



SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA

SEP

---

# **INFORME TÉCNICO**

## **DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

### **INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

**PRESENTA**

**DÍAZ LÓPEZ ALEJANDRO**

**NOMBRE DEL PROYECTO**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD  
ANTIRADICAL DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *PIMENTA  
DIOICA***

**PERIODO DE REALIZACIÓN**

**ENERO-JUNIO 2012**

## Tabla de contenido

	<i>Página</i>
Lista de Figuras.....	i
Lista de Tablas.....	ii
1. Introducción.....	1
2. Justificación.....	3
3. Caracterización del área.....	4
3.1. Políticas y normas.....	4
3.2. Objetivos de la institución .....	4
3.3. Servicios que presta la institución.....	4
3.4. Descripción del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica .....	5
3.4.1. Funciones del departamento de Ingeniería Química y Bioquímica.....	6
5. Problemas a resolver .....	7
6. Objetivos .....	8
6.1. Objetivo General .....	8
6.2. Objetivos específicos .....	8
7. Alcances y Limitaciones .....	9
7.1. Alcances .....	9
7.2. Limitaciones .....	9
8. Fundamento teórico .....	9
8.1. Pimienta.....	9
8.2. Antioxidantes y antiradicales.....	11
8.3. Procesos de oxidación en el organismo.....	12
8.4. Procesos de oxidación en los alimentos .....	12

8.5. Actividad antioxidante y atrapamiento de radicales .....	13
8.6. Actividad antioxidante determinada por el método del blanqueamiento del $\beta$ -caroteno .....	15
8.7. Compuestos fenólicos .....	16
9. Metodología.....	19
9.1. Obtención de los extractos de hoja de pimienta dioica .....	19
9.1.1. Tratamiento de la muestra .....	19
9.1.2. Extracto metanólico .....	19
9.2. Determinación de la actividad antioxidante .....	20
9.4. Determinación de la actividad antirradical.....	21
9.5. Cuantificación de flavonoles totales .....	21
9.6. Cuantificación de fenoles totales.....	22
10. Resultados y discusión.....	23
10.1. Actividad antioxidante de extractos metanólicos de <i>Pimenta dioica</i> .....	23
10.2. Actividad antirradical de extractos metanólicos de <i>Pimenta dioica</i> .....	27
Anexos .....	32
Anexo a: Curva patrón de flavonoles totales (Método de $AlCl_3$ ) .....	32
Anexo b: Curva patrón de fenoles totales (Folin-Ciocalteu). .....	33

## Lista de figuras

	<i>Página</i>
Figura 1. Mecanismo de reacción del antioxidante sobre DPPH.....	15
Figura 2. Principales grupos de flavonoides.....	17
Figura 3. Cinética de oxidación de la emulsión $\beta$ -caroteno-ácido linoléico en presencia de $7.425 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extracto metanólico de hojas de pimienta macho. ....	23
Figura 4. Cinética de oxidación de la emulsión $\beta$ -caroteno-ácido linoléico en presencia de $2.97 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extracto metanólico de hojas de pimienta macho. ....	24
Figura 5. Cinética de oxidación de la emulsión $\beta$ -caroteno-ácido linoléico en presencia de $0.99 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extracto metanólico de hojas de pimienta macho. ....	24
Figura 6. Cinética de oxidación de la emulsión $\beta$ -caroteno-ácido linoléico en presencia de $0.37 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extracto metanólico de hojas de pimienta macho. ....	25
Figura 7. Actividad antioxidante (%) de <i>Pimenta dioica</i> (P) comparado con quercetina (Q). Los números entre paréntesis son las concentraciones utilizadas para la prueba. ....	26
Figura 8. Actividad antirradical del extracto metanólico de <i>Pimenta dioica</i> a diferentes concentraciones. ....	27

## Lista de tablas

	<i>Página</i>
Tabla 1. Porcentajes de composición del aceite esencial de la hoja del árbol masculino de pimienta ( <i>Pimenta dioica</i> ).....	11
Tabla 2. Concentración de fenoles y flavonoles en los extractos metanólicos de <i>P. dioica</i> .....	28

## 1. Introducción

En los últimos años se ha incrementado el interés por la búsqueda de antioxidantes naturales, generalmente constituidos por mezclas de compuestos con una elevada diversidad molecular y funcionalidad biológica. En su mayoría estas entidades son aceptadas como no tóxicas, aunque algunos de estos compuestos naturales pudieran presentar un definido riesgo toxicológico (Vidal et al., 2005).

Diversos compuestos presentes en productos vegetales tienen la propiedad de actuar como antirradicales o antioxidantes.

Algunos de los antioxidantes son vitaminas (aminas indispensables para la vida, tales como la vitamina A, C y E; otros son flavonoides (quercetina, catequina), antocianinas, carotenoides o ácidos fenólicos (ácido caféico y ácido clorogénico) así como también enzimas (catalasas, peroxidasas y dismutasa superperoxidasas) y minerales necesarios para que el sitio activo enzimático trabaje (selenio, manganeso, zinc y cobre). Los flavonoides como la catequina se encuentran en el vino tinto y manzanas; quercetina en cebollas, uvas y manzanas. El poder antioxidante de algunos compuestos ha sido clasificado de menor a mayor grado de la siguiente forma: vitamina C (=4); B-caroteno (=5); vitamina E (=6); frutas y verduras (=8) (Castañeda et al., 2008)

Numerosos estudios en nutrición humana, demuestran una estrecha correlación entre el consumo de frutas y verduras y la menor incidencia de enfermedades crónico degenerativas, debido a su bajo contenido en colesterol y a la presencia de vitaminas, fibras, antioxidantes naturales y minerales. Así mismo, el estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas, como: arterioesclerosis, artritis, demencia, cáncer, etc; es por ello que el uso de antioxidantes, es estudiado de forma intensiva, en farmacología; particularmente, en el tratamiento de accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas. Actualmente, se sabe que tanto por causas ambientales (radiación), así como por la ingesta de algún contaminante o incluso como consecuencia de nuestro propio metabolismo, surgen algunas moléculas que nos pueden provocar daño. A estas se

les conoce como especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), que se asocian a enfermedades como cáncer, problemas cardiacos o al natural envejecimiento humano. Entre los problemas que originan figuran: destrucción de paredes celulares, inactivación de enzimas, debilitamiento de la capacidad defensiva, alteración del sistema inmunológico e incluso daño del material genético (Castañeda et al., 2008).

Por otra parte la oxidación de grasas y aceites es la reacción común de deterioro o pérdida de la calidad de los alimentos, y la ingesta de estos compuestos lipídicos causa estrés oxidativo de las células del organismo. Los productos de la reacción de oxidación afectan las propiedades nutricionales, color, sabor y textura de los alimentos. Las causas principales de la oxidación son: la exposición de los alimentos ricos en grasas y aceites al oxígeno, aire, radiación, prooxidantes metálicos, temperaturas ambientales elevadas, y las propias enzimas del tipo lipoxigenasas (Rosales et al., 2006).

Es por ello el interés de encontrar nuevas fuentes de compuestos antioxidantes, sobre todo de origen natural que en un futuro puedan contribuir en la solución de problemas relacionados con la salud y en la industria de los alimentos.

## 2. Justificación

Como consecuencia del aumento de la población y la globalización, también ha aumentado la contaminación ambiental y este tiene grandes efectos sobre la salud y como consecuencia de esto, estamos expuestos a infinidad de sustancias químicas que nos provocan diversas enfermedades, sobre todo aquellas relacionadas con los radicales libres que son causantes de enfermedades de la piel, y sobre todo de diversos tipos de cáncer. Debido a esto, se tiene la necesidad de buscar nuevas fuentes y sobre todo de origen natural de suplementos o medicamentos que nos ayuden a evitar o contrarrestar estos efectos. También en las industrias alimentarias se requiere de nuevos antioxidantes que ayuden a preservar la calidad de los alimentos, sobre todo aquellos que son fácilmente oxidables como los ácidos grasos. La *Pimenta dioica* masculino, es un árbol que aunque florece no da frutos y para los productores no es muy conveniente tener en sus parcelas árboles de este tipo ya que no tiene ningún provecho. Debido a esto se han realizado investigaciones en donde se ha encontrado que el aceite de la hoja tiene la propiedad de ser un buen antimicrobiano. Por su alto contenido de polifenoles y de aceite se puede suponer que puede tener otras propiedades, por esto el objetivo de este trabajo es evaluar su capacidad antioxidante y atrapadora de radicales de los compuestos polifenólicos de los extractos de las hojas de pimienta macho.

### **3. Caracterización del área**

Este proyecto de residencia profesional fue realizado en los laboratorios de Biotecnología e Investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, el cual se encuentra ubicado en la carretera Panamericana Km.1080.

#### **3.1. Políticas y normas**

Ser una oferta educativa tecnológica suficiente a nivel superior y postgrado, en las modalidades escolarizadas y abiertas, con perfiles profesionales acorde a los retos de todas las regiones del país.

Compartir con la población en general los beneficios de conocimiento, la cultura científica y tecnológica; en particular, proporcionar al público, con la finalidad de coadyuvar al modelo de desarrollo que el país reclama, para alcanzar el bienestar social que demandamos los mexicanos.

#### **3.2. Objetivos de la institución**

Promover el desarrollo integral y armónico del educando con los demás, consigo mismo y con su entorno, mediante una formación intelectual que lo capacite en el manejo de los métodos y los lenguajes sustentados, en los principios de identidad nacional, justicia, democracia, cultura, que le permiten una mente y cuerpo sanos.

#### **3.3. Servicios que presta la institución**

- Atender la demanda de educación superior y postgrado con alta calidad nacional e internacional en las áreas industriales, agropecuarias y de servicios, en todas las regiones del país, como la forma de auspiciar el desarrollo regional. Se imparten 8 carreras a nivel Licenciatura, las cuales son: Ingeniería Bioquímica, Ingeniería Eléctrica, Ingeniería Electrónica, Ingeniería Industrial, Ingeniería Mecánica, Ingeniería Química, Ingeniería en Gestión Empresarial e Ingeniería en Sistemas Computacionales. Además se oferta el posgrado con la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica y la Maestría en Ciencias en Ingeniería en Mecatrónica.

- Hacer de cada uno de los institutos Tecnológicos un instrumento de desarrollo mediante una estrecha y permanente retroalimentación con la comunidad, en especial entre los sectores productivos de bienes y servicios, sociales, públicos y privados.
- Promover y convocar a los sectores productivos y educativos de cada localidad para generar y otorgar apoyos materiales y financieros adicionales, requeridos en la operación de los planteles.
- Compartir con la comunidad la cultura científica tecnológica y humanista, así como la recreación y el deporte, mediante los diversos foros y medios con que se cuenta el sistema.
- Oferta de perfiles profesionales que integran las necesidades específicas regionales, para que el egresado contribuya de manera satisfactoria al desarrollo de cada comunidad, en especial a la planta educativa.
- Actualizar de manera permanente al personal docente y administrativo, para favorecer el desarrollo armónico entre toda la comunidad tecnológica.

#### **3.4. Descripción del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica**

Este departamento se encarga de planear, coordinar, controlar y evaluar las actividades de docencia, investigación y vinculación en las áreas correspondientes a la Ingeniería Química y Bioquímica que se imparte en el Instituto Tecnológico, de conformidad con las normas y lineamientos establecidos por la Secretaría de Educación Pública, además de elaborar el programa educativo anual y el anteproyecto de presupuesto del departamento y presentarlo a las Subdirección Académica para lo conducente.

También se encarga de aplicar la estructura orgánica autorizada para el departamento de procedimientos establecidos.

### **3.4.1. Funciones del departamento de Ingeniería Química y Bioquímica**

Las funciones del departamento son múltiples por lo que tiene que coordinarse con otros departamentos:

- ✓ Coordinar con las divisiones de estudios profesionales y postgrado e investigación, la aplicación de programas de estudios y con el departamento de desarrollo académico, los materiales y apoyos didácticos a las asignaturas de las correspondientes a las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se imparten en Instituto Tecnológico y controlar el desarrollo.
- ✓ Coordinar con la división de estudios profesionales y postgrado e investigación, con el departamento de desarrollo académico, la formulación y aplicación de técnicas e instrumento para la evaluación del aprendizaje de las asignaturas correspondientes en las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se imparte en el Instituto Tecnológico.
- ✓ Coordinar los proyectos de investigación educativa, científica y tecnológica en las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se llevan a cabo en el Instituto Tecnológico con el sector productivo de bienes y servicios de la región, así como controlar su desarrollo.
- ✓ Proponer a la Subdirección Académica el desarrollo de recurso y eventos que propicie la superación y actualización profesional del personal docente de las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica, en el Instituto Tecnológico.
- ✓ Apoyar a la División de Estudios Profesionales en el proceso de titulación de los alumnos del Instituto.
- ✓ Superar y evaluar el funcionamiento del departamento con las demás áreas y con base a los resultados, proponer las medidas que mejoren su operación.
- ✓ Coordinar las actividades del departamento con las demás áreas de la Subdirección Académica.

- ✓ Presentar reportes periódicos de las actividades desarrolladas a la Subdirección Académica.

En el área de Ingeniería Bioquímica se cuenta con laboratorios, los cuales son utilizados para realizar las actividades experimentales correspondientes a las distintas materias impartidas en la institución, así como para la realización de proyectos de investigación que se llevan a cabo dentro del área.

El presente proyecto de residencia profesional fue realizado en los laboratorios de Biotecnología e Investigación ya que cuentan con los servicios y materiales necesarios para la realización de dicho trabajo.

## **5. Problemas a resolver**

- ❖ Evaluar la capacidad antioxidante y la capacidad atrapadora de radicales libres de la hoja de *Pimenta dioica* masculino a diferentes concentraciones.
- ❖ Cuantificar la presencia de fenoles totales y de flavonoides (flavonoles y flavanonas).

La mayor parte de las técnicas usadas para la determinación de actividad antioxidante tiene la desventaja de que son muy sensibles a los cambios de temperatura, la interacción con el medio ambiente, la luz y el pH. Este puede ser una desventaja por lo que todas las determinaciones se harán por triplicado.

## **6. Objetivos**

### **6.1. Objetivo General**

Evaluar la capacidad antioxidante y anti-radical del extracto metánolico de *Pimenta dioica* masculino.

### **6.2. Objetivos específicos**

- ✓ Evaluar el contenido de compuestos fenólicos de extractos de metanol.
- ✓ Evaluar la capacidad antioxidante y anti-radical de extractos fenólicos de *Pimenta dioica*.
- ✓ Determinar la capacidad antioxidante y anti-radical a diferentes concentraciones del extracto.

## **7. Alcances y Limitaciones**

### **7.1. Alcances**

En el desarrollo del proyecto se logró evaluar la capacidad antioxidante y anti-radical del extracto metanólico de *Pimenta dioica*; mediante análisis espectrofotométricos se determinaron fenoles y flavonoles.

### **7.2. Limitaciones**

Debido a problemas con el estándar de naringenina y con el 2,4-dinitrofenilhidrazina no se pudieron cuantificar las flavanonas en los extractos metanólicos de las hojas del árbol macho de la pimienta.

## **8. Fundamento teórico**

### **8.1. Pimienta**

El género *Pimenta* Lin. (Myrtaceae) consta de 15 especies que viven en el neotrópico, la mayor parte de ellas en Centroamérica y la región del Caribe, y solamente una especie en el sudeste de Brasil. Hay dos especies de interés económico notable: *P. dioica* y *P. racemosa*. La segunda especie, de las Antillas menores, desde Santo Tomás hasta Trinidad y Tobago, Puerto Rico y Cuba, tiene gran importancia comercial por la obtención de su aceite esencial. En México solamente vive *P. dioica* (L.) Merrill, la más importante del género desde el punto de vista botánica económica y objeto de estudio.

*Pimenta dioica*, identificada también con los nombres científicos de: *Pimenta officinalis* Lindl, *Myrtus pimenta*, *Pimenta pimenta*; y de nombres comunes, pimienta, pimienta de tabasco, pimienta de Jamaica, pimienta gorda y pimienta. Pertenece a la familia Myrtaceae y es un árbol de hasta 20 m de altura y 40 cm de diámetro, con el tronco derecho, ligeramente acanalado, ramas ascendentes, copa irregular y densa; corteza externa lisa que se desprende en escamas muy delgadas y alargadas, pardo

verdosa o amarillenta con manchas moreno rojizas, corteza interna color crema amarillento o rosado, quebradiza, de sabor amargo y olor muy fragante. El grosor total de la corteza es de 4 a 6 mm; de madera albura de color amarillo rosado o crema amarillento, de sabor ligeramente amargo; de ramas jóvenes de sección transversal cuadrada, verde grisáceas a verde oscuras, sin lenticelas, con fina pubescencia cuando jóvenes, glabras con la edad; yemas de 3 a 7 mm, agudas, desnudas, de color pardo amarillento o verdoso, finamente pubescentes; hojas decusadas, simples; láminas de 6 x 2.5 a 21 x 7 cm, elípticas u oblongas, con el marco entero, ápice agudo o redondeado, base aguda a obtusa; haz verde oscura y brillante, envés verde pálido o amarillento, glabras en ambas superficies; las hojas despiden un fuerte olor fragante que perdura aun después de que se secan; flores en panículas axiliares de 6 a 12 cm de largo, con las ramas cimosas, finamente pubescentes; pedicelos de 1 a 5 mm o flores sésiles; flores actinomorfas, fragantes, de 6 mm de diámetro; cáliz verde, de 3 mm de largo; su distribución en México comprende los estados de Puebla, Veracruz, Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Campeche, Yucatán y Quintana Roo; habita los bosques tropicales subcaducifoleo, selvas altas y medianas perennifolias y subperennifolias; se encuentra a una altitud desde el nivel del mar hasta los 750 msnm; su madera se emplea localmente para construcciones rurales. Las hojas y la corteza se emplean contra el dolor de estomago, disentería y diarrea (Penington y Srukhán, 1998).

La *Pimenta dioica* presenta un amplio abanico de usos. En el campo medicinal se ha usado como anestésico, carminativo, estimulante y aromático, antidiarréico. Desde el punto de vista farmacológico muestra una notable actividad antifúngica y antioxidante; en alimentación se emplea para la preparación de salsas, adobos y conservas de carnes y elaboración de bebidas alcohólicas y no alcohólicas. El extracto de aceites esenciales obtenido de hojas o frutos se usa en perfumería y aromatización de alimentos (Tabla 1). La utilización más extendida de esta planta es como condimento, para lo que se usan los frutos desecados, que son muy aromáticos, y reúnen las características de aroma y sabor a clavo, canela y nuez moscada, por lo que en inglés se denomina allspace (Macias, 1988).

**Tabla 1. Porcentajes de composición del aceite esencial de la hoja del árbol masculino de pimienta (*Pimenta dioica*).**

<b>Compuesto</b>	<b>Porcentaje</b>
B-Mirceno	11.22
Limoneno	0.62
3-careno	1.28
Eucaliptol	3.07
Linalol	0.58
B-cariofileno	6.30
$\alpha$ -cariofileno	0.74
Eugenol	75.62
Oxido de cariofileno	0.57

## **8.2. Antioxidantes y anti-radicales**

"Es difícil en estos días no encontrar en una revista de ciencia o revista médica sin ver a un artículo sobre el papel de los radicales libres en las enfermedades humanas". Esta frase escrita en el año 1994 por los principales científicos en el campo de los radicales libres y antioxidantes, John Gutteridge y Halliwell Barry. Otra afirmación de los autores, que "Antioxidante es un término ampliamente utilizado, pero rara vez se define". Halliwell y Gutteridge hicieron la propuesta para definir un antioxidante como "cualquier sustancia que, cuando está presente en concentración baja en comparación con los de un sustrato oxidable, retrasa significativamente o previene la oxidación de ese sustrato" (Tirzitis y Bartosz, 2010).

Por otra parte, la validez del término "antioxidante" depende del medio ambiente de su acción, por ejemplo si tenemos en cuenta su acción en un sistema *in vitro* o *in vivo*. En este contexto una precisa definición de las condiciones del procesos en los que los antioxidantes se estudian, es algo importante (Tirzitis y Bartosz, 2010).

### **8.3. Procesos de oxidación en el organismo**

El cuerpo humano es un procesador de compuestos químicos que provienen de alimentos (850 Kg/año), agua (800 L/ año) y oxígeno (7,000 m<sup>3</sup>/año); requiere de una compleja mezcla de medicamentos y vacunas, dependiendo de la región geográfica de que se trate. Los alimentos que consumimos deben proveer de los nutrientes que necesitamos, como lípidos o grasas, carbohidratos simples y complejos, proteína, agua y minerales (Kikugawa, 2004).

La oxidación de las moléculas biológicas, membranas y tejidos, es inducida por el oxígeno activo y mediada por radicales libres, siendo la causa del aumento de la incidencia de enfermedades degenerativas en los seres humanos. El metabolismo oxidativo, proceso biológico normal, es capaz de generar radicales libres oxigenados, altamente reactivos. Estas especies con oxígenos activos que incluyen el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•</sup>), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el radical óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) y el oxígeno singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Además, la radiación cósmica y la radiación electromagnética de baja longitud de onda (por ejemplo los rayos gama) pueden dividir el agua en el organismo para generar el radical hidroxilo, OH<sup>•</sup>. Este radical, débilmente reactivo, una vez producido ataca a cualquiera molécula que esté cerca, siendo su vida media extremadamente pequeña y reaccionando en su punto de formación dejando tras de sí una secuela de reacciones en cadena, de radicales libres en propagación. Asimismo, cierta parte de los superóxidos son producidos por reacciones químicas, en las que muchas moléculas del cuerpo interactúan directamente con el oxígeno, para producir superóxido. Ejemplos de estas moléculas constituyen las catecolaminas, tetrahydrofolatos y algunos componentes de la cadena mitocondrial y otras cadenas de transporte de electrones. Esta producción de superóxido es inevitable (Castañeda et al., 2008).

### **8.4. Procesos de oxidación en los alimentos**

La oxidación de grasas y aceites es la reacción común de deterioro o pérdida de la calidad de los alimentos, y la ingesta de estos compuestos lipídicos causa estrés

oxidativo de las células del organismo. Los productos de la reacción de oxidación afectan las propiedades nutricionales, color, sabor y textura de los alimentos. Las causas principales de la oxidación son: la exposición de los alimentos ricos en grasas y aceites al oxígeno, aire, radiación, prooxidantes metálicos, temperaturas ambientales elevadas, y las propias enzimas del tipo lipooxigenasas. Esta reacción consta de tres etapas: la inicial, que no es percibida por el consumidor, seguida de una reacción en cadena o cíclica, hasta terminar en una compleja mezcla de productos tóxicos, olor desagradable tipo oxidado, colores oscuros y aspecto no deseable de los alimentos. Una vez iniciada la oxidación es casi imposible detenerla. Los antioxidantes naturales o agregados son los compuestos químicos principales que protegen la calidad del alimento, previniendo la oxidación lipídica. Se denominan suplementos antioxidantes a las vitaminas ( $\beta$ -caroteno ó A, E y C), polifenólicos (vitamina K), enzimas (catalasas, peroxidasas y dismutasa superperoxidasas) y minerales necesarios para que el sitio activo enzimático trabaje (selenio, manganeso, zinc y cobre) (Kikugawa, 2004).

### **8.5. Actividad antioxidante y atrapamiento de radicales**

Numerosos estudios han demostrado que la actividad antioxidante medida depende mucho del sistema de ensayo utilizado y recomiendan basar las conclusiones en al menos dos sistemas de prueba diferentes. La mayoría de los métodos de determinación de la actividad antioxidante caracteriza la capacidad comprobada del compuesto o producto para eliminar los radicales libres y / o a los complejos de iones metálicos que conducen el proceso de oxidación (Yanishlieva y Gordon, 2005).

Debe hacerse hincapié en que hay una gran diferencia entre "anti-radical" y la actividad "antioxidante" y que no coinciden necesariamente. De acuerdo con Burlakova y colaboradores (1975), la actividad anti-radical caracteriza la capacidad de los compuestos de reaccionar con los radicales libres (en una sola reacción de radicales libres), pero la actividad antioxidante representa la capacidad de inhibir el proceso de oxidación (que generalmente, al menos en el caso de los lípidos, implica

un conjunto de reacciones diferentes). En consecuencia, todos los sistemas de prueba con un radical libre estable (por ejemplo, DPPH, ABTS, etc) dan información sobre la captación de radicales o de la actividad anti-radical, aunque en muchos casos, esta actividad no se corresponde con la actividad antioxidante. Con el fin de obtener información acerca de la actividad antioxidante real con respecto a los lípidos o estabilización de alimentos, es necesario llevar a cabo el estudio sobre el producto real (aceite vegetal, lipoproteínas, etc.) (Tirzitis y Bartosz, 2010).

Actualmente, existen diversos métodos para determinar la actividad antioxidante, los cuales se basan en su capacidad para captar radicales libres. Entre ellos se pueden mencionar el uso del 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH), ácido 2,2', azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6- sulfónico (ABTS, prueba del estatus antioxidante total), la reacción con el óxido nitroso (prueba NO), diclorhidrato de N,N-Dimetilp-fenilendiamina (DMPD), poder antioxidante reductor férrico (Ferric Reducing/antioxidant Power: FRAP), generación de radicales superóxido: a) en leucocitos de rata, b) autooxidación de pirogalol, c) sistema hipoxantina/xantina oxidasa, Sistema NADH-fenazina metosulfat-O<sub>2</sub>-azul de nitrotetrazolio; generación de radical hidroxilo: sistema H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>+3</sup>-EDTA ascorbato, sistema ácido ascórbico-hierro EDTA; generación del radical peróxido de hidrógeno: sistema NADH-Microsomas hepáticos, sistema ABAP/Lisozima; generación del ácido hipocloroso (HOCl): Sistema Na OCl/ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, entre otros. Así como también el método de decoloración del β-Caroteno (Castañeda et al., 2008).

Los métodos que usaremos para nuestras determinaciones serán 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) y el método de decoloración del β-Caroteno. Para la determinación de la actividad anti-radical y antioxidante respectivamente.

1,1-difenil-2-picrilo- hidrazilo (DPPH) es un radical libre estable que tiene un electrón de valencia desapareado en un átomo del puente de nitrógeno. Al aceptar hidrógeno a partir de un donante correspondiente, sus soluciones tiende a perder su color violeta característico a amarillo y se lee absorbancias que van de 515-517 nm  $\lambda_{max}$

(Figura 1). Es uno de los métodos más usados para determinación de antirradicales (Sharma y Bath, 2009).

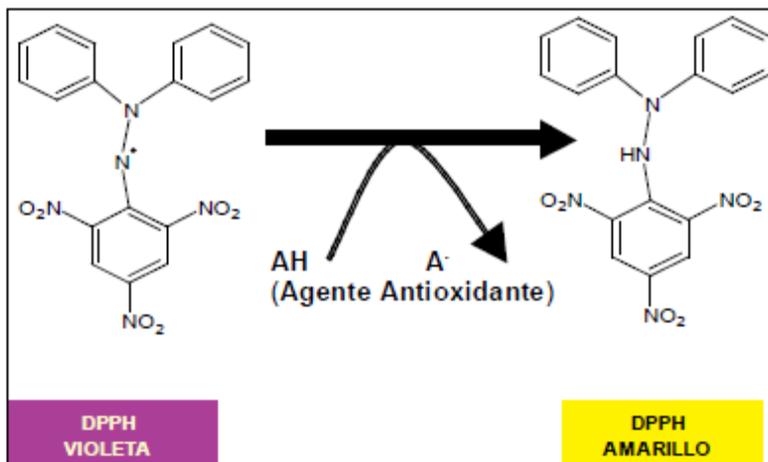


Figura 1. Mecanismo de reacción del antioxidante sobre DPPH.

### 8.6. Actividad antioxidante determinada por el método del blanqueamiento del $\beta$ -caroteno

El ensayo se basa en el blanqueamiento de la solución de  $\beta$ -caroteno y de la habilidad de los antioxidantes para inhibir la decoloración de la solución propiciada por la oxidación del ácido linoléico. El radical libre del ácido linoleico ataca al  $\beta$ -caroteno altamente insaturado. La presencia de los antioxidantes puede obstaculizar la extensión del blanqueamiento del  $\beta$ -caroteno neutralizando el radical libre linoleato y otros radicales libres formados en el sistema. De acuerdo a esto, la absorbancia decrece rápidamente en muestras sin antioxidantes, mientras que en presencia de antioxidantes la solución retiene el color y así la absorbancia por un largo período de tiempo. La absorbancia se lee a una  $\lambda$  de 470 nm (Rincón et al., 2011).

## 8.7. Compuestos fenólicos

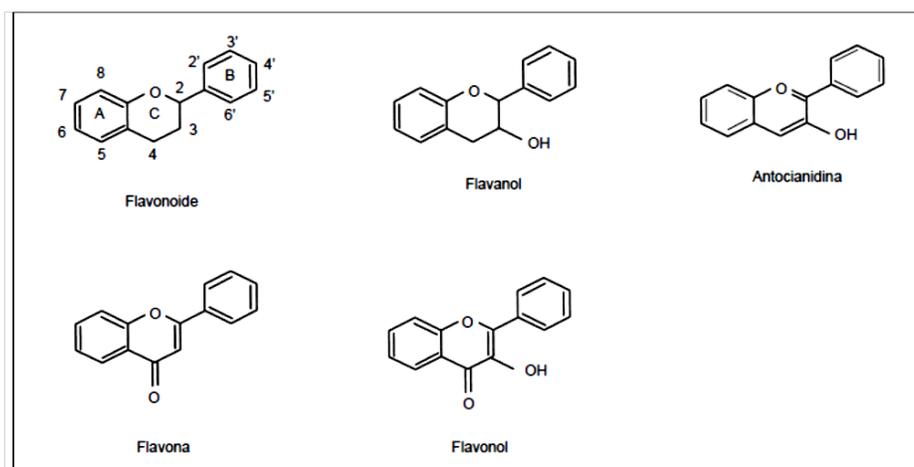
Los compuestos polifenólicos son los compuestos bioactivos antioxidantes más abundantes en la dieta. Se trata de un amplio grupo de compuestos, producto del metabolismo secundario en la plantas, poseen estructuras con anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante. Se pueden subdividir en cuatro grandes grupos; los ácido fenólicos, las ligninas, los taninos y los flavonoides (este engloba subgrupos como las flavonas, isoflavonas, antocianinas, entre otros).

Entre los compuestos polifenólicos extraíbles, podemos encontrar los flavonoides (principalmente flavanoles, flavonoles, flavanonas y antocianidinas), por ser el grupo de polifenoles presente de manera más extensa en los alimentos vegetales (Martínez, 2010). Estos protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc., contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Muñoz y Gutiérrez (2008) señalan que los antioxidantes naturales, en especial los flavonoides han mostrado un amplio rango de efectos biológicos incluyendo algunas funciones como: antibacterial, antiviral, antiinflamatoria y antialérgica.

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soya, consumidos en la dieta cotidiana, así también, en extractos de plantas como arándano, ginkgo biloba, cardo, mariano o crataegus (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Figura 2). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C.



**Figura 2. Principales grupos de flavonoides.**

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.

4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

Tres características estructurales son importantes para su función: a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi; b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3; c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5. La quercetina presenta las tres características, mientras que la catequina solo presenta la segunda y la diosmetina la primera (Martínez-Flórez et al., 2002 ).

Para la cuantificación de fenoles totales en los extractos de hoja de *Pimenta dióica* masculino se utilizará un método espectrofotométrico, basándose en un reacción colorimétrica de óxido reducción. El método empleado es el de Folin-Ciocalteu, que se fundamenta en su carácter reductor, y es el más empleado. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio y molibdeno. La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por cada 100 gramos de muestra seca (Singleton et al., 1999 y Kuskoski et al., 2005).

La cuantificación de flavonoles en los extractos, se llevará a cabo por espectrofotometría. El principio del método colorimétrico del cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) descrito por Chang *et al.* (2002), es la formación de complejos ácidos con los grupos "cetos" de C-4 y con los grupos hidroxilo de C-3 ó C-5 de las flavonas y flavonoles. Además, el  $AlCl_3$  forma complejos ácidos con los grupos orto-dihidroxil en los anillos A ó B de los flavonoides. Chang *et al.* (2002) menciona que los compuestos formados con los grupos orto-hidroxil (rutina, quercetina y mirceno) muestran una máxima absorción en la longitud de onda de 415-440 nm. Eligiendo la  $\lambda_{max}$  de 415 nm como la longitud de onda para la cuantificación.

## **9. Metodología**

### **9.1. Obtención de los extractos de hoja de *Pimenta dioica***

#### **9.1.1. Tratamiento de la muestra**

La hoja de pimienta fue muestreada en el municipio de Copainalá, Chiapas, con los productores de pimienta de la cooperativa Jotiquetz. El lote de muestra fue seleccionada fresca, siendo cuidadosamente seleccionada, descartando partes maltratadas y/o magulladas.

Las hojas seleccionadas fueron lavadas bajo el chorro de agua y se eliminó el exceso de agua con papel absorbente. Parte de esta muestra se puso a secar por más de 72 horas a temperatura ambiente, cubriéndola con papel estracel para evitar el contacto con la luz.

Posteriormente, a la muestra seca, se le realizó cortes pequeños de entre 1 y 2 centímetros de longitud. La muestra fue almacenada en frascos de color ámbar para evitar su exposición a la luz. La muestra, después de secarse en el laboratorio, fue triturada en una licuadora común y luego cubierta de la luz.

#### **9.1.2. Extracto metanólico**

Se pesaron 20 g de muestra seca de *Pimenta dioica* en una balanza analítica. Se colocó cada muestra en un frasco color ámbar de 1 L y se le adicionaron 450 mL de metanol absoluto. Posteriormente, la muestra fue macerada durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de la maceración se filtró utilizando vacío, por un papel filtro Whatman no. 1. El filtrado se recuperó en tubos Falcon que fueron cubiertos con papel aluminio. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. Con ayuda de matraz bola de 125 mL, previamente pesado ( $P_1$ ), se recuperó el sobrenadante obtenido de la muestra, se llevó a sequedad a presión reducida, usando una temperatura no mayor a 50 °C. Después de ser evaporado el solvente, se obtuvo el nuevo peso del matraz ( $P_2$ ) de manera correspondiente. Posterior al pesado, se resuspendió con metanol absoluto a un volumen de 15 mL. El producto

se recuperó en tubos Falcon de 50 mL, almacenándose en refrigeración y cubiertos con aluminio para su posterior análisis.

## 9.2. Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante fue determinada de acuerdo al método colorimétrico de  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico descrito por Burda y Oleszek (2001). Para la determinación se utilizaron 25 mL de agua destilada previamente saturada de oxígeno durante 15 min, se mantuvo en agitación y cuando se alcanzó la temperatura de 50°C se adició 100  $\mu$ L de Tween 20, al disolverse después de 5 minutos se adició 500  $\mu$ L de  $\beta$ -caroteno ( $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) cuando se formó la emulsión se agregó un volumen de 10  $\mu$ L de ácido linoléico, al transcurrir 4 min se agregó 100  $\mu$ L de muestra o estándar y se mantuvieron las emulsiones en agitación a 50°C durante toda la determinación. Para la preparación del blanco se sustituyó el  $\beta$ -caroteno por la misma cantidad de cloroformo. Las muestras control consistieron en sustituir la misma cantidad de la muestra por el disolvente en las que están diluidas las muestras. Se procedió a tomar las absorbancias a 470 nm tomando de referencia dicha lectura como tiempo cero, después a los 120 min. Durante ese lapso se tomaron lecturas cada 20 min para determinar su comportamiento gráficamente. La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición al control utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{AAO}\% = [1 - (A_s^0 - A_s^{120}) / (A_c^0 - A_c^{120})] \times 100$$

Donde AAO% es el porcentaje de actividad antioxidante,  $A_s^0$  es la absorbancia de la muestra al tiempo cero,  $A_s^{120}$  es la absorbancia de la muestra a los 120 min,  $A_c^0$  es la absorbancia del control al tiempo cero y  $A_c^{120}$  la absorbancia del control a los 120 min.

#### 9.4. Determinación de la actividad anti-radical

La técnica de DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazil) se realizó de acuerdo al método reportado por Burda y Oleszek (2001) el cual determina el potencial de una muestra en atrapar radicales libres a partir del radical DPPH. Para la determinación 1 mL de muestra diluida, estándar o blanco se adicionó a 2 mL de la solución de DPPH (10 mg·L<sup>-1</sup>). Cinco minutos después la absorbancia se midió a 517 nm. El espectrofotómetro se calibró con 2 mL de metanol y 1 mL del disolvente en el que la muestra se encuentra diluida. El blanco se leyó al tiempo cero, tomándose dicha lectura como de referencia. La actividad antiradical fue calculada como el porcentaje de decoloración de DPPH usando la siguiente ecuación:

$$AAr\% = 1 - \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs de referencia}} \times 100$$

#### 9.5. Cuantificación de flavonoles totales

Se utilizó el método del cloruro de aluminio para determinar flavonoles. La determinación de la concentración se realizó comparando con una curva patrón de quercetina. Se preparó una solución patrón de quercetina 0.1 mg·mL<sup>-1</sup>, disolviendo 10 mg en 100 mL de etanol al 80%, a partir de ésta se tomaron diferentes alícuotas en diferentes tubos de ensaye para obtener la curva patrón de 0, 20, 40, 60, 80 y 100 µg·mL<sup>-1</sup> con un volumen final de 0.5 mL. Para iniciar con la determinación a 0.5 mL de las soluciones estándar y de la muestra diluida se les adicionaron 1.5 mL de etanol al 95%, 0.1 mL de cloruro de aluminio al 10%, 0.1 mL de acetato de potasio 1M y 2.8 mL de agua destilada. Después se mantuvieron en incubación a temperatura ambiente por 30 min. La absorbancia de la mezcla reaccionante se midió a 415 nm. Para preparar el blanco se sustituyó la cantidad de cloruro de aluminio al 10% por agua destilada (Chang *et al.*, 2002).

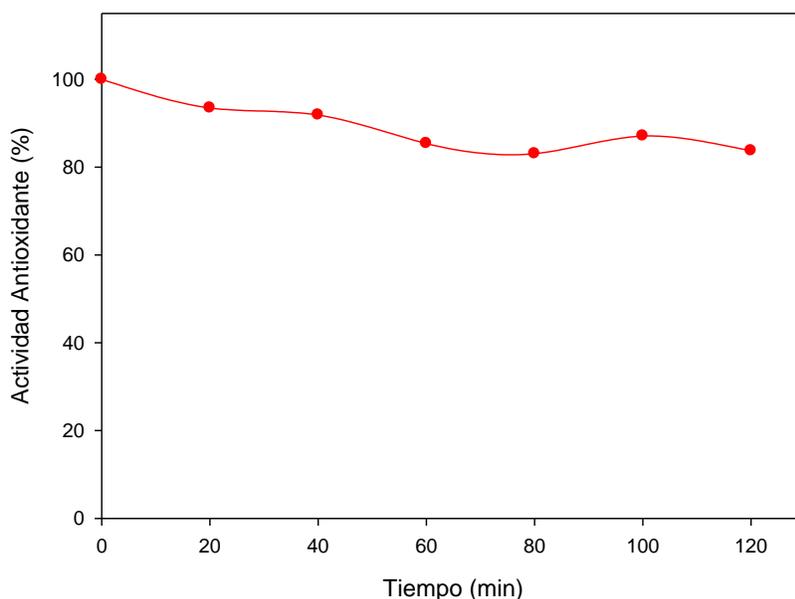
## 9.6. Cuantificación de fenoles totales

La concentración de fenoles totales fue determinada por el medio de la técnica de Folin Ciocalteau. Para realizar la cuantificación se realizó una curva estándar a partir de una solución patrón de ácido gálico 800 ppm, de la cual se tomaron alícuotas para obtener diferentes concentraciones: 0, 200, 300, 500, 600 y 800 ppm llevándolos a un volumen total de 500  $\mu$ L. Para la determinación se tomaron 0.1 mL de muestra, blanco o soluciones estándar (ácido gálico) se le adicionaron 4.2 mL de agua destilada y 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteau previamente diluido 1:10 con agua destilada, después de mezclar por un minuto se adicionó 1 mL de carbonato de sodio al 20% y 4.2 mL de agua destilada, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 2 horas. Después se midió la absorbancia a 765 nm. La concentración obtenida de fenoles totales se expresó en porcentajes en términos de de ácido gálico ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Singleton *et al.*, 1999).

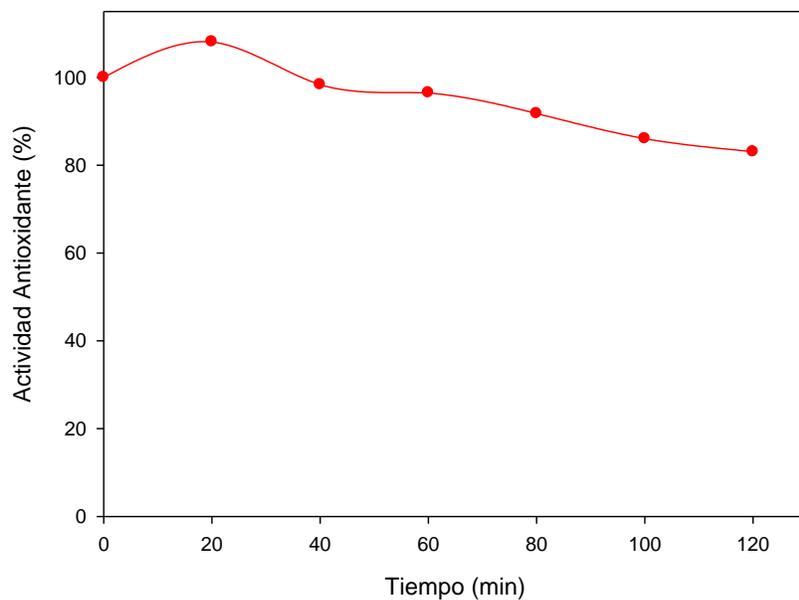
## 10. Resultados y discusión

### 10.1. Actividad antioxidante de extractos metanólicos de *Pimenta dioica*

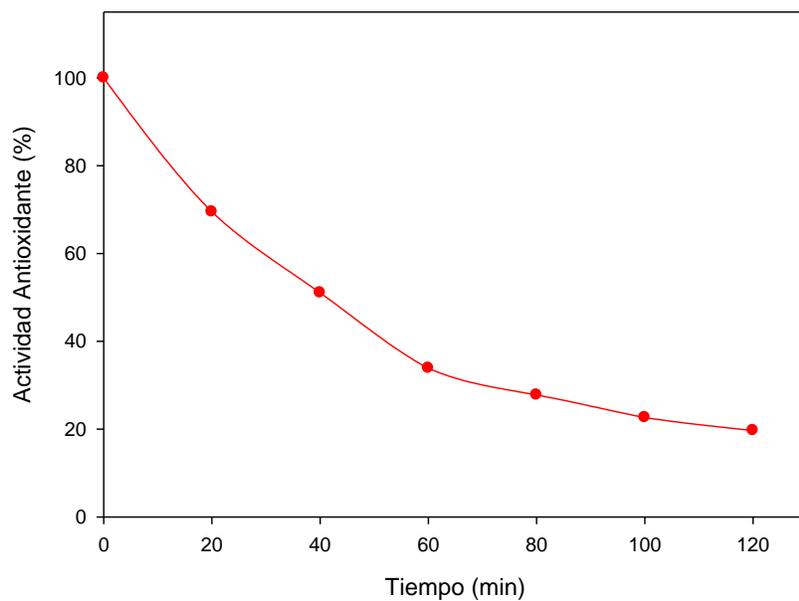
Se realizaron cinéticas para evaluar la actividad antioxidante (AAO) de los extractos metanólicos de *P. dioica*, con la finalidad de evaluar la tendencia y determinar si los tiempos reportados de 120 min eran suficientes para alcanzar la estabilidad en la prueba con estos extractos. En las figuras 3, 4, 5 y 6 se muestra la disminución de la absorbancia a lo largo del tiempo para diferentes concentraciones de extracto. Se observa que a concentraciones de extracto de 7.43 y 2.97  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 3 y 4), la actividad antioxidante se mantiene por arriba del 80% a lo largo de los 120 minutos de la cinética, lo que sugiere una gran capacidad antioxidante de los extractos crudos de los compuestos que se encuentran solubilizados en el metanol. A partir de 0.99  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 5), la AAO disminuyó drásticamente a partir de los 20 min. Se obtuvo el porcentaje de actividad más bajo, después de los 120 min, para la concentración de 0.37  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 6).



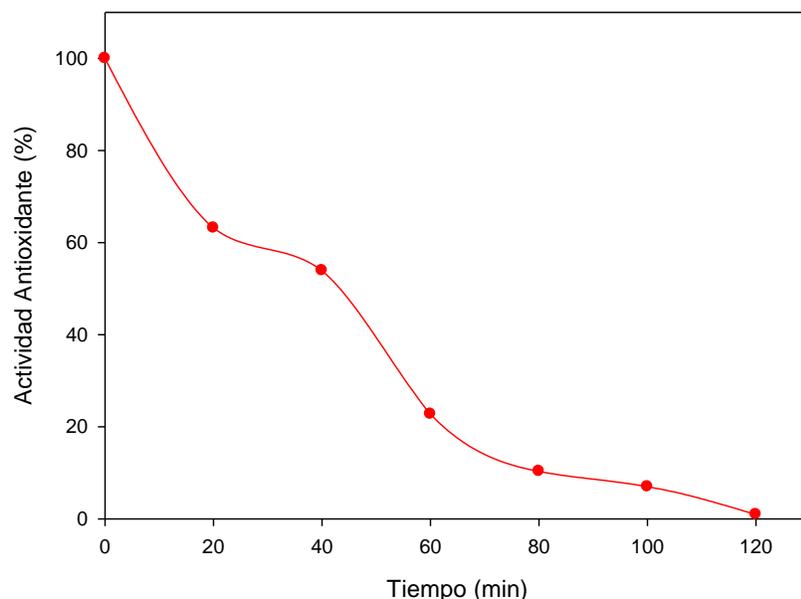
**Figura 3.** Cinética de oxidación de la emulsión  $\beta$ -caroteno-ácido linoléico en presencia de 7.425  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de extracto metanólico de hojas de pimienta macho.



**Figura 4.** Cinética de oxidación de la emulsión  $\beta$ -caroteno-ácido linoléico en presencia de  $2.97 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de extracto metanólico de hojas de pimienta macho.

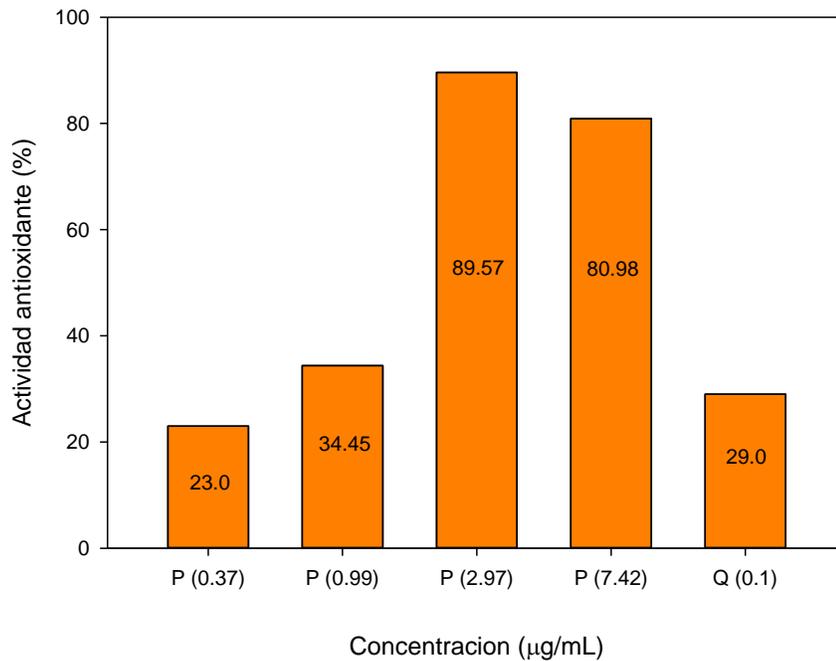


**Figura 5.** Cinética de oxidación de la emulsión  $\beta$ -caroteno-ácido linoléico en presencia de  $0.99 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de extracto metanólico de hojas de pimienta macho.



**Figura 6. Cinética de oxidación de la emulsión  $\beta$ -caroteno-ácido linoléico en presencia de  $0.37 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de extracto metanólico de hojas de pimienta macho.**

El resultado final obtenido en la evaluación de AAO de los extractos crudos de hoja de *Pimenta dioica* a diferentes concentraciones, arroja que a una concentración de  $7.42 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  se tiene una actividad antioxidante del 80.98% (Figura 7), esta es la mayor concentración empleada. Sin embargo, a la concentración de  $2.97 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , se obtiene una %AAO más elevada (89.57%). Este resultado sugiere que la concentración de oxígeno que se encuentra disuelto en la emulsión, es atrapado casi en su totalidad; esta reacción impide la oxidación del  $\beta$ -caroteno, es decir, se mantiene protegido por los compuestos antioxidantes presentes en el extracto.

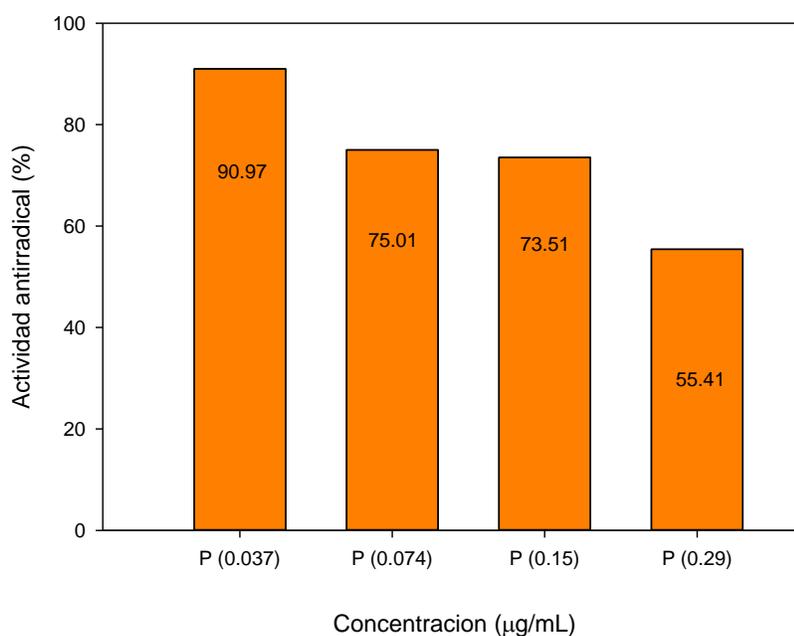


**Figura 7. Actividad antioxidante (%) de *Pimenta dioica* (P) comparado con quercetina (Q). Los números entre paréntesis son las concentraciones utilizadas para la prueba.**

Burda y Oleszek (2001) reportan un valor de actividad antioxidante de la quercetina de 63 %, pero aquí se obtuvo 29% de AAO. Castañeda (2008) reporta valores altos de %AAO de extractos vegetales como hojas de muñas (92.41 %AAO), corteza de canela (97.59% AAO), y menciona que estos valores tan altos se debe a que existe un efecto sinérgico de todos los compuestos presentes en los vegetales y resultan superiores a un compuesto puro.

## 10.2. Actividad anti-radical de extractos metanólicos de *Pimenta dioica*

Los resultados de la actividad atrapadora de radicales (%AAR) del extracto metanólico de hoja de *P. dioica* (Figura 8) muestran que al aumentar la concentración del extracto ésta disminuye. Sin embargo, los reportes sobre esta actividad antirradical señalan lo contrario.



**Figura 8. Actividad antirradical del extracto metanólico de *Pimenta dioica* a diferentes concentraciones.**

Analizando la metodología, se observó que el haber utilizado la mezcla antes de adicionar la muestra como si fuera la referencia, es decir, un antioxidante de uso común, ocasionó que los resultados fueran contrarios a lo esperado, por lo tanto, se recomienda utilizar, BHT o catequina como referencia para realizar la prueba de actividad antirradical. La determinaciones con estos estándares están en proceso.

### 10.3. Cuantificación de flavonoles y fenoles totales

En la cuantificación de fenoles totales, los extractos mostraron una concentración de 0.457 % y 0.108% de flavonoles (Tabla 2). La cantidad de flavonoides totales no se puede determinar por problemas presentados en la determinación de flavanonas que sumados con la cantidad de flavonoles, nos da la cantidad total de flavonoides. Para la cantidad de fenoles estaría representado como porcentaje de ácido gálico y para flavonoles como porcentajes de quercetina, que son los estándares usados.

**Tabla 2. Concentración de fenoles y flavonoles en los extractos metanólicos de *P. dioica*.**

<b>Metabolito</b>	<b>Concentración (%)</b>
Fenoles totales	0.457 %
Flavonoles	0.108 %

## 11. Conclusiones

Se pudo comprobar que el extracto metanólico de hojas de *pimenta dioica* tiene propiedades antioxidantes.

La actividad antioxidante cambia con respecto a la disminución de la concentración de muestra. A concentraciones por arriba de  $2.97 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  al menos en este caso, la actividad antioxidante no tiene mucha variación que va de un rango del 80-89 (%).

La capacidad del extracto de *pimenta dioica* de inhibir la oxidación del  $\beta$ -caroteno, se le puede atribuir a la presencia de los fenoles cuantificados entre ellos los flavonoles, aunque puede atribuírsele también al efecto sinérgico de otros compuestos que no se analizaron. Además, dado que la capacidad de un componente o sistema para actuar como antioxidante *in vitro* no significa necesariamente que pueda actuar de la misma manera *in vivo*.

Con estos datos se puede seguir trabajando y nos puede ayudar a comparar resultados futuros para tener la certeza que en realidad este vegetal, puede ser un buen recurso para ser explotado y encontrarle alguna aplicación en beneficio de la sociedad.

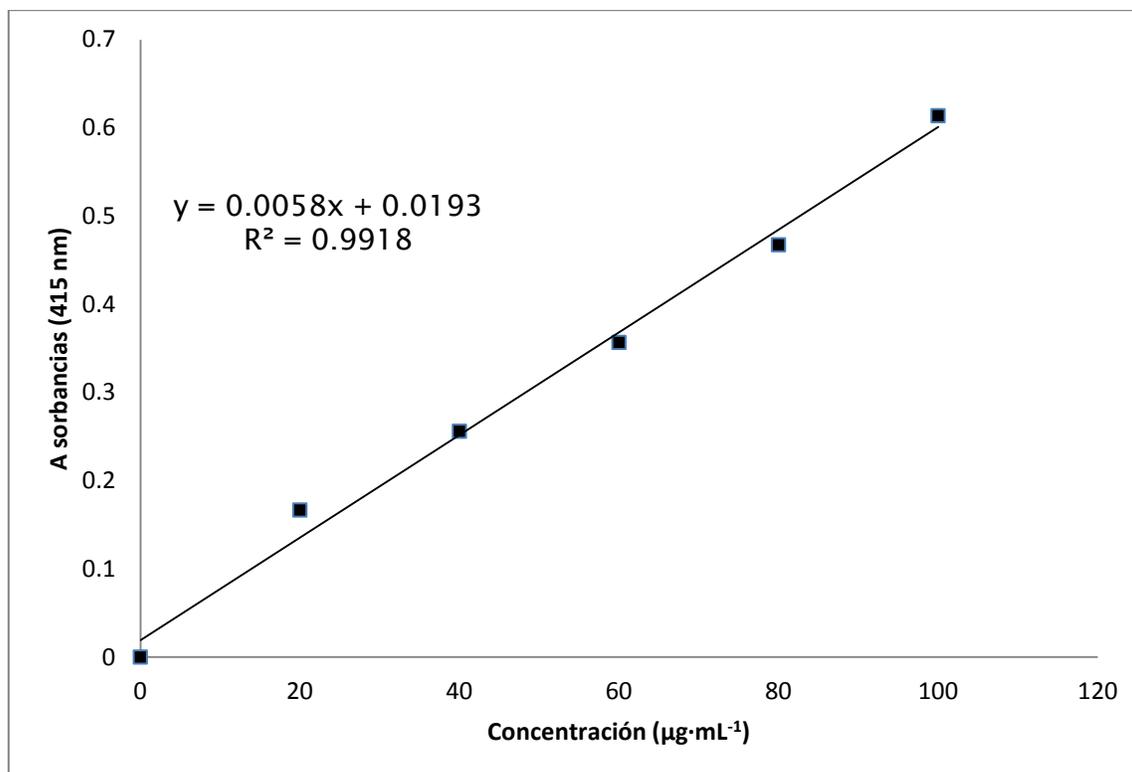
## 12. Bibliografía

- Asaolu MF, Oyeyemi OA y Olanlokun J (2009). Chemical Composition, Phytochemical Constituents and *in vitro* Biological Activity of Varios Extracts Of *Cymbopogon citratus*. Pakistan J Nut. 8: 1920-1922 .
- Burda S y Oleszek W (2001). Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. J. Agric. Food Chem., Polonia, 49: 2774-2779.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. J Food Drugs Anal. 10: 178-182.
- Castañeda C B, Ramos LL. E, Ibáñez VL (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Médico, Venezuela, 8: 54-72
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press.
- Kikugawa K (2004). Strategy in a living body to protect against oxidative stress-induced damage. Journal of Health Science, 50(4):443-455.
- Kuskosky EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidantes en pulpa de frutos. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, 25(4): 726-732.
- Macía, MJ, 1988, “la pimienta de Jamaica *pimienta dioica* (L.) merrill, *myrtaceae*, en la sierra norte de puebla”, Real jardín botánico ,CSIC. Madrid,56 (2): 337-349.
- Martínez SA (2010). Compuestos Polifenólicos (Extraíbles y No Extraíbles) En Alimentos de la Dieta Española: Metodología para su Determinación e Identificación. Memoria Doctoral, Universidad Complutense De Madrid; Facultad de Farmacia, Nutrición Y Bromatología II, Madrid.

- Martínez-Flórez JS, González-Gallego J, Culebras JM & Tuñón MJ (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 17, nº 6: 271-278.
- Makkar HPS, Norvsambuu T, Lkhagvatseren S & Becker K (2009). Plant Sencodary Metabolites in some Medicinal Plants of Mongolia Used for Enhancing Animal Health and Production. *Tropicultura* 27, nº 3: 159-167. Disponible Online; <http://www.tropicultura.org/text/v27n3/159.pdf>
- Miean KH & Mohamed S (2001). Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Rincón A, Pérez M, Bou R , Romero A (2011). Métodos para la determinación de la actividad antioxidante de vegetales. *Horizonte médico, Venezuela*, 74: 24-28.
- Rosales M, Pérez ME, Ponce M del C (2006). Propiedades anti-radicales libres de extractos de corteza de pino. *Maderas y bosques*, 12: 37-49.
- Sharma P, Bhat K (2005). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry, journal EL SEVIER*, 113 : 1202-1205
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152-178.
- Tirzitis y Bartosz(2010). Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. Department of Biochemistry and Cell Biology, University of Rzeszów Polonia, 57:139-142.
- Studium Press, 2005. v. 10, p. 1-14. (Phytotherapeutics - Review series)
- Yanishlieva N, Gordon M. antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas. Zaragoza: Acribia 2005.

### 13. Anexos

#### Anexo a: Curva patrón de flavonoles totales (Método de $\text{AlCl}_3$ )



**Anexo b: Curva patrón de fenoles totales (Folin-Ciocalteu).**

