



INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

LICENCIATURA EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIRRADICAL DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE HOJAS ADULTAS DE *Ardisia sp.*”

PRESENTA:

CHRYSTEL GUADALUPE REYES OVANDO

ASESOR:

Dra. TERESA DEL ROSARIO
AYORA TALAVERA

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS; JUNIO DE 2018

CONTENIDO

<i>Lista de Figuras</i>	3
<i>Lista de Cuadros</i>	5
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	6
CAPITULO II. JUSTIFICACION	8
CAPITULO III. CARACTERIZACION DEL AREA	10
3.1 Políticas y normas	10
3.2 Objetivos de la institución	10
3.3 Servicios que presta la institución	10
3.4 Descripción del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica	11
3.5 Funciones del departamento de Ingeniería Química y Bioquímica	11
CAPITULO IV. PROBLEMAS A RESOLVER	14
CAPITULO V. OBJETIVOS	15
5.1 Objetivo General	15
5.2 Objetivos Específicos	15
CAPITULO VI. ALCANCES Y LIMITACIONES	16
6.1 Alcances	16
6.2 Limitaciones	16
CAPITULO VII. FUNDAMENTO TEORICO	17
7.1 Descripción general de la especie <i>Ardisia sp.</i>	17
7.2 Metabolismo secundario en las especies vegetales	20
7.3 Biosíntesis de los metabolitos secundarios	21
7.4 Polifenoles: Antioxidantes por excelencia	25
7.5 Flavonoides	28

CAPITULO VIII. METODOLOGIA	33
8.1 Recolecta del material vegetal.....	33
8.2 Procesamiento del material vegetal.....	33
8.3 Obtención del extracto metanólico	33
8.4 Determinación del contenido de Fenoles Totales (Método colorimétrico de Folin-Ciocalteu)	34
8.5 Determinación del contenido de Flavonoides Totales (Método colorimétrico de Cloruro de Aluminio)	35
8.6 Evaluación de la actividad antioxidante (Método colorimétrico de β -caroteno/ácido linoléico).....	36
8.7 Evaluación de la actividad antirradical (Ensayo del DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)	39
CAPITULO IX. RESULTADOS Y DISCUSION	41
9.1 Contenido de fenoles y flavonoides totales en extractos de <i>Ardisia sp.</i>	41
9.2 Actividad antirradical del extracto metanólico mediante el Ensayo del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	42
9.3 Actividad antioxidante del extracto metanólico mediante el Ensayo del β -Caroteno/Ácido Linoléico.....	45
CAPITULO X. CONCLUSIONES	47
CAPITULO XI. BIBLIOGRAFIA	48

Lista de Figuras

Figura 1. Huitumbillo (<i>Ardisia sp.</i>).....	17
Figura 2. Flores y frutos de Huitumbillo (<i>Ardisia sp.</i>).....	18
Figura 3. Eventos en los cuales, los metabolitos secundarios se inducen durante la respuesta de defensa de las plantas	21
Figura 4. Elementos del metabolismo del carbono en relación con las rutas de síntesis de metabolitos secundarios	22
Figura 5. Biosíntesis del ácido shikímico a partir de fosfoenolpirúvico y eritrosa 4-fosfato	23
Figura 6. Ruta del Ácido Malónico o de los Poliacetatos	24
Figura 7. Ruta del Ácido Mevalónico.....	25
Figura 8. Estructura especial de un radical libre.....	25
Figura 9. Un antioxidante es un donador de electrones que neutraliza o estabiliza a los radicales libres (Velázquez-Paniagua et al., 2004)	27
Figura 10. Estructura básica de los flavonoides	28
Figura 11. Biogénesis de los flavonoides	29
Figura 12. Estructura química básica de los flavonoides y de las distintas subfamilias.....	30
Figura 13. Características estructurales de los flavonoides relacionados con la capacidad antioxidante.....	31
Figura 14. Características estructurales de los principales tipos de flavonoides	31
Figura 15. Curva patrón de Ácido Gálico	35

Figura 16. Reacción de quelación del ión Al^{3+} con flavonoides.....	35
Figura 17. Curva patrón de Quercetina	36
Figura 18. Esquema de la decoloración de la emulsión β-caroteno/ácido linoléico en presencia de un compuesto con actividad antioxidante	37
Figura 19. Mecanismo de acción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•).....	39
Figura 20. 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	43
Figura 21. 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	43
Figura 22. 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	44
Figura 23. Actividad Antioxidante de extractos metanólicos de <i>Ardisia sp</i> a diferentes concentraciones.....	45
Figura 24. Valores de IC_{50} para las diversas concentraciones de <i>Ardisia sp</i>	46

Lista de Cuadros

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Ardisia sp.</i>.....	18
Tabla 2. Principios activos del género <i>Ardisia</i> y sus propiedades medicinales.....	19
Tabla 3. Principales familias de los compuestos fenólicos.....	26
Tabla 4. Potenciales efectos farmacológicos de diferentes flavonoides en humanos y animales	27
Tabla 5. Contenido de fenoles y flavonoides totales en el extracto metanólico de <i>Ardisia sp.</i>.....	41

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

En el estado normal del metabolismo, los niveles de oxidantes y antioxidantes en el hombre permanecen en equilibrio, lo cual es importante para mantener las condiciones fisiológicas óptimas (Temple, 2000). El metabolismo oxidativo es un proceso biológico normal capaz de generar radicales libres oxigenados, altamente reactivos. La sobreproducción de éstos en determinadas condiciones puede producir un desequilibrio que conduce a daño oxidativo de diferentes biomoléculas tales como lípidos, ADN, y proteínas, superando la resistencia metabólica e impidiendo que sean eliminados por el cuerpo (Flores, 2000). Las moléculas producidas son conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS) que son asociadas a enfermedades como cáncer, problemas cardiacos incluso al envejecimiento humano (Castañeda et al., 2008). Los antioxidantes reaccionan con los radicales libres para formar compuestos estables no reactivos, proceso conocido como “atrapamiento o captura de radicales libres”.

En la actualidad la actividad antioxidante de los alimentos está captando el interés de la población, debido a que existe evidencia científica de que éstos promueven la salud humana confiriendo efectos protectores antibacterianos, antivirales, antialérgicos y anti-trombóticos.

Los polifenoles son, en realidad, los principales antioxidantes de la dieta, y su ingesta es 10 veces superior a la de la vitamina C, y 100 veces superior a la de la vitamina E o los carotenoides (Scalbert y Williamson, 2000). Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido shikímico y la ruta de los poli acetatos. Éstos participan en funciones fisiológicas vegetales como de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.). Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides. Ejemplos de éste último grupo son la catequina o la quercetina capaces de neutralizar especies reactivas

de oxígeno (ROS) como el O_2 , el H_2O_2 o el HClO. Los flavonoides quercetina, miricetina y kenferol son los que poseen mayor actividad neutralizadora de radicales libres.

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 género *Ardisia* ha sido ampliamente estudiado 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.* La contribución de este informe radica en ampliar los datos sobre actividad antioxidante y anti radical de los extractos metanólicos de dicha planta.

CAPITULO II. JUSTIFICACION

En la actualidad las investigaciones referentes a los compuestos fenólicos y a sus actividades biológicas están en auge, los resultados positivos en cuanto a las propiedades beneficiosas y la aceptación de los consumidores para utilizar antioxidantes naturales como complementos nutricionales han disparado el mercado de estos productos. Muchas personas creen que las medicinas tradicionales son seguras, basándose en que todo lo natural es bueno y sano en oposición a lo sintético, así también en que las plantas se han empleado en medicina tradicional por mucho tiempo, por lo que su seguridad estaría confirmada por siglos de experimentación. Para la validación científica de la práctica tradicional es de gran importancia el estudio de los vegetales que utiliza la medicina tradicional, porque mediante esos estudios se puede demostrar la composición química y los principios activos que poseen. La información obtenida de la investigación de los compuestos de origen vegetal de las especies de uso tradicional en el tratamiento de enfermedades ayudaría a comprender la fisiología y la bioquímica de los organismos que los producen y lograr su mejor aprovechamiento con fines científicos y económicos.

La especie aquí planteada es abundante y se encuentra distribuida desde Norteamérica hasta Sudamérica. En México se localiza en Jalisco, Querétaro, Oaxaca, Veracruz y Chiapas. En el estado de Chiapas se encuentra distribuida principalmente en los municipios de Escuintla, Ocozocoautla de Espinosa e Independencia. Han sido identificadas siete especies de *Ardisia* endémicas del estado, entre las que se encuentran *Ardisia compressa*, *Ardisia standleyana* y *Ardisia escallonioides*; consumidas por la población para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y respiratorias. A pesar de la diversidad taxonómica y fotoquímica del género, sólo un número limitado de especies *Ardisia* han sido investigadas por sus propiedades medicinales, describiéndose con poco detalle en la literatura (Mejía y Kobayashi, 2005).

Por lo anterior, el proyecto pretende ampliar el conocimiento de la composición química del género *Ardisia sp.*, evaluando la capacidad antioxidante y anti radical de los extractos metanólicos de las hojas adultas de dicha planta y se asociarán al contenido de fenoles totales correspondientes dentro de la muestra. Un mayor conocimiento de los aspectos metabólicos relacionados con la ingesta de polifenoles contenidos en *Ardisia spp* ha de permitir explicar los potenciales efectos beneficiosos, medicinales o industriales, de éstos.

CAPITULO III. 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.

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 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.

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.

3.5 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 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 y Analítica, ya que cuentan con los servicios y materiales necesarios para la realización de dicho trabajo.

CAPITULO IV. PROBLEMAS A RESOLVER

- ✓ Como se ha venido mencionando, en la actualidad poco se sabe sobre la actividad antioxidante y anti radical de los extractos metanólicos de las hojas adultas de la especie *Ardisia spp.* Por lo que se pretende elucidar 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 anti radical).
- ✓ Los extractos vegetales contienen mezclas complejas de compuestos fenólicos que varían en composición desde ácidos fenólicos simples hasta taninos condensados o hidrolizables. Para establecer una relación estructura-actividad es necesario definir los compuestos que mayoritariamente componen la mezcla y, así posteriormente, poder explicar su actividad biológica, para ello se cuantificará la presencia de fenoles y flavonoides en el extracto.
- ✓ El buen rendimiento de la experimentación se encuentra en función no sólo del disolvente empleado para la extracción sino también a cambios en la temperatura, el pH, el tiempo de extracción y la luz; por lo que se tratará de minimizar lo más posible estos factores para evitar la pérdida de los compuestos fenólicos de interés.

CAPITULO V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

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

5.2 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).

CAPITULO VI. ALCANCES Y LIMITACIONES

6.1 Alcances

- Se determinó tanto la presencia como el contenido de fenoles y flavonoides en los extractos metanólicos de *Ardisia sp.*, demostrando así que dichos metabolitos secundarios bioactivos le confieren las propiedades medicinales ya conocidas.
- Los resultados de las pruebas químicas *in vitro* de las actividades antioxidantes y anti radicales son significativos que van íntimamente relacionados con el contenido de compuestos poli fenólicos.

6.2 Limitaciones

- Durante el desarrollo del proyecto se presentaron problemas que iban desde las condiciones ambientales que afectaban a las muestras hasta la falta de material y reactivos empleados en las pruebas. Ya que sin éstos era casi imposible comenzar con los ensayos en los tiempos establecidos.

CAPITULO VII. FUNDAMENTO TEORICO

7.1 Descripción general de la especie *Ardisia sp*

Ardisia spp o “huitumbillo”, como también es conocido, es un árbol que llega a medir hasta 10 m de alto de corteza grisácea, hojas alternas a ovadas o elípticas, lampiñas de flores blancas, y frutos redondos pequeños (Figuras 1 y 2). En Chiapas 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). El género está ampliamente distribuido desde Norteamérica hasta Sudamérica. En México se localiza en Jalisco, Querétaro, Oaxaca, Veracruz y Chiapas (extensamente localizada en Escuintla, Ocozocoautla, Independencia entre otros).



Figura 1. Huitumbillo (*Ardisia sp*)

El género *Ardisia* es la más grande de la familia Myrsinaceae (Tabla 1), y aproximadamente 500 especies de arbustos y árboles de hoja perenne, su correcta identificación ha sido difícil a nivel de especie, en parte por el gran número de especies y la falta de claves de identificación. Además, el último estudio exhaustivo del género se remonta a 1902, y la falta de información precisa y actualizada añade más confusión para los investigadores. Aunque las especies *Ardisia* se han utilizado como fuentes de alimentos y medicinas, el registro

detallado sobre tal uso es escaso y limitado. La tabla 2 resume algunos de los resultados de investigaciones relacionadas con el género *Ardisia*.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Ardisia sp*

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



Figura 2. Flores y frutos de Huitumbillo (*Ardisia sp*)

Indilí-Cruz (2011) reporta actividad antimicrobiana de extractos de hojas y frutos de *Ardisia sp* sobre dos bacterias (*Staphylococcus aureus* y *S. epidermis*). En cuanto a actividad antiviral, únicamente el extracto metanólico de la hoja de *Ardisia sp.* demostró actividad sobre tres cepas virales de influenza tipo A: A/Taiwán/1/86 (H1N1), A/Sidney/5/97 (H3N2) y A/Yucatán/2370/09 (H1N1).

El género *Ardisia* produce varios grupos de fitoquímicos biológicamente activos que incluyen saponinas, cumarinas, y quinonas. De acuerdo con Duke (Duke, 2001), los siguientes compuestos fitoquímicos se han aislado de *Ardisia japónica*: 2-hidroxi-5-metoxi-pentadecenilo-benzoquinona; ardisinol I y II; bergenina, miricitrina y quercetina.

Tabla 2. Principios activos del género *Ardisia* y sus propiedades medicinales

ESPECIE	PROPIEDAD MEDICINAL	PARTE DE LA PLANTA USADA	PRINCIPIO ACTIVO
<i>Ardisia compressa</i>	Enfermedades del hígado, antidiarreico y antitusivo.	Hojas	Quinonas
<i>Ardisia colorata</i>	Alimentos del hígado	Desconocido	Isocumarinas
<i>Ardisia crenata</i>	Actividad antitrombótica	Toda la planta	Isocumarinas Saponinas
<i>Ardisia crispa</i>	Antimetastico y antitumoral	Desconocido	Quinonas Saponinas
<i>Ardisia elliptica</i>	Antiviral y antimicrobiana	Hojas	Isocumarinas
<i>Ardisia gigantifolia</i>		Rizomas	Triterpenoides
<i>Ardisia japónica</i>	Antioxidante, anti carcinogénico y antiviral	Rizomas y toda la planta	Benzoquinonas
<i>Ardisia mamillata</i>	Desordenes del tracto respiratorio y Antiespasmódico	Raíces	Saponinas
<i>Ardisia pusilla</i>	Actividad anti-tumoral	Desconocidos	Saponinas
<i>Ardisia sieboldii</i>	Inhibición de la 5-Lipoxigenasa	Corteza	Quinonas
<i>Ardisia teysmanniana</i>	Antimicrobiana	Hojas	Quinonas

Se ha reportado también, el uso de las hojas de *Ardisia chinensis* en la medicina tradicional china (Li *et al.* 2006). 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 berberina, 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 Metabolismo secundario en las especies vegetales

Los metabolitos secundarios se hallan restringidos a un determinado género de plantas, a una familia o incluso a algunas especies. Son de gran interés comercial, usados en las industrias farmacéutica, alimenticia, de cosméticos y como fuentes de numerosas sustancias de interés agroquímico (Karuppusamy, 2009). Se estima que más de 100 000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas (Bhalla *et al.*, 2005).

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, sino que también una síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas (Figura 3); dando lugar a compuestos que presentan propiedades biológicas, caracterizadas por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros (Valdés y Balbín, 2000).

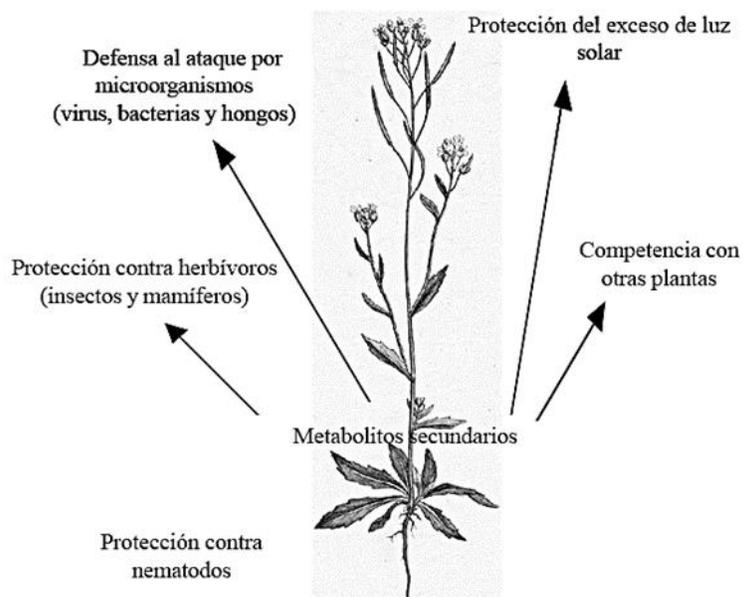


Figura 3. Eventos en los cuales, los metabolitos secundarios se inducen durante la respuesta de defensa de las plantas

7.3 Biosíntesis de los metabolitos secundarios

Atendiendo a las vías biosintéticas que les dan origen, los compuestos secundarios se dividen en tres grandes grupos: **los terpenos, las sustancias fenólicas y los compuestos que contienen nitrógeno** en su estructura.

Las principales rutas de biosíntesis de éstos metabolitos derivan del metabolismo primario del carbono, el cual proporciona un gran número de moléculas simples, como el ácido shikímico, el acetato y los aminoácidos, que constituyen los materiales de partida para las rutas biosintéticas del metabolismo secundario (Figura 4).

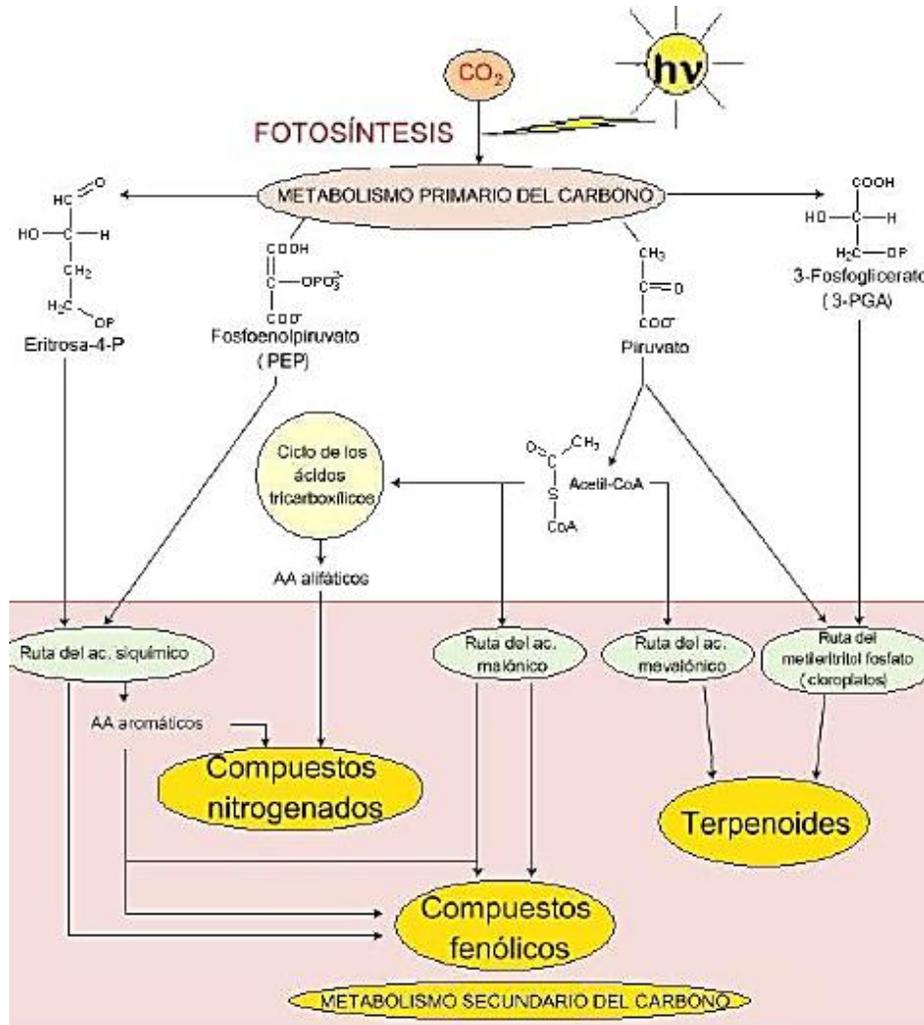


Figura 4. Elementos del metabolismo del carbono en relación con las rutas de síntesis de metabolitos secundarios

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 poli fenólicas.
- **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- CoenzimaA.** Es el precursor de los terpenos naturales, las unidades de acetato activo (acetil-CoenzimaA) se condensan y transforman para originar ácido mevalónico, unidad de cinco átomos de carbono, específica de la biosíntesis de terpenos.

En la Figura 4 pueden distinguirse las siguientes rutas: ruta del metil-eritritol-fosfato (MEP), ruta del ácido mevalónico, ciclo del ácido cítrico, ruta del ácido malónico y la ruta del ácido shikímico. Cada una de estas vías está relacionada de la siguiente manera con el metabolismo primario:

- ☼ **La ruta del ácido shikímico** (Figura 5), es originada por la condensación del fosfoenolpiruvato y la eritrosa-4- fosfato, obteniéndose el ácido shikímico, que a su vez es precursor de algunos fenoles, derivados del ácido cinámico, flavonoides, cumarinas, lignanos y alcaloides (Auriola y Huopalahti, 2003).

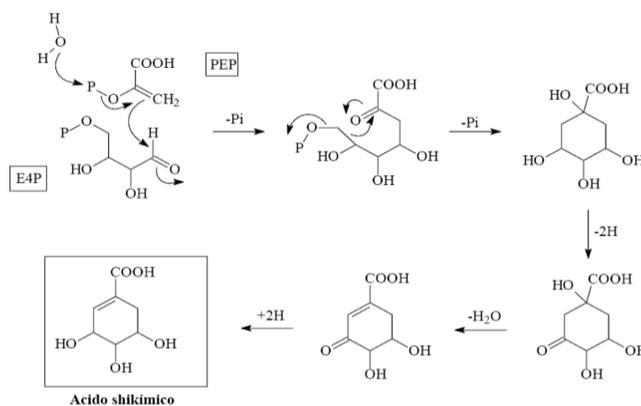


Figura 5. Biosíntesis del ácido shikímico a partir de fosfoenolpirúvico y eritrosa 4-fosfato

- ☼ **La ruta del ácido malónico** (Figura 6), conocida también como la ruta de los poliacetatos, es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores. Comienza a partir de una

molécula inicial de acetilCoA, y a través de una serie de condensaciones se originan los poliacetatos. Por reducción de los poliacetatos se forman los ácidos grasos, y por ciclación posterior se forman una gran variedad de compuestos aromáticos, como las quinonas y otros metabolitos que se generan a través de rutas mixtas (Auriola y Huopalahti, 2003).

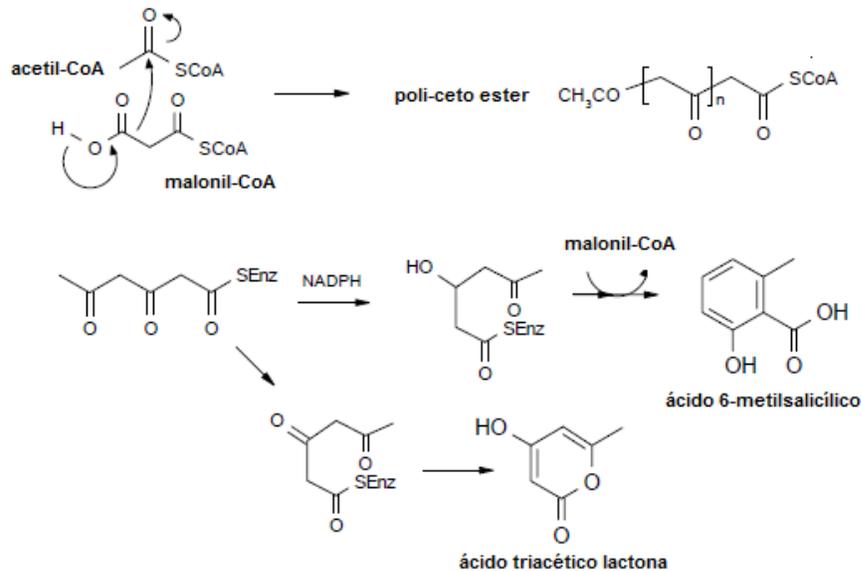


Figura 6. Ruta del Ácido Malónico o de los Poliacetatos

- ☼ La **ruta del ácido mevalónico** (Figura 7), activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar un compuesto de cinco átomos de carbono que contiene unidades de isopreno: isopentenil difosfato (IPP), el cual se combina con difosfato de dimetilalilo (DMAPP) para formar un gran número de terpenos (Auriola y Huopalahti, 2003).
- ☼ La **ruta MEP**, funciona en los cloroplastos a partir del piruvato y del gliceraldehido-3-fosfato, generando también isopentenil difosfato (IPP).
- ☼ El **ciclo del ácido cítrico** sintetiza los aminoácidos alifáticos.

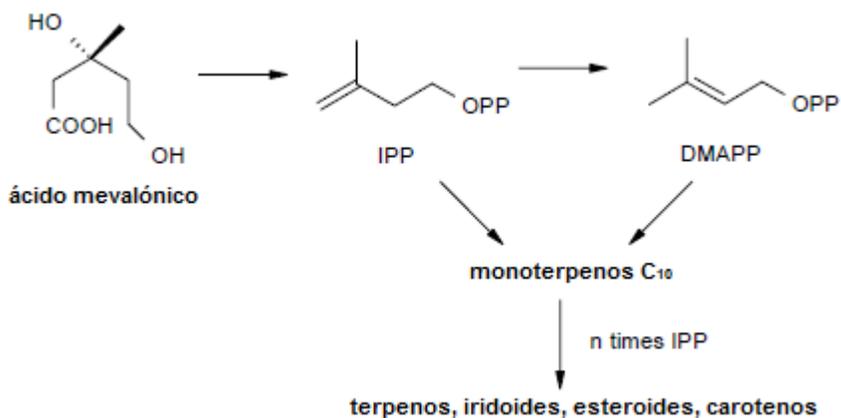


Figura 7. Ruta del Ácido Mevalónico

7.4 Polifenoles: Antioxidantes por excelencia

Entre un 2% y un 5% de la reducción del oxígeno ocurre de forma incompleta en la mitocondria generando otras especies derivadas del oxígeno que se caracterizan por ser altamente oxidantes y reactivas, denominadas radicales libres (Figura 8) y especies reactivas del oxígeno (ROS) (también existen especies reactivas del nitrógeno (RNE), del cloro (RCIS) y del bromo (RBrS)), las cuales pueden provocar daño oxidativo.

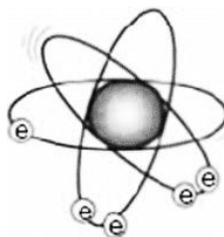


Figura 8. Estructura especial de un radical libre

Numerosa evidencia experimental demuestra que los compuestos fenólicos son poderosos antioxidantes. Las plantas contienen una diversidad de compuestos fenólicos como alcaloides, terpenoides, esteroides y flavonoides; que le confieren propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales y antiasmáticas, sin embargo, las propiedades biológicas de mayor interés han sido sus efectos antioxidantes (Andersen y Markham, 2006; Mann, 1994).

Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo bencénico que contiene uno o diversos grupos hidroxilo. Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen principalmente en función del número de átomos de carbono que presentan en su estructura (Tabla 4). Cada grupo tiene a su vez subdivisiones, por lo que la variedad de estos compuestos en las plantas es muy grande.

Tabla 3. Principales familias de los compuestos fenólicos

Estructura	Familia
C_6	Fenoles simples
C_6-C_1	Ácidos fenólicos
C_6-C_2	Ácidos fenólicos y acetofenonas
C_6-C_3	Cumarinas y ácidos hicroxicinámicos
$C_6-C_1-C_6$	Xantonas benzofenonas
$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos
$C_6-C_3-C_6$	Chalconas
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Taninos condensados
$(C_6-C_1)_n$	Taninos hidrolizables

El grupo más numeroso es el de los flavonoides, que se reporta existen entre 4000 y 5000 (Middleton *et al.*, 2000; Pérez, 2003). Estos compuestos destacan desde el punto de vista farmacológico por su baja toxicidad y por presentar numerosos efectos biológicos y actividades terapéuticas (López Luengo, 2002).

Numerosos estudios *in vitro* ponen de manifiesto que estos compuestos reaccionan con los radicales libres y quelan metales para formar compuestos estables no reactivos, proceso conocido como “atrapamiento o captura de radicales libres” (Figura 9).

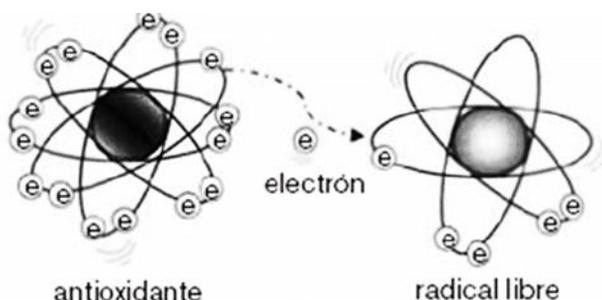


Figura 9. Un antioxidante es un donador de electrones que neutraliza o estabiliza a los radicales libres (Velázquez-Paniagua et al., 2004)

En la tabla 5 se hace un resumen de algunos de los efectos farmacológicos mostrados por diferentes flavonoides en humanos y animales.

Tabla 4. Potenciales efectos farmacológicos de diferentes flavonoides en humanos y animales

ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS	COMPUESTOS
Analgésica	Quercetina, hesperidina, miricitrina, 5,7-dimetoxi-flavanona-4'-O-[β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopiranosido, 2'-hidroxi-4',6'-dimetoxi-chalcona-4-O- β -D-glucopiranosido
Antialérgica	Quercetina
Antiaterogénica	Quercetina
Anticancerígena	Baicaleína, epigallocatequina, kaenferol-3-O- β -D-glucopiranosido, nobiletina, quercetina, rutina, tangeretina, tricina, woogonina
Antidiabética	Quercetina
Antidiarréica	Apigenina, kaenferol, morina, miricetina, naringenina, quercetina, quercitrina
Antihepatotóxica	Gospipina, hispidulina, hidroxietilrutósido, kolavirona, quercetina, silimarina
Antiinflamatoria	Apigenina, crisina, gospipina, hibrifolina, hipolaetina-8- β -D-glucósido, luteolina, miricetina, nepetina, quercetina, quercitrina, rutina, sidertoflavonona
Antiosteoporótica	Ipriflavona
Antiespasmódica	Apigenina, crisina, kaenferol, quercetina
Antiulcerosa	Hipolaetina-8-glucósido, kaenferol, quercetina, rutina, solona, naringina
Protector Vascular	Antocianidina, citrina, rutósido

7.5 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios que se distribuye en las plantas vasculares de manera ubicua (Di Carlo et al., 1999). Son los responsables de la coloración rojo, azul y amarillo en flores, y en las hojas en otoño. Presentan un núcleo fenilpropanoide de 15 átomos de carbono, el cual consiste en dos anillos de benceno que unidos a través del heterociclo pirano forman el fenilbenzo- γ -pirona ($C_6-C_3-C_6$). 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 10).

Aproximadamente, un 2% del carbono fotosintetizado por las plantas es convertido en flavonoides o compuestos estrechamente relacionados. Abundan, sobre todo, en las partes aéreas jóvenes y más expuestas al sol ya que la luz solar favorece su síntesis (López Luengo, 2002). En los órganos en los que están presentes (frutos, hojas, flores y cortezas) actúan como copigmentos o como responsables directos de la coloración de los mismos (Bruneton, 2001).

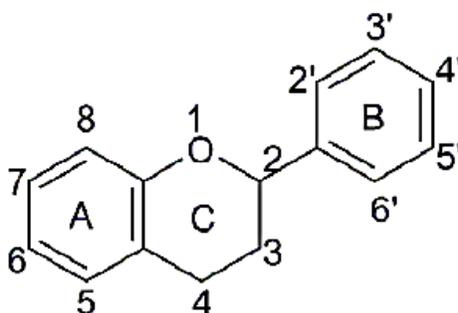


Figura 10. Estructura básica de los flavonoides

Las fuentes de flavonoides en la dieta son las frutas y algunas bebidas (vino, té, cerveza, chocolate), mientras que las hortalizas, legumbres y cereales contribuyen en menor extensión. Se estima que las antocianinas y los flavanoles (catequinas y taninos condensados) constituyen las dos clases de flavonoides mayoritarios en la dieta, representando en su conjunto más de 2/3 del total de la ingesta total de flavonoides.

Los flavonoides presentan una alta estabilidad molecular, soportando bajas y altas temperaturas, hasta 300 °C. Pueden ser extraídos inicialmente con solventes orgánicos sin perder sus propiedades estructurales, y son muy estables al calor y a las reacciones de oxidación, resistiendo la mayoría de los tratamientos térmicos que se emplean en la manufactura de los alimentos enlatados (Badúí, 1996).

La biosíntesis de la unidad C₆-C₃-C₆ deriva de precursores tanto de la vía del ácido shikímico como de la ruta de los policétidos (Figura 11). El primer flavonoide se forma inmediatamente después de la confluencia de los dos caminos y parece ser que se trata de la chalcona. A partir de ella derivan las demás estructuras por distintas vías (Ebel & Hahlbrock, 1982; Grisebach, 1985; Hahlbrock & Grisebach, 1975).

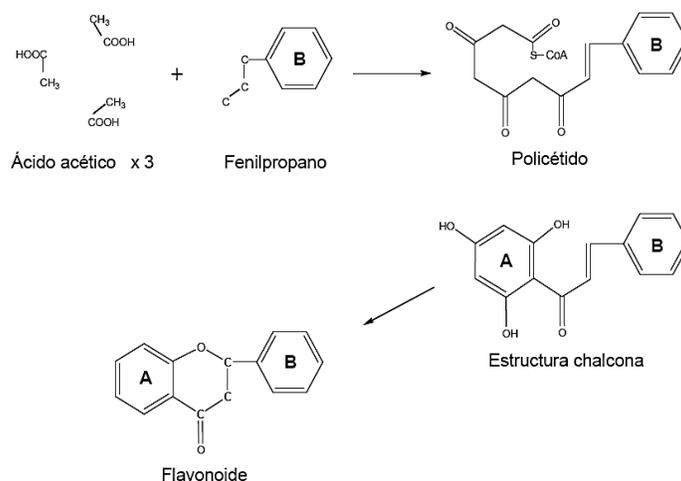


Figura 11. Biogénesis de los flavonoides

Las variaciones estructurales en el anillo C, debido a modificaciones enzimáticas por glucosilación, acilación o metilación el núcleo fenil propanoide genera un escaso número de estructuras básicas a partir de las cuales se deriva la amplia gama de flavonoides, entre los que se encuentran las flavanonas, flavonas, flavonoles, isoflavonas, antocianinas y flavan-3-ol (también llamados flavanoles) (Figura 12).

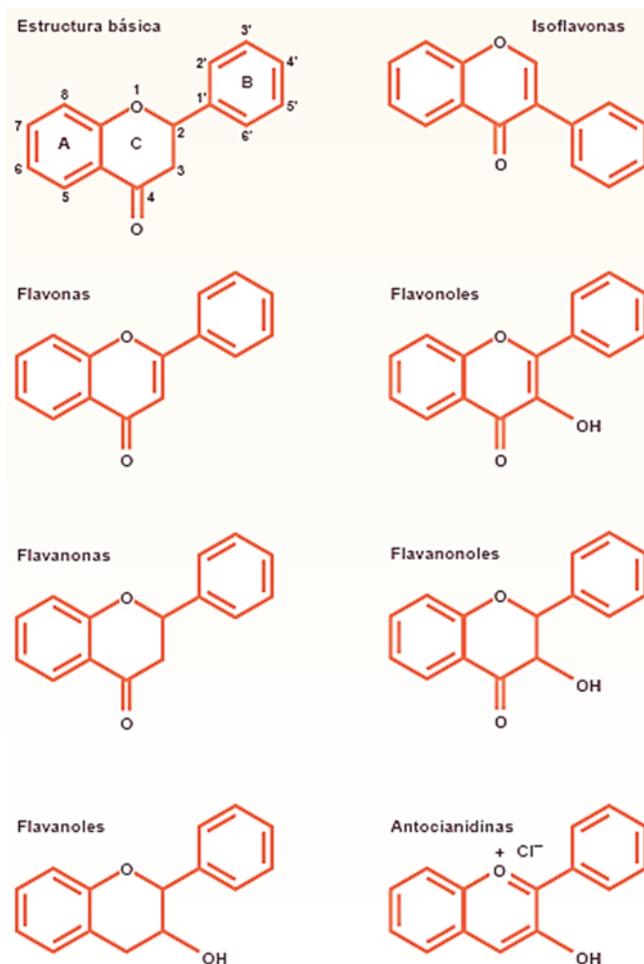


Figura 12. Estructura química básica de los flavonoides y de las distintas subfamilias

En las plantas, los flavonoides se encuentran en estado libre (agliconas) tal como se muestra en la Figura 18 o en forma de heterósidos, que es lo más frecuente. Estos heterósidos son generalmente solubles en agua, mientras que sus geninas o agliconas (parte no azucarada del heterósido) lo son sólo ligeramente.

Frecuentemente, los flavanoles forman polímeros $(C_6-C_3-C_6)_n$, que reciben el nombre de taninos condensados. Otro tipo de polímeros de gran importancia en la naturaleza, que no forman parte del grupo de los flavonoides, son los taninos hidrolizables que están constituidos por unidades de ácido gálico.

Bors postuló tres criterios que definen una mayor capacidad antioxidante en los flavonoides (Bors *et al.*, 1990). Éstos son:

1. Presencia de dos grupos hidroxilo en posición *orto* (catecol) en el anillo B, que le confiere mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
2. Un doble enlace entre el C₂-C₃ conjugado con la función 4-oxo del anillo C que es responsable de la deslocalización de los electrones en el anillo B.
3. Presencia de dos grupos hidroxilo en posición *meta* posiciones C₃ y C₅.

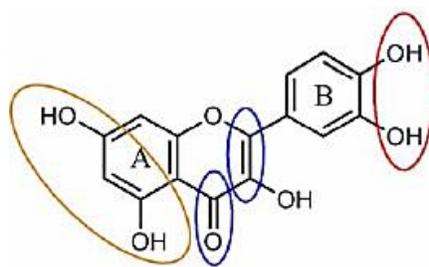


Figura 13. Características estructurales de los flavonoides relacionados con la capacidad antioxidante

La quercetina presenta las tres características, mientras que la catequina solo presenta la segunda y la diosmetina la primera (Figura 14).

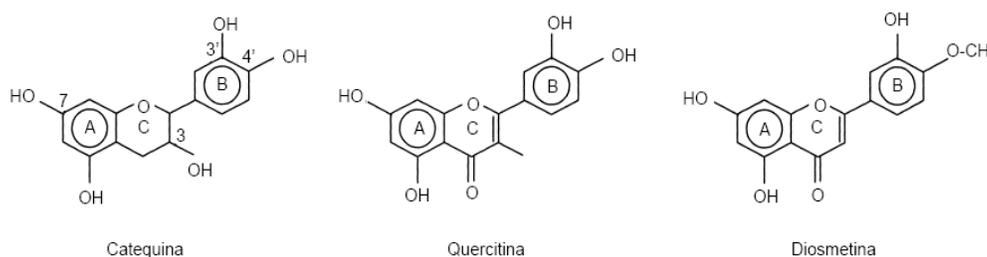


Figura 14. Características estructurales de los principales tipos de flavonoides

Para la caracterización de estos compuestos se utilizan técnicas basadas en la presencia de grupos fenólicos. Los grupos fenólicos de los flavonoides hacen que al añadirles álcalis (NaOH, KOH) se produzca una coloración amarilla o la

intensificación del color de la disolución inicial de la muestra. Igualmente, la adición de sales metálicas como FeCl_3 o AlCl_3 da lugar a una coloración verde o a una fluorescencia amarillo intensa a la luz ultravioleta, respectivamente. (Bruneton, 2001).

En cuanto a los métodos clásicos de valoración de los flavonoides, éstos son, sobre todo, colorimétricos o espectrofotométricos (por ejemplo la medida de la absorbancia después de la reacción con AlCl_3). La cromatografía en capa fina (CCF) con reveladores específicos también permite, en ciertos casos, conocer el perfil flavónico de un extracto, sin embargo es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) quien ofrece en la actualidad la posibilidad de una valoración rápida y precisa de todos los flavonoides presentes en una muestra (Wagner y cols., 1984; Bruneton, 2001).

CAPITULO VIII. METODOLOGIA

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 rota vapor Buchi R-120 a una temperatura de 45 °C; el residuo se re suspendió 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 15).

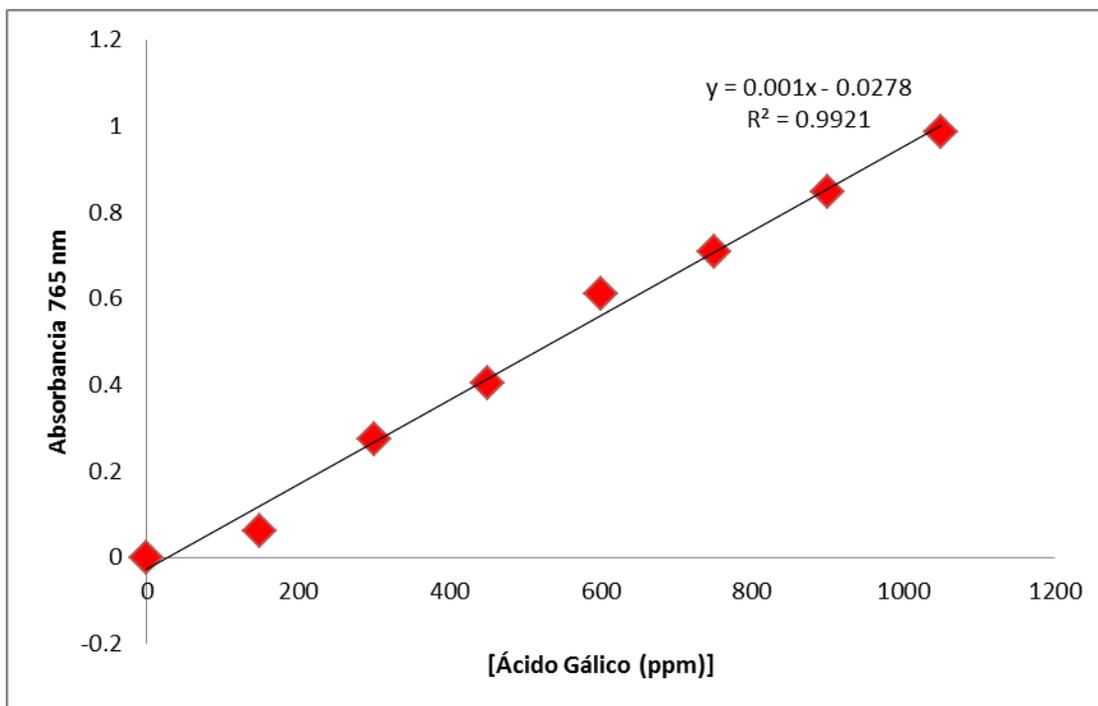


Figura 15. Curva patrón de Ácido Gálico

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) (Figura 16).

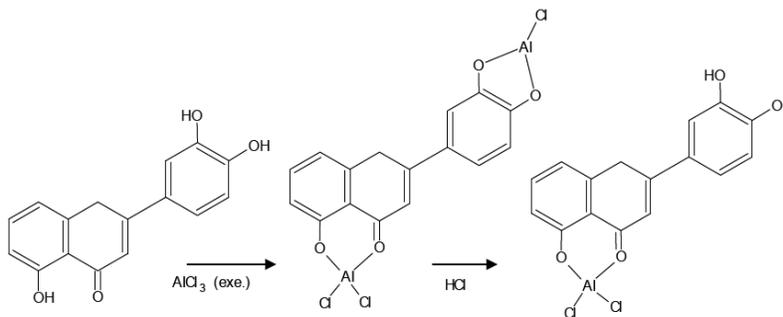


Figura 16. Reacción de quelación del ión Al^{3+} con flavonoides

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 mg/mL 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 17).

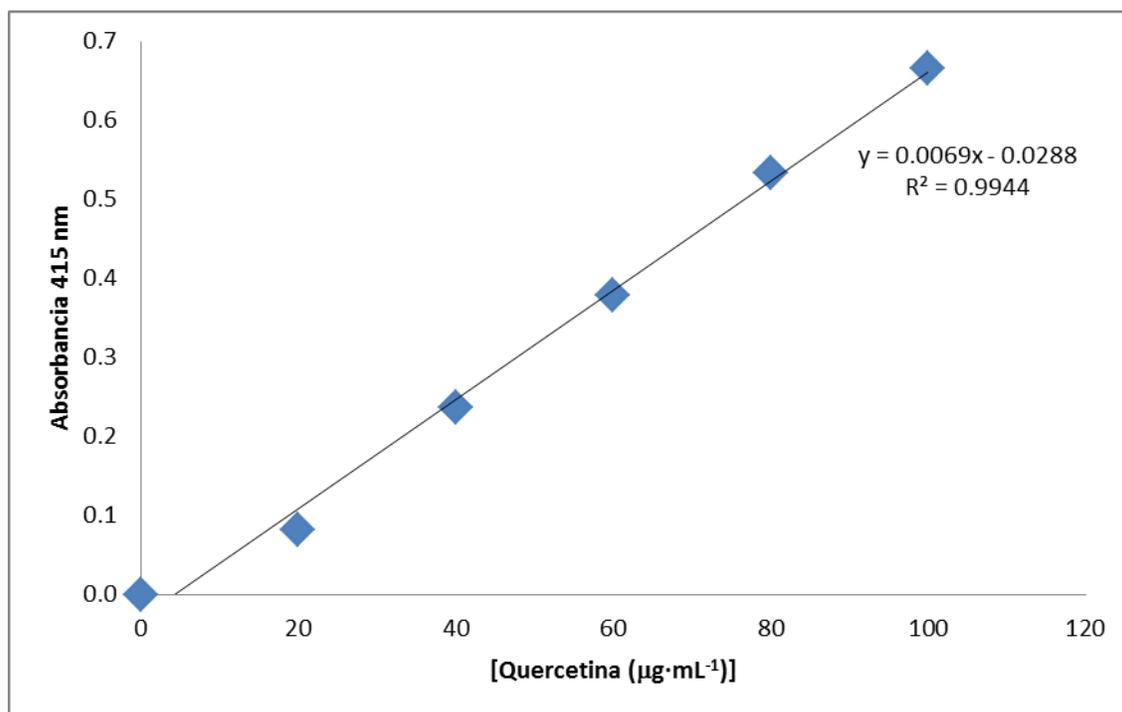


Figura 17. Curva patrón de Quercetina

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 18).



Figura 18. Esquema de la decoloración de la emulsión β -caroteno/ácido linoléico en presencia de un compuesto con actividad antioxidante

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 = absorbancia en t_{cero} .

b = absorbancia 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 19).



Figura 19. Mecanismo de acción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•)

Los resultados se expresan como IC_{50} , que representa la cantidad de muestra ($\mu\text{g/mL}$) 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

A₁= absorbancia del blanco control

A₂= 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 (IC₅₀).

CAPITULO IX. RESULTADOS Y DISCUSION

9.1 Contenido de fenoles y flavonoides totales en extractos de *Ardisia sp.*

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).

Los métodos de Folin-Ciocalteau y de formación del complejo con $AlCl_3$ para determinar el contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides, respectivamente, son comúnmente usados para analizar plantas y alimentos. En el presente trabajo se observa que el contenido de fenoles totales es de 79.83 mg EAG/g MS y de flavonoides de 7.62 mg EQ/g MS (Tabla 6).

Tabla 5. Contenido de fenoles y flavonoides totales en el extracto metanólico de *Ardisia sp*

Fenoles totales	79.83 mg EAG / g MS
Flavonoides totales	7.62 mg EQ / g MS

EAG= equivalentes de ácido gálico; EQ= equivalentes de quercetina; MS= 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 porque, 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 20 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 21.

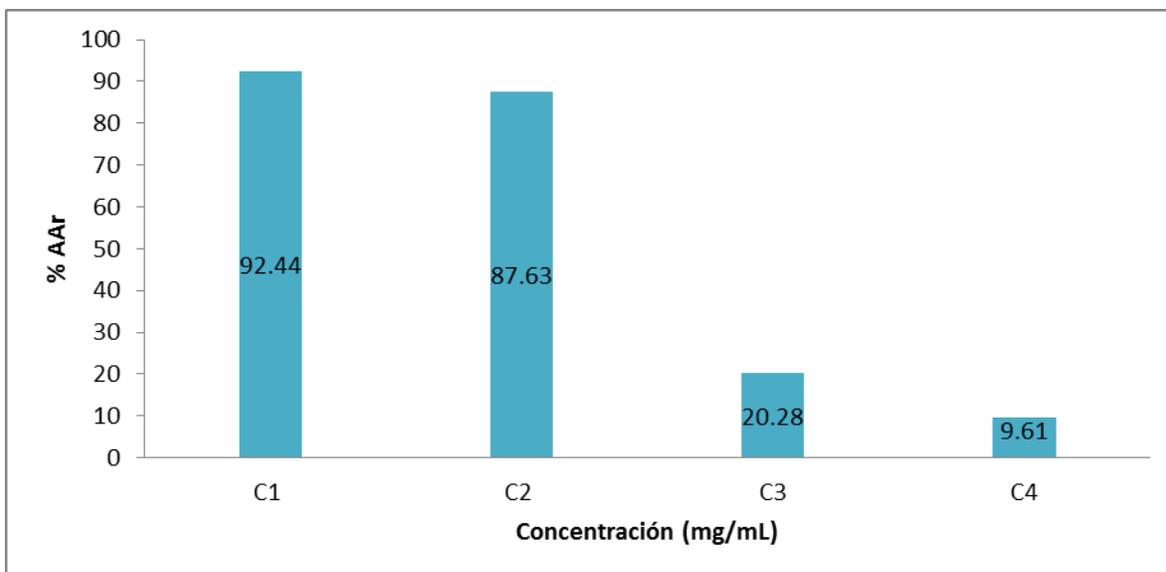


Figura 20. Actividad Antirradical de extractos metanólicos de *Ardisia sp* a diferentes concentraciones: C1= 1.125 mg/mL; C2= 0.5625 mg/mL; C3= 0.04 mg/mL; C4= 0.03mg/mL

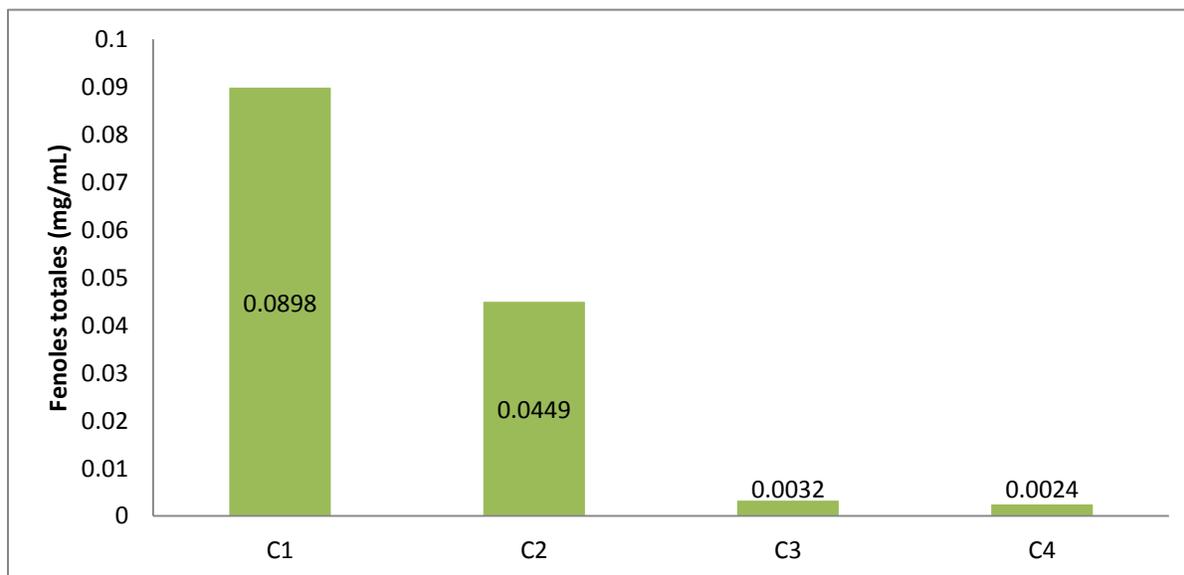


Figura 21. Contenido de fenoles totales (mg/mL) en las diferentes concentraciones de *Ardisia sp*: C1= 1.125 mg/mL; C2= 0.5625 mg/mL; C3= 0.04 mg/mL; C4= 0.03mg/mL

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 22 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[•] que el extracto de *Ardisia sp.*

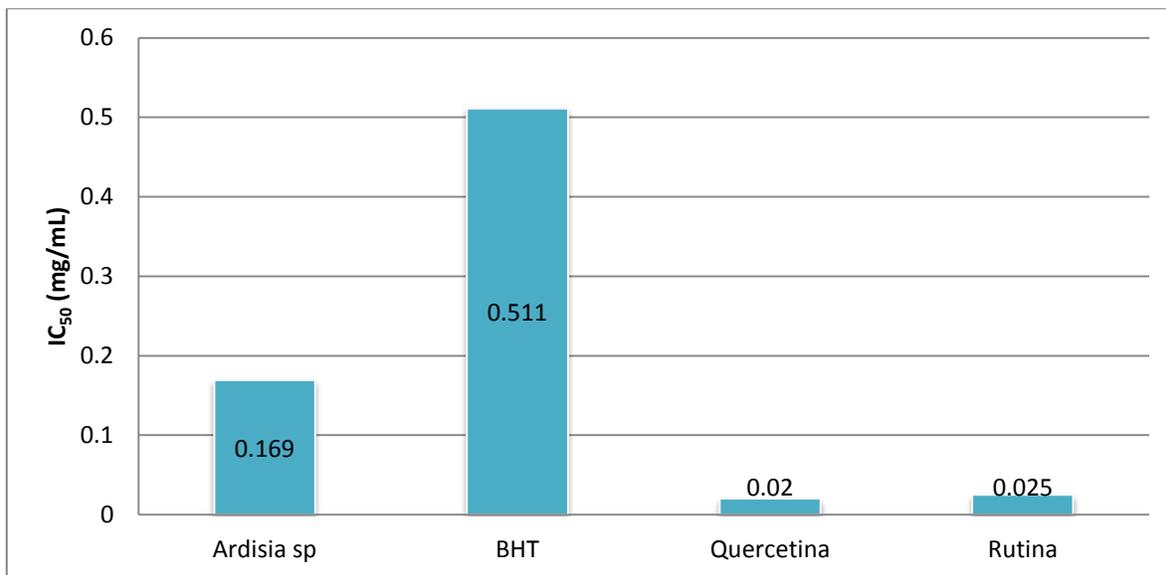


Figura 22. Comparación de la Actividad Antirradical en términos de IC_{50} (mg/mL) entre los extractos de *Ardisia sp* y los estándares BHT, quercetina y rutina

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 23 por los valores de actividad antioxidante (%AA) obtenidos a partir de las diferentes concentraciones del extracto metanólico de *Ardisia sp.*

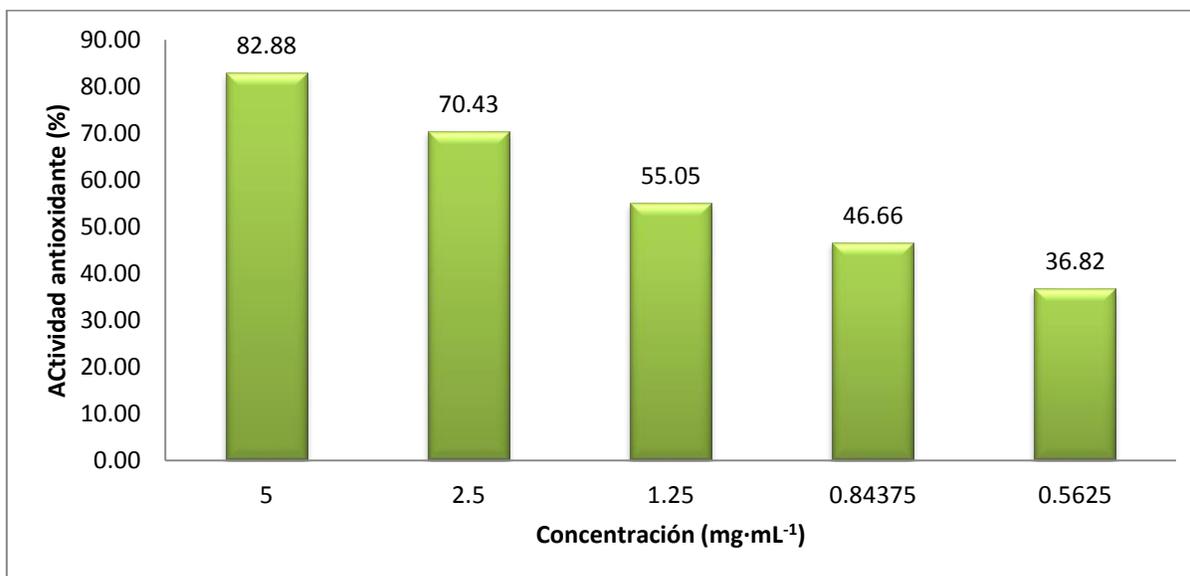


Figura 23. Actividad Antioxidante de extractos metanólicos de *Ardisia sp* a diferentes concentraciones

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 24 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).

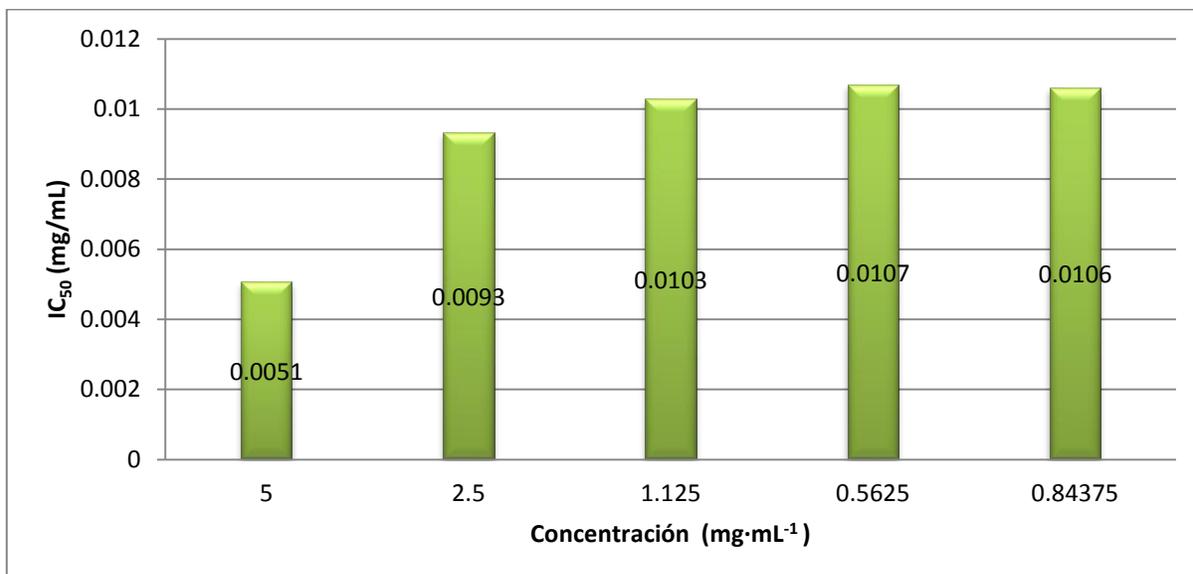


Figura 24. Valores de IC₅₀ para las diversas concentraciones de *Ardisia sp*

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.

CAPITULO X. 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, debio 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.

CAPITULO XI. BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSEN O.M., Markham K.R.; 2006. "*Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*". Boca Raton: CRC, Taylor and Francis.
2. ASTILL, C.; Birch, M. R.; Dacombe, C.; Humphrey, P. G.; Martin, P. T. "*Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions*". Journal Agric. Food. Chem. 2001, 49, 5340-5347.
3. 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, Finlandia.
4. BADÚI S., (1996). "*Química de los alimentos*". 3ª ed. Logman-Alhambra. México DF, México. 645 pp.
5. BEECHER, G. R. "*Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake*". J. Nutr. 2003, 133, 3248S-3254S.
6. BHALLA, R, Narasimhan K, Swarup S (2005) "*Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants*". Plant Cell Rep 24:562-571.
7. BORS, w.; Heller, W.; Michael, C., Saran, M.; "*Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies*". Methods in Enzymology, 1990, 186 343-355.
8. BURDA, S., y Oleszek, W., 2001, "*Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids*", J. Agric. Food Chem., Polonia, 49: 2774-2779.
9. CASTAÑEDA, Ramos LL. E, Ibáñez VL (2008). "*Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas*". Revista Horizonte Médico, Venezuela, 8: 54-72.

10. CHANDRA, Sonia; González De Mejía, E., 2004. "Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3583-3589.
11. CHANG, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. y Chern, J.C., 2002, "Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods", *Journal of Food and Drug Analysis, China*, 10(3) 178-182.
12. 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.
13. Di CARLO, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F., 1999. "Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs". *Life Sciences* 65 (4), 337-353.
14. De MEJÍA, E. G.; Ramírez-Mares, M. V (2002). "Leaf extract from *Ardisia compressa* protects against 1-nitropyrene-induced cytotoxicity and its antioxidant defense disruption in cultured rat hepatocytes". *Food and Chemical Toxicología* 179 (2002) 151-162.
15. 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.
16. DUKE, J. (2001). "Phytochemical and ethnobotanical databases". Green Farmacy Garden 8210 Murphy Rood. Fulton, MD 20759 USA.

17. EREL, O. 2004. "Anovel método de medición directa automatizada para capacidad antioxidante total utilizando una nueva generación, más estable Cati3n radical ABTS". *Clinical Biochemistry* 37: 277-285.
18. 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.
19. FRANKEL, EN & Finley, JW 2008. "C3mo estandarizar la multiplicidad de m3todos para evaluar los antioxidantes naturales". *Diario Agricultura Food Chemistry* 56: 4901 hasta 4908.
20. GONZÁLEZ DE MEJIA, E., S. CHANDRA, M. RAMÍREZ MARES & W. WANG. 2006. "Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase by phenolic compounds in *Ardisia compressa* extracts and their effect on human colon cancer cells". *Food Chemistry Toxicology* 44(8):1191-203.
21. GONZÁLEZ DE MEJÍA, E. & M.V. RAMÍREZ-MARES. 2002. "Leaf extract from *Ardisia compressa* protects against 1-nitropireneinduced cytotoxicity and its antioxidant defense disruption in cultured rat hepatocytes". *Toxicología* 179: 151-162.
22. GOW-CHINYEN., Pin-Der Duh y Hui-LingTsai. 2002. "Antioxidant y propiedades pro-oxidante del 3cido asc3rbico y 3cido g3lico". *Food Chemistry* 79:307-313.
23. HARBORNE JB (1998). "Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plants analysis". 3rd Ed. Published by Chapman and Hall. London. p. 202-215.
24. 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.

25. 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.
26. KARUPPUSAMY, S (2009). "A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures". *Journal of Medicinal Plants Research* 3:1222-1239.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Li, Y.F., L.H. HU, F.C. LOU, J. LI & Q. SHEN. 2005. "PTP1B inhibitors from *Ardisia japonica*". *Journal Asian Natural Products Research* 7 (1):13-8.
31. Li, Y.L., M.X. Su, Y.Z. Cen & Y.C. Zhong. 2006. "Study on the chemical constituents of *Ardisia chinensis*". *Journal of Chinese Medicinal Materials* 29(4): 331-3.

32. LÓPEZ-LUENGO, M.T., 2002. "*Flavonoides*". *Offarm* 21 (4), 108-113.
33. 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.
34. Lu, Z., Nie, G., Belton, PS, Tang. H. & Zhao, B. 2006. "*Estructura-actividad de análisis de la relación de antioxidante capacidad y el efecto neuroprotector de los derivados del ácido gálico*". *Neuroquímica Internacional* 48: 263-274.
35. MIDDLETON E Jr, Kandaswami C y Theoharides TC: "*The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*". *Pharmacol Rev*, 2000, 52:673-751.
36. 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.
37. 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.
38. RUGNA A., Ricco R, Gurni A, Wagner M (2008). Variaciones en el "*Contenido de los Polifenoles Foliarens en Smilax campestris Griseb. - Smilacaceae - según su Grado de Desarrollo*". *Lat. Am. J. Pharm.* 27 (2): 247-249.
39. SINGLETON, V., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999, "*Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, Methods in Enzymology*", 299:153-178.

40. 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.
41. SCALBERT, A., G. Williamson. 2000. "Dietary intake and bioavailability of polyphenols". *The Journal of Nutrition* 130:2073S-2085S.
42. TEMPLE, N. J. 2000. "Antioxidants and disease: More questions than answers". *Nutrition Research* 20:449-459.
43. VELIOGLU, YS, Mazza, G., Gao, L. & Oomah, BD 1998. "La actividad antioxidante y fenoles totales en las frutas seleccionadas, verduras y cereales". *Revista de Agricultura y la Alimentación Química* 46: 4113 a 4117.
44. VILAPAKKAM, RP, Ponnian, SMP, Ramesh, K. & Jemmi, S. 2011. "Antihiperglucemiantes, peroxidativo antilipídico y efectos antioxidantes del ácido gálico en streptozotocin inducida ratas Wistar diabéticos". *European Journal of farmacológicos* 650: 465-47.
45. 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.
46. WAGNER, H., Bladt, S., Zgainski, E.M., 1984. "Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas". Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 163-192.
47. 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.