de diferentes especies, familias etc... Los valores obtenidos para las hojas de la *Swinglea glutinosa* son similares al Orégano ¹⁰⁵ y la *saccharata* ¹¹¹, consideradas plantas con un alto poder antioxidan.

Tabla 3.5. El contenido fenólico total del extracto de algunas plantas medicinales publicado en la literatura.

Nombre de planta	Contenido fenólico total publicado en extracto (mg/g)	Referencias bibliográficas
Thyme (black)	7,51	105
Rosemary	1,62	
Myrtle	9,98	
Oregano	10,58	
L.coronopifolia	31,20	98
L. stoechas	25,20	
Bitter fennel	2,21	111
N. bettonicifolia	25,30	
N. saccharata	9,00	



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.2.3. Cuantificación del contenido de flavonoides en los extractos

Los flavonoides son distribuidos extensamente en los productos derivados de origen natural y tienen demostrada su actividad antioxidante. Además, muchos estudios han reportado que un incremento del contenido de flavonoides en la dieta podría reducir ciertas enfermedades ¹¹¹. En el presente trabajo el contenido total de flavonoides fue calculado como la cantidad equivalente de rutina sobre el peso del extracto, utilizando una curva de calibración de la Rutina como referencia (figura 3.8).

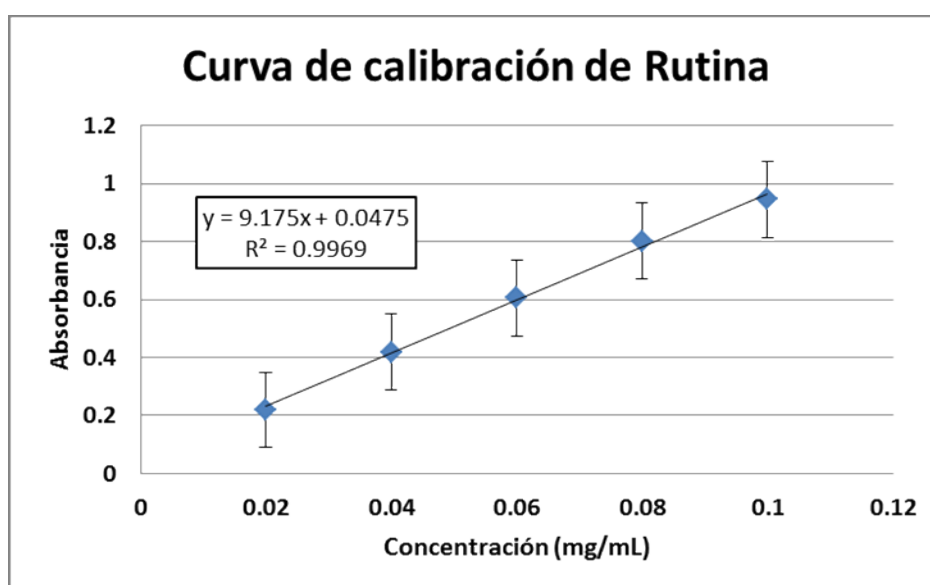
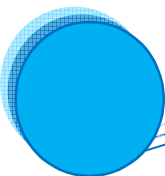


Figura 3.8. Curva de calibración del rutina, para la determinación del contenido de flavonoides.

El contenido de flavonoides totales en el extracto de hoja y fruto de *Swinglea glutinosa* colectado en Jardín botánico de UCLV se expresa como la cantidad (mg) equivalente a rutina por gramo del extracto. El resultado indica que las hojas poseen mayor cantidad de flavonoides que los frutos (45,38 y 17,97, respectivamente). Estos valores se encuentran en total correspondencia con los resultados obtenidos en el contenido fenólico para ambos extractos e igualmente debe tener relación directa con la actividad antioxidante de los mismos.



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al comparar los valores obtenidos con el contenido de flavonoides presente en otros extractos de plantas medicinales reportados en la literatura (tabla 3.6), se observa que el valor de flavonoides obtenido para el extracto de las hojas resultó ser alto, mientras que el extracto del fruto posee un contenido de flavonoides cercano a la mayoría de los valores reportados.

Tabla 3.6. El contenido total de flavonoides del extracto de algunas plantas medicinales publicado en la literatura.

Nombre de planta	Contenido total de flavonoides publicado (mg/g)	Bibliografía
L. coronopifolia	16,3	111
L. multifida	12,3	
L. stoechas	10,1	
Tetrastigma	72,1	112
V. agnus castus fruta	10,8	
T. sonbolii	37,1	

3.3. Actividad antioxidante de los aceites esenciales y los extractos de *Swinglea glutinosa*

Los extractos como los aceites esenciales obtenidos de plantas medicinales que son ricos en compuestos fenólicos son de interés para industria farmacéutica, alimentaria y cosmética como un ingrediente antioxidante natural. Ellos son, desde el punto de vista química, mezcla compleja constituida por varios componentes que tienen además de su actividad individual, efecto antagónico y sinérgico, lo que dificulta fundamentar las actividades biológicas que poseen los mismos ¹⁰³.

La actividad antioxidante de aceite esencial y extracto de *Swinglea glutinosa* fue evaluada comparando con los antioxidantes sintéticos BHA, BHT, Vitamina C, Propilgalato (PG) y los patrones de origen natural eugenol, cineol y timol por diferentes mecanismo de acción y diferentes métodos: actividad secuestradora del radical libre DPPH, fuerza reductora, método del tiocianato férrico (FTC), y valor de ácido tiobarbitúrico (TBA). A continuación se exponen los resultados de dichos ensayos:

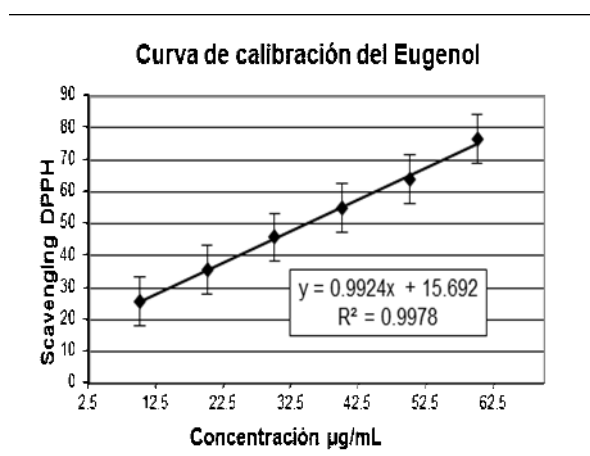
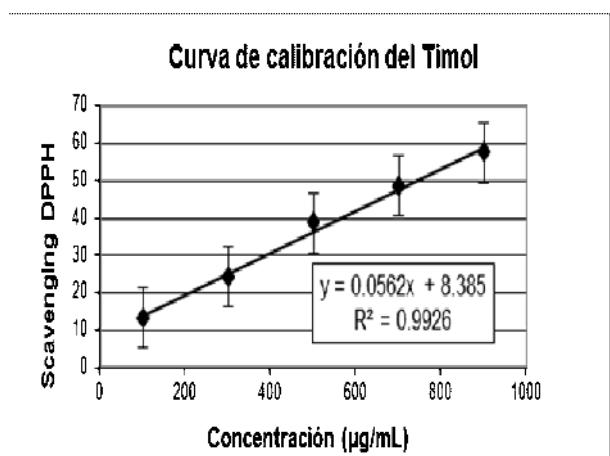
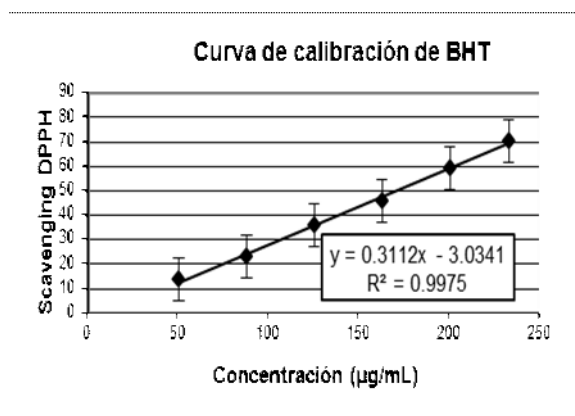
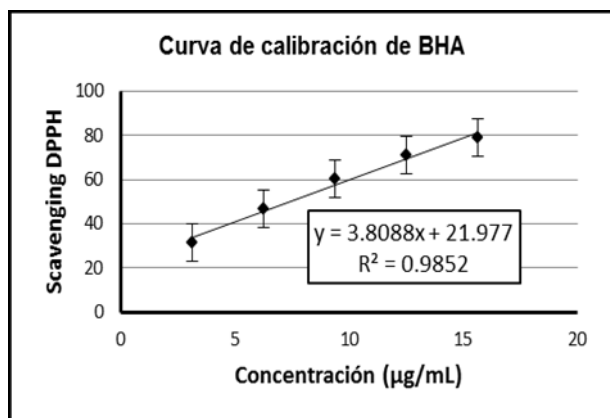
3.3.1. Métodos basados en la transferencia electrónica.

I. Cuantificación de la actividad secuestradora de radical libre DPPH:

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este ensayo se procesaron las curvas de calibración correspondientes a cada uno de los patrones utilizados (BHA, PG, Timol, y Eugenol), así como los productos evaluados (extractos y aceites esenciales en estudio), de las cuales se obtuvo las ecuaciones de las rectas y el coeficiente de correlación para cada caso (Figura 3.9).



Tú Le Thi Cam - Viet Nam (2012)

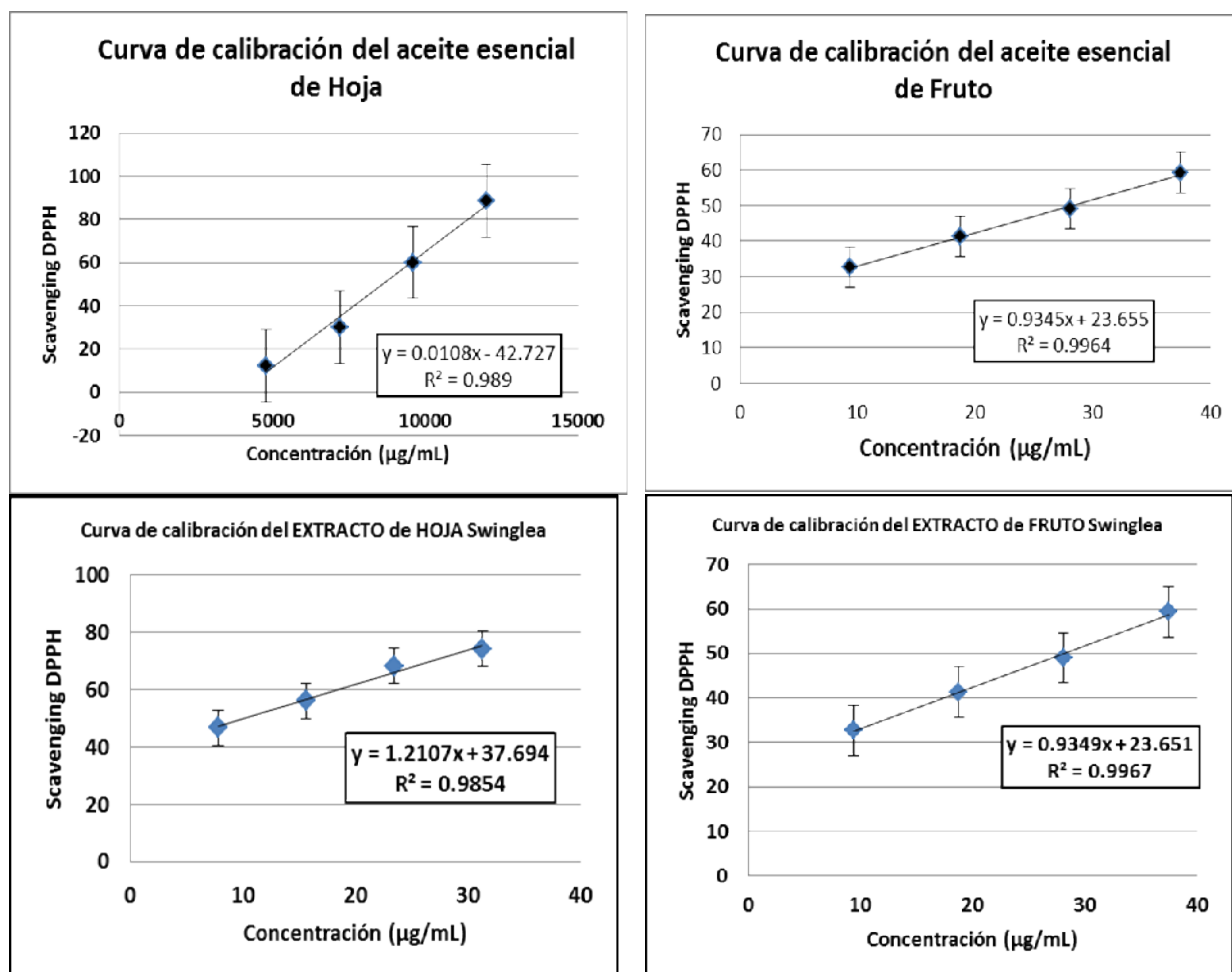
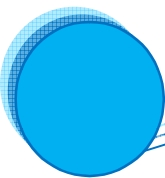


Figura 3.9. Curvas de calibración de los patrones (BHA, BHT, Timol, y Eugenol), los aceites esenciales y extractos de la hoja y del fruto de *Swinglea glutinosa*.

Estas curvas muestran que la actividad secuestradora se incrementa con el aumento de la concentración de la muestra debido a la reacción de donación de electrones entre las moléculas de antioxidante y los radicales libre ¹¹³, las mismas permitieron determinar el valor de IC₅₀ para cada muestra, utilizando el método de Litchfield and Wilcoxon. Los bajos valores de IC₅₀ indican alta actividad secuestradora de radicales libres. Estos valores de IC₅₀ de las muestras aparecen descritos en la tabla 3.7.

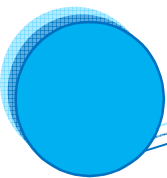


CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3.7. Resultados de la actividad secuestradora del radical DPPH para el aceite esencial obtenido de *Swinglea glutinosa* (hojas y frutos) y patrones utilizados.

Muestras	Concentración (µg/mL)	Inhibición (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
BHA	3	31,61	7
	6	46,54	
	9	60,36	
	12	70,94	
	15	78,92	
Timol	100	13,33	740
	300	24,36	
	500	38,76	
	700	48,54	
	900	57,44	
BHT	50	13,74	100
	80	23,32	
	127	35,96	
	162	46,07	
	200	59,07	
	232	70,45	
Eugenol	10	25,75	35
	20	35,72	
	30	45,79	
	40	54,92	
	50	63,91	
Aceite esencial Swinglea Hojas	4800	12,3	8600
	7200	30,2	
	9600	59,97	
	12000	88,55	
Aceite esencial Swinglea Frutos	15000	35,77	25790
	30000	44,4	
	45000	51,3	
	60000	61,73	
Extracto Swinglea Hojas	7,81	46,72	10
	15,62	56,12	
	23,44	68,19	
	31,25	74,31	
Extracto Swinglea Frutos	9,38	32,67	28,2
	18,75	41,29	
	28,12	48,96	
	37,5	59,31	

Tú Le Thi Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

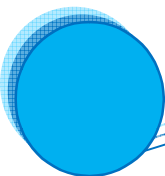
Si se tiene en cuenta que los bajos valores de IC_{50} obtenidos para los antioxidantes sintéticos son representativos de una marcada actividad antioxidante se puede inferir que la actividad antioxidante de ambos aceites esenciales evaluados, por este mecanismo de acción antioxidante, es muy baja para las concentraciones estudiadas. Sin embargo es importante destacar que la actividad antioxidante del aceite obtenido de las hojas es tres veces superior al de los frutos. Por su parte el valor obtenido de IC_{50} para el extracto de la hoja es muy superior a casi todos los patrones de antioxidante utilizados, lo que muestra que este extracto posee un alto poder antioxidante. El extracto del fruto muestra un valor de IC_{50} comparable con el BHA y mayor que el resto de los antioxidantes sintéticos utilizados como patrón (BHT, timol y Eugenol). Es destacable que ambos extractos muestran una marcada actividad antioxidante, aunque la misma en el extracto de la hoja resultó ser 10 veces superior que el extracto del fruto.

El efecto secuestrador del radical DPPH de las muestras estudiadas se resume en el siguiente orden: BHA > Extracto hojas > Extracto Fruto > Eugenol > BHT > Timol > Aceite esencial de *Swinglea* (hojas) > Aceite esencial de *Swinglea* (frutos).

Los altos valores de la actividad antioxidante en el extracto de permite proponer la valoración de su uso en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.

II. Fuerza reducida de ión férrico (Fe^{3+})

En este ensayo se evalúa la habilidad de las muestras en estudio para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . A mayor absorbancia, mayor será la actividad antioxidante. Los valores de absorbancia del aceite esencial (hojas y frutos) y de los patrones empleados se resumen en la tabla 3.8 y se representan en la figura 3.10.



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3.8. Valores de absorbancia del aceite esencial y extracto de la hoja y fruto de *Swinglea glutinosa* y patrones utilizados en términos de fuerza reductora.

Conc	Valores de Absorbancia								
	BHA	Eugenol	BHT	Timol	PG	AE hojas	AE fruto	Ex hojas	Ex fruto
0,25	3,54	0,586	3,86	3,12	4,34	0,067	0,094	0,286	0,135
0,5	3,82	1,167	4,13	3,26	4,56	0,226	0,132	0,295	0,176
0,75	4,21	1,487	4,21	3,51	4,72	0,339	0,242	0,328	0,221
1	4,34	1,865	4,86	3,81	4,91	0,548	0,303	0,361	0,274

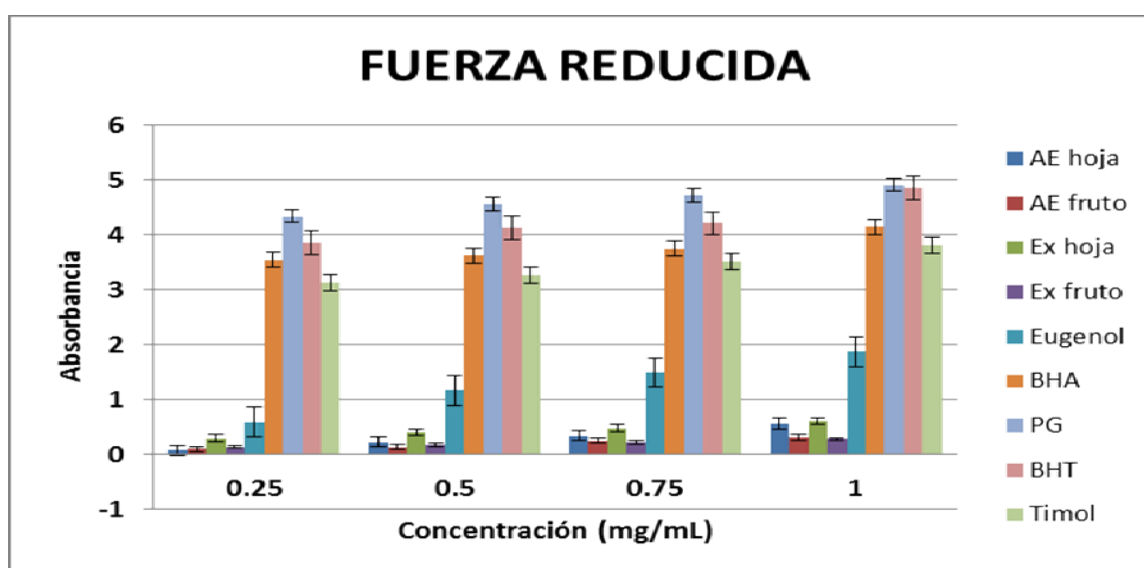
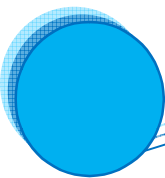


Figura 3.10. Actividad antioxidante del ambos aceites esenciales y extractos de *Swinglea glutinosa* (hojas y frutos) y patrones utilizados en términos de fuerza reductora.

Como se observa al aumentar la concentración aumenta la absorbancia de cada muestra, aunque en diferente medida. Teniendo en cuenta este mecanismo de acción se obtuvo que el aceite esencial y el extracto de la hoja tienen mayor actividad que el aceite y el extracto obtenido de los frutos. Sin embargo tanto los extractos como los aceites esenciales evaluados presentan actividad antioxidante baja con respecto a los patrones de antioxidantes utilizados. Estos resultados difieren de los obtenidos para el ensayo anterior (actividad secuestradora del radical libre DPPH), lo que puede ser debido a muchos factores tales como la metodología del ensayo, la naturaleza de los

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

sustratos para la oxidación, la interacción de los componentes, el modo de iniciación de la oxidación, etc, los cuales deberán ser dilucidados en posteriores investigaciones.

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

Dado que la oxidación lipídica es un proceso de multipasos, se evaluó la habilidad de los antioxidantes por 2 métodos diferentes para analizar su potencial en diferentes pasos del proceso de oxidación ^{103, 114}.

I. Determinación de la actividad antioxidante total por método de tiocianato férrico (FTC)

Es un método simple que se desarrolla en un período de tiempo largo (3-30h), usando el ácido linoleico como sustrato. Los hidroperóxidos son productos primarios de la oxidación y se miden por método espectrofotométrico. Bajos valores de absorbancia son indicativos de una baja concentración de peróxidos formados en la etapa inicial de la peroxidación lipídica del ácido linoleico y por tanto de una alta actividad antioxidante. Los valores obtenidos sin aditivos fueron tomados por un 100% de peroxidación lipídica. La absorbancia de la emulsión de ácido linoleico sin adición del aceite esencial y los antioxidantes sintéticos y naturales aumenta rápidamente. La tabla 3.9 muestra el cambio de los valores de absorbancia en el tiempo con los diferentes aditivos.

Tabla 3.9. Valores de absorbancia del aceite esencial y antioxidantes sintéticos en el sistema primario de oxidación del ácido linoleico por el método FTC en 30h.

Tiempo (horas)	Absorbancia de las muestras									
	Eu	Timol	Carv	BHT	BHA	AE Hoja	AE Fruto	Ex Hoja	Ex Fruto	Control
3	0,108	0,109	0,092	0,074	0,122	0,460	0,536	0,211	0,380	0,595
6	0,079	0,115	0,089	0,089	0,088	1,023	0,824	0,499	0,716	1,050
9	0,202	0,205	0,163	0,123	0,196	1,006	1,059	0,832	0,894	1,048
12	0,145	0,226	0,156	0,143	0,235	0,754	1,247	1,157	1,280	1,286
24	0,231	0,208	0,189	0,156	0,291	0,716	1,403	0,738	1,111	1,111
30	0,203	0,219	0,204	0,186	0,248	0,916	1,024	0,250	0,773	1,046

Donde: Eu: Eugenol; Carv: Carvacrol; AE: Aceite esencial; Ex: extracto.

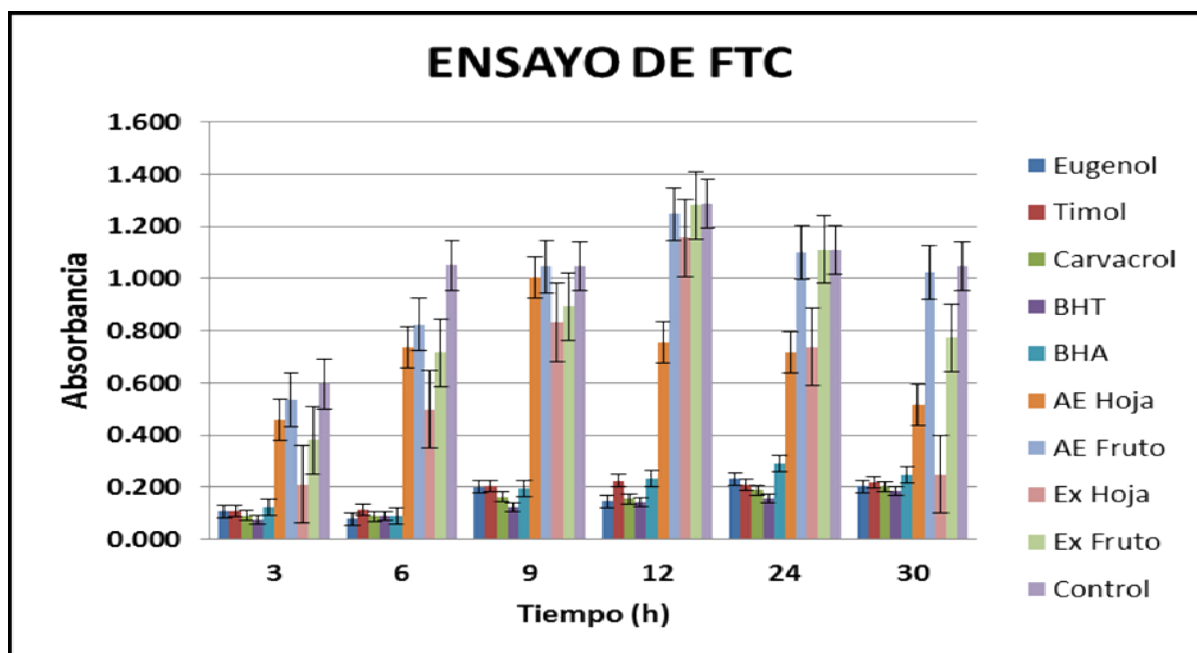
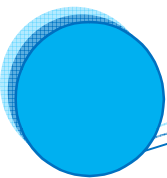


Figura 3.11. Efecto inhibitorio de los aceites esenciales, los extractos y antioxidantes patrones en el sistema primario de oxidación del ácido linoleico por el método FTC.

En la figura 3.11 se observa que ambos aceites muestran niveles bajos de actividad antioxidante durante las primeras 12 horas del ensayo, lo que se muestra con un incremento en los valores de absorbancia similares al control, que representa la formación máxima de hidroperóxidos. A partir de este tiempo el aceite del fruto mantiene un comportamiento estable, mientras que el aceite de la hoja logra disminuciones de los valores de absorbancia cercanos al 50%, con respecto al control. Lo anterior permite asegurar que, por este mecanismo, el aceite de la hoja muestra un mejor comportamiento antioxidante que el del fruto.

Por su parte en los extractos la actividad antioxidante resultó ser mucho mejor que en los aceites, siendo el extracto de la hoja muy superior al del fruto, ya que como se observa en la figura al concluir el ensayo el extracto de la hoja alcanza valores similares a los antioxidantes sintéticos y naturales evaluados.



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad baja de los aceites esenciales puede ser debida de su volatilidad ya que este ensayo se realiza a 70⁰C y esta temperatura pudiera afectar algunos componentes presentes en el aceite ⁹³.

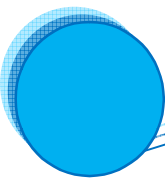
II. Ensayo de ácido tiobarbitúrico (TBA)

Mientras que el FTC mide la cantidad de los peróxidos formados en la etapa inicial de la peroxidación lipídica del ácido linoleico, el valor de TBA estima la producción de los productos de oxidación secundarios (malonaldehído, MDA) para determinar la extensión de la peroxidación. Por eso, este ensayo se realiza al finalizar el ensayo de FTC, utilizando las mismas muestras. A menor valor de absorbancia, mayor será la actividad antioxidante, es decir, poca cantidad de MDA formado.

En la tabla 3.10 y figura 3.12 se muestran los valores de TBA en las diferentes muestras. Los resultados obtenidos se corresponden completamente con el ensayo anterior, lo que muestra un comportamiento similar tanto para ambos aceites como para los extractos en las dos etapas de la oxidación, es decir el aceite esencial y extracto de las hojas muestran una actividad antioxidante mayor que el aceite esencial y extracto del fruto, mientras que en los extractos se evidencian efectos más apreciables que en los aceites esenciales tanto para la hoja como para el fruto de la *Swinglea glutinosa*.

Al comparar con los patrones de antioxidantes se observa que la actividad en el extracto y en el aceite esencial de la hoja es visible pero menor que el resto de los antioxidantes patrones. Por otra parte en el aceite obtenido de los frutos la actividad mostrada es casi nula, lo que está en correspondencia con el ensayo anterior y por tanto se puede generalizar que el comportamiento de los compuestos obtenidos de los frutos es similar tanto en la peroxidación lipídica primaria como en la secundaria.

Todo lo anterior podría estar relacionado con la concentración de ácidos grasos detectable en el extracto, susceptibles a la peroxidación lipídica, y la presencia en el aceite de hidrocarburos no oxigenados como componentes mayoritarios.



CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3.10. Valores de TBA del ácido linoleico en presencia de aceite esencial de *Swinglea glutinosa* y de los controles negativos como positivos.

Muestra	Absorbancia
Eugenol	0,028
Timol	0,028
Carvacrol	0,024
BHT	0,019
BHA	0,032
AE Swinglea Hoja	0,122
AE Swinglea Fruto	0,142
Ex Swinglea Hoja	0,056
Ex Swinglea Fruto	0,101
Control	0,158

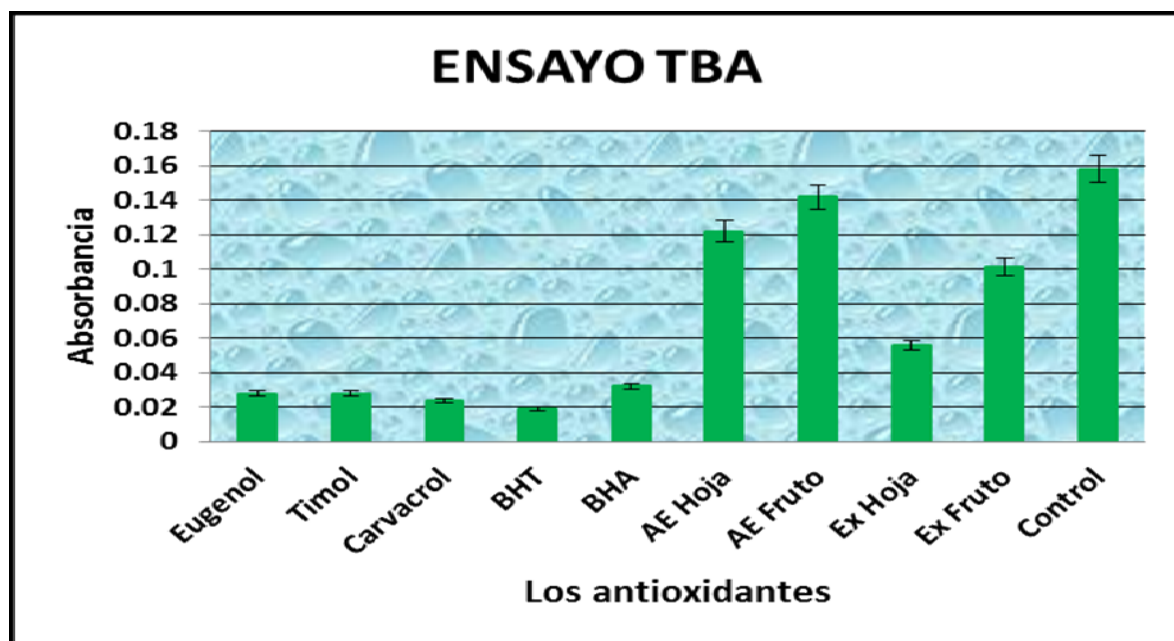
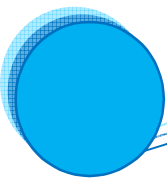


Figura 3.12. Efecto antioxidante del aceite esencial de *Swinglea glutinosa* en término de valores de TBA.

En resumen la actividad antioxidante estudiada por ambos mecanismos aportó que los extractos obtenidos de las hojas y los frutos de la *Swinglea glutinosa* poseen mayor actividad antioxidante que los aceites esenciales, obteniéndose los mejores resultados en el extracto de la hoja, con valores comparables a los patrones de antioxidantes. Al relacionar estos resultados con los valores superiores del contenido fenólico y de flavonoides para el extracto de la hoja se puede asegurar que existe una total correspondencia, mientras que la relación existente con el contenido de ácidos grasos en cada extracto es opuesta; según los resultados el extracto del fruto contiene ácido linoleico como componente mayoritario, lo que provoca que este extracto sea más susceptible a la oxidación lipídica y por lo tanto muestre menor actividad antioxidante. Por otra parte al relacionar la composición química obtenida para ambos aceites esenciales con la actividad antioxidante se puede plantear que la diferencia obtenida entre ambos está en correspondencia con los componentes presentes en cada uno ya que la presencia de los monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados en los aceites

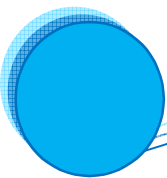


CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

incrementan la actividad antioxidante con respecto a los no oxigenados ¹⁰³. Si se tienen en cuenta que el aceite de la hoja tiene el nerolidol como el componente mayoritario y un porcentaje de compuestos oxigenados de 44,12%, mientras que el componente mayoritario en el aceite del fruto es el β -pineno (monoterpeno hidrocarburo) se puede deducir entonces que esta constituye una razón poderosa para que la actividad antioxidante del aceite de la hoja sea superior a la del fruto.

CONCLUSIONES & RECOMENDACIONES





CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

► CONCLUSIONES

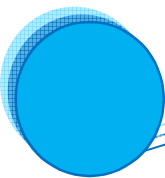
- ❖ El contenido de aceite esencial en las hojas de *Swinglea glutinosa*, resultó ser 0.67%, menor que el de los frutos (1.41%). Mientras que el rendimiento de los extractos de la hoja y del fruto fue de 1,76% y 2,02%, respectivamente.
- ❖ El aceite esencial de la hoja mostró un porcentaje grande de óxidos sesquiterpenos donde el Nerolidol fue el componente mayoritario. Sin embargo, el aceite esencial del fruto tiene como componente mayoritario un monoterpeno hidrocarburo con actividad antioxidante no apreciable (β -Pineno).
- ❖ En el aceite esencial el contenido de fenoles de la hoja fue superior al del fruto, mientras que en los extractos la hoja posee un contenido de fenoles y de flavonoides mayor que el obtenido para el fruto.
- ❖ Los extractos de las hojas y el fruto de *Swinglea glutinosa* contiene ácidos grasos, siendo mayoritarios los insaturados Omega 3 y 6. El extracto del fruto posee mayor cantidad y variedad de ácidos grasos.
- ❖ El aceite esencial de las hojas presenta una mayor actividad antioxidante que el de los frutos, evidenciada en los ensayos DPPH, peroxidación lipídica y valor TBA.
- ❖ Los extractos evaluados mostraron mejor actividad antioxidante que los aceites esenciales, siendo destacable los resultados obtenidos para el extracto de la hoja, los cuales fueron comparables con los patrones de antioxidantes en los ensayos DPPH y peroxidación lipídica.

► RECOMENDACIONES

- ❖ Obtener los aceites esenciales de la planta empleando otros métodos de extracción como método supercrítico con CO₂, con vistas a mejorar el rendimiento y comparar la composición química.
- ❖ Comprobar la actividad antioxidante en extractos obtenidos con otros solventes.
- ❖ Completar el perfil de ácidos grasos de ambos extractos.

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

1. (a) Gabriel, O.; Haydelba, D.; Dayanis, Y.; Shailili, M., Composición química de los aceites esenciales de las hojas de *Helicteres guazumifolia* (Sterculiaceae), *Piper tuberculatum* (Piperaceae), *Scoparia dulcis* (Arecaceae) y *Solanum subinerme* (Solanaceae), recolectadas en Sucre, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* **2011**, 59 (2), 585-595; (b) Abbas Ali Dehpour, M. A. E., Nabavi Seyed Fazel, Nabavi Seyed Mohammadb, Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *GRASAS Y ACEITES* **2009**, 60 (4), 405-412; (c) Álvarez, N. Consideraciones acerca del aseguramiento de la calidad de los medicamentos herbarios. 2003. <http://www.plantasmedicinales.org>.
2. OMS, Tradicional medicine. In OMS, 2008.
3. Shahidi, F., Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications. . Press, A., Ed. Champaign, Illinois.: EE.UU, 1997.
4. González-Laredo, R., Evaluación del efecto antioxidante y quimioprotector de extractos fenólicos de semillas de manzana. *Grasas y Aceites* **2007**, 58 (1), 5-9.
5. Montoya, B.; Lemeshko, V.; Lopez, J.; Pareja, A.; Urrego, R.; Torrez, R., Actividad antioxidante de algunos extractos vegetales. *vita* **2003**, 10 (72-79).
6. (a) Martinello, M. A.; Pramparo, M., Poder antioxidante de extractos de romero concentrados por destilación molecular. *Información Tecnológica* **2005**, 16 (5), 17-20; (b) Vicario, R.; Guillen, S.; Guzman, C., Utilización del ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (ATB) para evaluar el proceso autooxidativo en alimentos. *Grasas y Aceites* **1997**, 48 (2), 96-102.
7. Bozin, B.; Mímica-Durkin, N.; Simin, N.; Anacrov, G., Composition of Essential Oils of Some Lamiaceae Spices and Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Entire Oils. *J.Agric.Food Chem.* **2006**, 54, 1822-1828
8. Martínez-Rocha, A., Antioxidant and Antimutagenic Activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth). *Plant Foods Hum. Nutr.* **2008**, 63, 1-5.
9. Guala, M. S.; Elder, H. V.; Gustavo, P.; Chiesa, A., Evaluación del Poder Antioxidante de Fracciones de Aceite Esencial Crudo de *Schinus molle* L. obtenidas por Destilación al Vacío *Información Tecnológica* **2009**, 20 (2), 83-88.
10. Bandoni, A., Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. *Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica* **2000**, 29-231.
11. http://www.ecured.cu/index.php/Uso_de_plantas_medicinales, Uso de plantas medicinales.
12. Weniger, B.; Robledo, S.; Arango, G. J.; Deharo, E.; Aragón, R.; Muñoz, V.; Callapa, J., Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology* **2001a**, 78, 193-200.
13. Severino, R. P.; Guido, R. V. C.; Marques, E. F.; Brömme, D.; Fernandes, J. B.; Andricopulo, A. D.; Vieira, P. C., Acridone alkaloids as potent inhibitors of cathepsin V. *Bioorganic & Medicinal Chemistry - ScienceDirect* **2011**, 19, 1477-1481.
14. Desirée, D. S. C., MEDICAMENTOS, PLANTAS MEDICINALES Y PRODUCTOS NATURALES. **2004**, 16 (1 y 2), 13 - 20.
15. Isabel, D. M. P., Las plantas medicinales. *Rev Cubana Oncol* 2000, p 66.
16. Tagboto, S.; Townson, S., Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. *Adv Parasitol* 2001; 50:199-295. **2001**, 50, 199-295.
17. Willcox, M.; Cosentino, M.; Pink, R.; Bodeker, G.; Wayling, S., Natural products for the treatment of tropical diseases. *Trends Parasitol* **2001**, 17, 58-60.
18. Osorio, J. A. M. In *Mesa Redonda: El medicamento en la oficina de farmacia*

Tú Le Thi Cam - Viet Nam (2012)

- Plantas medicinales*, XIII Congreso Nacional Farmacéutico, Granada, Granada, 2002; pp 1-3.
19. (a) Biocomercio, S. *Estudio del mercado nacional de aceites esenciales*; Instituto de investigación de recursos biológicos alexander von humboldt, bogota, colombia: Colombia, 2003; pp 1-109; (b) Thomson, W. A. R. *Guía Práctica Ilustrada de LAS PLANTAS MEDICINALES FARMACOBOTÁNICA* [Online], 1981.
 20. Fretes, F., *PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS. UNA ALTERNATIVA DE PRODUCCIÓN COMERCIAL. Agencia del Gobierno de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID) 2010*, 1-60.
 21. Schrader, K. K.; Burandt, C.; Dellagrecia, M.; Meepagala, K.; Purcaro, R., Algidic Constituents from *Swinglea glutinosa*. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 10632–10635.
 22. Braga, P. A. C.; Dos Santos, D. A. P.; Da Silva, M. F. D. G. F.; Vieira, P. C.; Fernande, J. B.; Houghton, P. J.; Fang, R., In vitro cytotoxicity activity on several cancer cell lines of acridone alkaloids and N -phenylethyl-benzamide derivatives from *Swinglea glutinosa* (Bl.) Merr. *Natural Product Research* **2007**, 21 (1), 47-55.
 23. Dreyer, D. L., In *Tetrahedron*, 1970; pp 5745-5746.
 24. Weniger, B.; Um, B.-H.; Valentin, A.; Estrada, A.; Lobstein, A.; Anton, R.; Maillé, M., Bioactive Acridone Alkaloids from *Swinglea glutinosa*. *J. Nat. Prod.* **2001b**, 64, 1221-1223.
 25. (a) Boskou, D., Sources of natural phenolic antioxidants. *Food Science & Technology* **2006**, 17, 505-512; (b) Neuza, P.; Rosa, P.; Jose, C. M.; Jose, S. C., Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. *Food Chemistry* **2007**, 105, 204–214; (c) Onder, Y.; Atalay, S. H. A.; Nilgun, O.; Dimitra, D.; Munevver, S.; Bektas, T., Phenolic acid contents, essential oil compositions and antioxidant activities of two varieties of *Salvia euphratica* from Turkey. *Natural Product Research* **2011**, iFirst, 1-4.
 26. Gabriel, J. B.; Martínez-Morales, J. R.; Stashenko, E. E.; Ribón, W., Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia. *Biomédica* **2009**, 29, 51-60.
 27. Albornoz, A. M., *Productos Naturales: Sustancias y drogas extraídas de plantas*. Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela: Venezuela, 1980.
 28. Gokhan, Z.; Gokalp, O. G.; Yavuz, S.; Cakmaka, D.; Abdurrahman, A., Antioxidant capacity and fatty acid profile of *Centaurea kotschy* (Boiss. & Heldr.), Hayek var. *persica* (Boiss.) Wagenitz from Turkey. *grasas y aceites* **2011**, 62 (1), 90-95.
 29. Bourgaud, F.; Gravot, A.; Milesi, S.; Gontier, E., Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Review. *Plant Science* **2001**, 161, 839–851.
 30. Pier-Giorgio, P., Flavonoid as antioxidant. *J.Nat.Prod.* **2000**, 63, 1035-1042.
 31. (a) Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M., Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, 46, 446–475; (b) Stashenko, E. E.; Beatriz, E. J.; Jairo, R. M., COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE PLANTAS DE LA FAMILIA VERBENACEAE. *REV. ACAD. COLOMB. CIENC* **2003**, XXVII (105), 579-598.
 32. Boletín, Boletín de plantas medicinales y aromáticas. AGRARIA, G. D. C. F. P. L. I., Ed. Santiago - Chile, 2002; Vol. 6.
 33. (a) Guenther, E. *The essential Oils*; New York, 1942; (b) Martínez, N. *Los aceites esenciales naturales y la Aromaterapia* 2005.

34. Stashenko, E. E. ESTUDIO PROSPECTIVO DE ACEITES ESENCIALES COLOMBIANOS DE INTERÉS INDUSTRIAL 2000.
35. Bandoni, A. L., *Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica -Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. segunda ed.; Arnaldo L. Bandoni: Argentina, 2002; p 418.
36. Jaramillo-Colorado, B.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E. E.; Wagner-Döbler, I. B. K., Anti-quorum sensing activity of essential oils from Colombian plants. *Natural Product Research* **2011**, 1-12.
37. Morin, J.; Malhuret, R.; Bastide, P., Aromatherapy. *Pharmacie Hospitaliere Francaise* **1983**, 63, 23-28.
38. Firuzi, O.; Asadollahi, M.; Gholami, M.; Javidnia, K., Composition and biological activities of essential oils from four *Heracleum* species. *Food Chemistry* **2010**, 122, 117-122.
39. Tavares, A. C.; Gonçalves, M. J.; Cruz, M. T.; Cavaleiro, C.; Lopes, M. C.; Canhoto, J.; Salgueiro, L. R., Essential oils from *Distichoselinum tenuifolium*: chemical composition, cytotoxicity, antifungal and anti-inflammatory properties. *Journal of Ethnopharmacology* **2010**, 130, 593-598.
40. Guzman, J. D.; Gupta, A.; Evangelopoulos, D.; Basavannacharya, C.; Pabon, L. C.; Plazas, E. A.; Muñoz, D. R., Anti-tubercular screening of natural products from Colombian plants: 3-methoxynordomesticine, an inhibitor of MurE ligase of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, 65 (10), 2101-2107.
41. Okoh, O. O.; Sadimenko, A. P.; Afolayan, A. J., Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry* **2010**, 120, 308-312.
42. (a) Hashem, H.; Moharam, A. M.; Zaied, A. A.; Saleh, F. E. M., Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. *Crop Protection* **2010**, 29 (10), 1111-1117; (b) Mimica-dukic, N.; Bozin, B.; Sokovic, M.; Simin, N., Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 2485-2489.
43. Wang, X.; Zhang, F.; Liu, Z.; Feng, H.; Yu, Z. B.; Lu, Y.; Fan, D., Effects of essential oil from *Croton tiglium* L. on intestinal transit in mice. *Journal of Ethnopharmacology* **2008**, 117, 102-107.
44. Quintans-Juñior, L. J.; Souza, T. T.; Leite, B. S.; Lessa, N. M. N.; Bonjardim, L. R.; Santos, M. R. V., Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. *Phytomedicine* **2008**, 15, 619-624.
45. (a) Loizzo, M. R.; Menichini, F.; Conforti, F.; Tundis, R.; Bonesi, M.; Saab, A.; Frega, N., Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chemistry* **2009**, 117 (174-180); (b) Singh, P.; Shukla, R.; Prakash, B.; Kumar, A.; Singh, S.; Mishra, P. K.; Dubey, N. K., Chemical profile, antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, dl-limonene. *Food and Chemical Toxicology* **2010**, 48, 1734-1740.
46. Gimeno, C. E., Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm* **2004**, 23 (6), 80-84.
47. Harbone, J. B., Plant phenolics. In *Encyclopedia of plant physiology, secondary plant products* Bell, E. A.; Charlwood, B. V., Eds. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.: New York, 1980; Vol. 8, pp 329-395.
48. Paixao, N.; Perestrelo, R.; Marques, J. C.; Jose, S. C., Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. *Food Chemistry* **2007**, 105, 204-214.

49. (a) Martínez-Flórez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J. M.; Tuñón, M. A., Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *España XVII* **2002**, 6, 271-278; (b) Winkel-Shirley, B., Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology* **2001**, 126, 485-493.
50. López, L. T., Flavonoides. *fitoterapia* **2002**, 21 (4).
51. Andersen, M.; Kenneth, R. M.; Boca, R., *Chemistry, Biochemistry and Applications*. London, New York, 2000.
52. (a) López, O.; Muñoz, A.; Carmona, R.; Torres, L.; González, M. L., Influencia del uso de aditivos sobre el rendimiento del proceso de secado por aspersión del extracto acuoso de *C. Officinalis* L. . *Rev. Cub. Plant Med.* **2006**, 11 (1); (b) López, O.; Muñoz, A.; Carmona, R.; Torres, L.; González, M. L.; Varela, A. E.; García, J. M.; Suárez, E., Obtención y escalado del extracto seco de *C. Officinalis* L. . *Rev. Cub. de Química. XIX* **2007**, (1), 71-73; (c) Treybal, R. E., Operaciones con Transferencia de masa. *Revolucionaria, La Habana, Cuba.* **1986**.
53. García, J., La filtración y la centrifugación en la industria químico-farmacéutica. . *Primer Curso Internacional.* **1993**, 2, 82-86.
54. Hertog, M.; Gutiérrez, L.; Feskens, P.; Hollman, M.; Katan, Y.; Kromhout, D., Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease the Zutphen elderly study. *Lancet* **1993**, 342, 1007-1011.
55. Kostennikova, Z., UV spectrophotometric quantitative determination of flavonoid in calendula tincture. *Farmatsiya* **1997**, 33 (6), 83-86.
56. Gutiérrez, Y.; Miranda, M., Validación de dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajaba*, L. . *Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana* **2003**, 38 (1), 20-35.
57. Catherine, A.; RICE-EVANS, N.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G., STRUCTURE-ANTIOXIDANT ACTIVITY RELATIONSHIPS OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS *Free Radical Biology & Medicine* **1996**, 20 (7), 933-956.
58. Haraguchi, H.; Hashimoto, K.; Yagi, A., Antioxidant substances in leaves of *Polygonum hydropiper*. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40 (1349-1351).
59. (a) Kirk, R. S.; Sawyer, R.; Egan, H., Grasas. In *Composición y análisis de alimentos de Pearson*, Continental, C. E., Ed. Mexico, 1996; pp 25-28; (b) Woo, K.; Kim, J., New hydrolysis method for extremely small amount of lipids and capillary gas chromatographic analysis as N(O)-tert.-butyldimethylsilyl fatty acid derivatives compared with methyl ester derivatives. *J Chromatogr A.* **1999**, 862, 199-208.
60. Christie, W., Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *dundee* **1993**.
61. (a) Amin, S.; Mir, S. R.; Kohli, K.; Ali, B.; Ali, M., A study of the chemical composition of black cumin oil and its effect on penetration enhancement from transdermal formulations. *Nat Prod Res* **2010**, 24 (12), 1151-1157; (b) Cherif, A.; Belkacemi, K.; Kallel, H.; Angers, P.; Arul, J.; Boukhchina, S., Phytosterols, unsaturated fatty acid composition and accumulation in the almond kernel during harvesting period: importance for development regulation. *C R Biol.* **2009**, 332 (12), 1069-1077.
62. (a) Lefkothea-Stella, K.; Tvrzicka, E.; Stankova, B.; Zak, A., FATTY ACIDS AS BIOCOMPOUNDS: THEIR ROLE IN HUMAN METABOLISM, HEALTH AND DISEASE – A REVIEW.

PART 2: FATTY ACID PHYSIOLOGICAL ROLES AND APPLICATIONS IN HUMAN HEALTH AND DISEASE. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **2011**, 155 (3), 195-218; (b)

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)

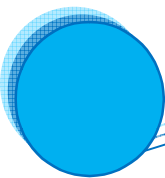
- Tvrzicka, E.; Lefkothea-Stella, K.; Stankova, B.; Zak, A., FATTY ACIDS AS BIOCOMPOUNDS: THEIR ROLE IN HUMAN METABOLISM, HEALTH AND DISEASE – A REVIEW.
PART 1: CLASSIFICATION, DIETARY SOURCES AND BIOLOGICAL FUNCTIONS. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **2011**, 155 (2), 117-130.
63. (a) Gerschman, R., Oxygen poisoning and X-Irradiation. A mechanism in common. . *Science* **1954**, 119, 623-626; (b) Halliwell, B.; Gutteridge, J., Free radical in biology and medicine. *Oxford: Clarendon* **1989**, 1, 142.
64. (a) Cabrera, T. C. S., D. S., Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev Cubana Cardiol* **2000**, 14 (1), 55-60; (b) Moreira, C. D.; Chase, C. D.; Gmitter, F. G. J.; Grosser, J. W., Inheritance of organelle genomes in citrus somatic cybrids. *Molecular Breeding* **2000**, 6, 401-405.
65. (a) Avello, M.; Suwalsky, M., Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección*. *Atenea* **2006**, 494, 161-172; (b) Ortega, A. M.; Izquierdo, A. C.; Gómez, J. J. H.; Olivares-Corichi, I. M.; Torres, V. M. M.; Méndez, J. d. J. V., PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y ANTIOXIDANTES EN LA PRESERVACIÓN DE SEMEN. UNA REVISIÓN. *INCI* **2003**, 28 (12).
66. SHI, H.; NOGUCHI, N.; NIKI, E., Introducción a los antioxidantes naturales. In *POKORNY, J., YANISHLIEVA, N., GORDON, M. Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas. Zaragoza: Edit. ACRIBIA, ACRIBIA, Ed. POKORNY, J.*
67. YANISHLIEVA-MASLAROVA, N. V.; HEINONEN, I. M., Origen de los antioxidantes naturales: verduras, frutas, hierbas, especias y té. In *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas, ACRIBIA, Ed. POKORNY, J.*
68. Maestri, D. M.; Nepote, V.; Lamarque, A. L.; Zygadlo, J. A., Natural products as antioxidants. *Phytochemistry: Advances in Research* **2006**, 105-135.
69. GORDON, M. H., El desarrollo del enranciamiento oxidativo en los alimentos. In *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas. , ACRIBIA, Ed. POKORNY, J.*
70. Sánchez- Moreno, C., Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Sci Tech Int* **2002**, 8 (3), 121–137.
71. Antolovich, M.; Prenzler, P.; Emilios, P.; McDonald, S.; Robards, K., Methods for testing antioxidant activity. *the analyst* **2002**, 127, 183-198.
72. (a) Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L., The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1841–1856; (b) Macdonald-Wicks, L.; Wood, L.; Garg, M., Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. . *J Sci Food Agric.* **2006**, 86, 2046–2056.
73. (a) Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K., Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic sin foods and dietary supplements. . *J.Agric.FoodChem.* **2005**, 53, 4290 - 4302; (b) Wright, J. S.; Johnson, E. R.; DiLabio, G. A., Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects and Application to Major Families of antioxidants. *J. Amer. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1173-1183
74. Frankel, E. N.; Meyer, A. S., The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J.SCI.FOODAGRIC.* **2000**, 80, 1925-1941.
75. Becker, E.; Nissen, L.; Skibsted, L., Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, 219, 561-571.

Tú Le Thi Cam - Viet Nam (2012)

76. Boveris, A.; Oshino, N., The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemistry* **1972**, 128 (3), 617-630.
77. Slinkard, K.; Singleton, V. L., Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American journal of tecnology and viticulture* **1977**, 28 (1), 49-55.
78. (a) Molyneux, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol* **2004**, 26 (2), 211-219; (b) Singh, G.; Kapoor, I. P. S.; Singh, P.; S. de Heluani, C.; P. de Lampasona, M.; Catalan, C. A. N., Chemistry, antioxidant, antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, 46, 3295-3302.
79. Rosales, A. R. R., Juana Rosa Betancort EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIFENOLES DE ALGAS MARINAS 2006.
80. (a) Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berseff, C., Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.FreeRadicalMethod *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Science and Technology* **2002**, 30, 609-615; (b) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berseff, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Science and Technology* **1995**, 28, 25-30.
81. Rodrigo, S. G., Helena Teixeira Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry* **2009**, 112, 654-658.
82. (a) Miceli, N.; Trovato, A.; Dugo, P.; Cacciola, F.; Donato, P.; Marino, A.; Bellinieri, V., Comparative Analysis of Flavonoid Profile, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 6570-6577; (b) Singh, G.; Marimuthu, P.; S. de Heluani, C.; A.N. Catalan, C., Antioxidant and Biocidal Activities of *Carum nigrum* (seed) Essential Oil, Oleoresin, and their Selected Components. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 174-181.
83. Fereidoon, S. Z., Ying Lipid Oxidation: Measurement Methods. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* **2005**, 6.
84. Gulcin, I.; Elmastas, M.; Aboul-Enein, H. Y., Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum* L. family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phytother. Res.* **2007**, 21 (4), 354-361.
85. Luis, Y. Obtención, parámetros de calidad y determinación cuantitativa de cineol de aceites esenciales obtenidos de dos especies de Mirtáceas. UCLV, Santa Clara, 2012.
86. Nurmi, K.; Ossipov, V.; Haukioja, E.; Pihlaja, K., Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* ssp. *tortuosa*). *Journal of Chemistry and Ecology* **1996**, 22, 2023-2040.
87. Herrera, P. L. Cuantificación de los ácidos grasos presentes en el aceite de semilla obtenido de tres especies de Cucurbita UCLV, Santa Clara, 2011.
88. Shimada, K.; Fujikawa, K.; Yahara, K.; Nakamura, T., Antioxidative properties of xanthan on auto oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **1992**, 40, 945-948.
89. Senevirathne, M.; Kin, S. H.; Siriwardhana, N.; Ha, J. H.; Lel, K. W.; Jeon, Y., Antioxidant potential of *Ecklonia cava* on reactive oxygen species, scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *Food Sci. Technol. Int.* **2006**, 12, 27-38.

90. (a) Cosentino, S.; Tuberoso, C. I. G.; Pisano, B.; Satta, M. V.; Arzedi, E.; Palmas, F., In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Lett. Appl. Microbiol* **1999**, 29, 130-135; (b) Ramona, A. C.; William, A. H.; William, N. S., Chemical composition of essential oils of seven species of Eugenia from Monte verde, Costa Rica. *Biochem. Syst. Ecol.* **2007**.
91. KAPOOR, I. P. S.; BANDANA, S.; GURDIP, S.; S. DE HELUANI, C.; P. DE LAMPASONA, M.; CESAR, A. N. C., Chemistry and in Vitro Antioxidant Activity of Volatile Oil and Oleoresins of Black Pepper. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57 (12), 5358-5364.
92. Nguyen, T. D.; Kim, J. M.; Kang, S. C., 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, 3632-3639.
93. Singh, G.; Maurya, S.; P. de Lampasona, M.; Catalan, C., Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control* **2006**, 17, 745-752.
94. Rajendra, C. P.; Ram, S. V., Comparative volatile oil composition of four *Ocimum* species from northern India. *Natural Product Research* **2011**, 25 (6), 569-575.
95. Rahman, A. T.; Kang, S. C., In vitro control of food-borne and food spoil age bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica*. *Food Chemistry* **2009**, 116, 670-675.
96. Sonboli, A.; Mohammad, A. E.; Abbas, G.; Reza, K., Composition, Cytotoxicity and Antioxidant Activity of the Essential Oil of *Dracocephalum surmandinum* from Iran. *Natural Product Communications* **2010**, 5 (2).
97. (a) Gurdip, S.; Marimuthu, P.; Catalan, C.; P. de Lampasona, M., Chemical, antioxidant and antifungal activities of volatile oil of black pepper and its acetone extract. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, 84, 1878-1884; (b) Rahman, A.; Kang, S. C., In vitro control of food-borne and food spoil age bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb. *Food Chemistry* **2009**, 116, 670-675.
98. Messaoud, C.; Chograni, H.; Boussai, M., Chemical composition and antioxidant activities of essential oils and methanol extracts of three wild *Lavandula L.* species. *Natural Product Research* **2011**.
99. Moro, A.; Zalacain, A.; Jorge, H.; Manuel, C., Effects of Agronomic Practices on Volatile Composition of *Hyssopus officinalis L.* Essential Oils. *Molecules* **2011**, 16, 4131-4139.
100. NEDA, M.; BILJANA, B.; MARINA, S.; NATASA, S., Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis L.* (Lamiaceae) Essential Oil. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 2485-2489.
101. Jancy, M. R.; Chandramohan, G.; Meenakshisundaram, M.; Loganathan, B., ANTIOXIDANT ACTIVITY, PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ACTIVITY OF NON POLAR CHEMICAL CONSTITUENTS FROM LANTANA CAMARA LEAVES. *IJPRD AUGUST - 2012*, 4 (06), 108 - 113.
102. Marzoug, H. N. B.; Mehrez, R.; Ahmed, L.; Florence, M.; François, C.; Manef, A.; Mohamed, L. K.; Jalloul, B., *Eucalyptus oleosa* Essential Oils: Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Oils from Different Plant Parts (Stems, Leaves, Flowers and Fruits). *Molecules* **2011**, 16, 1695-1709.
103. Giuseppe, R.; Baratta, M. T., Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry* **2000**, 69, 167-174.
104. (a) Yen, G. C.; Duh, P. D.; Tsai, C. L., Relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41 (1), 67-70; (b) Cai, Y.; Luo, Q.; Sun, M.; Corke, H., Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* **2004**, 74, 2157-2184.

Tú Lê Thị Cam - Viet Nam (2012)



BIBLIOGRAFÍA

105. Mehmet, M.; Özcan, E.; Emine, E. H., Antioxidant Activity, Phenolic Content, and Peroxide Value of Essential Oil and Extracts of Some Medicinal and Aromatic Plants Used as Condiments and Herbal Teas in Turkey. *J Med Food* **2009**, 12 (1), 198–202.
106. Gholivand, M. B.; Rahimi-Nasrabadi, M.; Batooli, H.; Ebrahimabadi, A. H., Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton canescens*. *Food and Chemical Toxicology* **2009**.
107. Wan, B.; Mohd, N.; Hakimi, W. S.; Farediah, A.; Khong, H. Y.; Hasnah, M. S., Chemical Compositions, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils of *Piper canin*. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, 12, 7720-7731.
108. MASANA, L., Frutos Secos y Salud Cardiovascular. *Fundación Nucis Salud y Frutos Secos* **2002**.
109. Diniz, Y.; Cicogna, A.; Padovani, C.; Santana, L.; Faine, L.; Novelli, E., Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition* **2004**, 20 (2), 230-4.
110. (a) Kaur, C.; Kapoor, H., Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int J Food Sci Technol.* **2002**, 37, 153-161; (b) Ivanova, D.; Gerova, D.; Chervenkov, T., Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* **2005**, 95, 145-150.
111. Peyman, S.; Sonboli, A.; Pooneh, K.; Fateme, M., Essential oil composition and antioxidant activity of different extracts of *Nepeta betonicifolia* C.A. Meyer and *Nepeta saccharata* Bunge. *Natural Product Research* **2011**.
112. Masoumeh, F.; Zahra, T.; Ali, S., Essential oil composition and antioxidant activities of the various extracts of *Tanacetum sonbolii* Mozaff. (Asteraceae) from Iran. *Natural Product Research* **2011**.
113. HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R., The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 1841-1856 **2005**, 53, 1841-1856.
114. Frankel, E. N., In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Science&Technology* **1993**, 4, 220-225.