



INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA

ÁLVAREZ GONZÁLEZ OBED

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD
ANTIRADICAL DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Ardisia sp*”**

PERÍODO DE REALIZACIÓN

ENERO-JUNIO 2013

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo General.....	4
3.2 Objetivos Específicos.....	4
4. CARACTERIZACION DEL AREA	5
4.1 Políticas y normas	5
4.2 Objetivos de la institución.....	5
4.3 Servicios que presta la institución	5
4.4 Descripción del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica	6
4.5 Funciones del departamento de Ingeniería Química y Bioquímica	6
5 PROBLEMAS A RESOLVER	9
6 ALCANCES Y LIMITACIONES	10
6.1 Alcances	10
6.2 Limitaciones.....	10
7. FUNDAMENTO TEÓRICO	11
7.1 <i>Ardisia sp.</i>	11
7.2 Metabolitos secundarios	14
7.2.1 Principales grupos de metabolitos secundarios.....	16
7.2.2 Propiedad antioxidante y antiradical de los compuestos fenólicos	18
8 METODOLOGÍA	21
8.1 Recolecta del Material Vegetal	21

8.2	Procesamiento del Material Vegetal	21
8.3	Obtención del Extracto Metanólico	21
8.4	Determinación del contenido de Fenoles Totales (método colorimétrico de Folin-Ciocalteu).....	22
8.5	Determinación del contenido de Flavonoides Totales (método colorimétrico de Cloruro de Aluminio).....	23
8.6	Evaluación de la actividad antioxidante (método colorimétrico de β -caroteno/ácido linoléico).....	24
8.7	Evaluación de la actividad antirradical (Ensayo del DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).	26
9	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
9.1	Cuantificación de fenoles totales y flavonoides totales	28
9.2	Actividad antirradical del extracto metanólico mediante el Ensayo del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	29
9.3	Actividad antioxidante del extracto metanólico mediante el Ensayo del β -Caroteno/Ácido Linoléico.	32
10	CONCLUSIONES.....	34
11.	BIBLIOGRAFÍA	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Hojas y Frutos de <i>Ardisia sp.</i>	12
Figura 2 Esquema general de la ruta metabólica de los metabolitos secundarios (Auriola y Huopalahti, 2003).....	15
Figura 3 Clases de alcaloides (Croteau et al., 2000).....	17
Figura 4 Estructura de fenol.....	18
Figura 5 Un antioxidante es un donador de electrones que neutraliza o estabiliza a los radicales libres (Velázquez-Paniagua et al., 2004).....	20
Figura 6 Curva patrón de Ácido Gálico.....	23
Figura 7 Reacción de quelación del ion Al ³⁺ con flavonoides	23
Figura 8 Curva patrón de Quercetina	24
Figura 9 Esquema de la reacción colorimétrica de la emulsión de β-caroteno y ácido linoléico en presencia y ausencia de sustancias antioxidantes	25
Figura 10 Esquema de la reacción colorimétrica de DPPH* en presencia de un compuesto con actividad antirradical	27
Figura 11 Actividad Antirradical de extractos metanólicos de <i>Ardisia sp</i> a diferentes concentraciones: C1= 1.125 mg/mL; C2= 0.5625 mg/mL; C3= 0.04 mg/mL; C4= 0.03mg/mL	30
Figura 12 Contenido de fenoles totales (mg/mL) en las diferentes concentraciones de <i>Ardisia sp</i> : C1= 1.125 mg/mL; C2= 0.5625 mg/mL; C3= 0.04 mg/mL; C4= 0.03mg/mL	30
Figura 13 Comparación de la Actividad Antirradical en términos de IC ₅₀ (mg/mL) entre los extractos de <i>Ardisia sp</i> y los estándares BHT, quercetina y rutina.....	31
Figura 14 Actividad Antioxidante de extractos metanólicos de <i>Ardisia sp</i> a diferentes concentraciones	32
Figura 15 Valores de IC ₅₀ para las diversas concentraciones de <i>Ardisia sp</i>	33

LISTA DE CUADROS

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Ardisia sp.</i>	11
Tabla 2 Propiedades medicinales de la especie <i>Ardisia</i> (Mejía y Kobayashi, 2005).....	13
Tabla 3 Contenido de fenoles y flavonoides totales en el extracto metanólico de <i>Ardisia</i> ..	28

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son los recursos naturales más importantes de la medicina tradicional. A lo largo de los siglos han sido utilizadas como remedios para las enfermedades del hombre, debido a que poseen sustancias con actividad biológica llamadas metabolitos secundarios; entre éstos compuestos destacan los compuestos polifenólicos que pueden ser útiles como medicamentos o aditivos alimentarios. En las plantas, estos metabolitos tienen un papel en la prestación de defensa contra plagas y patógenos, proporcionando protección contra los rayos UV y el estrés, o actuando como atractivos compuestos volátiles de olor o pigmentos. La aceptación de la medicina tradicional como una forma alternativa de cuidado de la salud y el desarrollo de resistencia microbiana a los antibióticos disponibles ha llevado a investigar la actividad farmacológica de las plantas medicinales. Estos compuestos polifenólicos han sido de principal interés de estudio por poseer propiedades como: antiagregantes plaquetarios, antirradicales, antioxidantes, antimicrobianas, antivirales, entre otras.

Existen abundantes fuentes de antioxidantes en diversos tipos de plantas, vegetales, frutas, hojas, cereales, plantas herbáceas, raíces y cortezas (Kahkonen et al., 1999; Yang et al., 2001). Algunos de los alimentos que se destacan por su alto contenido en polifenoles son el té, el vino y el cacao.

Las hojas jóvenes son la fuente principal de compuestos fenólicos, porque los sintetizan como defensa contra predadores herbívoros que las prefieren por su mayor calidad nutricional respecto a las hojas maduras. Sin embargo, eso no siempre ocurre porque no todos los metabolitos tienen el mismo comportamiento durante el desarrollo foliar (Loponen et al., 1997; Estiarte et al., 1999). Probablemente las hojas maduras sean más importantes para las plantas porque proveen carbohidratos a las estructuras protectoras y a los ápices de raíz y tallos (Krischik y Denno, 1983).

El estado de Chiapas se caracteriza por tener una abundante diversidad vegetal, dentro de esta flora la planta medicinal *Ardisia sp*, ha sido ampliamente estudiada y en la actualidad se conocen aproximadamente 500 especies. Estudios preliminares reportan actividades anti carcinogénicas, antitumorales, anti inflamatorias y antivirales de los extractos metanólicos de hojas adultas de *Ardisia sp*. En el presente trabajo se evaluó la capacidad antioxidante y antiradical que presentan los principales compuestos fenólicos de los extractos metanólicos de *Ardisia sp*.

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente las investigaciones referentes a los compuestos fenólicos y su actividad biológica están en constante desarrollo, los resultados que arrojan en cuanto a las propiedades benéficas han sido satisfactorios, los antioxidantes naturales han sido muy bien aceptados entre los consumidores y han potencializado el mercado de estos productos como complementos nutricionales. Aunado a esto está la problemática de la contaminación ambiental, la cual tiene múltiples efectos negativos sobre la salud, como consecuencia de esto nos exponemos a un sinnúmero de sustancias químicas que provocan diversas enfermedades, sobre todo aquellas relacionadas con los radicales libres que son causantes de enfermedades en la piel y diversas afectaciones en el cuerpo humano. Debido a esto, se tiene la necesidad de buscar nuevas fuentes, sobre todo de origen natural que contrarresten estos efectos. En la industria alimenticia se requiere de nuevos antioxidantes que ayuden a preservar la calidad de los alimentos, ya sea solos o en sinergia con los de actual uso. El género *Ardisia* posee son una fuente rica de compuestos fitoquímicos biológicamente potentes, por ejemplo bergenina, ardisina, quinonas, flavonoides, entre otros, lo que le confiere muchas propiedades medicinales como son: anticarcinogénica, antiviral, antioxidante, antiinflamatorio, entre otras (Howard, 2012).

El empleo de esta especie o sus constituyentes fitoquímicos no se han explorado completamente resultando en una subutilización de sus propiedades en la medicina y sobre todo como fuente de alimento. Debido a esto el interés principal es continuar con las investigaciones de la planta *Ardisia sp.* , debido a que sus diversas propiedades medicinales no han sido estudiadas, por lo que en este trabajo se evaluarán la actividad antioxidante y antiradical de los principales polifenoles de los extractos metanólicos. Un conocimiento de los aspectos metabólicos de los polifenoles contenidos en *Ardisia sp.* ha de permitir un mejor entendimiento de los múltiples beneficios de estos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antioxidante y anti radical de los extractos metanólicos obtenidos de las hojas adultas de *Ardisia sp.*

3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Obtener el extracto metanólico a partir del pulverizado de las hojas adultas de *Ardisia sp.*
- ❖ Determinar el contenido de fenoles totales en el extracto metanólico empleando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.
- ❖ Determinar el contenido de flavonoides totales en el extracto metanólico empleando el método colorimétrico del cloruro de aluminio.
- ❖ Evaluar la actividad antioxidante del extracto metanólico mediante el ensayo del β -caroteno/ácido linoléico.
- ❖ Evaluar la actividad anti radical del extracto metanólico mediante el ensayo del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

4. CARACTERIZACION DEL AREA

El proyecto de residencia profesional se desarrolló en los laboratorios de Biotecnología (Edificio “J”) y de Analítica (Edificio “Z”) del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; ubicados en la carretera Panamericana Km.1080.

4.1 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.

4.2 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.

4.3 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 postgrado 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 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.

4.4 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.

4.5 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 recursos y eventos que propicien 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 acabo dentro del área.

El presente proyecto de residencia profesional fue realizado en los laboratorios de Biotecnología y Analítica, 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 antiradical de los extractos metanólicos de hojas adultas de *Ardisia sp.* a diferentes concentraciones, determinando la relación entre la cuantificación de compuestos fenólicos y la efectividad para atrapar radicales libres, mediante el ensayo de β -caroteno/ ácido linoléico (actividad antioxidante) y el ensayo de la decoloración del DPPH (actividad antiradical).
- Los extractos vegetales contienen una amplia variedad de fenoles que varían en su composición desde ácidos fenólicos simples hasta taninos condensados, por lo cual es necesario definir los compuestos fenólicos mayoritarios en el extracto para así poder explicar su actividad biológica. Esto se hará cuantificando fenoles totales y flavonoides totales.

La mayor parte de las técnicas utilizadas para las determinaciones, están en función de factores como la temperatura, pH, el tiempo de extracción y la luz, por lo cual para un rendimiento óptimo y datos confiables sobre las determinaciones se tratará de minimizar en lo posible esos factores.

6 ALCANCES Y LIMITACIONES

6.1 Alcances

En el desarrollo del proyecto se logró evaluar la capacidad antioxidante y antiradical del extracto metanólico de *Ardisia sp.* mediante análisis espectrofotométricos, demostrando así que los metabolitos secundarios (fenoles y flavonoides) le confieren las propiedades benéficas que ya conocemos.

6.2 Limitaciones

A lo largo del proyecto se presentaron algunas limitaciones que iban desde condiciones ambientales que afectaban las muestras, hasta la falta de material y reactivos empleados en las pruebas, ya que sin estos era muy difícil comenzar con las determinaciones en los tiempos establecidos.

7. FUNDAMENTO TEÓRICO

7.1 *Ardisia*

Aproximadamente 500 especies de *Ardisia* se encuentran en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Varias de esas especies han sido utilizadas como plantas ornamentales, alimentos y medicinas. Por confusiones taxonómicas, la identificación correcta y la adquisición de materiales de plantas siguen siendo difíciles para algunas especies.

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *Ardisia sp.*

Nombre científico	<i>Ardisia sp.</i>
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Primurales
Familia	Myrsinaceae
Género	<i>Ardisia</i>

El huitumbillo como también es llamado es un árbol que llega a medir hasta 10 m de alto (Figura 1), de corteza grisácea, hojas alternas a ovadas o elípticas, lampiñas de flores blancas, y frutos redondos pequeños.

El género *Ardisia* es abundante y se encuentra distribuido desde Norteamérica hasta Sudamérica. En México se localiza en Jalisco, Querétaro, Oaxaca, Veracruz y Chiapas. En el estado de Chiapas se encuentra distribuido principalmente en los municipios de Escuintla, Ocozocoautla de Espinosa, Independencia, han sido identificadas siete especies de *Ardisia* endémicas del

estado, entre las que destacan *A. tacanensis* Lundell, *A. chiapensis* Brandegee, *A. escallonioides*, *A. crenata* Sims, *A. compressa*, entre otras. Debido a la deforestación y la quema de bosques y matorrales que se presenta cada año, estos arbustos tienden a desaparecer (Molina-Maldonado et al., 2012). En el Estado las flores de esta planta son utilizadas como adorno y el fruto es comestible, mientras que en el centro del país es utilizada como medicina para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y respiratorias (Indilí-Cruz, 2011).



Figura 1 Hojas y Frutos de *Ardisia sp*

Aunque las especies de *Ardisia* son una fuente rica de compuestos fitoquímicos biológicamente potentes, tales como bergenina y ardisina, la utilización de éstas especies o sus constituyentes fitoquímicos no se han explorado completamente resultando en una baja aplicación de sus usos. Dentro de las propiedades medicinales de éste género están el cáncer (*Ardisia cornudentata* Mez.), la diarrea (*Ardisia crispa*, *Ardisia odontophylla* Wall. y *Ardisia villosa* Roxb), la hepatitis (*Ardisia villosa*) y el reumatismo (*Ardisia crassa* CB Clark, *Ardisia crispa*, *Ardisia odontophylla* y *Ardisia villosa*). La tabla 2 muestra las diversas propiedades medicinales de las especies *Ardisia* que se han descrito en la literatura en los últimos 20 años. A pesar de la diversidad

taxonómica y fitoquímica del género, sólo un número limitado de especies de *Ardisia* han sido investigados por sus propiedades medicinales o describen en detalle en la literatura (Mejía y Kobayashi, 2005).

Tabla 2 Propiedades medicinales de la especie *Ardisia* (Mejía y Kobayashi, 2005).

Especies	Propiedades medicinales	Partes usadas de la planta
<i>Ardisia arborescens</i>	Febrífugo	Desconocida
<i>Ardisia colorata</i>	Enfermedad hepática, tos y diarrea,	Desconocida
	Antioxidante	Frutos
<i>Ardisia compressa</i>	Varias enfermedades hepáticas	Hojas
<i>Ardisia cornudentata</i>	Antiinflamatorio y analgésico	Toda la planta
<i>Ardisia crenata</i>	Contracciones de útero, Agregación	Rizomas
	Agregación plaquetaria y disminución de presión arterial	Toda la planta
	Inhibición de cAMP	Raíces
	Actividad antitrombina	Desconocida
<i>Ardisia crispa</i>	Antimetástica y antitumoral	Desconocida
<i>Ardisia elliptica</i>	Antibiótico	Hojas
	Antiviral	Ramas
<i>Ardisia iwahigensis</i>	Actividad citotóxica	Ramas y hojas
<i>Ardisia japónica</i>	Inhibición 5-Lipoxigenasa y antialérgica	Rizomas
	Anti-VIH	Partes aéreas
	Antioxidante	Toda la planta
	Anticarcinogénico (pancreático y otros tipos)	Toda la planta
	Diabetes mellitus Tipo 2	Toda la planta
<i>Ardisia mamillata</i>	Infección de vías respiratorias y trastornos menstruales	Raíces
<i>Ardisia pusilla</i>	Función inmunológica y actividad antitumoral	Desconocida
<i>Ardisia sieboldii</i>	Inhibición 5-Lipoxigenasa	Corteza
<i>Ardisia silvestris</i>	Cólico y malestar estomacal	Hojas
<i>Ardisia teysmanniana</i>	Antimicrobiana	Hojas

Indilí-Cruz (2011) reporta actividad antimicrobiana de extractos de hojas y frutos de *Ardisia sp* sobre dos bacterias (*Staphylococcus aureus* y *S. epidermis*). Los extractos acuosos de las hojas de *Ardisia compressa* inhibieron la carcinogénesis de hígado en células de ratas (González de Mejía *et al.* 2002) y tuvieron efecto supresor en células de cáncer de colon (González de Mejía *et al.* 2006). En *Ardisia japonica* se ha encontrado bergenina, un glucósido triterpénico que tiene actividad moderada contra el virus VIH (Piacente *et al.* 1996) y contra el virus PTP1B (Li *et al.* 2005). Un estudio químico preliminar en *Ardisia escallonioides*, nativa de Chiapas, demostró que existe la presencia de glucósidos triterpénicos en las hojas jóvenes de esta planta desarrollada en su hábitat natural (Molina- Maldonado *et al.* 2006).

7.2 Metabolitos secundarios

El metabolismo en los organismos vivos, es un gran grupo de reacciones bioquímicas catalizadas y reguladas por enzimas que producen energía en forma de ATP, producen sustancias necesarias para el crecimiento y el desarrollo de tejidos, y ayudan al organismo a sobrevivir en circunstancias diferentes.

Los compuestos producidos en el metabolismo se llaman metabolitos, estos pueden ser primarios o secundarios, dependiendo del origen biosintético y función bioquímica de dichos compuestos. Los primarios son los esenciales para todas las formas de vida, estos compuestos incluyen los carbohidratos, grasas, proteínas y ácidos nucleicos que son necesarios para crear y mantener la vida. Por lo general están involucrados en la regulación de la energía de los organismos, con el crecimiento y desarrollo de los tejidos. En cambio los metabolitos secundarios son más limitados, en las plantas pueden tener un papel en la prestación de defensa contra plagas y patógenos, proporcionando protección contra los rayos UV y el estrés, o actuando como atractivos compuestos volátiles de olor o pigmentos. Las reacciones que implican metabolitos secundarios producen una enorme selección de compuestos, algunos de ellos sustancias que pueden ser farmacológicamente activos en humanos y útiles como medicamentos o aditivos alimentarios.

Las vías de modificación y la síntesis de hidratos de carbono, proteínas, grasas y ácidos nucleicos son los mismos en todos los organismos, además de variaciones menores. Además, la biosíntesis de la mayoría de los metabolitos secundarios comienza a partir de un grupo relativamente pequeño de compuestos, que se modifican en un número ilimitado de compuestos a través de varias vías de síntesis (Figura 2) (Auriola y Huopalahti, 2003).

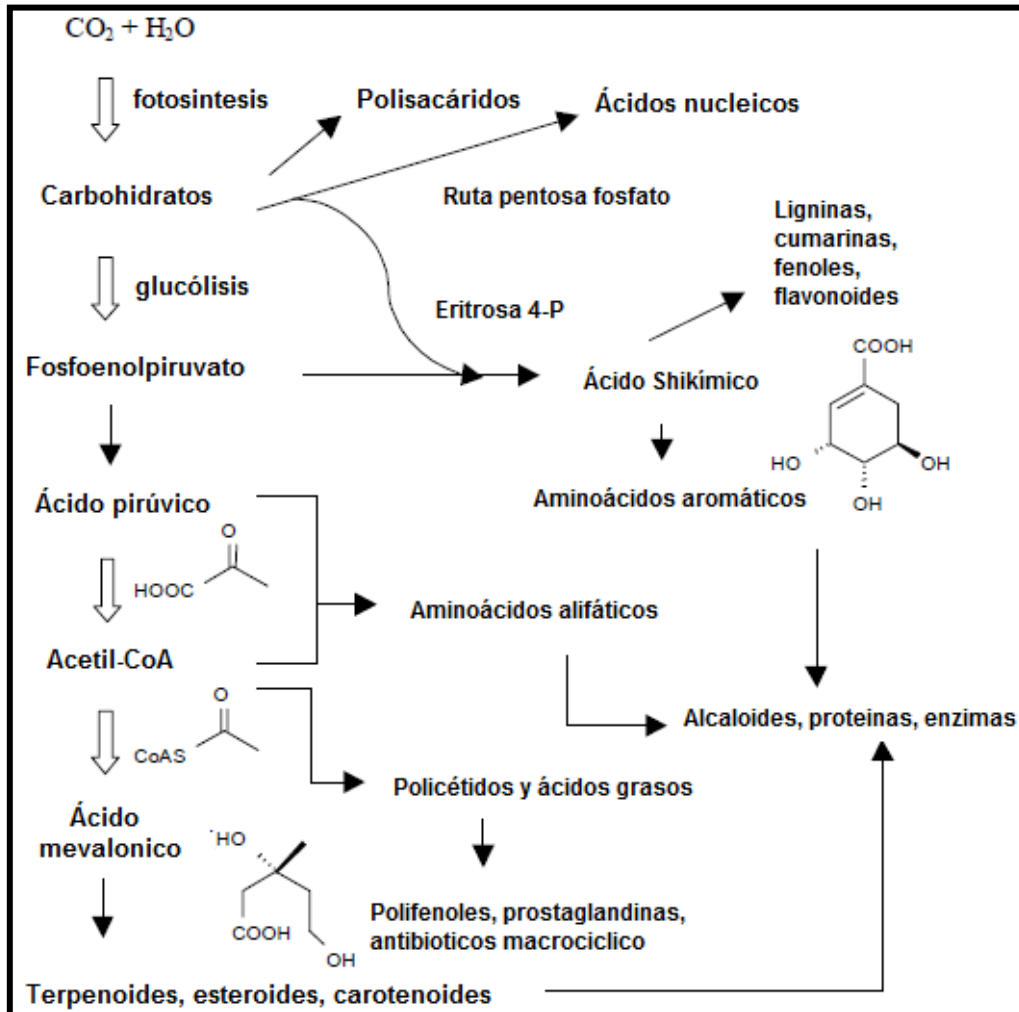


Figura 2 Esquema general de la ruta metabólica de los metabolitos secundarios (Auriola y Huopalahti, 2003)

A continuación se enlistan los principales precursores de los metabolitos secundarios:

- **Ácido Shikímico.** El ácido shikímico, por la ruta metabólica que lleva su nombre, da origen a muchos compuestos aromáticos, entre ellos los aminoácidos, los ácidos cinámicos y algunas estructuras polifenólicas.
- **Acetato.** Es el precursor de los ácidos grasos y de los policétidos en la ruta del acetato-malonato, y los terpenos o isoprenoides son sintetizados en la ruta del acetato-mevalonato.
- **Aminoácidos.** Son precursores de los alcaloides y de los antibióticos peptídicos.
- **Acetil- Coenzima A.** Es el precursor de los terpenos naturales, las unidades de acetato activo (acetil-Coenzima A) se condensan y transforman para originar ácido mevalónico, unidad de cinco átomos de carbono, específica de la biosíntesis de terpenos.

7.2.1 Principales grupos de metabolitos secundarios

7.2.1.1 Terpenos

Los terpenos o terpenoides son derivados por fusión repetitiva de cinco átomos de carbono y unidades ramificadas basadas en esqueleto del isopentano. Estos monómeros generalmente son referidos como unidades de isopreno porque la descomposición térmica de muchas sustancias terpenoides produce al gas alqueno isopreno como producto. Además, bajo ciertas condiciones químicas adecuadas pueden inducir al isopreno a polimerizarse en múltiplos de cinco carbonos, generando numerosos esqueletos terpenoides. Son clasificados por el número de unidades de cinco carbonos que contienen.

7.2.1.2 Compuestos nitrogenados

Los alcaloides son los compuestos básicos que contienen nitrógeno y están ampliamente distribuidos en grupos de diferentes plantas. Son farmacológicamente activos, se derivan de los aminoácidos que contienen uno o más átomos de nitrógeno heterocíclicos. Normalmente son agrupados sobre la

base del anillo presente en el sistema (Figura 3). Muchos de los alcaloides se derivan directamente de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina, y triptófano (Croteau et al., 2000).

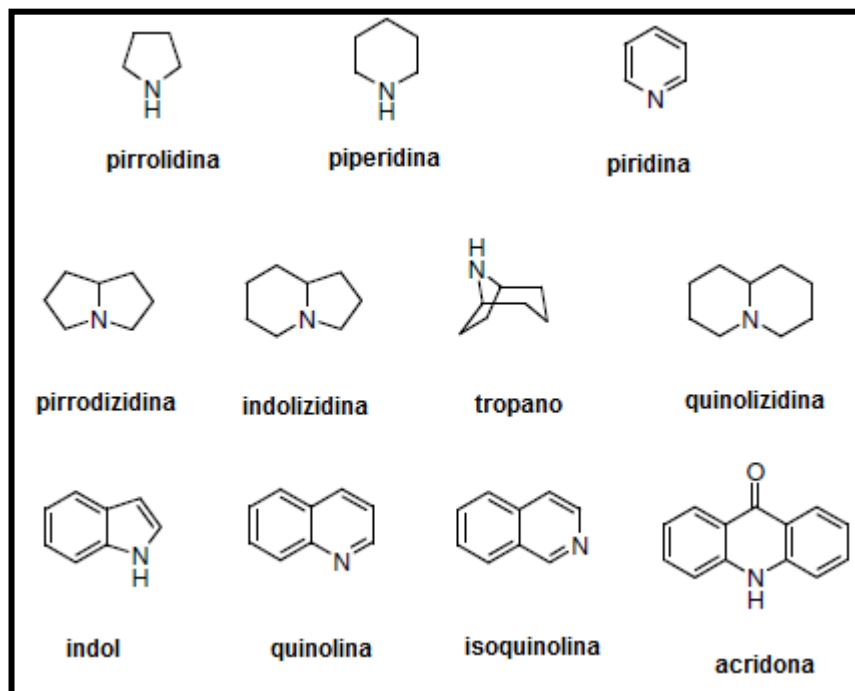


Figura 3 Clases de alcaloides (Croteau et al., 2000).

Los alcaloides en las plantas sirven como agentes quimioprotectores, antiherbívoros o como reguladores del crecimiento, por lo tanto el hombre ha utilizado a los alcaloides a lo largo de la historia en forma de extractos de plantas para venenos, narcóticos, estimulantes y medicamentos. Debido a éstas propiedades se ha abusado de estos compuestos, por ejemplo los más comunes; quinina, cafeína o la nicotina, los más potentes; la cocaína, morfina y estricnina (Croteau et al., 2000).

7.2.1.3 Compuestos fenólicos

Los polifenoles son compuestos que se caracterizan poseer en su estructura química un anillo aromático de al menos 6 carbonos que lleva uno o más grupos hidroxilo (Figura 4). Los fenoles se dividen en varios grupos diferentes, que se distinguen por el número de átomos de carbono constitutivos en conjunción con la

estructura del esqueleto fenólico básico (fenoles simples (C6)), ácidos benzoicos, fenilpropanoides (C6C3) y flavonoides (Croteau et al., 2000).

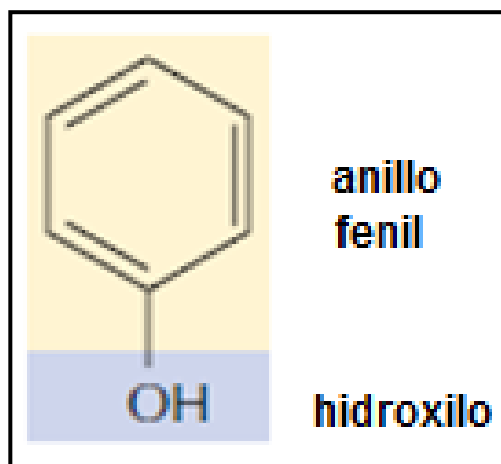


Figura 4 Estructura de fenol

Los flavonoides son pertenecientes a un grupo de los compuestos fenólicos, que se clasifican como flavonoles, flavononas, flavonas, flavanoles y las isoflavonas de acuerdo con las posiciones de los sustitutos presentes en la molécula. Estos compuestos se encuentran propagados en la fotosíntesis de las células vegetales, se pueden hallar en frutas, verduras, nueces, semillas, tallos y flores, así como el té, el vino, el propóleo y la miel. La función de los flavonoides en las flores es proporcionar colores atractivos para los polinizadores de plantas. En las hojas, estos compuestos tienen la función de promover la supervivencia fisiológica de la planta, que lo protege de, los hongos patógenos y la radiación UV-B. Además, están implicados en la fotosensibilización, transferencia de energía, las acciones de las hormonas de crecimiento de plantas, el control de la respiración y la determinación de la fotosíntesis, la morfogénesis y el sexo.

7.2.2 Propiedad antioxidante y antiradical de los compuestos fenólicos

El oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia, representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular, al mismo tiempo que puede causar un peligro potencial debido a las especiales características de

este gas, responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos, dotados de una alta reactividad, llamados especies oxigénicas reactivas (ROS, de sus siglas en inglés), los cuales son radicales libres, es decir especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado en un nivel energético superior y que les confiere una alta e indiscriminada reactividad (Hernández y Prieto, 1999).

Las ROS pueden ser radicales (ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), alcoxilo ($RO\cdot$), piróxilo ($ROO\cdot$) y óxido de nitrógeno ($NO\cdot$) y no radicales (peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno molecular ($\cdot O_2$) y peroxinitrito ($ONOO\cdot$). Además pueden tener un origen tanto endógeno como exógeno. Las fuentes endógenas pueden ser; la cadena respiratoria, donde la reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de estos compuestos, las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos) que utilizan el sistema de la NADPH oxidasa generando directamente ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). La autooxidación de compuestos de carbono reducido (aminoácidos, proteínas lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos), y la activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario (hipoxantina y xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamino oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxigenasa). Las fuentes exógenas de radicales libres pueden ser: ambientales (radiación electromagnética, luz solar, ozono, tabaco), farmacológicas (xenobióticos, drogas) o nutricionales (González et al., 2001).

Una herramienta útil contra el estrés oxidativo, es que el organismo responde con la defensa antioxidante, de ahí el interés que existe, hoy en día, por estos agentes, definidos como cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de ese sustrato, protegiendo a los sistemas biológicos frente a los efectos perniciosos de las reacciones que causan estas oxidaciones excesivas (Michalak, 2006).

Se debe destacar que hay una gran diferencia entre actividad antirradical y actividad antioxidante y que no necesariamente coinciden. La actividad antirradical se caracteriza por la capacidad de los compuestos para reaccionar con los

radicales libres (en una sola reacción de radicales libres) y la actividad antioxidante representa la capacidad de inhibir el proceso de oxidación (que por lo general, al menos en la caso de los lípidos, es un conjunto de reacciones diferentes) (Tirzitis y Bartosz, 2010).

La concepción de la acción antioxidante de los compuestos fenólicos no es nueva, como anteriormente se mencionó los compuestos fenólicos poseen esta actividad debido a su gran tendencia a quelar metales, los grupos hidroxilo y carboxilo que poseen estos, tienen la capacidad de unirse especialmente al hierro y al cobre. Las raíces de las plantas expuestas a muchos metales pesados transpiran altos niveles de compuestos fenólicos, los cuales pueden inactivar iones de hierro por su acción quelante y adicionalmente la eliminación de la superóxido (Michalak, 2006).

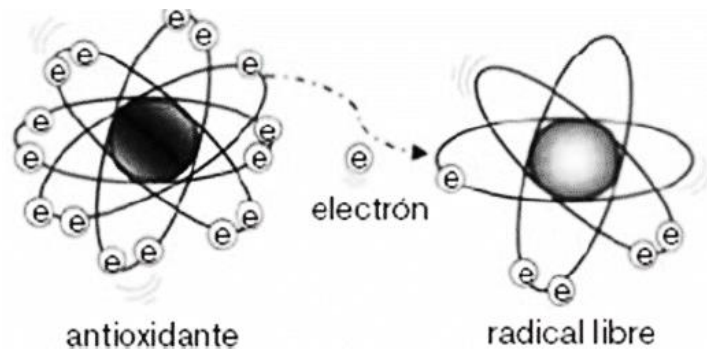


Figura 5 Un antioxidante es un donador de electrones que neutraliza o estabiliza a los radicales libres (Velázquez-Paniagua et al., 2004)

8 METODOLOGÍA

8.1 Recolecta del material vegetal

La planta *Ardisia sp.* fue colectada aleatoriamente en ecosistemas naturales del municipio de Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas, México; cuyas coordenadas geográficas son 16° 45" N y 93° 22" W. Las muestras colectadas se transportaron en bolsas de plástico negras protegidas de la luz al laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez para su posterior tratamiento.

8.2 Procesamiento del material vegetal

Las muestras colectadas se limpiaron y enjuagaron con abundante agua, se secaron con toallas de papel y se separaron los diferentes órganos en partes aéreas (tallos y hojas) y raíces, se congelaron y liofilizaron; posteriormente las muestras fueron molidas por separado en un mortero y el pulverizado se depositó en frascos de color ámbar con tapa y almacenados en oscuridad a temperatura ambiente.

8.3 Obtención del extracto metanólico

Se pesaron 20g del material pulverizado y se colocaron en un frasco color ámbar de 1L. Dado que los compuestos fenólicos y flavonoides son de naturaleza polar se utilizó metanol para su extracción en un volumen de 450 mL. Con el fin de liberar los compuestos fenólicos contenidos en la membrana celular la mezcla fue sometida a sonicación por 2 horas a temperatura ambiente, se filtró al vacío usando papel Whatman No.1 y posteriormente se centrifugó a 4,000 rpm durante 15 minutos.

Los extractos se concentraron con un rotavapor Buchi R-120 a una temperatura de 45 °C; el residuo se resuspendió en 20 mL de metanol para su almacenamiento a -20°C hasta su uso.

8.4 Determinación del contenido de Fenoles Totales (método colorimétrico de Folin-Ciocalteu)

La concentración de fenoles totales se determinó por el método descrito por Singleton & Rossi (1965) utilizando ácido gálico como referencia, el cual se fundamenta en el empleo del reactivo de Folin-Ciocalteu, que mezcla ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, los cuales se reducen para oxidar a los fenoles, en una mezcla de óxido de tungsteno y molibdeno, transformando la solución a color azul. Esta coloración presenta su absorción máxima alrededor de los 765 nm y es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos en la muestra.

A 0.05 mL de muestra se le adicionaron 2.1 mL de agua destilada y 0.25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, después de mezclar durante un minuto se añadieron 0.5 mL de una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20% y 2.1 mL de agua destilada. La mezcla se dejó en reposo durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. La absorbancia fue medida a 765 nm.

Los resultados se expresan como mg de equivalentes de ácido gálico/g de muestra. Para ello se obtuvo la correspondiente recta patrón obtenida tras aplicar el método a soluciones de ácido gálico de concentraciones conocidas: 0, 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1050 ppm (figura 6).

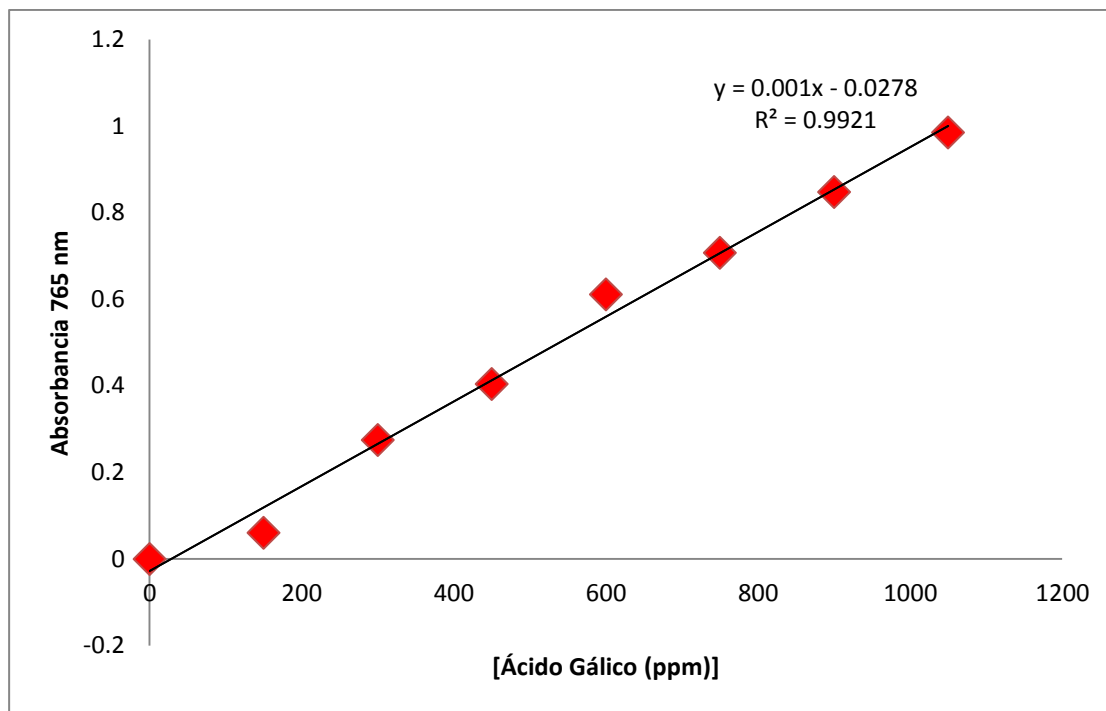


Figura 6 Curva patrón de Ácido Gálico

8.5 Determinación del contenido de Flavonoides Totales (método colorimétrico de Cloruro de Aluminio)

Para determinar el contenido de flavonoides totales se utilizó la formación del complejo flavonoide- AlCl_3 en medio metanólico (Chang *et al.*, 2002), los extractos fueron previamente diluidos en proporciones de 1:100 para obtener lecturas de absorbancia dentro de las curvas de calibración (figura 7).

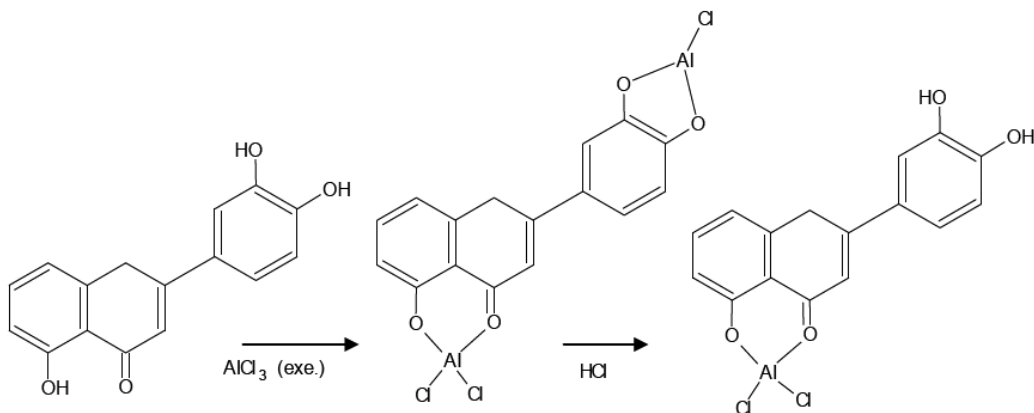


Figura 7 Reacción de quelación del ion Al^{3+} con flavonoides

A 0.5 mL de muestra diluida se agregaron 1.5 mL de metanol al 95%, 0.1 mL de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 10%, 0.1 mL de acetato de potasio 1 M y 2.8 mL de agua destilada. La mezcla se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 30 min, finalmente la absorbancia fue medida a 415 nm.

El contenido de flavonoides totales fue calculado como mg equivalentes de quercetina/g de extracto comparando los datos con una curva patrón de una solución stock de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de quercetina, obtenida disolviendo 5 mg en 50 mL de metanol y diluyendo a 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

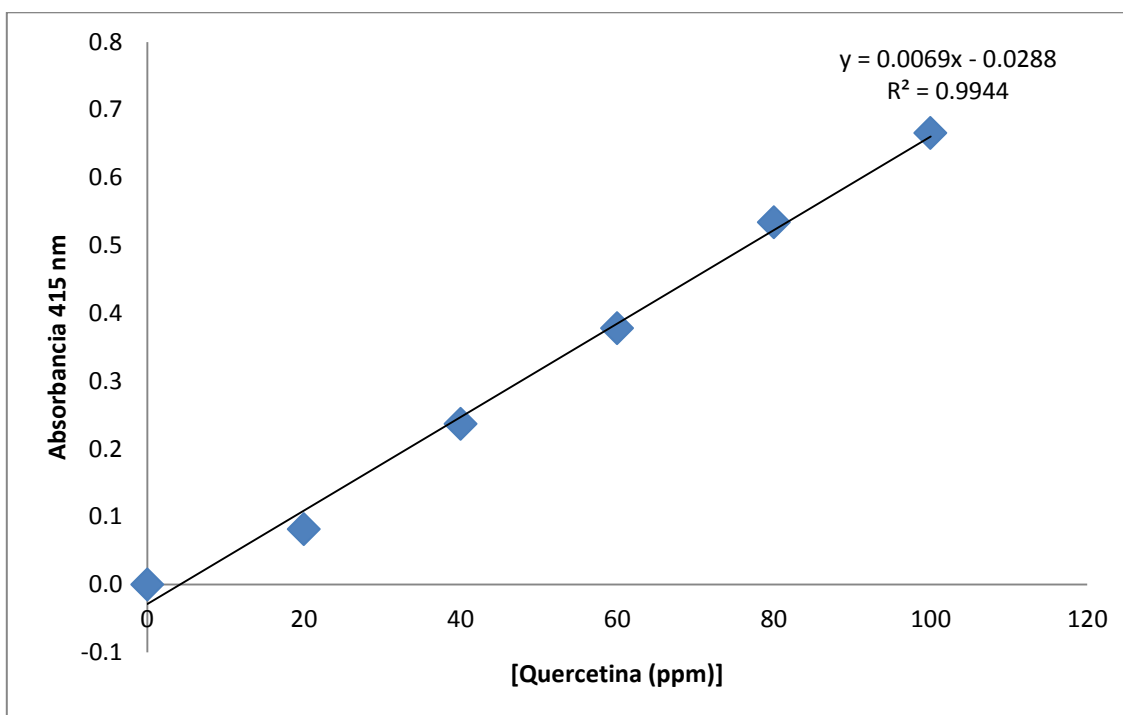


Figura 8 Curva patrón de Quercetina

8.6 Evaluación de la actividad antioxidante (método colorimétrico de β -caroteno/ácido linoléico)

La prueba se fundamenta en la protección contra la oxidación de una emulsión de β -caroteno y ácido linoléico expuesta a un medio oxidante. En presencia de una sustancia antioxidante la emulsión se estabiliza o se decolora muy lentamente, sin embargo, en ausencia de un antioxidante la emulsión se decolora rápidamente

(Burda y Oleszek; 2001). Es decir la actividad antioxidante es evaluada, según su efecto protector sobre la decoloración de la emulsión de β -caroteno-Ácido linoléico bajo el efecto combinado de la luz, oxígeno y calor.

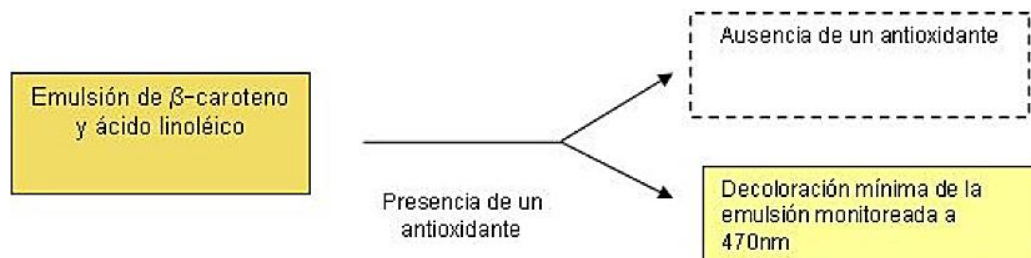


Figura 9 Esquema de la reacción colorimétrica de la emulsión de β -caroteno y ácido linoléico en presencia y ausencia de sustancias antioxidantes

Se inició con la preparación de una solución β -caroteno-Tween 20 (denominada solución A) de la siguiente manera: Se adicionaron 2.5 mL de Tween 20 y 2.5 mL de una solución stock de β -caroteno ($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) a un matraz aforado de 25 mL, el volumen fue completado con cloroformo y se refrigeró hasta su uso.

A un matraz Erlenmeyer se le adicionó 1 mL de solución (A), tras retirar el cloroformo por evaporación se agregaron 10 μL de ácido linoléico y 25 mL de agua destilada (previamente saturada de oxígeno y con una temperatura de 50 $^{\circ}\text{C}$). La emulsión se mantuvo en agitación a una temperatura de 65 $^{\circ}\text{C}$ durante toda la determinación. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado. Al transcurrir 4 min se agregó 100 μL de muestra o estándar, este tiempo fue considerado como t_{cero} . Las lecturas se tomaron a 470 nm a los tiempos: 0, 10, 30, 60, 90 y 120 minutos.

Se preparó otra emulsión (denominada control) de la misma forma descrita anteriormente pero sustituyendo la muestra por la misma cantidad del disolvente en que están diluidas, en este caso metanol.

Para calibrar el espectrofotómetro a 470 nm se empleó una solución obtenida a partir de la mezcla de 10 μL de ácido linoléico, 100 μL de Tween 20 y 25 mL de

agua destilada (oxigenada y calentada a 50°C) en un matraz Erlenmeyer, dicha solución fue sometida a agitación vigorosa a una temperatura de 65°C durante 10 minutos.

La actividad antioxidante se calculó de acuerdo al porcentaje de inhibición de degradación del β -caroteno relativo a un control, empleando la velocidad de degradación, según la ecuación de Dawidowicz & Olszowy (2010):

$$\%AA = \left[\frac{DR_c - DR_m}{DR_c} \right] \times 100$$

En donde:

$\%AA$ = porcentaje de actividad antioxidante.

DR_c = velocidad de degradación del β -caroteno en el control = $\{[\ln(a/b)]/t\}$.

DR_m = velocidad de blanqueamiento del β -caroteno con extracto o estándar = $\{[\ln(a/b)]/t\}$.

a = absorbencia en t_{cero} .

b = absorbencia a un tiempo definido (por ejemplo a 10, 20, ..., hasta 120 min.).

t = tiempo (minutos).

8.7 Evaluación de la actividad antirradical (Ensayo del DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

Este método se basa en la reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) por los antioxidantes de la muestra. El compuesto DPPH se caracteriza por poseer un electrón desapareado que es un radical libre, estabilizado por resonancia. Por esta propiedad, el DPPH se utiliza como material de referencia para determinar el poder antioxidante de una sustancia por captura de radicales libres. Presenta una coloración violeta intensa que absorbe radiación a 517 nm, por lo que su concentración se puede determinar por métodos espectrofotométricos. En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, que se traduce en la disminución de la coloración violeta a amarillo de la solución debido a la cesión de electrones de la especie antioxidante.

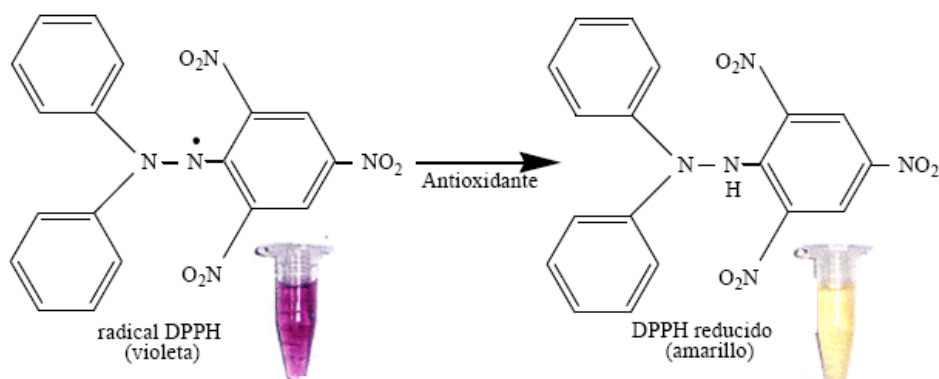


Figura 10 Esquema de la reacción colorimétrica de DPPH* en presencia de un compuesto con actividad antirradical

Los resultados se expresan como IC_{50} , que representa la cantidad de muestra (μL) que reduce la absorbancia de la solución de DPPH en un 50%. Así, un menor valor de IC_{50} indica mayor actividad antioxidante, porque se requiere menos cantidad de la muestra para disminuir en 50% la absorbancia de la solución de DPPH. Se preparó una solución de DPPH (6.01 mM) en metanol grado HPLC y 2.7 mL de esta solución fue adicionada a 300 μL de muestra, los tubos se mantienen en la oscuridad durante 30 minutos y se lee la absorbancia a 517 nm. El espectrofotómetro se calibró con metanol. La muestra se comparó con la lectura de un blanco control y de un blanco con muestra, el primero se preparó mezclando 2.7 mL de DPPH con 300 μL de metanol; la segunda solución contenía 2.7 mL de DPPH y 300 μL de muestra. El experimento se desarrolló por triplicado. El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera:

$$\%AAr = \left[1 - \left(\frac{A - A_1}{A_2} \right) \right] \times 100$$

Donde:

A= absorbancia de la muestra

A_1 = absorbancia del blanco control

A_2 = absorbancia del blanco con muestra

A partir de las cinéticas de disminución de DPPH* se grafican los valores asintóticos de absorbancia en función de las concentraciones para cada extracto. De éstas curvas se calcula la concentración media efectiva (IC_{50}).

9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Cuantificación de fenoles totales y flavonoides totales

El contenido de fenoles y flavonoides es un parámetro importante que establece tanto la calidad del material como su potencial biológico, en especial para la actividad antioxidante. Pues se ha reportado que estos compuestos pueden actuar interrumpiendo la reacción de oxidación de lípidos, inhibiendo las reacciones de quimioluminiscencia y capturando varias especies reactivas de oxígeno (ROS).

En la cuantificación de fenoles totales que se hicieron al extracto metanólico de *Ardisia sp.* los resultados arrojaron un contenido de 79.83 mg de ácido gálico/ g de muestra seca (Tabla 3). El extracto presentó un contenido de flavonoides totales de 7.62 mg/g de muestra seca.

Tabla 3 Contenido de fenoles y flavonoides totales en el extracto metanólico de *Ardisia*

Metabolito	Concentración
Fenoles totales	79.83 mg de ácido gálico/g de muestra seca
Flavonoides totales	7.62 mg de quercetina/g muestra seca

Indilí-Cruz (2011) reporta un contenido de fenoles y flavonoides totales en extractos metanólicos de *Ardisia sp* de 180.17 ± 12.55 mg EAG/g MS y 102.02 ± 5.71 mg EQ/g MS, respectivamente. De acuerdo a esto, el contenido fenólico encontrado en el estudio realizado con el mismo género y bajo las mismas condiciones de ubicación y etapa fenológica de recolección del presente año 2013 es 56% menor a lo obtenido en el estudio del año 2011. Se descartan las condiciones ambientales como principal factor del decremento en el contenido fenólico por que, como hemos mencionado, las muestras fueron colectadas en las mismas condiciones que en el estudio previo. Podemos atribuir, entonces, a que las hojas adultas de *Ardisia sp* estaban entrando en una etapa de senescencia al momento del tratamiento de extracción, pues autores como Rugna *et al.*, (2008) y Kumar *et al.*, (2012) expresan que a medida que las plantas van creciendo, los compuestos fenólicos se van almacenando en las vacuolas de las hojas,

aumentándose el contenido de compuestos fenólicos; pero éstos tienden a disminuir conforme la planta entra en un estado de senescencia.

A pesar de esto, los valores encontrados en el estudio son mayores que los reportados en extractos metanólicos de plantas como *Cymbopogon citratus* (zacate limón) y *Ardisia compressa*, del primero Yoo *et al.*, (2007) reportan contenidos de fenoles totales de 6.62 ± 0.13 mg EAG/g de hojas y de flavonoides totales de 4.16 ± 0.20 mg EQ/g de hojas; mientras que de la segunda planta, Chandra y González De Mejía (2004) reportan un contenido fenólico de 16.79 ± 1.22 mg EAG/g MS que es un 21% menor que lo encontrado *Ardisia sp.*

9.2 Actividad antirradical del extracto metanólico mediante el Ensayo del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Varios métodos han sido desarrollados para la evaluación de la eficacia antioxidante. Debido a que muchas especies activas y mecanismos de reacción están involucrados en procesos de estrés oxidativo, no hay un método simple que se puede considerar como universal y cuantifique con precisión la capacidad antioxidante (Frankel y Finley, 2008). En general, estos métodos se basan en la capacidad de los antioxidantes para captar radicales libres, el modelo de captura del radical estable DPPH \cdot es uno de los más usados (Villano *et al.* 2007). Se analizaron diferentes concentraciones de extracto para calcular dicho valor, la figura 11 muestra el porcentaje de actividad antirradical (%AAR) obtenido. Se observa que a la concentración de $1.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ hay una mayor captación de radicales libres. Esta alta actividad antioxidante del extracto metanólico se debe a la alta presencia fenólica, tal como se muestra en la figura 12.

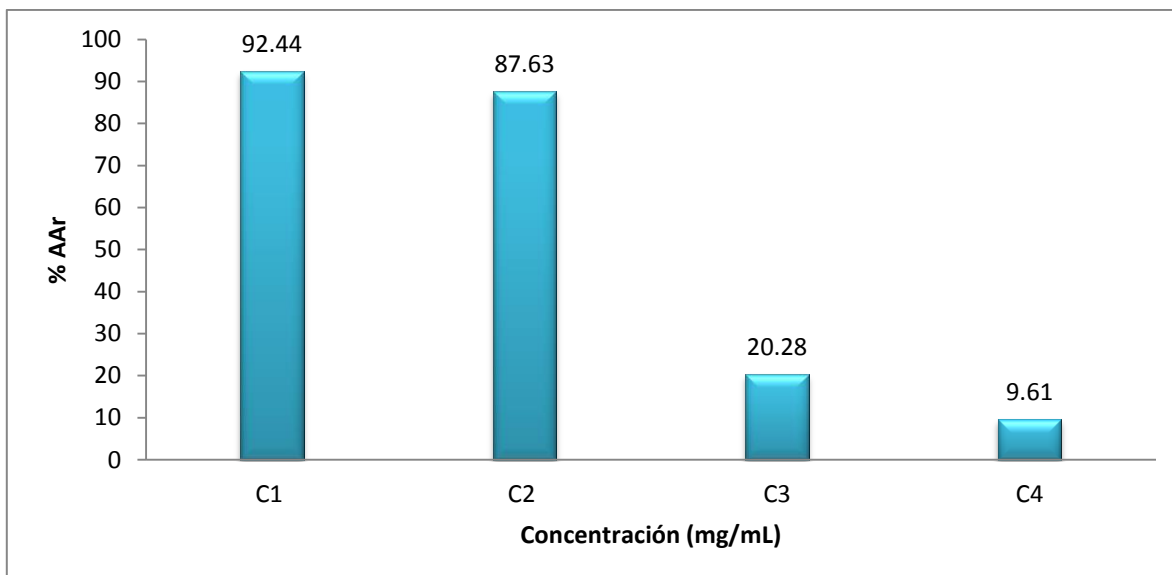


Figura 11 Actividad Antirradical de extractos metanólicos de *Ardisia sp* a diferentes concentraciones: C1= 1.125 mg/mL; C2= 0.5625 mg/mL; C3= 0.04 mg/mL; C4= 0.03mg/mL

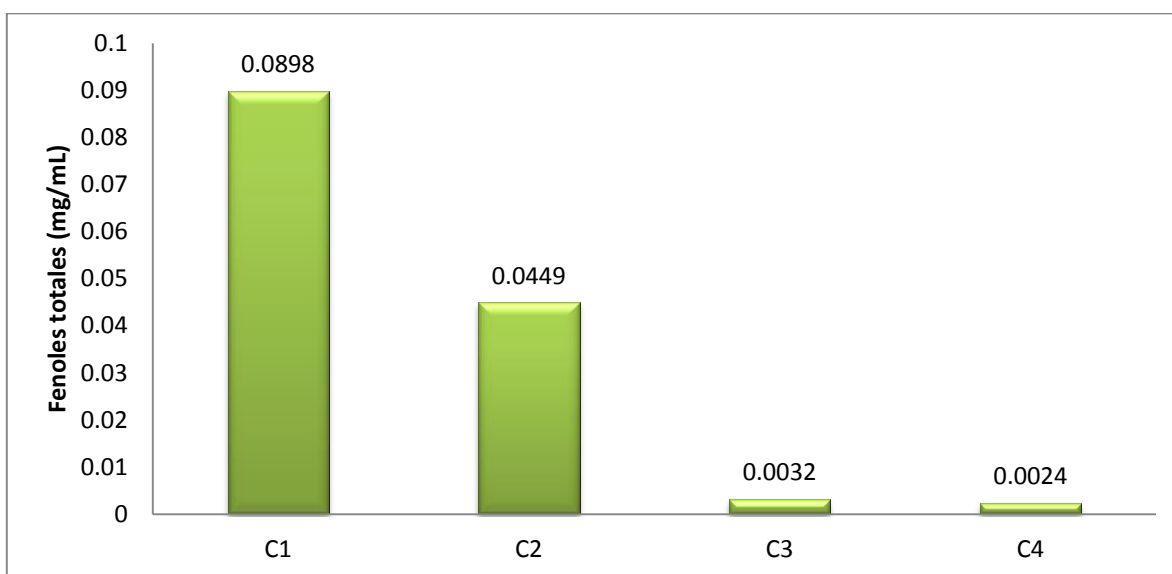


Figura 12 Contenido de fenoles totales (mg/mL) en las diferentes concentraciones de *Ardisia sp*: C1= 1.125 mg/mL; C2= 0.5625 mg/mL; C3= 0.04 mg/mL; C4= 0.03mg/mL

La alta inhibición del DPPH[•] en el extracto metanólico de *Ardisia sp* podría deberse al ácido gálico, ya que un estudio por Vilapakkam *et al.* (2011) demostró

que el ácido gálico tiene efecto antioxidante en ratas diabéticas inducidas por *winster*. Además, la presencia de ácido gálico en especies de *Ardisia* ha sido reportada anteriormente; Sumino *et al.* (2002) informaron la existencia de ácido gálico en los frutos de *Ardisia colorata* mientras que De Mejía *et al.* (2006) mencionan que *Ardisia compressa* contiene ácido gálico.

Se encontró el valor de $IC_{50} = 0.169 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para el extracto metanólico de *Ardisia sp* ($1.125 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). La figura 13 compara este y los valores de los estándares BHT, quercetina y rutina. Cabe destacar que la literatura indica que un menor valor de IC_{50} expresa mayor actividad antioxidante, por lo que el valor que exhibió el extracto de *Ardisia sp*. es superior al del antioxidante comercial BHT ($IC_{50} = 0.511 \pm 0.032 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) expresando una mejor captación de radicales libres; sin embargo los estándares quercetina y rutina que presentaron $IC_{50} = 0.020 \pm 0.002 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $0.025 \pm 0.004 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, son mejores inhibidores del $DPPH\cdot$ que el extracto de *Ardisia sp*.

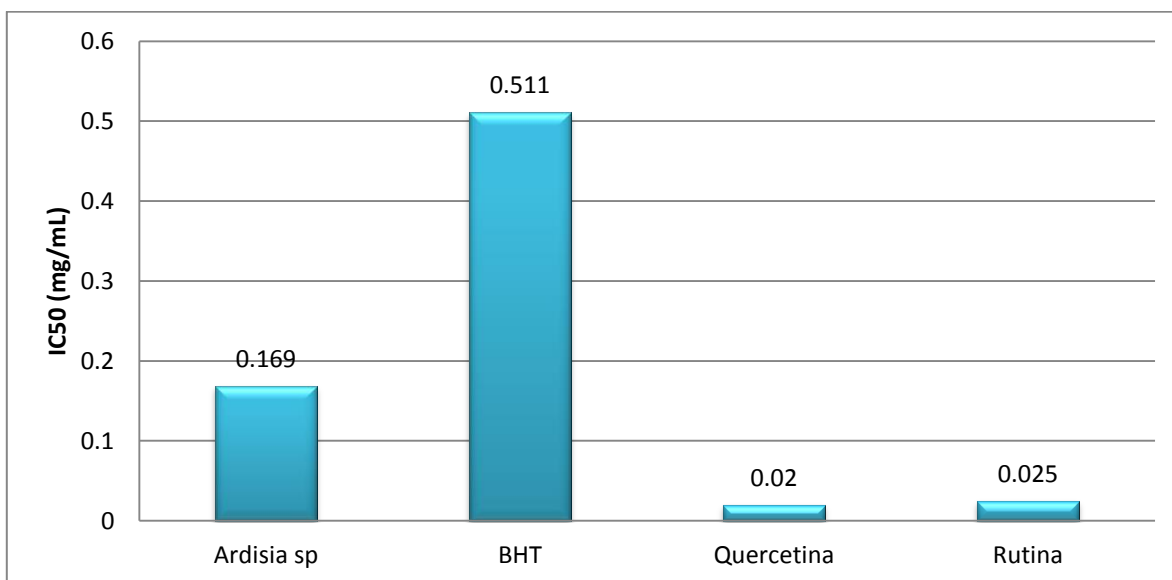


Figura 13 Comparación de la Actividad Antirradical en términos de IC_{50} (mg/mL) entre los extractos de *Ardisia sp* y los estándares BHT, quercetina y rutina

9.3 Actividad antioxidante del extracto metanólico mediante el Ensayo del β -Caroteno/Ácido Linoléico.

Los resultados del método del β -caroteno/ácido linoléico están representados en la figura 14 por los valores de actividad antioxidante (%AA) obtenidos a partir de las diferentes concentraciones del extracto metanólico de *Ardisia sp.*

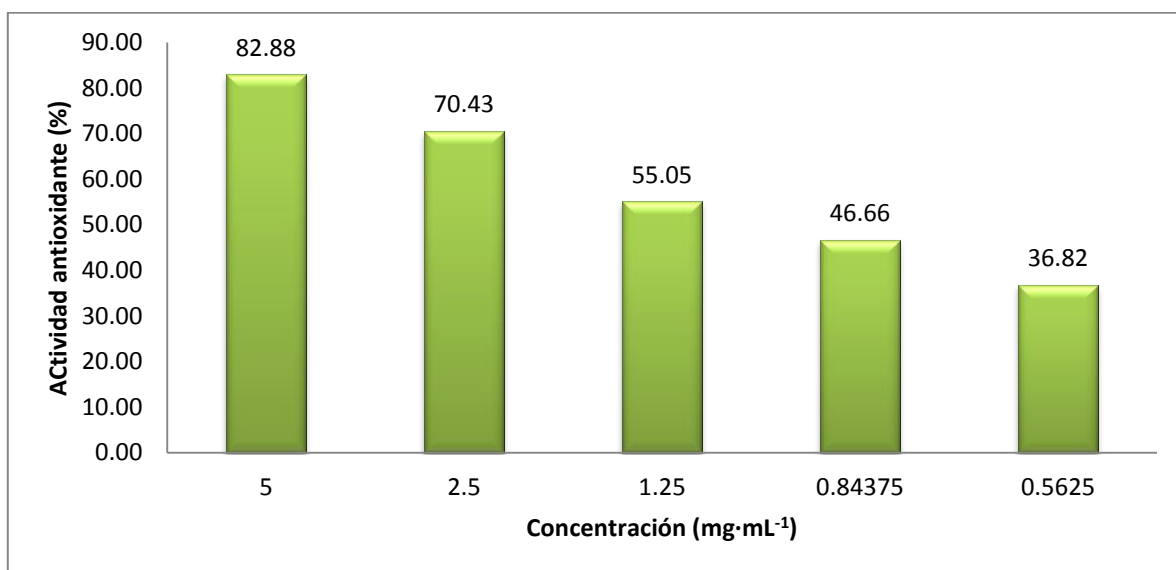


Figura 14 Actividad Antioxidante de extractos metanólicos de *Ardisia sp* a diferentes concentraciones

El extracto de concentración 5 mg·mL⁻¹ exhibió una actividad antioxidante promedio de 82.88%, por haber en él la mayor cantidad de compuestos fenólicos (0.39915 mg·mL⁻¹).

La figura 15 compara los valores de IC₅₀ de las diferentes concentraciones del extracto, confirmándose que la concentración de 5 mg·mL⁻¹ es la que presenta una superior actividad antioxidante, pues su valor es menor comparado con los demás (IC₅₀ = 0.0050 mg·mL⁻¹).

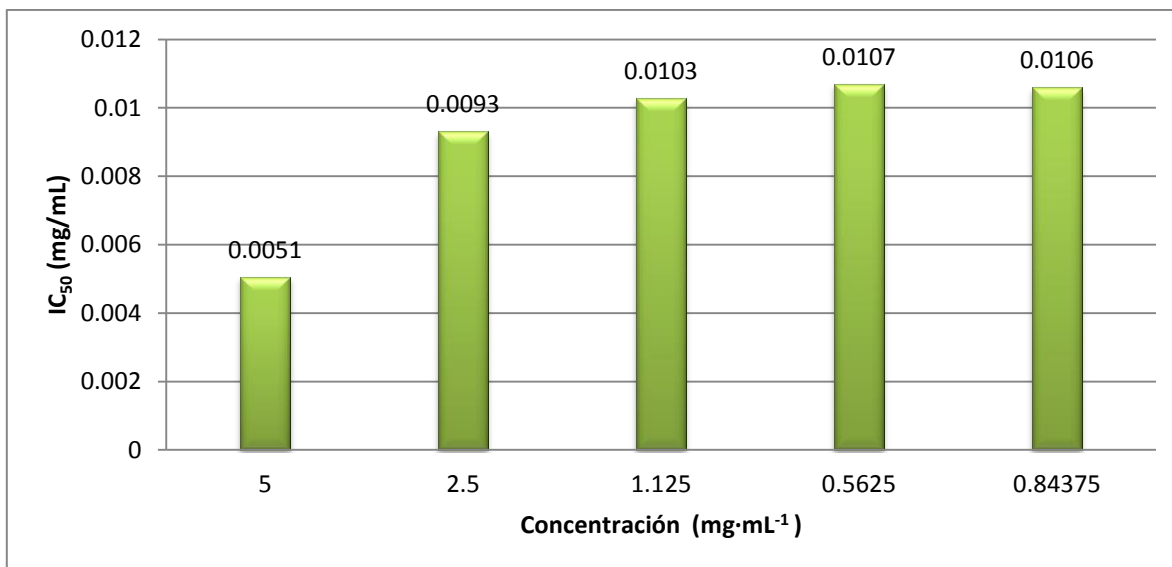


Figura 15 Valores de IC₅₀ para las diversas concentraciones de *Ardisia sp*

Comparando este resultado con los estándares BHT (IC₅₀ = 0.060 ± 0.003 mg·mL⁻¹) y quercetina (IC₅₀ = 1.12 ± 0.04 mg·mL⁻¹) se demuestra que el extracto metanólico de *Ardisia sp* es una excelente alternativa antioxidante por presentar un menor valor de IC₅₀, asegurando una alta capacidad para reaccionar con los radicales libres e inhibir el proceso oxidativo.

10 CONCLUSIONES

- Los extractos metanólicos de las hojas adultas de *Ardisia sp* poseen un contenido de fenoles y flavonoides de 79.83 mg EAG/ g MS y 7.62 mg EQ/ g MS, respectivamente.
- El extracto metanólico de concentración 1.125 mg·mL⁻¹ presentó una mayor actividad antirradical que el antioxidante comercial BHT, debido al bajo valor de IC₅₀ exhibido (IC₅₀ = 0.169 mg·mL⁻¹) pues un menor IC₅₀ indica mayor capacidad captadora de radicales libres. Sin embargo los estándares quercetina y rutina son mejores inhibidores del DPPH· que el extracto de *Ardisia sp*.
- El extracto metanólico de concentración 5 mg·mL⁻¹ demostró una actividad antioxidante superior al de los estándares BHT y quercetina, debió a su bajo valor de IC₅₀ = 0.0050 mg·mL⁻¹.
- Las propiedades antioxidantes y antirradicales del extracto están asociadas a la presencia de compuestos fenólicos que ejercen su acción a través del rompimiento de la reacción en cadena de los radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno. Dando como resultado que a mayor presencia de estos compuestos, mayores capacidades secuestradoras de radicales libres y de inhibición del proceso oxidativo.
- Estos resultados sugieren que el consumo de estos extractos podría tener los mismos efectos beneficiosos para la salud que han presentado otras plantas medicinales, además de su posible uso como materia prima para la obtención de antioxidantes naturales de utilidad en la industria alimentaria y farmacéutica.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. AURIOLA, S., HUOPALAHTI R., A., 2003. "*Analysis of secondary metabolites in plant and Cell culture tissue of Hypericum perforatum and Rhodiola rosea L*". Department of Chemistry, University of Oulu, Finland.
2. BURDA, S., y Oleszek, W., 2001, "*Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids*", J. Agric. Food Chem., Polonia, 49: 2774-2779.
3. CASTAÑEDA, Ramos LL. E, Ibáñez VL (2008). "*Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas*". Revista Horizonte Médico, Venezuela, 8: 54-72.
4. Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000). Natural products (Secondary Metabolites). 2nd. Ed. En: Buchanan B, Gruissem W, Jones R (editores). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. Capítulo 24, p 1250-1316.
5. DASTMALCHI, KD, Doeman, HJD, Oinonen, PP, Darwis, Y., Laaso, I, y Hiltunen, R. 2008. "*Composición química y en la actividad antioxidante in vitro de un bálsamo de limón (Melissa officinalis L.)*". LWT la Ciencia y Tecnología de los Alimentos 41 (3): 391-400.
6. De MEJÍA, EG; Chandra, S.; Ramírez-Mares, M. V. & Wang, W. 2006. "*Inhibición catalítico de la topoisomerasa de ADN humano por compuestos fenólicos en extractos Ardisia y compressa su efecto sobre las células de cáncer de colon humano*". Food and Chemical Toxicología 44: 1191-1203.
7. DUKE, J. (2001). "*Phytochemical and ethnobotanical databases*". Green Farmacy Garden 8210 Murphy Rood. Fulton, MD 20759 USA.
8. ESTIARTE, M., J. Penuelas, B. A. Kimball, D. L. Hendrix, P. J. Pinter, G. W. Wall, R. L. LaMorte, and D. J. Hunsaker, (1999). "*Free aire CO₂ enrichment*

of wheat: leaf flavonoid concentration throughout the growth cycle". *Physiol. Plant* 105: 423-433.

9. FRANKEL, EN & Finley, JW 2008. "Cómo estandarizar la multiplicidad de métodos para evaluar los antioxidantes naturales". *Diario Agricultura Food Chemistry* 56: 4901 hasta 4908
10. INDILÍ-CRUZ, R., 2011. "Efecto de extractos polares de tres plantas medicinales sobre agentes causales de enfermedades". Tesis Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Pp 103.
11. KÄHKÖNEN, M.P., A. I. Hopia, J. V. Heikki, R. Jussi-Pekka, K. Pihlaja, T. S. Kujala, and M. Heinonene. 1999. "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:3954-3962.
12. Kobayashi, H. y Mejía, E. de., 2005, "The genus *Ardisia*: a novel source of health-promoting compounds and phytopharmaceuticals", *Journal of Ethnopharmacology*, E.U.A., 96: 347–354.
13. KRISCHIK, V.A., and R. F. Denno . 1983. "Individual, population, and geographic patterns in plant defense. In: *Variable Plants and Herbivores in Natural and Managed Systems*". Denno, R. F., and M. S. McClure (Eds). Academic Press, New York, NY., pp: 463-512.
14. KUMAR A.; Abrol E.; Koul S. & Vyas D., (2012). "Seasonal low temperature plays an important role in increasing metabolic content of secondary metabolites in *Withania somnifera* (L.) Dunal and effects the time of harvesting". *Acta Physiol Plant* , 34, 2027-2031.
15. Li, HB, Wong, CC, Cheng, KW y Chen, F. 2008. "Antioxidantes, propiedades in vitro y el total de los contenidos fenólicos en metanol

extractos de plantas medicinales". *LWT - Ciencia y la Alimentación Tecnología* 41 (3): 385-390.

16. LOPONEN, J., V. Ossipov, J. Koricheva, E. Haukioja, and K. Pihlaja. 1997. "Low molecular mass phenolic in foliage of *Betula pubescens* Ehrh. In relation to aerial pollution". *Chemospher* 34: 687-697
17. MOLINA-MALDONADO, J.R., O.E. Albores Cruz, F.A. Gutiérrez Miceli, T. Ayora Talavera & J.A. Montes Molina. 2006. "Caracterización fitoquímica de *Ardisia compressa*, *Ardisia standleyana* y *Ardisia escalloniae*, nativas de Chiapas, México". *Ciencia y Tecnología en la Frontera*. Año III. 5:24-30
18. PIACENTE, S., Pizza, C., De Tommasi, N. and Mahmood N. (1996). "Constituents of *Ardisia japonica* and their *in vitro* anti-HIV". *Journal of Natural Products*, 59, 565-569.
19. RUGNA A., Ricco R, Gurni A, Wagner M (2008). Variaciones en el "Contenido de los Polifenoles Foliares en *Smilax campestris* Griseb. - *Smilacaceae* - según su Grado de Desarrollo". *Lat. Am. J. Pharm.* 27 (2): 247-249.
20. SUMINO, M., Sekine, T., Ruangrunsi, N., Igarashi, K. & Ikegami, F. 2002. "Ardisiphenols y otros principios antioxidantes de los frutos de *Ardisia colorata*". *Química y Farmacéutica Boletín* 50: 1484-1487.
21. VILAPAKKAM, RP, Ponnian, SMP, Ramesh, K. & Jemmi, S. 2011. "Antihiper glucemiantes, peroxidativo antilipídico y efectos antioxidantes del ácido gálico en streptozotocin inducida ratas Wistar diabéticos". *European Journal of farmacológicos* 650: 465-47.
22. VILLANO, D., Fernández Pachón, MS, Moya, ML, Troncoso, AM & García-Parrilla, MC 2007. "Radical barrido capacidad de los compuestos polifenólicos hacia DPPH libre radical". *Talanta* 71: 230-235.

- 23.** Yun, S. Liang, J. Peng, X. Yan. L. & Jinsong, B. 2009. “*Total fenólicos, flavonoides, la capacidad antioxidante en el grano de arroz y sus relaciones con el color del grano, el tamaño y el peso*”. *Journal of Cereal Science* 49 (1): 106 -111.