

42.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

OBTENCION DE ANTIOXIDANTES DE *Licania arborea*,
PROVENIENTE DE LA BIOSFERA DE HUAUTLA,
MORELOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
ADRIANA MEDRANO MARTINEZ



MEXICO, D.F. EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

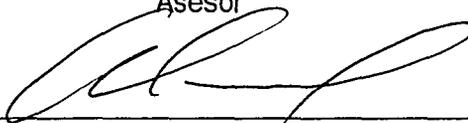
JURADO ASIGNADO

Presidente: María de los Ángeles Valdivia López
Vocal: Ana Adela Sánchez Mendoza
Secretario: Arturo Navarro Ocaña
1er. Suplente: Felipe de Jesús Rodríguez Palacios
2do. Suplente: Héctor Ríos Olivares

El trabajo se desarrolló en el:

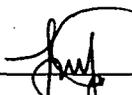
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
LAB 321 CONJUNTO "E" FACULTAD DE QUÍMICA.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Asesor



Dr. Arturo Navarro Ocaña

Supervisor Técnico



Q.F.B. Julieta Sandoval Guillén

Sustentante



Adriana Medrano Martínez

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda y asesoría de cada una de las personas que se mencionan a continuación, cada una especialista en su campo que de alguna u otra manera invirtieron parte de su tiempo para enriquecer esta tesis.

Con especial y profundo agradecimiento al Dr. Arturo Navarro Ocaña, que con su confianza, paciencia, dedicación, apoyo incondicional y enseñanzas, hizo posibles esta tesis. Agradezco que a pesar de sus múltiples ocupaciones, siempre tuvo tiempo para escucharme y ayudarme a resolver los problemas que surgieron durante el desarrollo de mis estudios y por el interés mostrado en todo momento en el avance y conclusión del mismo. Pero sobre todo le agradezco sus consejos y su forma tan amistosa de dirigir mi trabajo, lo cual nunca voy a olvidar.

De igual modo agradezco a Julieta Sandoval Guillén, por sus acertados comentarios y la valiosa ayuda proporcionada en la realización del presente trabajo de Tesis.

A los miembros del jurado por sus valiosas sugerencias, comentarios y críticas que enriquecieron de manera significativa el trabajo escrito: María de los Ángeles Valdivia López, Ana Adela Sánchez Mendoza, Felipe de Jesús Rodríguez Palacios y Héctor Ríos Olivares.

Al personal del laboratorio de la USAI (Facultad de Química, UNAM), en especial a Georgina Duarte, Marisela Gutiérrez y Oscar Yañez, por el apoyo brindado en el registro de los espectros de U.V, IR, EM y RMN.

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa y la Bióloga Valentina Carrasco por la donación del material vegetal.

DEDICATORIA

A mis padres: Olivia Martínez García y Manuel Medrano Gómez^d, por ser el mejor pilar moral que un hijo puede pedir, por su apoyo incondicional, comprensión y motivación a lo largo de mi vida. Por todo el esfuerzo realizado en estos años para lograr mi educación académica.

Con todo mi cariño, por su apoyo y comprensión a mis hermanos German, Teresa, Gerardo, Manuel, Alfredo, Fernando y Miguel.

A mis sobrinitos: Eduardo, Beatriz, Cristian, Magali, Gerardito, Ivan, Manuel y Ismael. Espero sea un ejemplo y una gran motivación para las metas que se propongan en un futuro.

A la familia Hernández García: Josefina, Roberto y Angélica, por sus buenos consejos, amistad y apoyo que siempre me han brindado.

A mis cuñados con los que se que cuento incondicionalmente Guillermina Castellano y Gorge Martínez.

A mi amiga Anel Olvera, la vecinita del laboratorio 323, por su valiosa y sincera amistad.

A mis compañeros del laboratorio 321 por su entusiasmo, buen humo y por crear un ambiente muy agradable para trabajar: Dulce, Sair, Leonardo, Tere, Sergio, Paola, Miriam, Diana, Victor, Sara, Héctor..... y los que faltaron también.

Amis amigos de la carrera que siempre han compartido conmigo las buenas y las malas: Marisela, Antonio, Elva, Miguel, Araceli, Gabriel, Verónica, Karina, Leticia, Larisa, Yair, Luisillo, Rogelio, Roberto, Israel y Erika.

A Lucia Cornejo Barrera por su amistad y por ser una persona a quien estimo mucho.

A mis dos grandes amigas de toda la vida Dalia Solis y Fabiola por el valor real de su amistad

ÍNDICE

1. RESUMEN	i
2. INTRODUCCIÓN	1
3. ANTECEDENTES	3
3.1 Importancia de los antioxidantes	3
3.1.1 Biodegradación oxidativa del organismo	3
3.1.2 Alimentos	4
3.2 Mecanismos de oxidación de los lípidos	4
3.2.1 Autooxidación de los lípidos	5
3.2.1.1 Iniciación	5
3.2.1.2 Propagación	5
3.2.1.3 Terminación	5
3.3 Antioxidantes	6
3.3.1 Acción de los antioxidantes fenólicos	6
3.4 Antioxidantes sintéticos	7
3.4.1 Butilhidroxianisol (BHA)	7
3.4.2 Butilhidroxitolueno (BHT)	8
3.4.3 Terbutilhidroquinona (TBHQ)	8
3.4.4 Galatos de alquilo	9
3.5 Antioxidantes naturales	11
3.5.1 Tocoferoles y Tocotrienoles	11
3.5.2 Carotenoides	13
3.5.3 Flavonoides	15
3.5.4 Ácido ascórbico	18
3.5.5 Alcaloides	18
3.5.6 Ácidos hidroxicinámicos	19
3.5.7 Antioxidantes del Romero	20
3.6 Las plantas como fuente de antioxidantes	21
3.6.1 Grupo de plantas provenientes de la reserva de la biósfera de Huautla, Morelos	22
3.6.2 Características botánicas de <i>Licania arborea</i>	27
3.6.3 Compuestos aislados del género <i>Licania</i> (Chrysobalanaceae)	29

3.7 Métodos de evaluación de la actividad antioxidante	33
4. OBJETIVOS	36
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	37
5.1 Material	37
5.1.1 Reactivos	37
5.2 Primera parte: Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de las veintidós plantas para seleccionar la fuente de obtención de antioxidantes	37
5.2.1 Plantas en estudio	37
5.2.2 Obtención de los extractos	39
5.2.3 Evaluación cualitativa de la actividad antioxidante	39
5.2.3.1 Cromatografía en capa fina	39
5.2.3.2 Actividad secuestrante con el radical-DPPH	39
5.2.3.3 Actividad antioxidante con β -caroteno	39
5.2.4 Evaluación cuantitativa de la actividad antioxidante	40
5.2.4.1 Actividad secuestrante con el radical-DPPH	40
5.2.4.2 Actividad antioxidante con β -caroteno	40
5.3 Segunda parte: Obtención de los compuestos con actividad antioxidante de <i>Licania arborea</i>	43
5.3.1 Procedimientos generales	43
5.3.2 Equipos	44
5.3.3 Planta (<i>Licania arborea</i>)	45
5.3.4 Obtención de los extractos de <i>Licania arborea</i>	45
5.3.5 Purificación del extracto obtenido con acetona de <i>Licania arborea</i>	47
5.3.5.1 Fraccionamiento del extracto obtenido con acetona	47
5.3.5.2 Aislamiento y purificación de los poliprenoles	48
5.3.6 Purificación del extracto obtenido con metanol de <i>Licania arborea</i>	49
5.3.6.1 Fraccionamiento del extracto obtenido con metanol	49
5.3.6.2 Evaluación cuantitativa de las fracciones con alta actividad antioxidante	51
5.3.6.3 Aislamiento y purificación del catecol	51

5.3.7 Identificación y obtención de flavonoides a partir del extracto crudo obtenido con metanol de <i>Licania arborea</i>	54
5.3.7.1 Obtención de los extractos	54
5.3.7.2 Identificación de flavonoides con actividad antioxidante	54
5.3.7.3 Fraccionamiento del extracto obtenido con acetato de etilo	54
5.3.7.4 Aislamiento y purificación de la miricetina-3-rutinoso	55
5.3.8 Evaluación cuantitativa de los antioxidantes aislados	57
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
6.1 Primera parte: Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de las veintidós plantas para seleccionar la fuente de obtención de antioxidantes	58
6.1.1 Plantas en estudio	58
6.1.2 Obtención de los extractos	59
6.1.3 Evaluación cualitativa de la actividad antioxidante	60
6.1.3.1 Actividad secuestrante con el radical-DPPH	60
6.1.3.2 Actividad antioxidante con β -caroteno	61
6.1.4 Evaluación cuantitativa de la actividad antioxidante	68
6.1.4.1 Actividad secuestrante con el radical-DPPH	68
6.1.4.2 Actividad antioxidante con β -caroteno	71
6.1.5 Selección de la fuente de obtención de antioxidantes	74
6.2 Segunda parte: Obtención de los compuestos con actividad antioxidante de <i>Licania arborea</i>	75
6.2.1 Planta (<i>Licania arborea</i>)	75
6.2.2 Obtención de los extractos de <i>Licania arborea</i>	75
6.2.3 Purificación del extracto obtenido con acetona de <i>Licania arborea</i>	76
6.2.3.1 Fraccionamiento del extracto obtenido con acetona	76
6.2.3.2 Aislamiento y purificación de los poliprenoles	76
6.2.4 Purificación del extracto obtenido con metanol de <i>Licania arborea</i>	79
6.2.4.1 Fraccionamiento del extracto obtenido con metanol	79
6.2.4.2 Evaluación cuantitativa de las fracciones con alta actividad antioxidante	81
6.2.4.2.1 Actividad secuestrante con el radical-DPPH	81
6.2.4.2.2 Actividad antioxidante con β -caroteno	83

6.2.4.3 Selección de la fracción para la obtención de los antioxidantes	85
6.2.4.4 Aislamiento y purificación del catecol	85
6.2.5 Identificación y obtención de flavonoides a partir del extracto crudo obtenido con metanol de <i>Licania arborea</i>	87
6.2.5.1 Obtención de los extractos	87
6.2.5.2 Identificación de flavonoides con actividad antioxidante	87
6.2.5.3 Fraccionamiento del extracto obtenido con acetato de etilo	91
6.2.5.4 Aislamiento y purificación de la miricetina-3-rutinoso	91
6.2.6 Evaluación cuantitativa de los antioxidantes aislados	93
6.2.6.1 Actividad secuestrante con el radical-DPPH	93
6.2.6.2 Actividad antioxidante con β -caroteno	96
7. CONCLUSIONES	98
8. BIBLIOGRAFÍA	99

1. RESUMEN

El presente proyecto de investigación tiene por objetivo evaluar la actividad antioxidante de un grupo de veintidós plantas provenientes de la reserva de la biósfera de Huautla-Morelos, con el fin de obtener antioxidantes.

El presente trabajo se realizó en dos etapas, en la primera se evaluó la actividad antioxidante de un grupo de veintidós plantas. Para este fin los extractos fueron obtenidos mediante extracciones sucesivas utilizando disolventes de diferente polaridad (Hexano, Acetona, Metanol y Metanol-Agua), los cuales fueron evaluados cualitativamente por cromatografía en capa fina (CCF), empleando los ensayos del radical-2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (radical-DPPH) y blanqueo (decoloración) del β -caroteno, para determinar la actividad antioxidante. Se encontró que en los extractos de metanol y metanol-agua se tiene una mayor actividad antioxidante para ambos ensayos. De las veintidós muestras analizadas se observó que *L. arborea* (1), *S. macrocarpum* (5), *V. mollis* (8), *H. patens* (12), *A. viminalis* (11), *S. humidis* (13), *S. bella* (14), *R. fusca* (15), *B. grandifolia* (16), *P. ellipticum* (20) y *C. engleriana* (21) fueron las que presentaron mayor actividad.

Para seleccionar las plantas con mayor actividad, se realizó una comparación cuantitativa a los extractos obtenidos con metanol de las veintidós plantas con patrones de referencia, por los métodos del radical-DPPH y blanqueo del β -caroteno. Los resultados cuantitativos con radical-DPPH muestran que de los veintidós extracto obtenidos con metanol los que presentaron mayor actividad secuestrante fueron: 5 (51.39%), 7 (50.41%), 1 (46.39%), 11 (39.56%), 16 (37.95%), 3 (37.60%) 6 *F. cotinifolia* (37.04%), 14 *S. bella* (35.24%) y 12 *H. patens* (34.29%), y con β -caroteno los que presentaron mayor actividad antioxidante fueron: 1 (36.01%), 14 (35.19%), 2 (34.35%), 12 (31.37%), 5 (29.23%), 3 (29.15%) y 4 (26.87%).

En la segunda etapa se seleccionó a la planta *Licania arborea*, para el aislamiento, purificación y caracterización de los compuestos con actividad antioxidante a partir de los extractos obtenidos con acetona y metanol. La actividad de los compuestos aislados fue comparada cuantitativamente con patrones de referencia. Del extracto obtenido con acetona se aislaron dos resinas identificadas como **poliprenol 1** y **poliprenol 2** y del extracto metanólico se obtuvo una mezcla de compuestos identificados como **β -sitosterol** y **estigmasterol**, **catecol** y **miricetina-3-rutinosa**.

Finalmente los compuestos **poliprenol 1**, **poliprenol 2** y **catecol** fueron comparados cuantitativamente con antioxidantes comerciales. Los resultados de este análisis cuantitativo con el radical-DPPH indican que de los antioxidantes aislados el catecol presentó mayor actividad secuestrante (52.09%) con respecto al BHA (23.98%), quercetina (36.48%) y con β -caroteno se obtuvo que el poliprenol 1 presentó mayor actividad antioxidante (84.34%) con respecto a los patrones de referencia.

2. INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes tienen una importancia muy relevante tanto en los seres humanos como en los alimentos, ellos pueden impedir o retardar la formación de radicales libres, ya sea secuestrando o donando átomos de hidrógeno.

En los seres humano, el proceso oxidativo es esencial para la vida, por lo tanto debe haber un equilibrio fisiológico entre el sistema de oxidación y el sistema de protección antioxidante sobre los sustratos susceptibles a la oxidación (lípidos, proteínas) sin embargo en situaciones extremas, si los sistemas de protección antioxidante resultan insuficientes puede haber una degradación oxidativa del organismo y generar enfermedades, por eso es importante tener una dieta rica en antioxidantes.

En los alimentos con alto contenido de lípidos, los radicales libres provocan una serie de cambios durante el procesamiento y almacenamiento. Estos cambios son causados por la oxidación de lípidos. Tal oxidación depende de las condiciones bajo las cuales se encuentra el alimento como: la luz, temperatura, oxígeno, humedad, metales. La oxidación de lípidos es una reacción en cadena de radicales libres que causan un total cambio en las propiedades sensoriales (olor, color, sabor y textura) y disminución del valor nutritivo (daño a proteína y pérdida de vitaminas). La oxidación de lípidos puede ser retardada por la adición de antioxidantes

Existen dos tipos de antioxidantes los sintéticos y naturales. Los sintéticos, tales como el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroquinona (TBHQ) y galato de propilo (PG) son los más utilizados en la industria alimentaria, pero sin embargo han sido criticados por posibles efectos tóxicos, además de ser muy volátiles a temperaturas elevadas y en presencia de vapor de agua como el BHA y BHT. Por esta razón surge un interés por obtener nuevos antioxidantes de fuentes naturales que puedan contrarrestar los efectos negativos de los antioxidantes sintéticos, como una opción a los sintéticos ya que las ventajas que presentan estos compuestos naturales son por su acción potencialmente benéfica para la salud como la inhibición de los daños oxidativos causados por la peroxidación de los lípidos previniendo las enfermedades degenerativas. En algunos casos son menos volátiles y más estables, algunos de ellos presentan mayor actividad antioxidante por ejemplo el ácido rosmarínico, el cual se ha encontrado que presenta mayor actividad antioxidante con respecto al BHA y BHT.

Se han aislado compuestos de distintas fuentes naturales que presentan actividad antioxidante, como los tocoferoles en los aceites vegetales; los carotenos y ácido ascórbico en frutas cítricas y leguminosas; el ácido ferúlico en la pared celular de vegetales; los ácidos rosmarínico, ursólico, carnosol en las especias y los flavonoides de frutas y plantas.

De las fuentes naturales mencionadas anteriormente, México cuenta con una diversidad rica en plantas que en general son utilizadas en la medicina tradicional, resaltando que un porcentaje mínimo de estas especies han sido objeto de algunos estudios químicos enfocados al aislamiento de compuestos con actividad antioxidante. De lo anterior se desprende que el potencial que ofrecen las plantas son una fuente importante para el aislamiento y caracterización de compuestos con actividad antioxidante.

El presente proyecto se enfoca a la evaluación de la actividad antioxidante de un grupo de veintidós plantas, provenientes de la reserva de la biósfera de Huautla-Morelos, con el propósito de obtener compuestos con actividad antioxidante, dada la preferencia de la gente hacia lo natural. Vale destacar las características antioxidantes de los compuestos naturales como una opción a los sintéticos.

El grupo de plantas en estudio fue seleccionado con base en estudios previos de herbivoría se comprobó que presentaban compuestos fenólicos, por lo que resultó interesante relacionar el contenido de estos compuestos con la actividad antioxidante. Por lo que el estudio de estas plantas permitiría conocer algunas de las estructuras moleculares de compuestos con actividad antioxidante.

3. ANTECEDENTES

3.1 IMPORTANCIA DE LOS ANTIOXIDANTES

3.1.1 Biodegradación oxidativa del organismo

Los antioxidantes tienen una importancia muy relevante, tanto en los seres humanos como en los alimentos, ellos pueden retardar o impedir la formación de radicales libres, ya sea secuestrando o donando átomos de hidrógeno.

En los seres humanos, el proceso de la oxidación es esencial para la vida del que se obtienen indudables beneficios ya que las necesidades energéticas del organismo se cubren con la oxidación de los nutrientes principales que aportan los alimentos como los lípidos y proteínas. Generalmente el proceso oxidativo está regulado por vía enzimática. Para mantener el equilibrio fisiológico del organismo, debe actuar de forma moderada, el sistema de oxidación y el sistema de protección antioxidante sobre los sustratos susceptibles a la oxidación de importancia vital para el organismo (De la Torre, 1997). Sin embargo en situaciones extremas, si los sistemas de protección antioxidante son insuficientes, se generan especies reactivas derivadas del oxígeno como los radicales superóxido (O_2^*), hidroxilo (OH^*), peroxilo (RO_2^*), alcoxilo (RO^*), nitroxilo (NO^*), (Halliwell, 1994). Una producción excesiva de estos diferentes radicales libres en particular los *radicales hidroxilo*, pueden fácilmente iniciar el proceso de oxidación causando un severo daño a las moléculas como los lípidos especialmente a los ácidos grasos insaturados, proteínas y carbohidratos (De la Torre, 1997). Una situación de este tipo, en donde hay una producción excesiva de especies reactivas del oxígeno, puede fácilmente iniciar el proceso de degradación oxidativa del organismo y derivar enfermedades degenerativas entre las que cabría destacar el cáncer, diabetes, artritis, cataratas, desórdenes inflamatorios, aterosclerosis, trombosis, degeneración neurológica, enfermedades cardiovasculares, por nombrar algunas (Madhavi, 1996). Por eso es recomendable tener una dieta rica en antioxidantes de forma mantenida y habitual para disminuir y prevenir los daños oxidativos.

Existen dos sistemas protectores de la oxidación (Larso, 1998):

1. Sistemas enzimáticos: superoxidodismutasa (SODs), catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión-S-transferasa.

2. Sistemas no enzimáticos: vitamina E, vitamina C, β -caroteno, flavonoides, ácido úrico, ácido rosmarínico, bilirrubina, ceruloplasmina y aminoácidos como histidina, triptofano y metionina.

3.1.2 Alimentos

En los alimentos con alto contenido de lípidos, los radicales libres provocan una serie de cambios durante el procesamiento y almacenamiento. Estos cambios son causados por varios factores que incluyen reacciones de oscurecimiento y oxidación de lípidos (Rodríguez, 1984). Tal oxidación depende de las condiciones bajo las cuales se encuentra el alimento como: la luz ($h\nu$), temperatura (t), oxígeno (O_2), acidez (pH), actividad del agua (a_w) y presencia de metales (Fe^{2+} , Cu^{2+}). La oxidación de lípidos es una reacción en cadena de radicales libres que causan un total cambio en las propiedades sensoriales (olor, color, sabor y textura) y disminución del valor nutritivo (daño a proteína y pérdida de vitaminas) (Madhavi, 1996).

3.2 MECANISMOS DE OXIDACIÓN DE LOS LÍPIDOS

El término rancidez se usa para describir los diferentes mecanismos a través de los cuales se alteran los lípidos y se han dividido en tres grupos: *lipólisis* o rancidez hidrolítica, *autooxidación* o rancidez oxidativa y fotooxidación; la primera se debe básicamente a la acción de las lipasas que liberan ácidos grasos de los triacilglicéridos, mientras que la segunda se refiere a la acción del oxígeno sobre las insaturaciones de los ácidos grasos y en la última el oxígeno triplete (3O_2), que intervienen preferentemente en reacciones monoeléctricas con radicales, por lo que la oxidación directa de un ácido graso no ocurre fácilmente.

La forma activa es el oxígeno singulete (1O_2). En este estado los dos electrones de la capa de valencia tienen "spin" opuestos, es decir se sitúan en forma antiparalela, de manera que la repulsión electrostática es grande, dando lugar a un estado excitado de vida corta y muy electrófilo. Por lo tanto puede reaccionar más rápidamente con zonas de densidad electrónica alta, tales como los dobles enlaces $C=C$. Para la formación del oxígeno singulete se precisa la concurrencia de ciertas sustancias que actúan como sensibilizadores encontrándose dos tipos: el tipo 1, es el sensibilizador activado por la luz que reacciona con el sustrato con formación de radicales provocando una autooxidación, en el tipo 2, la reacción consiste al contrario, en la activación del oxígeno a 1O_2 (Belitz, 1997).

3.2.1 Autooxidación de los lípidos

De los tres mecanismos mencionados anteriormente el más importante es el de la autooxidación de lípidos, lo que hace que los alimentos que sufren este tipo de reacciones sean rechazados por el consumidor o que se reduzca su vida útil, además de que algunos productos de oxidación son potencialmente tóxicos. La estabilidad de los alimentos con alto contenido de lípidos disminuye en presencia de luz, debido a que ésta inicia la formación de los radicales peroxi, siendo éstos los productos primarios de la autooxidación de lípidos. Ésto tiene lugar por mecanismos típicos de radicales libres que comprenden tres etapas: iniciación, propagación y terminación.

3.2.1.1 Iniciación

En la etapa de iniciación se sustrae uno de los átomos de hidrógeno del carbono alílico adyacente a un doble enlace del ácido graso, formándose radicales libres al cual el oxígeno puede unirse fácilmente. Esta reacción está catalizada principalmente por la presencia de metales, oxígeno, luz y temperatura. Aunque cuando el oxígeno tiene una configuración electrónica de singulete, puede unirse directamente al ácido insaturado sin la previa formación de radicales libres; produciéndose así los correspondientes hidroperóxidos.

3.2.1.2 Propagación

En la etapa de la propagación los radicales libres formados en la primera etapa reaccionan con el O_2 para dar origen a radicales peroxi, estos radicales son capaces de sustraer un átomo de hidrógeno de nuevos ácidos grasos, formando hidroperóxidos y radicales libres con lo cual se propaga la reacción.

3.2.1.3 Terminación

La etapa de terminación, se efectúa a través de reacciones de condensación formando compuestos muy estables. Las reacciones de descomposición de los hidroperóxidos formados en la etapa de propagación producen diferentes compuestos como son aldehídos, cetonas, ácidos, epóxidos, polímeros y cetoglicéridos; algunos de los cuales son responsables de las propiedades sensoriales de las grasas oxidadas, además los radicales peroxi tienen la capacidad de interactuar con otros constituyentes de los alimentos como proteínas y pigmentos reduciendo su valor nutritivo y generando sustancias tóxicas (Belitz, 1997).

3.3 ANTIOXIDANTES

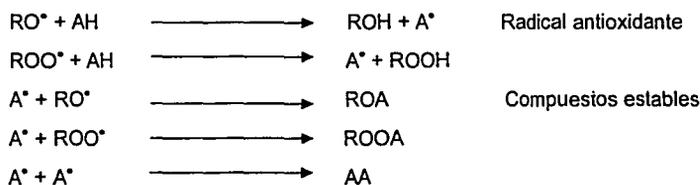
Para evitar la formación de los radicales libres durante la etapa de iniciación en la autooxidación de lípidos, se ha recurrido a la utilización de los antioxidantes, los cuales son sustancias o mezclas de sustancias que retardan el inicio o bien disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales autooxidables, evitando la propagación de los radicales libres y por consiguiente la formación de los hidroperóxido mediante tres mecanismos: 1) donación de átomos de hidrógeno (H^+), 2) transferencia de electrones que determina la formación de una molécula radical antioxidante inactiva o estable y 3) la habilidad para acomplejar metales, ésto depende de la naturaleza del grupo funcional y de la colocación en que se encuentren en la molécula (Packer, 1999).

Los principales antioxidantes utilizados en los alimentos son los mono y polifenoles con varias sustituciones en el anillo, cada uno de los hidroxilos tienen una potencia distinta y se ha visto que la sustitución de estos grupos en la posición orto y para aumenta considerablemente la actividad antioxidante (Fennema, 1993).

3.3.1 Acción de los antioxidantes fenólicos

Los antioxidantes tienen uno o más grupos hidroxilo y actúan en los pasos de iniciación de la oxidación actuando como donadores de hidrógeno o como aceptores de radicales libres, pues ceden un átomo de hidrógeno tanto a los radicales alcoxi (RO^*) como a los peroxi (ROO^*). Los radicales de los antioxidantes son estables debido a su resonancia con un sistema aromático logrando que no se pueda sustraer átomos de hidrógeno del carbono alílico adyacente a un doble enlace del ácido graso evitando que no se promueva la oxidación de los lípidos. En la tabla No.1 se ilustra el mecanismo de acción de los antioxidantes fenólicos (Sortwell, 1997).

Tabla No. 1 Mecanismo de acción de los antioxidantes fenólicos



3.4 ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

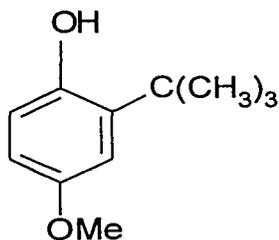
Existen dos tipos de antioxidantes, los sintéticos y naturales. Entre los antioxidantes sintéticos más utilizados en la industria alimentaria se encuentran el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroquinona (TBHQ) y el galato de propilo (PG). Éstos detienen la formación de los radicales libres que se generan en la oxidación de los lípidos y al reaccionar con ellos los estabilizan. (Sortwell, 1997)

Las ventajas que presentan estos tipos de antioxidantes es que son baratos, activos a concentraciones bajas, solubles en sistemas liposolubles y actúan como sinergistas para incrementar la actividad antioxidante, ya sea con ellos mismos o con antioxidantes naturales como el ácido ascórbico, tocoferoles, carotenoides, etc (Madhavi, 1996).

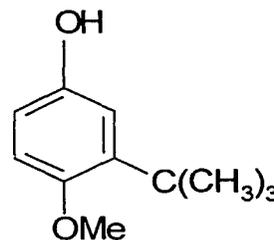
3.4.1 Butilhidroxianisol (BHA)

El BHA es una mezcla de dos isómeros, el 3-ter-Butil-4-hidroxianisol y el 2-ter-Butil-4-hidroxianisol, los cuales en su estructura contienen un grupo hidroxilo y un grupo terbutilo. Este antioxidante es más efectivo para estabilizar emulsiones de aceites puros ya que por ser lipofílico, se concentra mas cerca de la membrana de las micelas donde se lleva a cabo la oxidación.

Es un antioxidante grado alimentario y tiene un valor de DL₅₀ oral para ratas de 2.2 g/kg. Con la ventaja de que el cuerpo humano lo elimina apropiadamente (aproximadamente 80% en 24 hrs) (Madhavi, 1996).



3-ter-Butil-4-hidroxianisol



2-ter-Butil-4-hidroxianisol

Figura 1. Estructuras del BHA

3.4.2 Butilhidroxitolueno (BHT)

El BHT (2,6-di-ter-Butil-4-metilfenol) es un sólido (perlas cristalinas) blanco con propiedades similares al BHA. Por su estructura química es sumamente débil como estabilizante en aceites vegetales ya que al igual que el BHA presenta impedimento estérico, y es más efectivo para estabilizar emulsiones que aceites puros, es ideal para grasas animales. Tiene un valor de DL_{50} oral para ratones de 1.4 g/kg, pero el cuerpo humano lo absorbe en pequeñas cantidades (Madhavi, 1996).

El BHT es particularmente buen antioxidante aunque normalmente es utilizado en mezclas con otros antioxidantes como el BHA, ácido cítrico, ácido fosfórico y galato de propilo para obtener efectos sinérgicos, es usado en barras de granola, cereales, grasas animales, papas fritas, margarinas, cosméticos, productos farmacéuticos, etc.

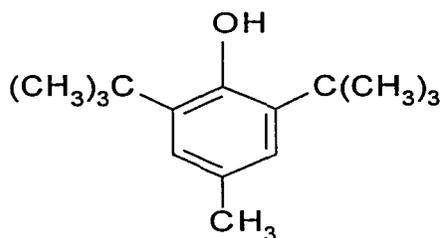


Figura 2. Estructura del BHT

3.4.3 Terbutilhidroquinona (TBHQ)

El TBHQ es un polvo de color beige, tiene una estructura muy similar al BHT solo que incluye un grupo hidroxilo en vez del grupo metilo. Es un antioxidante grado alimentario y exhibe una excepcional potencia en aceites vegetales altamente insaturados y en grasas animales comestibles. No presenta decoloración cuando es usado en presencia de hierro. No produce olor y sabor discernible cuando es adicionado en aceites, grasas y alimentos.

El TBHQ presenta una buena solubilidad y puede mezclarse con el BHA y BHT para permitir combinaciones de antioxidantes altamente efectivas para la estabilización de aceites y alimentos cuya formulación contienen alto contenido de lípidos.

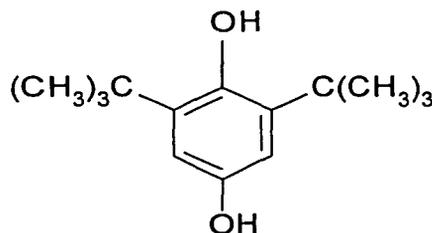


Figura 3. Estructura del TBHQ

3.4.4 Galatos de alquilo

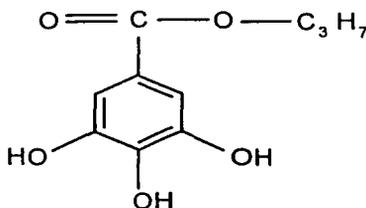
Los galatos son ésteres del ácido gálico y los que más se emplean son los de propilo, octilo y dodecilo, el incremento del tamaño de la cadena alifática los hace más liposolubles y así el galato de propilo es algo soluble en agua.

Los galatos de alquilo tienen la particularidad de producir una coloración azul en los alimentos que contienen hierro al formarse un complejo azul-negro en una reacción tan sensible que se lleva a cabo con el propio hierro de la mioglobina de la carne de los embutidos. En los alimentos que tiene una composición compleja, es factible que se induzca esta interacción en la fase acuosa ya que es ahí donde se encuentra el hierro.

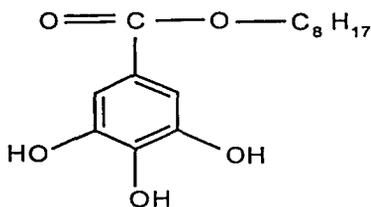
El galato de propilo es un polvo blanco cristalino ligeramente soluble en agua, adecuado para grasas animales y aceites vegetales. Su punto de fusión es de 148°C, por lo que pierde su efectividad bajo condiciones de calentamiento a temperaturas de más de 190°C (Madhavi, 1996).

Comercialmente podemos encontrar el galato de propilo solo o en mezclas con otros antioxidantes por su acción sinérgica. Se puede mezclar con BHA y ácido cítrico es usado como agente secuestrante de cualquier traza de iones metálicos presentes, reduciendo así la posibilidad de formación de compuestos coloridos en el producto final.

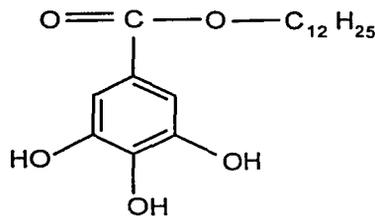
En general para efectos comerciales son muy frecuentes las mezclas de antioxidantes, por ejemplo, TBHQ y BHT con aspectos de un líquido ámbar de baja viscosidad para aplicación en aceites y grasas vegetales o animales que se vayan a utilizar en procesos con temperaturas bajas.



Galato de propilo



Galato de octilo



Galato de dodecilo

Figura 4. Estructuras de algunos Galatos de Alquilo

Este tipo de antioxidantes sintéticos presentan ciertas desventajas ya que en particular el BHA y BHT son muy volátiles e inestables a temperaturas elevadas y en presencia de vapor de agua, además de que se les ha asociado con posibles efectos tóxicos (Dapkevicius, 1998). Debido a estos problemas y a la tendencia creciente de la gente por consumir productos naturales, surge un interés por la obtención de nuevos antioxidantes que puedan contrarrestar los efectos que presentan los antioxidantes sintéticos, ya que las ventajas que presentan los antioxidantes naturales por su acción potencialmente benéfica para la salud, son por ejemplo la inhibición de los daños oxidativos causados por la peroxidación de los lípidos, previniendo así las enfermedades degenerativas; son menos volátiles y más estables, algunos de ellos presentan alta actividad antioxidante, por ejemplo el ácido rosmarínico el cual presenta mayor actividad antioxidante con respecto al BHA y BHT.

3.5 ANTIOXIDANTES NATURALES

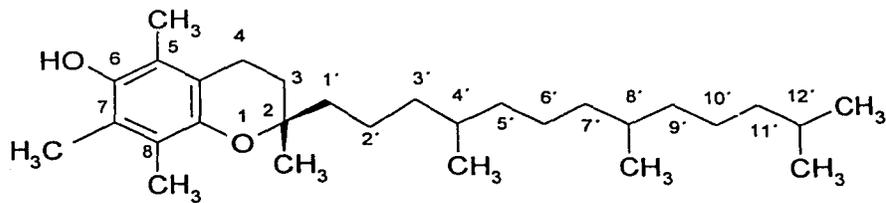
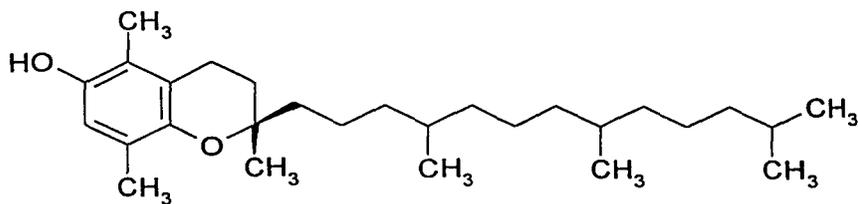
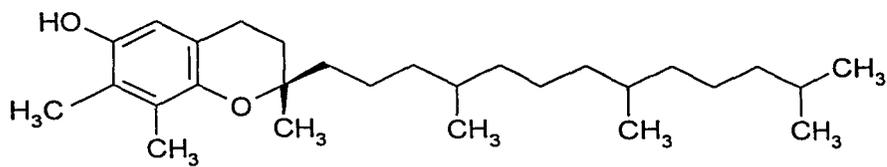
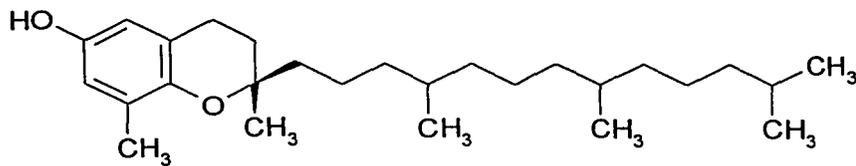
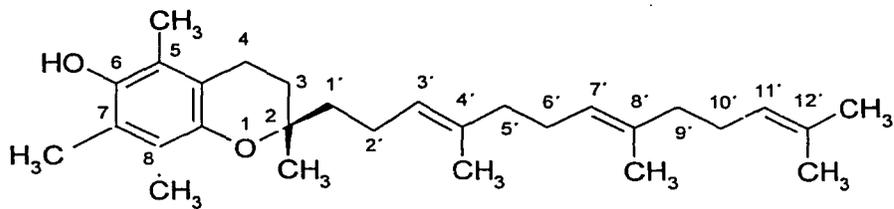
Entre los grupos de antioxidantes aislados de fuente natural más importantes se encuentran los tocoferoles, carotenoides, flavonoides, ácido ascórbico, alcaloides, fenoles ácidos, antioxidantes del romero, aminoácidos y proteínas, sin embargo los que tienen mayor actividad antioxidante son los que presentan en su estructura una parte fenólica con los grupos hidroxilos en posición orto y para (Moire, 2001).

3.5.1 Tocoferoles y Tocotrienoles

Los tocoferoles y tocotrienoles son considerados la principal fuente de vitamina E, son los antioxidantes más ampliamente distribuidos en la naturaleza encontrándose principalmente en la fase lipídica de los alimentos como: semillas, aceites vegetales, granos de cereales, frutas, hortalizas y productos de origen animal. Los tocoles son los 2-metil-2 (4',8',12'-trimetiltridecil) cromano-6-oles, son derivados poliinsaturados (núcleo cromanol) y tienen una cadena lateral saturada de 16 átomos de carbono, centros de asimetría en las posiciones 2, 4' y 8', mientras que los tocotrienoles son idénticos excepto por la presencia de un doble enlace en la posición 3', 7' y 11' de la cadena lateral. Existen ocho diferentes formas de la vitamina E con relativa actividad antioxidante: α -, β -, γ - y δ -tocoferoles y α -, β -, γ - y δ -tocotrienoles cuya estructura química se muestra en la figura 5 (Packer, 1999).

Como antioxidantes los tocoferoles ejercen su máxima eficacia a niveles relativamente bajos, ésta aumenta en la serie $\alpha \longrightarrow \delta$, en general el α -tocoferol es considerado la principal fuente de vitamina E, a pesar de que este tiene poca actividad antioxidante, el δ - y γ -tocoferol son considerados substancialmente antioxidantes más efectivos. Sin embargo la actividad relativa de estos compuestos se ve influida significativamente por la temperatura y luz (Belitz, 1997).

La vitamina E es un potente secuestrador de radicales peroxil formando radicales estables como el radical tocoferoxil, protegiendo a los ácidos grasos poliinsaturados, los fosfolípidos de las membranas biológicas y a las lipoproteínas del plasma (Packer, 1999).

 α -tocopherol β -tocopherol γ -tocopherol δ -tocopherol α -tocotrienol

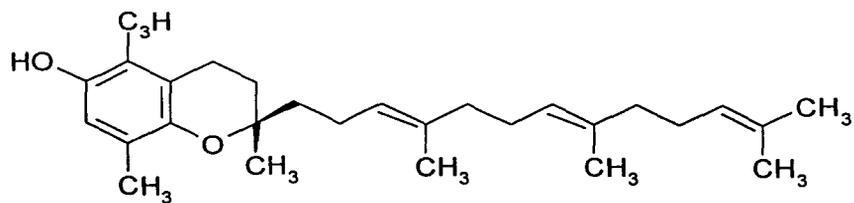
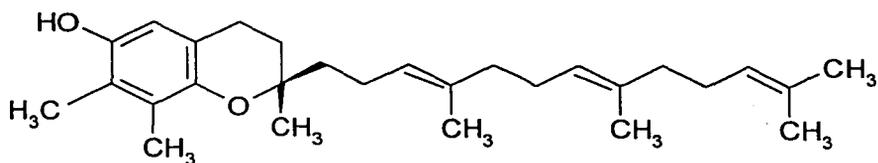
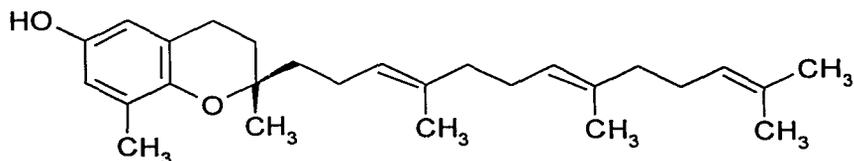
 β -tocotrienol γ -tocotrienol δ -tocotrienol

Figura 5. Estructuras de los tocoferoles y tocotrienoles

3.5.2 Carotenoides

Los carotenoides son otro grupo de compuestos que presentan actividad antioxidante, los cuales están presentes en una amplia variedad de alimentos como son las frutas y en los vegetales aislándose principalmente de la manzana, naranja, guayaba, zanahorias, espinacas y brócoli. Estos compuestos impiden la formación del oxígeno singulete suprimiendo la acción de los hidropéroxidos, esta habilidad se relaciona con el número de dobles enlaces presentes en la molécula, por ejemplo los que tienen 9, 10 y 11 dobles enlaces conjugados son más activos que los que tienen 8 o menos (Madhavi, 1996).

La estructura química de la mayoría de estos compuestos es poliénica de 40 átomos de carbono, formada por ocho unidades de isopreno, cuyo arreglo se hace inverso en el centro y pueden ser de cadena lineal o tener ciclizaciones en los extremos.

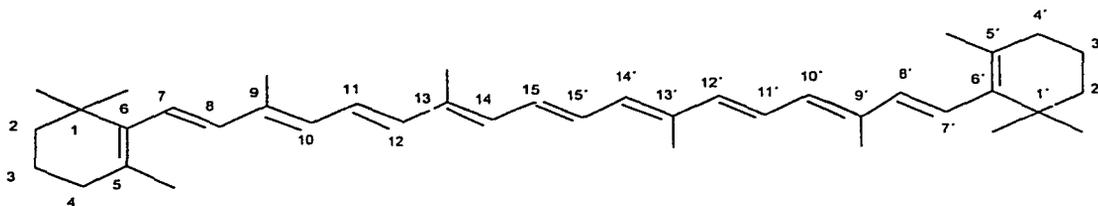
El sistema conjugado de dobles enlaces es el responsable de las coloraciones del amarillo al rojo, esto es debido a la deslocalización de electrones a lo largo de la cadena insaturada. La intensidad del color es afectada por la longitud de la cadena insaturada de la cual los electrones pueden oscilar, así como de la configuración de la cadena, que pueden contener enlaces *cis* o *trans*.

Se han dividido en dos grandes grupos de acuerdo con su estructura química: carotenos y xantofilas. Los primeros tienen características de hidrocarburos, son solubles en éter de petróleo y poco en etanol; entre estos destacan el β -, γ -carotenos y licopeno cuyas estructuras químicas se muestran en la figura 6.

Por su parte las xantofilas son la forma oxidada de las anteriores. Se presentan como ácidos, aldehídos o alcoholes y son solubles en etanol, metanol y éter de petróleo, por ejemplo la flucoxantina, la luteína y la violaxantina. Ambos grupos le deben su color a la conjugación de los dobles enlaces, así como la presencia de anillos extremos (en caso de su existencia).

En términos generales, en la naturaleza la cantidad de xantofilas sobrepasa la de carotenos; sin embargo β -caroteno es el carotenoide de mayor importancia ya que es usado en la industria de los alimentos como colorante. Puede ser adicionado a aceites vegetales mostrando una protección antioxidante similar a la del BHA.

Los carotenoides están sujetos a muchos cambios químicos inducidos por las diferentes condiciones de procesamiento (principalmente por las altas temperaturas, las electromagnéticas y el oxígeno) que se dan en la industria (Packer, 1999).



β -Caroteno

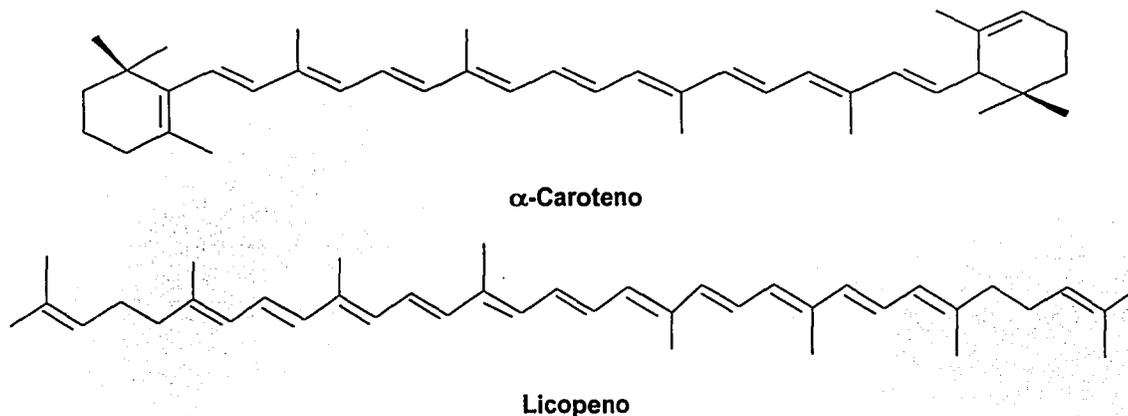


Figura 6. Estructuras de algunos carotenos

3.5.3 Flavonoides

Los flavonoides son otro grupo importante de antioxidantes naturales, son pigmentos comúnmente encontrados en los vegetales, frutos y algunas plantas. Estos pigmentos son generalmente amarillos, son glicósidos formados principalmente por una aglucona que contienen varios grupos fenólicos en su estructura (Harbore, 1999). La amplia gama de efectos atribuidos a los flavonoides constituye la expresión de funcionalidad de su grupo químico, incluyendo propiedades de oxido-reducción, interacción con los mecanismos de transmisión de señales y efectos benéficos para la salud (antiviral, antiinflamatoria, antialérgicas, acción vasodilatadora, anticancerígenas, etc) además constituyen el principio activo de algunas plantas medicinales. Su acción antioxidante depende de su capacidad para reducir radicales libres y quelar metales, impidiendo las reacciones catalizadas por los radicales libres.

Normalmente los flavonoides son estables al calor y a las reacciones de oxidación, resisten la mayoría de los tratamientos térmicos realizados en la manufactura de alimentos. Se estima que el número de flavonoides conocidos por la diversidad de su estructura molecular es de alrededor de 5000 sustancias (Yan-Hwo, 2000 y Pietta, 2000).

La estructura básica de los flavonoides consiste en un núcleo de flavon, los cuales tienen 15 átomos de carbono en su núcleo básico y están ordenados en una configuración $C_6-C_3-C_6$ es decir dos anillos aromáticos de carbono, que darán origen al anillo B, relacionados con un núcleo básico (figura 7) (Pietta, 2000).

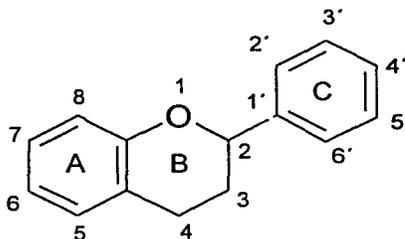
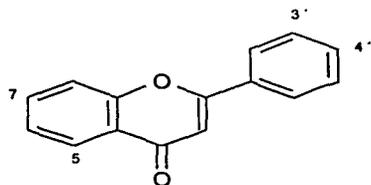


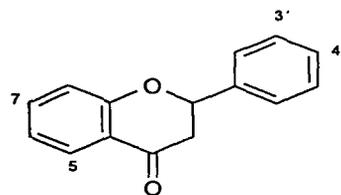
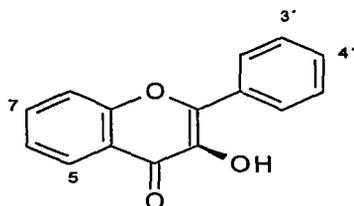
Figura 7. Estructura básica de los flavonoides

Entre las principales agluconas se encuentran las flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles, flavon 3-oles y antocianidinas. Las diferencias que existen entre estas agluconas son el grado de aromaticidad, el ordenamiento y el número de hidroxilos sustituidos así como la extensión y el tipo de glicosilación de estos grupos. El sitio de glicosilación preferida es la posición tres y la glucosa constituye el residuo más usual, existiendo otros residuos como la galactosa, ramnosa, xilosa, fructosa, etc (Packer, 1999).

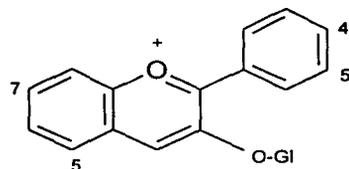
Se han aislado y caracterizado flavonoides de varias fuentes naturales, específicamente de los granos de cereales y plantas aromáticas como el perejil, romero y tomillo, de donde se han obtenido flavonas (apigenina, luteolina y quisina); las flavanonas de frutas cítricas (hesperetina, eriodictiol y naringina); los flavonoles de frutas y vegetales (quercetina, miricetina, kaemferol, galangina y fisetinla); isoflavonoides de leguminosas en las que incluye soya, frijoles negros y frijoles verdes (genisteina, genistina, deidzeina, deidzina y biochanina-A); flavan-3-oles de plantas (catequina, epicatequina, epigalocatequina y ésteres de galato); oligómeros de flavona de la manzana, uvas, fresas, pasas, sorgo y grano de cebada y las antocianidinas de las frambuesas, fresa, cerezas y uvas (cianidina, delfinidina, malvidina). Las estructuras básicas de los principales grupos de flavonoides son expuestas en la figura 8, junto con ejemplos de cada uno (Pietta, 2000 y Priori, 2000).

**FLAVONAS**

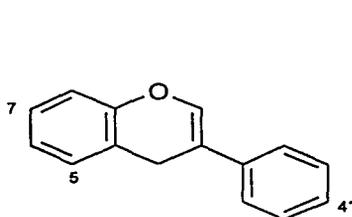
Apigenina 5=7=3'=4'=OH

**FLAVANONAS**Hesperetina: 5 = 7 = 3' = OH, 4' = OCH₃**FLAVONOLES**

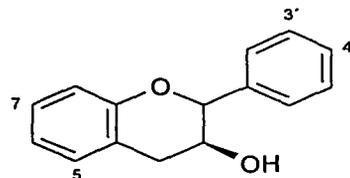
Quercetina: 5 = 7 = 3' = 4' = OH

**ANTOCIANINAS**

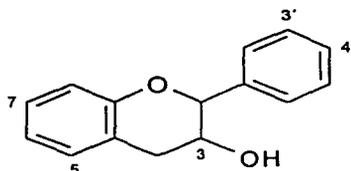
Cianidina-3-glucosa 5'=4'=5=7=OH

**ISOFLAVONAS**

Genisteina: 5=7=4'=OH

**FLAVAN-3-OLES**

(+) -Catequina: 5=7=3'=4'=OH

**DIHIDROFLAVONOLES**

Dihidroquercetina: 3=5=7=3'=4'=OH

Figura 8. Estructura básica de lo principales grupos de flavonoides.

3.5.4 Ácido ascórbico

Otro compuesto que presenta actividad antioxidante es el ácido ascórbico y se encuentra de manera natural en varias frutas y vegetales (manzana, guayaba, naranja, plátano, limón, espárragos, papas, tomates, espinacas, brócoli, etc). Es un agente reductor muy fuerte, el efecto de actividad antioxidante de este compuesto de debe a su acción como agente quelante evitando así que los iones metálicos presentes promuevan la oxidación (Giese, 1995).

Es un compuesto cristalino, soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol; insoluble en éter de petróleo, aceites y grasas; es muy estable al aire cuando esta seco, actúa como sinergista.

En los alimentos se utiliza como antioxidante natural en varios productos por ejemplo: néctares de frutas, bebidas carbonatadas, vinos, para la estabilización del zumo de frutas, etc. También se utiliza como aditivo alimenticio, ya sea para fortificar productos o para conservar el contenido vitamínico de otros. En los productos cárnicos se utiliza junto con los sistemas de curado para favorecer la coloración roja de embutidos.

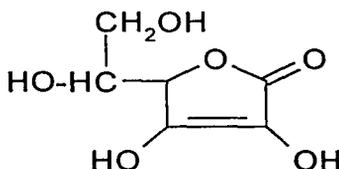


Figura 9. Estructura del ácido ascórbico

3.5.5 Alcaloides

Los alcaloides son compuestos nitrogenados que presentan actividad antioxidante, aislándose principalmente de plantas, son potentes inhibidores del oxígeno suprimiendo varios procesos oxidativos tanto *in vivo* como *in vitro*. (Vichnevetskaia, 1997). Recientemente se han incrementado las investigaciones a la obtención de nuevos alcaloides enfocados a prevenir enfermedades provocadas por la oxidación de lípidos en el organismo. Se ha reportado el aislamiento y caracterización de la tetrandrina que es un alcaloide proveniente de la raíz de *Radix stefania* tetrandra una hierba china.

La tetrandina es estudiada por su acción antioxidante, se dice que suprime la síntesis de colágeno y adherencia de fagocitos. Comparada con la vitamina E, galato de propilo, carnosol, quercetina, hidroxitirosol y otros compuestos antioxidantes naturales, tetrandrina reacciona más hábilmente con los radicales peróxi (Cao, 1997 y Larson, 1998).

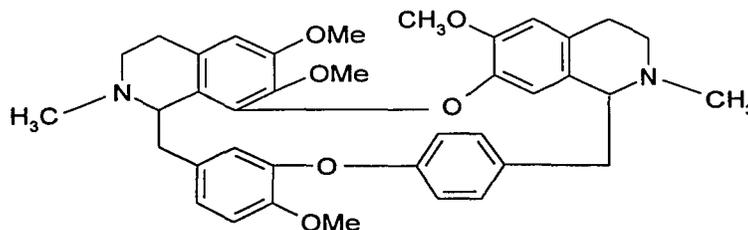
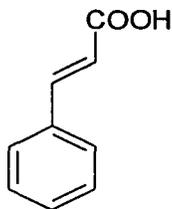


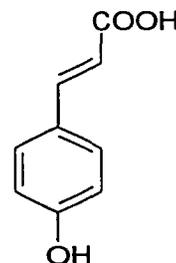
Figura 10. Estructura de la tetrandrina

3.5.6 Ácidos hidroxicinámicos

Los fenoles ácidos es otro grupo de compuestos que presentan actividad antioxidante, estos compuestos se encuentran en diversas fuentes naturales como el ácido caféico que se ha aislado de la manzana, albaricoque, durazno, espinacas, col, alfalfa y trigo; el ácido cinámico de la uva, vino rojo, frambuesa, frutas cítrica, espinacas, col y alfalfa; el ácido cloragenico del café, manzana, pera, ciruela y albaricoque; el ácido ferúlico de la manzana, durazno, espinacas, col, arroz, trigo y maíz; el ácido *p*-cumárico de la manzana, durazno, espinacas, espárragos y trigo (Morton, 2000). La actividad antioxidante de los fenoles ácidos depende del número de grupos hidroxilos y de la posición en la que se encuentren en la molécula (Riecke-Evans, 1996).



Ácido cinámico



Ácido cumárico

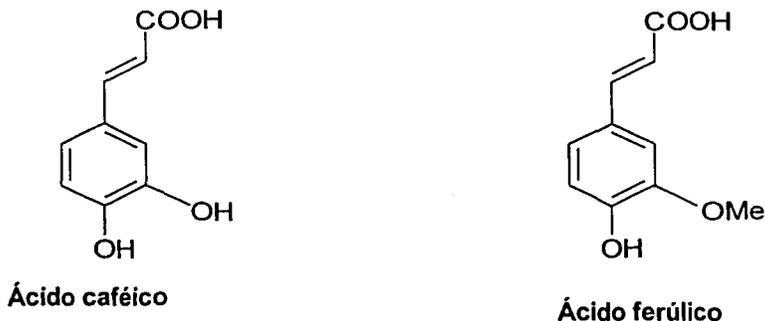
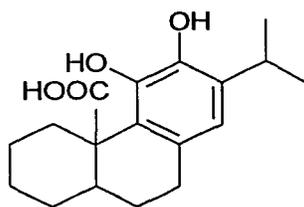


Figura 11. Estructuras de algunos ácidos fenólicos

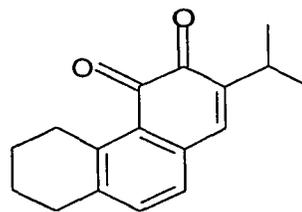
3.5.7 Antioxidantes del Romero

El romero es una planta aromática que pertenece a la familia *Labiatae*, su nombre científico es *Rosmarinus officinalis*, históricamente el romero ha sido utilizado por su agradable sabor, aroma y por la habilidad que tiene de retardar el deterioro del sabor, actualmente se han aislado diferentes compuestos con actividad antioxidante como el carnosol, ácido carnósico, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, rosmarinquinona, rosmaridinfenol, royleanona y el ácido rosmarínico. Estos compuestos son de naturaleza fenólica, derivados diterpénicos con grupos OH en la estructura de la molécula. En la figura 12 se muestran los antioxidantes aislados del romero (Ramarthnam, 1995).

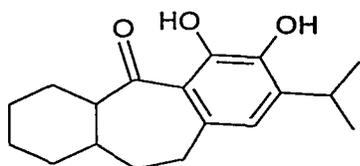
De estos compuestos el máximo interés se dirige hacia el ácido rosmarínico, ya que presenta mayor actividad antioxidante que el BHA y el BHT. Se comienza a obtener comercialmente extracto de romero, dispersable en aceites, agua, como sinérgico para combinar con el tocoferol (De la Torre, 1997). La actividad antioxidante de los compuestos aislados del romero se demostró tanto en grasas animales como en aceites vegetales, manteniendo la estabilidad del sabor en aceites de soya, una menor volatilidad y una mejor estabilidad a temperaturas elevadas que los antioxidantes BHA y BHT (Chang, 1997; Houlihan, 1985). El extracto del romero ayuda a estabilizar grasas, aceites vegetales y esenciales contra la rancidez y para proteger los pigmentos carotenoides de la oxidación y pérdida del color en el producto. En aceites para ensaladas, los niveles usados para una buena estabilidad son bajos (0.01-0.05%) por lo que el sabor a romero es casi imperceptible. Los extractos del romero son adicionados a diferentes productos alimenticios para evitar su oxidación tales como botanas, mayonesas y aderezos, productos cárnicos, confitería, productos horneados, etc (Barbut, 1995).



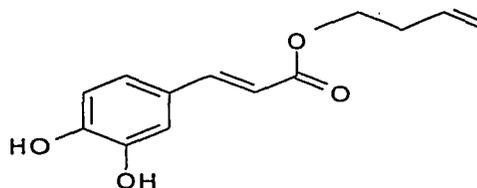
Ácido carnósico



Rosmarinquinona



Rosmarindifenol



Ácido rosmarínico

Figura 12. Estructuras algunos antioxidantes del Romero

3.6 LAS PLANTAS COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES

Las plantas utilizadas en las prácticas medicinales populares de diversas regiones del mundo constituyen un punto de partida importante para el descubrimiento de numerosos compuestos. En los últimos años se ha incrementado el interés por la obtención de compuestos de naturaleza fenólica ya que presentan actividad antioxidante, un ejemplo sobresaliente es el ácido rosmarínico aislado de *Rosmarinus officinalis* el cual ya es explotado actualmente.

Para la obtención de estos compuestos fenólicos se han utilizado diferentes métodos ya que no existe un procedimiento de extracción general. Chen et al, en 1992 obtuvieron distintos extractos del romero, encontrándose que el extracto obtenido con hexano contenía una alta concentración de carnosol, ácido carnósico (diterpenos fenólicos que presentan actividad antioxidante), comparado con el de acetona y metanol. Sin embargo, debido a los bajos rendimientos se llegó a la conclusión de que la acetona es el disolvente ideal para el aislamiento de las sustancias antioxidantes del romero.

Chang, en 1997, realizó una extracción con disolventes orgánicos a las hojas del romero. En este proceso el extracto es sometido a una destilación por arrastre de vapor al vacío. La actividad antioxidante del extracto se demostró en aceites vegetales.

Breña, en 1998, obtuvo el extracto de romero con disolvente orgánico (acetona y metanol) en este proceso se utilizaron dos métodos: a reflujo por 2 horas a 65°C y en reposo por 24 horas a temperatura ambiente. Llegó a la conclusión de que utilizando el metanol y el método de extracción en reposo se obtienen mayores rendimientos.

Otro método para la obtención de compuestos fenólicos es la extracción secuencial, en el cual se usan disolventes de diferente polaridad (cloroformo, acetato de etilo, acetona y metanol), la ventaja de esta técnica es que los extractos orgánicos pueden ser evaluados directamente (Xiaojun, 1998).

En México existen alrededor de 3015 especies de plantas medicinales, las cuales son utilizadas por la población para tratar la sintomatología de los padecimientos más comunes, sin embargo un porcentaje mínimo de esas especies han sido objeto de estudios químicos que conduzcan al aislamiento de nuevos compuestos con actividad antioxidante. De lo anterior se desprende que el potencial que ofrecen las plantas son una fuente importante para el aislamiento de nuevos antioxidantes.

3.6.1 Grupo de plantas provenientes de la reserva de la biósfera de Huautla, Morelos

En este contexto dentro de la gran diversidad vegetal que posee México y las numerosas reservas ecológicas con las que cuenta, se encuentra la de la biósfera de Huautla, Morelos. La reserva está limitada al Norte por la carretera Chinameca-Tepalcingo, al Sur por el Río Amacuzac y el estado de Guerrero, al Este por el estado de Puebla y al Oeste por el Río Cuautla. Abarca los municipios de Tlaquitenango y Tepalcingo.

En 1993 la zona fue decretada como zona sujeta a Conservación Ecológica y el 10 de julio de 1999 fue declarada como Reserva de la Biósfera de Huautla, protegiendo más de 59 mil hectáreas, la cual se encuentra representada en el Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Con ello, Morelos se ubica como una de las dos reservas con extensión significativa de esta clase de selva.

El clima es cálido subhúmedo, con régimen de lluvias en verano y con oscilación de temperaturas medias mensuales entre 7 y 14°C. La temperatura más alta es en el mes de mayo (26-27°C). La vegetación del área corresponde a una selva baja caducifolia, tomando en cuenta la fisonomía del sitio, el biotipo (forma de vida) de sus especies y los factores climáticos. La selva húmeda se encuentra fuertemente dividida en dos estaciones, una de lluvias y la otra de secas, dando lugar a una fenología contrastante. Entre las características fisonómicas distintivas de esta selva destaca la presencia de un solo estrato arbóreo, que oscila entre los 4 y 10m de alto ocasionalmente llegando a 15m, los árboles perennifolios alcanzan una mayor altura (15 a 20m); de ahí el nombre de la selva baja. Por lo general los troncos de los árboles son cortos, robustos, torcidos y ramificados cerca de la base. Casi todas las especies pierden sus hojas durante el periodo de secas, durante 6-8 meses al año provocando un contraste en la fisonomía de la vegetación entre la época de lluvia y la de seca.

Dentro de los estudios que se han realizado en la reserva de Huautla, señalan la existencia de 742 especies de plantas, de las cuales se seleccionó un grupo de veintidós plantas (caducifolias y perennifolias) de diferentes especies por presentar compuestos fenólicos. Este trabajo surge del argumento de que la herbivoría es capaz de ejercer una selección por las plantas, induciendo el desarrollo de sistemas de defensa contra los herbívoros. Este argumento se aplica para evaluar si la heterogeneidad ambiental genera respuesta defensiva reflejada en la tasa de herbivoría, dependiendo del hábito fenológico (perennifolio y caducifolio) de las plantas en estudio. Para demostrar la validez de este argumento se intentó demostrar si hay una relación entre la tasa de herbivoría y el contenido de compuestos fenólicos. No se encontró ninguna relación, pero sí se pudo concluir que todas las plantas contenían compuestos fenólicos (Carrasco, 2002). Por lo que resultó interesante relacionar el contenido de estos compuestos con la actividad antioxidante. En general la utilidad que se le ha dado a estas plantas es en la medicina tradicional curando enfermedades comunes como diarrea, fiebre, úlceras, nervios, granos, dolor de estómago, entre otras. En la tabla No.2 se mencionan las características más importantes de este grupo de veintidós plantas.

Tabla No. 2 Características más importantes de las veintidós plantas en estudio

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	FAMILIA	USOS
<i>Licania arborea</i> **	Cacahuananche, Cacahuate, Caña dulce, Toposote	Chrysobalanaceae	El fruto y la corteza son utilizados para evitar la caída del cabello. Los tallos para la fabricación de vigas. El aceite de las semillas es aprovechado industrialmente para la fabricación a micro escala de velas y jabón .
<i>Ficus involuta</i> **	Amate blanco	Moraceae	Su exudado o látex se emplea como remedios caseros para la eliminación del dolor estomacal y parásitos. Las raíces presentan propiedades purgativas y son utilizadas industrialmente para la fabricación de papel.
<i>Bunchosia cannesens</i> *	Nanche de perro	Malpigiaceae	La corteza se utiliza para la eliminación de la diarrea, dolor estomacal, empacho e industrialmente se emplea para combustible.
<i>Syderoxylon capiri</i> **	Capire	Sapotaceae	La flor se emplea para uso ceremonial. El fruto es aprovechado para consumo humano (crudo o cocido).
<i>Sapium macrocarpum</i> **	Venellino, Hincha huevos, Lechon, Palo verde	Euphorbiaceae	El látex contra la fiebre, sin embargo puede producir ceguera y esterilidad cuando se utiliza por periodos prolongados. Los tallos para la construcción de vigas.

Hábito de las hojas: Caducifolias (*) y Perennifolias (**)

47

Continuación de la Tabla No. 2 Características más importantes de las veintidós plantas en estudio

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	FAMILIA	USOS
<i>Ficus cotinifolia</i> **	Texcalamate, Amate prieto, Copó, Álamo, Higueron.	Moraceae	El látex induce el vómito, se emplea contra el paludismo y desinflamación del bazo
<i>Annona squamosa</i> *	Chirimoyo, Texaltzapotl, Quantzapotl	Annonaceae	Las hojas maceradas se emplean para curar las siguientes enfermedades: diarrea, dolor estomacal, cólicos y úlceras. El fruto para consumo humano. Las semillas presentan propiedades insecticidas.
<i>Vitex mollis</i> **	Cuayatomate, Nanche de perro	Verbenaceae	Las hojas contra el dolor de estomago, nervios, ayuda a la digestión y piquete de alacrán.
<i>Piper leucophyllum</i> **	Cordoncillo, Hoja santa	Piperaceae	Las hojas contra el mal de aire, dolor estomacal y en alimentos se emplea como condimento.
<i>Glicindia sepium</i> *	Mata rata, Guerrero, Guaje, Cola de alacrán, Tacahuananche	Fabaceae	La corteza y las hojas contra el paludismo, granos, cangrena, sarna (animales), Icteria, fiebre y dolor de cabeza. Los tallos industrialmente se emplean para la construcción de vigas, combustible y forraje. Las semillas son potencialmente tóxicas.
<i>Astianthus viminalis</i> **	Azochil, Palo de agua, Axochitl, Ahuejotes, Flor de agua	Bignoniaceae	Las hojas contra la diabetes, caída de cabello y paludismo. Los tallos se emplean para la construcción de vigas.

* Hábito de las hojas: Caducifolias (*) y Perennifolias (**)

Continuación de la Tabla No. 2 Características más importantes de las veintidós plantas en estudio

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	FAMILIA	USOS
<i>Hamelia petens</i> *	Coral, Trompetilla, Jicarillo	Rubiaceae	Las hojas se emplean como cicatrizante
<i>Swietenia humilis</i> *	Zopilote, Cóbano, Palo de zopilote	Meliaceae	Las semillas contra los parásitos intestinales y la caída del cabello. El tronco para la construcción de muebles.
<i>Stemmadenia bella</i> *	-	Apocynaceae	-
<i>Ruprechtia fusca</i> *	Guayabillo, Azulillo	Polygonaceae	Los tallos industrialmente se emplean para la fabricación de postes.
<i>Bursera grandifolia</i> *	Palo mulato	Burseraceae	La corteza y resina contra la disentería.
<i>Ziziphus amole</i> *	Huixcolote, Limoncillo	Rhamnaceae	La corteza para curar úlceras gástricas y lavar heridas.
<i>Jacaratia mexicana</i> *	Bonele, Papayon	Caricaceae	Las hojas y corteza contra el frío en los huesos.
<i>Pseudobombax ellipticum</i> *	Rosal, Clavelillo, Escibetillo	Bombacaceae	La flor contra la tos y fiebre. Los tallos para la construcción de vigas.
<i>Comocladia engleriana</i> *	Hincha huevos, Teclatia, Teclate, Teclatilla	Anacardiaceae	Las flores y los tallos son muy tóxicos (producen dermatitis), a veces se emplean industrialmente como combustible.
<i>Plumeria rubra</i> *	Cacaloxochitl, Flor de mayo	Apocynaceae	El látex y la flor para la eliminación de verrugas, hemorroides vaginales y dolor de muelas.

Hábito de las hojas: Caducifolias (*) y Perennifolias (**)

3.6.2 Características botánicas de *Licania arborea*

Licania arborea (Figura 13), perteneciente a la familia (Chrysobalanaceae), se conoce popularmente como cacahuananche, cacahuate, caña dulce, toposete, curindal, totopostle, roble blanco y alcornoque (Carrasco, 2000).

Este árbol, era conocido por los indígenas desde antes de la llegada de los españoles a las tierras de América, inclusive el nombre común cacahuananche, es una degeneración de su antiguo nombre náhuatl (cacahoanantzi), que significa madrecita del cacao; en referencia a la similitud en la forma de las semillas del cacahuananche con la de cacao.

El árbol tiene una altura de 4.5m alcanzando hasta los 20 metros de altura, las hojas son perennifolias, pequeñas-pecioladas, venación muy conspicua midiendo de 5.5 a 21cm de largo por 2 a 11.5cm de ancho; las flores son panículas de 15 a 20mm de color amarillo las cuales son observadas de diciembre a enero y los frutos maduros caen del árbol durante los meses de abril y mayo. Son de forma oblonga y escasa pulpa, la mayor parte la ocupa una sólo semilla rica en aceite, rodeada por una cubierta delgada y dura. El tamaño del fruto varía ampliamente de 2 a 5cm.



(a)



(b)



(c)

Figura No.13 *Licania arborea* : a (hojas), b (hojas y frutos) y c (árbol)

El árbol se encuentra extensamente distribuido en México en los estados de: Morelos, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Michoacán, Chiapas y en otros países como Guatemala, Honduras, Perú, Panamá, Costa Rica y Colombia.

La utilidad que se le da es la siguiente: las hojas son empleadas en la medicina tradicional mexicana como remedios caseros para el tratamiento contra las hemorroides, ictericia, caída del pelo y en infecciones para animales (sarna). Los tallos se usan como leña y en la preparación de carbón; su madera es bastante dura, los árboles son derribados y cortados en trozos para apilarlos en las carboneras o para formar las cargas de leña, o desramados para el emplearlos como poste. El fruto fue usado como fuente de aceite vegetal durante la segunda guerra mundial. Actualmente el aceite de cacahuanache se ha explotado en pequeña escala en México para obtener veladoras, pinturas, barnices impermeables al agua, jabón y recientemente, se ha empezado a producir shampoo.

3.6.3 Compuestos aislados del género *Licania* (Chrysobalanaceae)

Desde el punto de vista químico la planta *Licania arborea* no ha sido objeto de estudio alguno de compuestos que presenten actividad antioxidante, sin embargo el género *Licania* perteneciente a la familia chrysobalanaceae en otros países como Venezuela, África y Sudáfrica se le han realizado estudios fitoquímicos. En estos estudios se describe principalmente el aislamiento y caracterización de triterpenoides y flavonoides en su forma libre o glicosilados (Bate-Smith, 1961).

Mendez, en 1995, realizó una extracción sucesiva por soxhlet durante 24 horas a las hojas de *L. pittieri*, utilizando tolueno-metanol (1:1) y metanol. El extracto obtenido con metanol se fraccionó en una columna cromatográfica de Sephadex LH-20, usando como eluyente metanol. De este proceso se describe el aislamiento y purificación de triterpenoides y flavonoides: ácido oleanico, ácido ursólico, hiperina, catequina, epicatequina, isoquercetina, quercitrina, quercetina y quercetina-3-arabinopiranososa.

Bilia, en 1996, realizó una investigación fitoquímica de *Licania Pyrifolia*, planta proveniente de Venezuela. Obtuvo los extractos de cloroformo y cloroformo-agua, por soxhlet durante 24 horas. El material vegetal residual posteriormente se le realizó una extracción con metanol a temperatura ambiente durante una semana. Los extractos obtenidos de cloroformo-metanol y metanol, fueron fraccionados en

una columna cromatográfica de Sephadex LH-20, empleando como eluyente metanol. De los cuales se aislaron y caracterizaron catorce flavonoides: kaemferol, kaemferol-3-ramnosa, kaemferol-3-arabinosa, kaemferol-3-(2"-xilosil)ramnosa, quercetina, quercetina-3-ramnosa, quercetina-3-(2"-xilosil)ramnosa, quercetina-3-arabinosa, miricetina, miricetina-3-ramnosa, miricetina-3-(2"-xilosil)ramnosa, hipolaetina, 8-hidroxi-naringenina y un nuevo derivado 8-hidroxi-eridictiol.

En este mismo año, de *Licania pyrifolia*, se obtuvieron los extractos de n-hexano, cloroformo y cloroformo-metanol (9:1), mediante extracciones sucesivas por soxhlet durante 28 horas. Los dos extractos más polares fueron fraccionados en una columna cromatográfica. De los cuales el extracto obtenido con cloroformo se aislaron los siguientes compuestos: β -sitosterol, lupeol, betulin, ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido betulínico, β -sitosterol-3- β -D-glucosa, ácido eucaspico-28- β -D-glucosil ester, ácido tormentico-28- β -D-glucosil ester, ácido-2 α -hidroxieursólico, ácido maslínico y del extracto obtenido con cloroformo-metanol(9:1), se aislaron cuatro triterpenos: ácido 11 α -hidroxibetulínico, ácido 6 β -hidroxibetulínico, 2 α , 3 β -dihidroxi-up-12-en-28-oic ácido 3-(3',4'-dihidroxibenzoil ester) y 2 α , 3 β ,27-trihidroxilup-12-en-28-oic-acido 3-(3',4'-dihidroxibenzoil ester) (Bilia, 1996).

En 1996 en Venezuela se realizó una investigación fitoquímica de *Licania carii*. Aislándose flavonoides y triterpenoides. Para la obtención de estos compuestos, se realizaron extracciones sucesivas con hexano, cloroformo y cloroformo-metanol (9:1), por Soxhlet durante 24 horas. Del extracto obtenido con cloroformo-metanol, se aislaron los siguientes compuestos: ácido ursólico, ácido betulínico, β -sitosterol-3-O-glucosa, ácido 2 α -hidroxieursólico, ácido maslínico, miricetina-3-(2"-xilosil) ramnosa, quercetina-3-(2"-xilosil)ramnosa, quercetina-3-glucosa, miricetina-3-galactosa, rutina, miricetina-3'-metil-3-rutinosa y miricetina-3-rutinosa (Bilia, 1996).

Braca, en 1999, aisló tres nuevos flavonoides de *Licania densiflora*. Realizó una extracción sucesiva por Soxhlet durante 24 horas, utilizando hexano, cloroformo y cloroformo-metanol (9:1). El material residual posteriormente se sometió a una extracción a temperatura ambiente por cuatro semanas con metanol. Los extractos obtenidos con cloroformo-metanol y metanol fueron fraccionados en una columna cromatográfica de Sephadex LH-20. Del primer extracto se aisló el compuesto identificado como

naringenina-8-hidroxi-4'-metil eter y del extracto metanólico se aislaron los compuestos miricetina-3-O- α -L-(2"-O- α -L-ramnopiranosil) ramnopiranos y 3',4'-dimetilmiricetina-3-O- β -D- glucopiranos.

En ese mismo año de *Licania heteromorpha*, se aislaron tres flavonoides: miricetina-3,4'-di-O- α -L-ramnopiranos, miricetina 7-metileter-3,4-di-O- α -L-ramnopiranos y miricetina-4'-metileter-3-O- β -D-galactopiranos, obtenidos del extracto con butanol (**Braca, 1999**).

En el 2002 se encontró un solo trabajo donde se describe el aislamiento de flavonoides con actividad antioxidante de *Licania licaniaeflora*. Para la obtención de estos flavonoides, al material vegetal se realizó una extracción sucesiva con hexano y metanol. Posteriormente el extracto metanólico se solubilizó en agua para realizar una partición sucesiva con acetato de etilo y n-butanol. El extracto obtenido con butanol se fraccionó en una columna cromatográfica con Sephadex LH-20, obteniéndose los siguientes compuestos: kaemferol-3-O- α -(2"- β -xilosil)ramnosa, quercetina-2-O- β -galactosa, quercetina-3-O- α -arabinosa, kaemferol-3-O- α -ramnosa, quercetina-3-O- α -ramnosa, 8-hidroxi-naringenina, taxifolina-3-O- α -ramnosa (**Braca, 2002**), quercetina-3-O- β -galactosa, miricetina-3-O- β -galactosa, miricetina-3-O- α -arabinosa y dihidromiricetina-3-O- α -ramnosa (**Braca, 2002**). Finalmente en ese mismo año de *Licania apetala*, se aislaron siete flavonoides siguiendo el procedimiento anterior. En la tabla No. 3 se enlistan los flavonoides aislados del género *Licania* (**Braca, 1999**).

Tabla No. 3 Flavonoides aislados del género *Licania*

<i>Especies</i>	<i>L. pittieri</i>	<i>L. cari</i>	<i>L. pyrifolia</i>	<i>L. desinflora</i>	<i>L. heteromorpha</i>
Flavonoles					
Kaemferol (Kae)			+		
Kae-3-ramnosa			+		
Kae-3-arabinosa			+		
Kae-3-(2"-xilosil)-ramnosa			+		
Kae-3-(6"- <i>p</i> -cumaril)-glucosa				+	
Quercetina (Quer)	+		+	+	
Quer-3-glucosa	+	+		+	
Quer-3-galactosa	+	+		+	
Quer-3-arabinosa	+		+		
Quer-3-ramnosa	+		+	+	
Quer-3'-OCH ₃ -3-glucosa				+	
Quer-3-rutinosa		+		+	
Quer-3-(2"-xilosa)-ramnosa		+	+		
Miricetina (Mir)			+	+	
Mir-3-glucosa		+		+	
Mir-3-galactosa		+		+	
Mir-3-ramnosa			+	+	+
Mir-3-xilosa				+	
Mir-3'-OMe-3-glucosa				+	
Mir-3'-OMe-3-galactosa				+	
Mir-4'-OMe-3-glucosa					+
Mir-4'-OMe-3-galactosa					+
Mir-4'-OMe-3-ramnosa				+	+
Mir-3'-OMe-3-rutinosa		+			
Mir-3',4'-di-OMe-3-glucosa				+	
Mir-3',5'-di-OMe-3-glucosa				+	
Mir-3',5'-di-OMe-3-ramnosa				+	
Mir-3-rutinosa		+			
Mir-3-(2"-xilosa)-ramnosa		+	+		
Mir-3-(2"-ramnosil)-ramnosa				+	+
Mir-3,4'-diramnosa					+
Mir-7-OMe-3,4'-diramnosa					
Catequinas					
(+) Catequina	+			+	
(-) Epicatequina	+				
Flavonas					
8-OMe-apigenina				+	
8-OH-luteolina			+		
Flavanonas					
8-OH-eriodictyol			+		
8-OH-naringenina			+		
4'-OMe-8-OH-naringenina				+	

3.7 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para evaluar la actividad antioxidante se han usado técnicas cromatográficas y analíticas, que han permitido estudiar estos compuestos. La actividad antioxidante en un parámetro ampliamente utilizado para conocer la potencialidad de antioxidantes ya sea en su forma pura o extractos de materiales vegetales aislados de diferentes fuentes naturales como: frutas, vinos, té, aceites, especias, plantas, etc. La actividad está relacionada con compuestos capaces de proteger a los sistemas biológicos y a los alimentos de la oxidación de lípidos producida por los radicales libres (Arnao, 2000), capaces de causar enfermedades degenerativas, disminución del valor nutricional y pérdida de las propiedades sensoriales de los alimentos con alto contenido de lípidos.

No existe un solo método que pueda medir la diferente polaridad que presentan los antioxidantes, dado que la actividad depende de la solubilidad de los compuestos. Existen diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante. Entre los más utilizados se encuentran el radical libre-2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (Radical-DPPH*) (Xiaojun, 1998), el radical catión (ABTS*+) 2,2'-azino-bis-(3-etilbencetiozoline-6-ácido sulfónico) (ABTS) (Cano, 1998) y blanqueo (decoloración) de β -caroteno (Esam y Ali, 1999).

La utilidad de estos tres métodos se debe a que son rápidos, reproducibles, se utilizan pequeñas cantidades de muestra y no requiere de equipos sofisticados. Todos estos compuestos son cromógenos, los cuales pueden ser leídos espectrofotométricamente midiendo el decrecimiento de la absorbancia. Cabe resaltar que los métodos del radical-DPPH y blanqueo (decoloración) del β -caroteno son reactivos con los que se pueden realizar pruebas cualitativas en CCF (Cavin, 1997).

El método del radical-DPPH, se basa en la capacidad secuestrante que presentan los compuestos con actividad antioxidante para reducir al radical mediante la donación de átomos de hidrógeno. El radical-DPPH en su forma oxidada es de color púrpura, cuando éste es reducido, toma una coloración amarilla. La técnica por CCF, consiste en asperjar sobre la muestra en estudio una solución de radical-DPPH al 0.2% en metanol, si la muestra presenta actividad secuestrante reduce al radical, por lo tanto se observan manchas amarillas en contra de un fondo púrpura (Cavin, 1998). Cuantitativamente se basa en la

reducción del reactivo a 517nm mediante la presencia del antioxidante (AH) reduciendo al radical mediante la donación de átomos de hidrógeno:



El ensayo de blanqueo (decoloración) del β -caroteno confirma la actividad antioxidante de la muestra en estudio ya que los radicales que se generan son los alcoxi y peroxi, mismos que se generan en los alimentos que contienen ácidos grasos insaturados. Cualitativamente se basa en la capacidad que presenta el antioxidante para inhibir la oxidación de la molécula evitando la ruptura y formación de radicales libres mediante la donación de átomos de hidrógeno, estabilizando a la molécula y evitando su decoloración de amarillo a blanco. El procedimiento consiste en asperjar sobre la muestra en estudio una solución de β -caroteno 0.05% en acetona, posteriormente se le hace incidir luz ultravioleta, la luz oxida el β -caroteno provocando que este pierda su coloración, si la muestra presenta actividad antioxidante evita la oxidación del β -caroteno de amarillo a blanco (Yan-Hwa, 2000). Cuantitativamente se pone a reaccionar el extracto en una emulsión de β -caroteno-ácido linoleico y se lee a 417nm.

El método del radical-ABTS^{•+}, es un radical parecido al DPPH con la única diferencia que se tiene que generar por vía enzimática (peroxidasa, mioglobina) o químicamente (dióxido de magnesio, persulfato de potasio). Midiendo el decrecimiento de la absorbancia del radical-ABTS^{•+}, en presencia de un compuesto con actividad antioxidante, mediante la donación de átomos de hidrógeno. Este método se puede emplear para muestras lipofílicas e hidrofílicas (Arnao, 2000). En la tabla No. 4 se muestran las ventajas y limitaciones de los tres métodos más utilizados para evaluar la actividad antioxidante (Koleva, 2001).

Tabla No. 4 Ventajas y limitaciones de los métodos del radical-DPPH, β -Caroteno y radical-ABTS*

MÉTODOS	VENTAJAS	LIMITACIONES
Radical-DPPH	<p>Rápido</p> <p>Simple</p> <p>Sensitivo</p> <p>Reproducible</p> <p>Reactivo común</p> <p>No requiere de equipo sofisticado</p> <p>No requiere tratamiento preliminar la muestra</p> <p>Independiente de la polaridad de la muestra en estudio</p> <p>Se puede asperjar para pruebas cualitativas en CCF</p>	<p>La muestra en estudio no informa acerca del tipo del protección del lípido</p> <p>Correlación parcial con resultados de otros métodos de prueba</p>
β -Caroteno	<p>Relativamente rápido</p> <p>Sensitivo</p> <p>Reactivo común</p> <p>No requiere tratamiento preliminar la muestra</p> <p>No requiere de equipo sofisticado</p> <p>Se puede asperjar para pruebas cualitativas en CCF</p>	<p>Depende de la polaridad de la muestra (aplicable a muestras menos polares)</p> <p>No específico</p> <p>Reproducibilidad alta, depende de las variables experimentales</p>
Radical-ABTS*	<p>Rápido</p> <p>Simple</p> <p>Estable</p> <p>Sensitivo</p> <p>Reproducible</p> <p>Soluble en sistemas acuosos (hidrofilicos) y orgánicos (lipofílicos)</p> <p>Puede ser leído en un amplio espectro de absorbancia</p>	<p>Requiere tratamiento preliminar de la muestra</p> <p>No se puede asperjar para pruebas cualitativas en CCF</p>

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Conocer la actividad antioxidante de un grupo de veintidós plantas provenientes de la reserva de la biósfera de Huautla-Morelos, para seleccionar la fuente de obtención de antioxidante.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar si los extractos obtenidos del grupo de plantas presentan actividad antioxidante.
- Comparar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos del grupo de veintidós plantas con patrones de referencia.
- Obtener antioxidantes naturales, a partir de *Licania arborea*
- Aislar y purificar las fracciones con actividad antioxidante mediante métodos cromatográficos convencionales
- Caracterizar las estructuras moleculares de los antioxidantes aislados, mediante la aplicación de pruebas espectroscópicas y espectrométricas
- Comparar la actividad de los antioxidantes aislados con patrones de referencia

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 MATERIAL

5.1.1 Reactivos

Todos los disolventes orgánicos utilizados fueron grado reactivo analítico (hexano, acetona, acetato de etilo, metanol, diclorometano, éter de petróleo y n-butanol), dimetilsulfóxido (DMSO) grado espectrofotométrico, radical-2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (radical-DPPH), sulfato cérico (Aldrich Chem.), vainillina, ácido ascórbico, butilhidroxianisol (BHA), terbutilhidroquinona (TBHQ), quercetina, ácido ferúlico, β -caroteno, ácido linoleico pureza 99% (Sigma Chem.), Tween 80 (Hycel de México), cloruro férrico (Mallinckrodt), ácido sulfúrico (Reasol), aire sintético (AGA), oxígeno extra seco pureza 99.5% (INFRA).

5.2 PRIMERA PARTE: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE LAS VEINTIDÓS PLANTAS PARA SELECCIONAR LA FUENTE DE OBTENCIÓN DE ANTIOXIDANTE

5.2.1 PLANTAS EN ESTUDIO

Para el desarrollo de la primera parte de la investigación se seleccionó un grupo de veintidós plantas (Tabla No. 5) las cuales en estudios previos de herbivoría, se comprobó que contenían compuestos fenólicos. Las especies seleccionadas corresponden a dos tipos de hábitat: caducifolio y perennifolio. Corresponden a 20 familias, donde sólo dos especies pertenecen a dos familias diferentes (Apocynaceae: *Stemmandenia bella* y *Plummeria rubra*; Moraceae: *Ficus obtusifolia* y *Ficus cotinifolia*) (Carrasco, 2002). La recolecta de este grupo de plantas se realizó en la reserva de la biósfera de Huautla-Morelos, México el 4 de agosto de 2000, la clasificación botánica de estas especies y la recolección estuvo a cargo del Biólogo Ricardo Reyes Chilpa. Ejemplares de réplica se encuentran depositados en el Herbario Nacional, Instituto de Biología, (MEXU) de la UNAM.

Tabla No. 5 Grupo de plantas en estudio

IDENTIFICACIÓN	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	FAMILIA
1	<i>Licania arborea</i> **	Cacahuananche	Chrysobalanaceae
2	<i>Ficus obtusifolia</i> **	Amate blanco	Moraceae
3	<i>Bunchosia cannesens</i> *	Nanche de perro	Malphigiaceae
4	<i>Syderoxylon capiri</i> **	Capire	Sapotaceae
5	<i>Sapium macrocarpum</i> **	Palo verde	Euphorbiaceae
6	<i>Ficus cotinifolia</i> **	Amate prieto	Moraceae
7	<i>Annona squamosa</i> *	Chirimoyo	Annonaceae
8	<i>Vitex mollis</i> **	Cuayotomate	Verbenaceae
9	<i>Piper leucophyllum</i> **	Cordoncillo	Piperaceae
10	<i>Gliricidia sepium</i> *	Cacahunanche	Fabaceae
11	<i>Astianthus viminalis</i> **	Palo de agua	Bignoniaceae
12	<i>Hamelia patens</i> *	Coral	Rubiaceae
13	<i>Swietenia humilis</i> *	Zopilote	Meliaceae
14	<i>Stemmandenia bella</i> *	-----	Apocynaceae
15	<i>Ruprechtia fusca</i> *	Guayabillo	Polygonaceae
16	<i>Bursera grandifolia</i> *	Palo mulato	Burseraceae
17	<i>Ziziphus amole</i> *	Huixcolote	Rhamnaceae
18	<i>Jacaratia mexicana</i> *	Bonete	Caricaceae
19	<i>Gyrocarpus jathtophilus</i> *	Palomitas	Hernandiaceae
20	<i>Pseudobombax ellipticum</i> *	Rosal	Bombacaceae
21	<i>Comocladia engleriana</i> *	Tecletia	Anacardiaceae
22	<i>Plumeria rubra</i> *	Cacaloxochitl	Apocynaceae

Hábitat de las plantas: Caducifolias (*) y Perennifolias (**)

Después de la colecta, el grupo de veintidós plantas fueron llevadas al laboratorio para realizar la investigación. Las plantas se secaron a temperatura ambiente (28°C) por 15 días. Posteriormente las hojas fueron separadas de los tallos, reduciendo su tamaño manualmente y pasándolas por una malla del número 10 para obtener un tamaño de partícula homogéneo.

5.2.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se pesaron 27g de hojas y se procedió a la extracción por maceración a temperatura ambiente durante 24h con hexano (100mL), se filtró y el extracto obtenido se concentró en un rotavapor a vacío (Büchi). El material vegetal residual se sometió a extracciones sucesivas con acetona, metanol y metanol-agua (1:1) siguiendo el mismo procedimiento anterior. Los extractos de metanol-agua se congelaron a -80°C (Ultra congelador, Harris) y posteriormente se liofilizaron (Labconco freezezone 6) para la eliminación del agua. Los extractos se almacenaron a 4°C hasta su uso. Este proceso de extracción se realizó a cada una de las veintidós plantas en estudio.

5.2.3 EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

5.2.3.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

Los 88 extractos obtenidos del proceso de extracción anterior se evaluaron cualitativamente por CCF en gel de sílice, empleando los ensayos del radical-DPPH y blanqueo del β -caroteno.

Para la preparación de las cromatoplasmas, se pesaron 2mg del extracto crudo los cuales se diluyeron en un 1ml del disolvente de extracción correspondiente. Los veintidós extractos obtenidos con hexano se eluyeron con éter de petróleo-acetato de etilo (9.5:0.5), los extractos de acetona con hexano-acetato de etilo (7:3), los extractos metanólicos con acetato de etilo-metanol (9:1) y para los extractos con metanol-agua se empleó metanol. Posteriormente las cromatoplasmas fueron reveladas con radical-DPPH y β -caroteno de la siguiente manera.

5.2.3.2 Actividad secuestrante del radical-DPPH

Las placas fueron reveladas con una solución de radical-DPPH al 0.2% en metanol. La presencia de manchas color amarillo en contra de un fondo púrpura, indican que el radical-DPPH ha sido reducido por la presencia de compuestos con actividad antioxidante de los extractos (Yan-Hwa, 2000).

5.2.3.3 Actividad antioxidante con β -caroteno

Las placas se revelaron con una solución de β -caroteno al 0.05% en acetona y expuestas durante una hora en luz ultravioleta a 365nm (Lámpara de UV, CAMAG), los extractos con actividad antioxidante son visualizados como manchas amarillas en contra de un fondo blanco.

5.2.4 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

5.2.4.1 Actividad secuestrante con el radical-DPPH (Xiaojun, 1998)

En una serie de 4 tubos de ensayo se realizaron las siguientes reacciones. En el primer tubo se agregó 1mL del extracto crudo (200ppm) obtenido con metanol con 1mL de solución de radical-DPPH $3 \times 10^{-5}M$ en DMSO. Al segundo tubo se le adicionó 1mL del mismo extracto y 1mL de DMSO. Al tercer tubo se le agregó 1mL de la solución de radical-DPPH y 1mL de DMSO. Al cuarto tubo (ajuste de la absorbancia a cero) se le adicionaron 2mL de DMSO. Posteriormente se burbujeó nitrógeno y se dejaron

en reposo durante 60min. Transcurrido el tiempo de reacción, se leyó la absorbancia a 517nm (Espectrofotómetro Genesis 5, Milton Roy). Se usaron como patrones de referencia ácido ascórbico, ácido ferúlico, quercetina, BHA y TBHQ a (200ppm). La determinación se realizó por triplicado. De las absorbancias obtenidas se calculó el porciento de actividad secuestrante del radical-DPPH de la siguiente manera:

$$\% \text{ actividad secuestrante del radical} = 1 - [(A_i - A_j) / A_c] \times 100$$

Donde:

A_i = Absorbancia del extracto mezclado con la solución de DPPH.

A_j = Absorbancia del mismo extracto mezclado con DMSO

A_c = Absorbancia de la solución DPPH con DMSO.

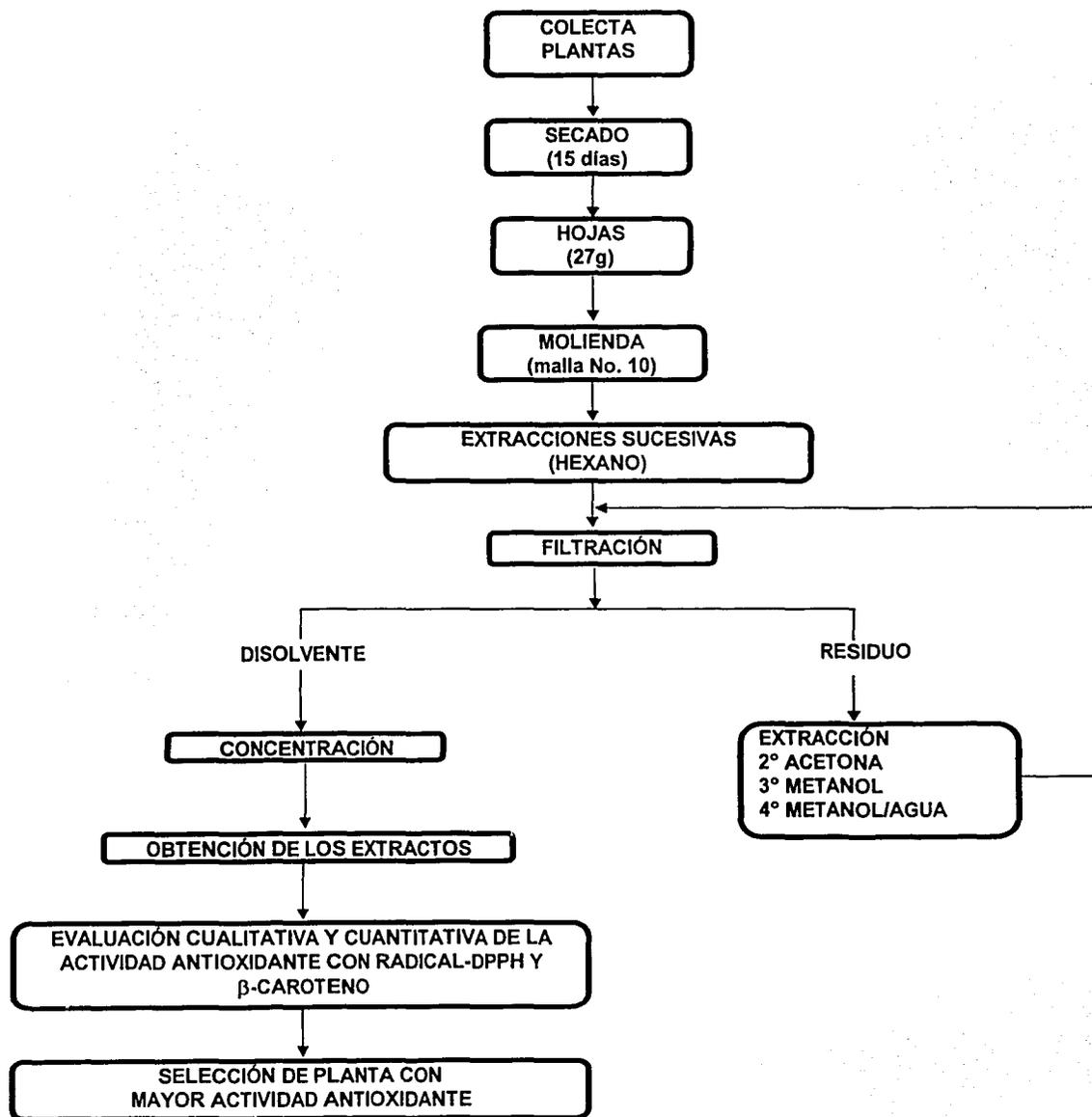
5.2.4.2 Actividad antioxidante con β -caroteno

Se saturó agua destilada desionizada con aire por 15min (Koleva, 2001). Se preparó una solución de β -caroteno (20mg/10mL de cloroformo). Se adicionó 1mL de esta solución en un frasco obscuro el cual previamente contenía 20mg de ácido linoleico y 200mg de Tween 80. Posteriormente se eliminó el cloroformo en un rotavapor a 40°C, se adicionaron 50mL de agua destilada aireada para preparar la emulsión. En un tubo de ensayo se adicionaron 5mL de la mezcla anterior la que contenía 0.2mL del extracto en metanol (200ppm), inmediatamente se leyó la absorbancia a 470nm (tiempo cero), se mantuvo en baño maría a 50°C durante 120min y se volvió a leer (tiempo final). Paralelamente se preparó un ensayo control adicionando 0.2mL de metanol con la solución de β -caroteno-agua destilada aireada, y se leyó como en el caso anterior.

Para ajustar la absorbancia a cero se utilizaron 0.2mL de metanol en 5mL de agua destilada. La determinación se realizó por triplicado (Miller, 1968 y Moure, 2000). Se usaron como patrones de referencia BHA, BHT, TBHQ y ácido ferúlico a 200ppm. De las absorbancias obtenidas se calculó el porcentaje de la actividad antioxidante de acuerdo a la siguiente ecuación AAC (coeficiente de actividad antioxidante):

$$AAC = \frac{(\text{Absorbancia del extracto }_{120\text{min}} - \text{Absorbancia del control }_{120\text{min}})}{(\text{Absorbancia del control }_{0\text{min}} - \text{Absorbancia del control }_{120\text{min}})} \times 100$$

DIAGRAMA 1. PRIMERA PARTE: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE LAS VEINTIDÓS PLANTAS PARA SELECCIONAR LA FUENTE DE OBTENCIÓN DE ANTIOXIDANTES



5.3 SEGUNDA PARTE: OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Licania arborea*

5.3.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES

Cromatografía en capa fina

Para el seguimiento de las fracciones durante el proceso de purificación así como la detección de otros componentes se utilizó la CCF, empleando placas de aluminio de gel de sílice, con un espesor de 0.2mm (60 F₂₅₄ Merck) y placas de celulosa microcristalina con un espesor de 0.1mm (Machery-Nagel). Se utilizaron diversos reveladores los cuales se enlistan en la tabla No. 6.

Tabla No. 6 Reveladores utilizados para los análisis en CCF

AGENTE REVELADOR	COMPOSICIÓN	REFERENCIA
Radical-DPPH (0.2%)	0.2g (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) + 100mL de metanol	Cavin, 2000
β -Caroteno (0.05%)	0.05g (β -Caroteno) + 100mL de acetona	Cavin, 2000
Sulfato cérico Ce (SO ₄) ₂	12g de sulfato cérico + 22.5mL de ácido sulfúrico + 350g de hielo picado	Lowery, 1993
Cloruro férrico (FeCl ₃)	1g Cloruro férrico anhidro + 100mL metanol	Prakash, 1998
Vainillina-ácido sulfúrico	0.5g vainillina + 100mL ácido sulfúrico-etanol (40:10)	Prakash, 1998

- En todos los casos antes de revelar las placas se procedió a visualizarlas en lámpara de UV (onda corta 254nm y onda larga 365nm)
- Para el desarrollo del color con sulfato cérico fue necesario calentar por cinco minutos a 110 °C, aproximadamente.
- Para el desarrollo del color con cloruro férrico y vainillina-ácido sulfúrico, los compuestos son visualizados de dos maneras después de asperjar y calentando a 110°C por 1 minuto aproximadamente, estos dos reveladores son específicos para la identificación de polifenoles.

Cromatografía en columna

Para realizar el fraccionamiento de los extractos obtenidos con acetona y metanol, se empleó la cromatografía en columna empleando vacío, utilizando columnas de vidrio de diferentes tamaños y como adsorbente gel de sílice (Macherey-Nagel) con un espesor de 0.04-0.063mm y celulosa microcristalina.

Cromatografía en capa fina preparativa

Para la realización de la cromatografía preparativa se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm recubiertas de gel de sílice (60 F₂₅₄, Merck) con un espesor de 0.25mm. Para detectar los compuestos con actividad antioxidante se empleó el revelador radical-DPPH, así como luz UV.

5.3.2 EQUIPOS

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer (FTYR) modelo 1605, en pastilla de KBr o película. Los espectros de UV/Vis se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (Lamda 2).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-¹H) y de Carbono-13 (RMN-¹³C) se generaron en un aparato Varian Unity Inova VXR-3005, el cual se operó a una frecuencia de 100 y 300 MHz. Los espectros se obtuvieron utilizando como disolvente CDCl₃ y los desplazamientos químicos se asignaron en unidades δ (ppm) referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Los espectros de masas se determinaron en un aparato JEOL modelo SX-102^a, tipo doble sector, geometría inversa, mediante impacto electrónico a 70 eV, temperatura de la cámara de ionización 300°C,

temperatura de la línea de transferencia a 300°C, rango de masas (33 a 800 UMA) y como estándar de calibración (perfluorokeroseno).

Todos los análisis anteriormente mencionados se efectuaron en la USAI, Facultad de Química de la UNAM.

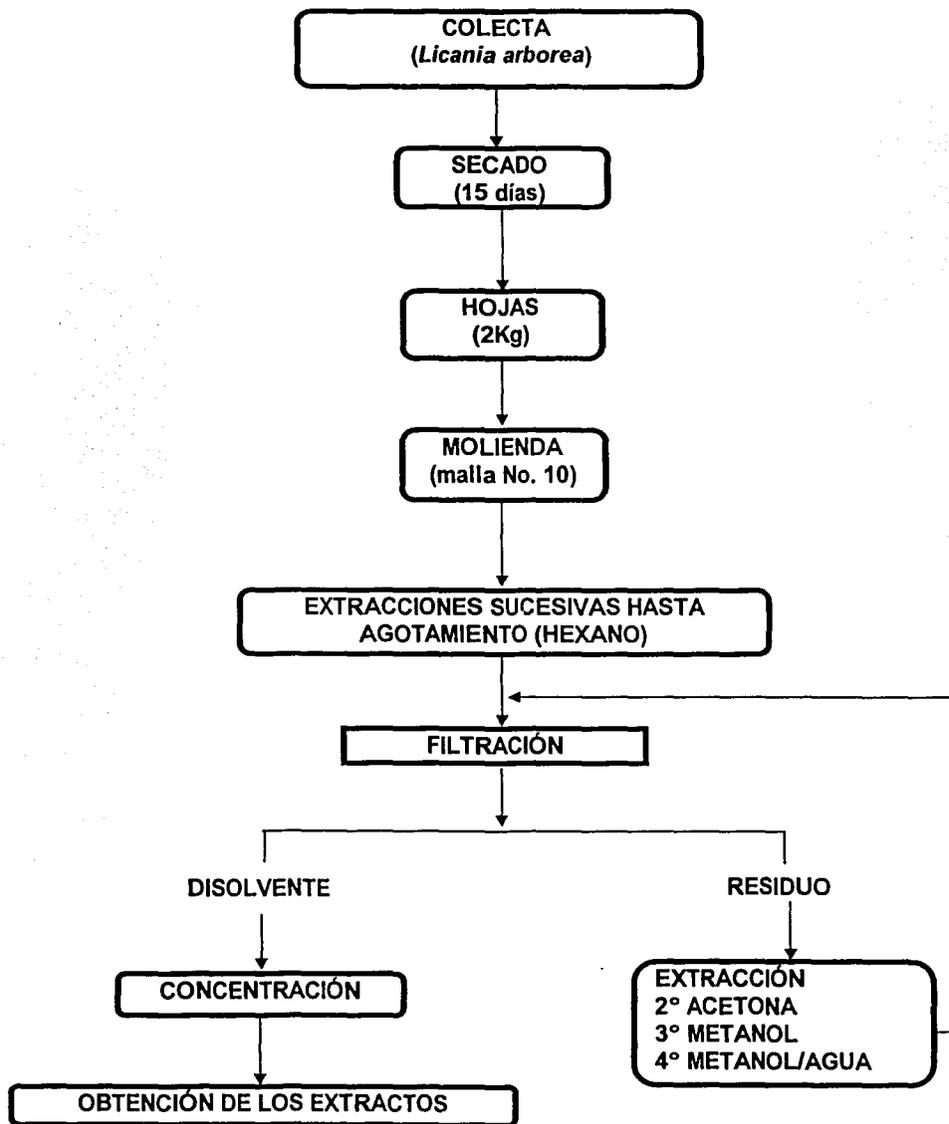
5.3.3 PLANTA (*Licania arborea*)

Para el desarrollo de la segunda parte de la investigación se seleccionó a la planta *Licania arborea* (Chrysobalanaceae), por presentar una menor complejidad por CCF y cuantitativamente una actividad secuestrante y antioxidante significativa. La recolecta de esta planta se realizó en la reserva de la biósfera de Huautla-Morelos, México el 28 de julio del 2001. La clasificación botánica de esta especie y la recolección estuvo a cargo del Biólogo Ricardo Reyes Chilpa. Ejemplares de réplica se encuentran depositados en el Herbario Nacional, Instituto de Biología, (MEXU) de la UNAM.

Después de la colecta, la planta fue llevada al laboratorio para realizar la investigación. El proceso de desecación de la planta se realizó a temperatura ambiente (28°C) por 15 días. Posteriormente las hojas fueron separadas de los tallos, reduciendo su tamaño manualmente y pasándolas por una malla del número 10 para obtener un tamaño de partícula homogéneo.

5.3.4 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Licania arborea*

Se pesaron 2 Kg de hojas y se procedió a la extracción a temperatura ambiente por maceración hasta agotamiento con hexano (24L), se filtró y el extracto obtenido se concentró en un rotavapor a vacío (Büchi). El material vegetal residual se sometió a extracciones sucesivas con acetona (21L), metanol (21L) y una mezcla de metanol-agua (1:1) (20L) siguiendo el mismo procedimiento. Los extractos de metanol-agua se congelaron a -80°C (Ultra congelador, Harris) y posteriormente se liofilizaron (Labconco freezezone 6), para la eliminación del agua. Los extractos se almacenaron a 4°C hasta su uso.

DIAGRAMA 2: OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Licania arborea*

5.3.5 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO OBTENIDOS CON ACETONA DE *Licania arborea*

5.3.5.1 Fraccionamiento del extracto obtenido con acetona

El extracto obtenido con acetona (29.46g) se fraccionó en una columna cromatográfica (26cm de largo y 10cm de diámetro interno), empacada con gel de sílice (350g) con un espesor de 0.04mm. El proceso de elución se inició con hexano y posteriormente se utilizó un gradiente de hexano-acetato de etilo, acetato de etilo-metanol, para finalizar con metanol, eluyéndose un total de 230 fracciones de 150mL. Cada una de las fracciones resultantes se evaluó por CCF utilizando como reveladores radical-DPPH, β -caroteno, vainillina-ácido sulfúrico, cloruro férrico y sulfato cérico para reunir las fracciones. De esta forma se reunieron 32 fracciones combinadas (XXXII). Estableciéndose que la actividad antioxidante se concentraba en la fracción II, la cual posteriormente se purificó para aislar los compuestos responsables de dicha actividad.

La complejidad por CCF en el resto de las fracciones diferentes a la II, aunado a la cantidad de muestra insuficiente impidió su análisis subsecuente. En la tabla No. 7 se resume el fraccionamiento del extracto obtenido con acetona, así como los sistemas de elución empleados para la obtención de las fracciones.

Tabla No. 7 Fraccionamiento del extracto obtenido con acetona de *Licania arborea*

Eluyente	Proporción %	Número de fracciones	Fracciones combinadas	Clave
Hexano-Acetato de etilo	90:10	31	1-14	I
			15-20	II
			21-24	III
			25-27	IV
			28-31	V
Hexano-Acetato de etilo	80:20	10	32-33	VI
			34-35	VII
			36-37	VIII
			38-41	IX
Hexano-Acetato de etilo	70:30	14	42-55	X
Hexano-Acetato de etilo	60:40	13	58-68	XI
Hexano-Acetato de etilo	50:50	6	69-74	XII
Hexano-Acetato de etilo	40:60	6	75-80	XIII

Continuación de la tabla No. 7 Fraccionamiento del extracto obtenido con acetona de *Licania arborea*

Eluyente	Proporción %	Número de fracciones	Fraciones combinadas	Clave
Hexano-Acetato de etilo	30:70	15	81-86	XIV
Hexano-Acetato de etilo	20:80	15	87-90	XV
			91-96	XVI
			97-101	XVII
Hexano-Acetato de etilo	10:90	4	102-105	XVIII
Acetato de etilo	100	13	106-118	XIX
Acetato de etilo-Metanol	90:10	14	119-124	XX
			125-132	XXI
Acetato de etilo-Metanol	80:20	17	133-139	XXII
			140-141	XXIII
			142-149	XXIV
Acetato de etilo-Metanol	70:30	11	150-160	XXV
Acetato de etilo-Metanol	60:40	18	161-168	XXVI
			169-178	XXVII
Acetato de etilo-Metanol	50:50	14	179-185	XXVIII
			186-192	XXIX
Acetato de etilo-Metanol	40:50	11	193-203	XXX
Acetato de etilo-Metanol	30:60	15	204-218	XXXI
Metanol	100	12	219-230	XXXII

5.3.5.2 Aislamiento y purificación de los poliprenoles

La fracción número II (203.8mg) se purificó por CCF preparativa, utilizando como sistema de elución hexano-acetato de etilo (9.5:0.5) y la elución se realizó tres veces. De esta separación se aislaron dos resinas LA-A1(**poliprenol 1**) con un peso de 22.4mg y LA-A2 (**poliprenol 2**) de 49.3mg ambos de color anaranjado y con un R.f de 0.5 para el primero y 0.45 para el segundo por CCF utilizando como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo (9.5:0.5).

5.3.6 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO OBTENIDOS CON METANOL DE *Licania arborea*

5.3.6.1 Fraccionamiento del extracto obtenido con metanol

El extracto con metanol (25.0g) se fraccionó en una columna cromatográfica (26cm de largo y 10cm de diámetro interno), empacada con gel de sílice (300g) con un espesor de 0.04mm. El proceso de elución se inició con hexano y posteriormente se utilizó un gradiente de hexano-acetato de etilo, acetato de etilo-metanol para finalizar con metanol, eluyéndose un total de 185 fracciones de 150mL, las cuales se analizaron mediante CCF utilizando como reveladores radical-DPPH, β -caroteno, vainillina-ácido sulfúrico, cloruro férrico y sulfato cérico, para reunir las fracciones. De esta forma se reunieron 39 fracciones combinadas (XXXIX) de las cuales, con base en los ensayos por CCF se estableció que la actividad antioxidante se concentraba en las fracciones XVII, XIX, XX, XXVII y XXVIII. De la fracción No. VII, con actividad antioxidante, precipitó un sólido cristalino que se lavó con metanol para obtener 4.8mg de una mezcla identificada como β -sitosterol y estigmasterol con un p.f de 136-141°C y un R.f de 0.5 por CCF utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo (9:1). A continuación se muestran sus datos espectrométricos y fueron comparados con espectros y por CCF de muestras auténticas.

β -sitosterol: EM m/z (intensidad relativa) 414 (M+, 100), 396 (37), 381 (21), 329 (22), 303 (26), 255 (16).

Estigmasterol: EM m/z (intensidad relativa) 412 (M+, 100), 369 (10), 351 (12), 300 (18), 255 (23), 213 (13), 105 (38).

La complejidad por CCF en el resto de las fracciones diferentes a la II, XVII, XIX, XX, XXVII y XXVIII, aunado a la cantidad de muestra insuficiente impidió su análisis subsecuente. En la tabla No. 8 se resume el fraccionamiento del extracto obtenido con metanol, así como los sistemas de elución para la obtención de las fracciones.

Tabla No. 8 Fraccionamiento del extracto obtenido con metanol de *Licania arborea*

Eluyente	Proporción %	Número de fracciones	Fracclones combinadas	Clave
Hexano-Acetato de etilo	90:10	3	1-3	I
Hexano-Acetato de etilo	80:20	11	4	II
			5	III
			6-10	IV
			11-13	V
			14	VI
Hexano-Acetato de etilo	70:30	39	15	VII
			16	VIII
			17	IX
			18-52	X
			53	XI
Hexano-Acetato de etilo	60:40	5	54-58	XII
Hexano-Acetato de etilo	50:50	7	59-60	XIII
			53-60	XIV
			61-65	XV
Hexano-Acetato de etilo	20:80	3	66-68	XVI
Acetato de etilo	100	17	69-75	XVII
			76-81	XVIII
			82-85	XIX
Acetato de etilo-Metanol	90:10	21	86-90	XX
			87-93	XXI
			94-96	XXII
			97-99	XXIII
			100-102	XXIV
			103-106	XXV
Acetato de etilo-Metanol	80:20	13	107-112	XXVI
			103-112	XXVII
			113-119	XXVIII
			120	XXIX
Acetato de etilo-Metanol	70:30	12	121-122	XXX
			123-125	XXXI
			126-131	XXXII
			132-138	XXXIII
Acetato de etilo-Metanol	60:40	11	139-143	XXXIV
			144-150	XXXV
Acetato de etilo-Metanol	50:50	9	151-159	XXXVI
Acetato de etilo-Metanol	40:60	8	160-167	XXXVII
Acetato de etilo-Metanol	30:70	9	168-176	XXXVIII
Metanol	100	9	177-185	XXXIX

5.3.6.2 Evaluación cuantitativa de las fracciones con alta actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las fracciones XVII, XIX, XX, XXVII y XXVIII se comparó cuantitativamente con patrones de referencia, para seleccionar las fracciones con mayor actividad, empleando los métodos del inciso (5.2.4). Con base en los ensayos cualitativos por CCF, cuantitativos y la cantidad de muestra se seleccionará la fracción mas adecuada, que posteriormente se fraccionará para obtener los compuestos responsables de dicha actividad.

5.3.6.3 Aislamiento y purificación del catecol

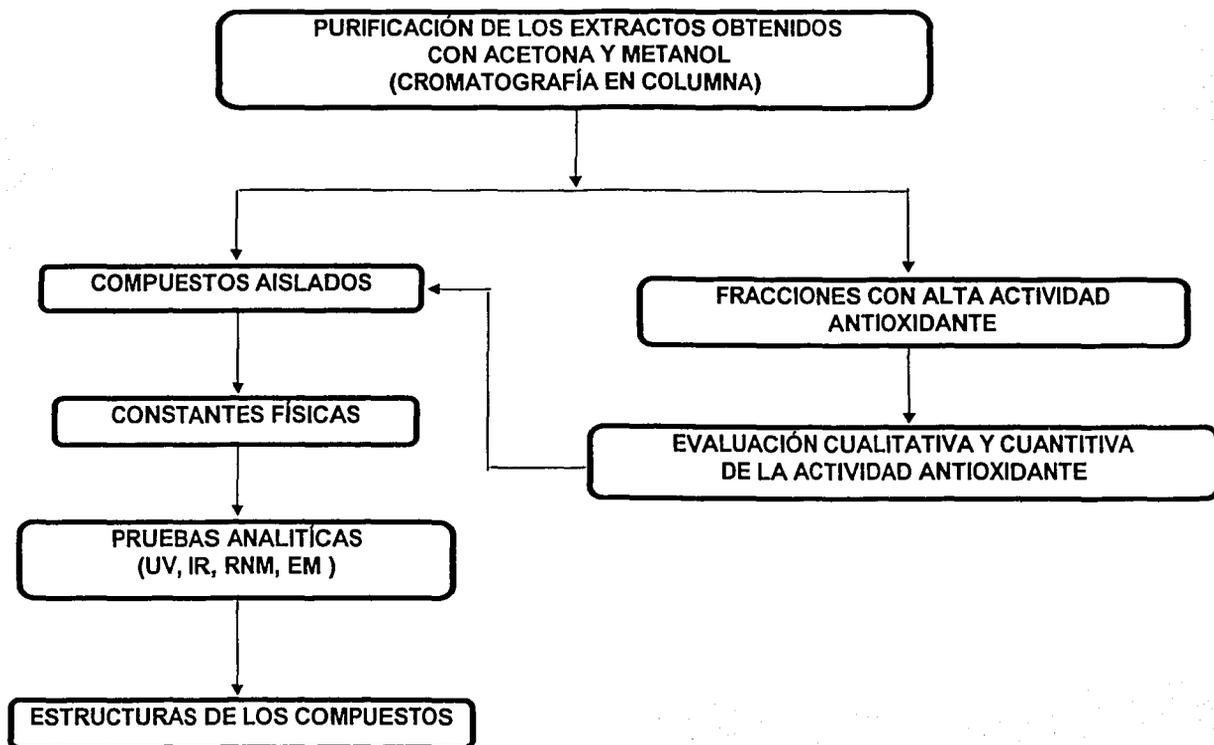
Se seleccionó la fracción XIX, por presentar una menor complejidad por CCF y cuantitativamente una actividad secuestrante significativa. La fracción número XIX (1.61g) se sometió a un fraccionamiento en una columna cromatográfica (30cm de largo y 2cm de diámetro interno), empacada con gel de sílice (30g) con un espesor de 0.04mm. Se utilizó un gradiente de elución hexano-acetato de etilo, acetato de etilo-metanol, para finalizar con metanol. Este procedimiento permitió colectar un total de 158 fracciones de 8mL, las cuales se analizaron por CCF empleando los mismos reveladores utilizados en el fraccionamiento del extracto obtenido con metanol. El análisis por CCF permitió reunir 29 fracciones combinadas, de las cuales la fracción identificada como LA-M12 con actividad antioxidante, precipitó un sólido cristalino (52.7mg), identificado como **Catecol**, con un punto de fusión de 105-106°C y un R.f de 0.6 por CCF en gel de sílice, utilizando como eluyente acetato de etilo. Los datos espectrométricos fueron comparados con espectros y por CCF de muestras autenticas. La tabla No. 9 resume el aislamiento y purificación del catecol.

Tabla No. 9 Aislamiento y purificación del catecol

Eluyente	Proporción (%)	Número de fracciones	Fracciones combinadas	Clave
Hexano-Acetato de etilo	50:50	19	1-19	LA-M1
Hexano-Acetato de etilo	40:60	20	20-22	LA-M2
			23-31	LA-M3
			32	LA-M4
			33	LA-M5
			34	LA-M6
			35-39	LA-M7
Hexano-Acetato de etilo	30:70	7	40-42	LA-M8

Continuación de la tabla No. 9 Aislamiento y purificación del catecol

Eluyente	Proporción (%)	Número de fracciones	Fraciones combinadas	Clave
			43-44	LA-M9
			45-47	LA-M10
Hexano-Acetato de etilo	20:80	4	48-51	LA-M11
Acetato de etilo	100	18	52-58	LA-M12
			59-64	LA-M13
			65-69	LA-M14
Acetato de etilo-Metanol	90:10	13	70-76	LA-M15
			77	LA-M16
			78	LA-M17
			79-81	LA-M18
Acetato de etilo-Metanol	80:20	15	82-87	LA-M19
			88-96	LA-M20
Acetato de etilo-Metanol	70:30	12	97-102	LA-M21
			103-108	LA-M22
Acetato de etilo-Metanol	60:40	8	109-116	LA-M23
Acetato de etilo-Metanol	50:50	10	117-121	LA-M24
			122-126	LA-M25
Acetato de etilo-Metanol	40:60	14	127-134	LA-M26
			135-140	LA-M27
Metanol	100	18	141-147	LA-M28
			148-158	LA-M29

DIAGRAMA 3: OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Licania arborea*

5.3.7 IDENTIFICACIÓN Y OBTENCIÓN DE FLAVONOIDES A PARTIR DEL EXTRACTO CRUDO OBTENIDO CON METANOL DE *Licania arborea*

5.3.7.1 Obtención de los extractos

Se pesaron 69.8g del extracto crudo obtenido con metanol y se disolvió en agua (200mL), posteriormente se procedió a realizar una extracción por partición sucesiva con acetato de etilo (200mL) y n-butanol (200mL). Los extractos obtenidos se concentraron en un rotavapor a vacío.

5.3.7.2 Identificación de flavonoides con actividad antioxidante

Para la identificación de los flavonoides con actividad antioxidante, el extracto obtenido con acetato de etilo y n-butanol obtenidos a partir del extracto crudo de metanol, se evaluaron por CCF en celulosa, utilizando como sistema de elución cloruro de metileno-metanol-ácido acético (50:50:1), empleando los reveladores del radical-DPPH, cloruro férrico y vainillina-ácido sulfúrico. Los resultados de esta evaluación muestran la identificación de flavonoides para ambos extractos, por lo que en principio se inició con el extracto obtenido con acetato de etilo para la obtención de estos compuestos.

5.3.7.3 Fraccionamiento del extracto obtenido con acetato de etilo

El extracto obtenido con acetato de etilo (20g), se fraccionó en una columna cromatográfica (26cm de largo x 10cm de diámetro interno), empacada con celulosa microcristalina (200g). El proceso de elución se inició con una mezcla de cloruro de metileno-metanol (8:2), posteriormente se utilizó cloruro de metileno-metanol (7:3), (1:1), metanol, metanol-agua (1:1), para finalizar con agua. Eluyéndose un total de 65 fracciones de 100mL. Cada una de las fracciones se evaluó por CCF utilizando como reveladores, radical-DPPH, cloruro férrico y vainillina-ácido sulfúrico para reunir las fracciones. De esta forma se reunieron 13 fracciones combinadas (XIII) con actividad antioxidante. De las cuales se seleccionó la fracción IX para realizar una purificación y aislar los compuestos responsables de la actividad antioxidante. La tabla No.10 resume el fraccionamiento del extracto obtenido con acetato de etilo de *Licania arborea* para la obtención de flavonoides.

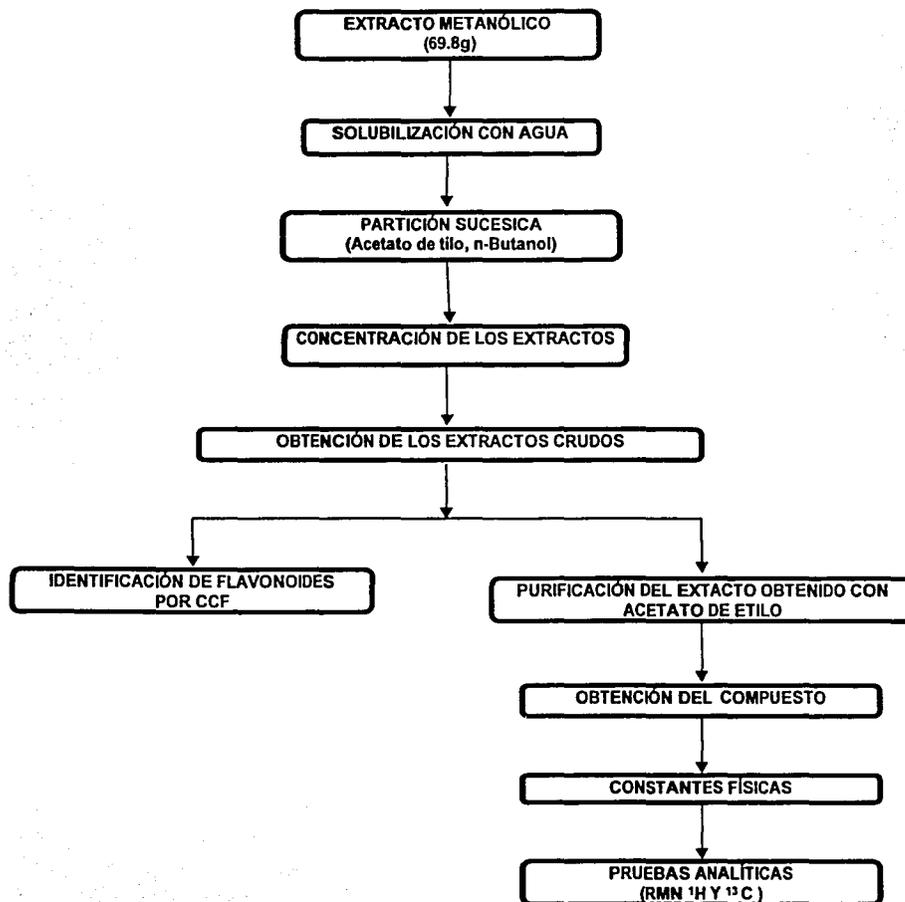
Tabla No.10. Fraccionamiento del extracto obtenido con acetato de etilo de *Licania arborea*

Eluyente	Proporción (%)	Número de fracciones	Fraciones combinadas	Clave
Cloruro de metileno-metanol	80:20	14	1-6	I
			7-12	II
			13-14	III
Cloruro de metileno-metanol	70:30	10	15-16	IV
			17-20	V
			21-23	VI
Cloruro de metileno-metanol	1:1	16	24-30	VII
			31-35	VIII
			36-40	IX
Metanol	100	10	41-48	X
			49-50	XI
Metanol-agua	10:10	10	51-60	XII
Agua	100	5	61-65	XIII

5.3.7.4 Aislamiento y purificación de la miricetina-3-rutinosa

La fracción número IX (300mg), se sometió a un fraccionamiento en una columna cromatográfica (30cm de largo x 2cm de diámetro interno), empacada con gel de sílice (7g). Como eluyente se utilizó una mezcla de cloruro de metileno-metanol-agua (3.5:1.3:0.2), eluyéndose un total de 10 fracciones de 10mL. Cada una de las fracciones resultantes se evaluó por CCF utilizando como reveladores vainillina-ácido sulfúrico, cloruro férrico y radical-DPPH. Con base en los ensayos por CCF se obtuvo que de las fracciones 6, 7 y 8, se aisló un compuesto sólido (60mg) identificado como **miricetina-3-rutinosa**, con un punto de fusión de 190-192°C y un R.f de 0.45 por CCF utilizando como eluyente cloruro de metileno-metanol-agua (3.5:1.3:0.2). Los datos de RMN-¹H y RMN-¹³C, fueron comparados con espectros de muestras auténticas.

DIAGRAMA 4: IDENTIFICACIÓN Y OBTENCIÓN DE FLAVONOIDES



5.3.8 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LOS ANTIOXIDANTES AISLADOS

Finalmente se comparó cuantitativamente la actividad antioxidante de algunos de los compuestos aislados (poliprenol 1, poliprenol 2 y catecol) con patrones de referencia (quercetina, ácido ascórbico, ácido ferúlico, BHA, BHT y TBHQ, por los métodos empleados en el inciso (5.2.4).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La discusión de los resultados se presenta en dos partes. La primera describe la evaluación cualitativa y cuantitativa de la actividad antioxidante, de los extractos obtenidos de un grupo de veintidós plantas provenientes de la biósfera de Huautla-Morelos, misma que permitió seleccionar la fuente más adecuada para la obtención de antioxidantes. La segunda parte consiste en aislar, purificar y caracterizar las estructuras de los compuestos con actividad, además de la comparación cuantitativa con patrones de referencia a partir de *Licania arborea*.

6.1 PRIMERA ETAPA: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE LAS VEINTIDÓS PLANTAS PARA SELECCIONAR LA FUENTE DE OBTENCIÓN DE ANTIOXIDANTES

6.1.1 PLANTAS EN ESTUDIO

Se decidió trabajar con este grupo de plantas debido a que en estudios previos de herbivoría se comprobó que contenían compuestos fenólicos (Carrasco, 2002), los cuales forman parte de la estructura de antioxidantes conocidos, por lo que resultó interesante relacionar el contenido de estos compuestos fenólicos con la actividad antioxidante. Con base en esto se decidió llevar a cabo un estudio químico enfocado al aislamiento y caracterización de los compuestos responsables de la actividad antioxidante. A este grupo de plantas se les realizó una investigación bibliográfica detallada acerca del tipo de compuestos aislados con actividad antioxidante, no se encontraron trabajos previos.

Se obtuvo información acerca de la utilidad en medicina tradicional. En general la utilidad que se les ha dado es en la cura de enfermedades comunes como: diarrea, fiebre, nervios, dolor de estómago, diabetes, dolor de cabeza, cólicos, úlceras gástricas, etc. En el caso particular de *Licania arborea* de la semilla de su fruto, se obtiene aceite de cacahuananche, el cual es utilizado para fabricación de veladoras, barnices, pinturas, jabón y hasta recientemente se ha empezado a producir shampoo para la caída del cabello a micro escala (Martínez, 1972). En la tabla No. 2, se muestran las características más importantes de este grupo de veintidós plantas.

6.1.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Para este fin el grupo de veintidós plantas fue colectado el 4 de agosto del 2000 en la reserva de la biósfera de Huautla-Morelos. La fecha de la colecta corresponde a la época de lluvias destacando la presencia de estrato herbáceo. Las plantas se recolectaron de tal forma que no tuvieran daño. En la tabla No. 5 se muestra la familia, el nombre común y científico de este grupo de plantas.

Para cumplir con la primera etapa se propuso un esquema de extracción, diseñado con base en procedimientos generales descritos para la preparación de extractos con actividad antioxidante (AA), por lo que el método de extracción de antioxidantes consistió en realizar extracciones sucesivas utilizando disolventes de diferente polaridad (Hexano, Acetona, Metanol y Metanol-Agua 1:1). El método que se empleó para la extracción de los compuestos con AA ofrece las siguientes ventajas: es rápido, sencillo y no requiere de equipo o material sofisticado.

De este proceso de extracción se obtuvieron para cada planta cuatro extractos crudos (hexano, acetona, metanol y metanol-agua), obteniéndose de las veintidós plantas un total de 88 extractos. Se encontró que se obtiene una mayor cantidad de extracto crudo cuando se emplean disolventes polares, extrayéndose en general las siguientes cantidades con su respectivo rendimiento, partiendo de 27g de hojas secas: para los de hexano (1g-5.5%), acetona (1.3g-8.51%), metanol (2.6g-13.33%) y metanol-agua (3.2g-15.55%), cantidades suficientes para la realización de las pruebas cualitativas y cuantitativas de la actividad antioxidante. Cabe destacar que en los extractos de metanol y metanol-agua se obtienen compuestos ricos en polifenoles como los flavonoides, tal como lo comprobó Braca, 2002. En el que describe el aislamiento de varios flavonoides en su forma libre o glicosilados, a partir del extracto metanólico de las plantas *Licania Licanieflora* y *Licania apetala*. Los rendimientos obtenidos de la extracción de las veintidós plantas son comparables con los descritos por Moure, 2000. En su estudio, realizó extracciones sucesivas con disolventes de diferente polaridad a partir de la planta *Gevuina avellana* Hulls y encontró que el rendimiento y la cantidad de los compuestos polifenólicos aumenta conforme se incrementa la polaridad del extracto crudo: agua (2.75g) > metanol (2.53g) > etanol (1.93g) > acetona (1.45g) > dietil éter (1.10g).

6.1.3 EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

6.1.3.1 Actividad secuestrante con el radical-DPPH

Estudios previos de herbivoría demostraron que las plantas en estudio presentaron compuestos fenólicos, para relacionar estos compuestos con la actividad antioxidante, se realizó la evaluación cualitativa de la AA a los extractos obtenidos con hexano, acetona, metanol y metanol-agua de las veintidós plantas. Para conocer su actividad se utilizaron los ensayos de reducción del radical-DPPH y blanqueo (decoloración) del β -caroteno, estos métodos son indicativos de la presencia de compuestos con actividad antioxidante, tal como lo demostró Cavin en 1998. En sus estudios evaluó la actividad secuestrante y antioxidante del extracto obtenido de cloruro de metileno de la planta *Tinospora crispa*. Encontró que ambos reveladores son indicativos de la presencia de compuestos con actividad, los cuales posteriormente se aislaron, además de concluir que estos ensayos son rápidos, sencillos, fáciles de preparar y se requiere de pequeñas cantidades tanto del extracto crudo como del reactivo.

El método del radical-DPPH, se basa en la capacidad secuestrante que presentan los compuestos con actividad antioxidante presentes en los extractos para reducir el reactivo mediante la donación de átomos de hidrógeno, pasando de una coloración púrpura a amarillo. Los resultados de la evaluación cualitativa indican que en la cromatoplaqueta realizada para los veintidós extractos obtenidos con hexano (**Cromatoplaqueta No. 1**), se presentó poca actividad secuestrante, extrayéndose principalmente antioxidantes de baja polaridad. Cabe resaltar que las plantas que presentaron mayor capacidad secuestrante fueron: *L. arborea* (1), *B. grandifolia* (16), *Z. amolle* (17), *J. mexicana* (18), *G. jatthophifolius* (19), *P. ellipticum* (20) y *C. engleriana* (21), estos siete extractos tienen la característica de que presentan los mismos *R.f.*, al observarse dos bandas bien definidas con actividad antioxidante.

En los extractos obtenidos con acetona (**Cromatoplaqueta No. 2**) se observa poca actividad secuestrante, sin embargo es mayor que la obtenida con los extractos de hexano. Las plantas que presentaron mayor actividad fueron: *L. arborea* (1), *S. macrocarpum* (5), *P. leucophyllum* (9), *B. grandifolia* (16), *Z. amolle* (17), *J. mexicana* (18), *G. jatthophifolius* (19), *P. ellipticum* (20) y *C. engleriana* (21).

En los extractos obtenidos con metanol y metanol-agua, se observó un comportamiento diferente en comparación con los extractos de hexano y acetona, esto se ve reflejado al obtener una mayor actividad secuestrante, extrayéndose antioxidantes más polares como los flavonoides.

Se puede ver que para el extracto obtenido con metanol (**Cromatoplaça No. 3**) las plantas que presentaron mayor capacidad para reducir al radical-DPPH fueron: *L. arborea* (1), *S. macrocarpum* (5), *V. mollis* (8), *H. patens* (12), *S. humidis* (13), *S. bella* (14), *R. fusca* (15), *B. grandifolia* (16), *P. ellipticum* (20) y *C. engleriana* (21), y para el extracto con metanol-agua (**Cromatoplaça No. 4**) las plantas que presentaron mayor actividad fueron: *L. arborea* (1), *V. mollis* (8), *A. viminalis* (11), *S. humidis* (13), *S. bella* (14), *R. fusca* (15), *B. grandifolia* (16) y *C. engleriana* (21).

6.1.3.2 Actividad antioxidante con β -caroteno

El ensayo del blanqueo con β -caroteno confirma la actividad antioxidante. Se basa en la capacidad que presentan los extractos con AA para inhibir la oxidación la molécula (provocada por la luz UV), evitando la ruptura y formación de radicales libres mediante la donación de átomos de hidrógeno o secuestró de los radicales, estabilizando así a la molécula y evitando su decoloración de amarillo a blanco. Los radicales que se forman de la descomposición del β -caroteno, son principalmente del tipo que se generan en un sistema lipofílico, como los radicales alcoxi (RO^*) y peroxi (ROO^*) (Belitz, 1997).

Los resultados de esta evaluación indican que en la (**Cromatoplaça No. 1**) realizada para los veintidós extractos obtenidos con hexano, se presentó poca actividad antioxidante, extrayéndose principalmente antioxidante de baja polaridad. Cabe resaltar que las plantas que presentaron mayor actividad fueron: *L. arborea* (1), *B. grandifolia* (16), *Z. amolle* (17), *J. mexicana* (18), *G. jatthophifolius* (19), *P. ellipticum* (20), *C. engleriana* (21) y *P. rubra* (22).

En los extractos obtenidos con acetona (**Cromatoplaça No. 2**) se observa poca actividad antioxidante, sin embargo es mayor que la obtenida con los extractos de hexano. Las plantas que presentaron mayor actividad fueron: *L. arborea* (1), *S. macrocarpum* (5), *P. leucophyllum* (9), *R. fusca* (15), *B. grandifolia* (16), *Z. amolle* (17), *J. mexicana* (18), *G. jatthophifolius* (19), *P. ellipticum* (20) y *C. engleriana* (21).

En los extractos obtenidos con metanol y metanol-agua, se observó un comportamiento diferente en comparación con los extractos de hexano y acetona, en estos se observó una mayor actividad antioxidante, extrayéndose antioxidantes más polares como los flavonoides que pueden estar en su forma libre o glicosilada. Se puede ver que para el extracto obtenido con metanol (**Cromatoplaça No. 3**) las plantas que presentaron una mayor capacidad para inhibir la decoloración del β -caroteno fueron: *L. arborea* (1), *S. macrocarpum* (5), *V. mollis* (8), *H. patens* (12), *S. humidis* (13), *S. bella* (14), *R. fusca* (15), *B. grandifolia* (16), *P. ellipticum* (20) y *C. engleriana* (21), y para el extracto con metanol-agua (**Cromatoplaça No. 4**), las plantas que presentaron mayor actividad fueron: *L. arborea* (1), *V. mollis* (8), *A. viminalis* (11), *S. humidis* (13), *S. bella* (14), *R. fusca* (15), *B. grandifolia* (16) y *C. engleriana* (21).

Con base en los resultados obtenidos de manera cualitativa, se demostró que todos extractos de las veintidós plantas (hexano, acetona, metanol y metanol-agua) presentaron actividad secuestrante y antioxidante. Se encontró una mayor actividad cuando se emplearon disolventes polares como el extracto de metanol y metanol-agua, esto es debido a que se extraen compuestos polares del tipo de los polifenoles. De lo anterior se puede resaltar que para ambos extractos las plantas que presentaron mayor actividad en ambos ensayos fueron: *L. arborea* (1), *S. macrocarpum* (5), *V. mollis* (8), *H. patens* (12), *A. viminalis* (11), *S. humidis* (13), *S. bella* (14), *R. fusca* (15), *B. grandifolia* (16), *P. ellipticum* (20) y *C. engleriana* (21).

Es importante mencionar que ambos resultados no se pueden comparar debido a que son dos sistemas diferentes y el tipo de radical en ambos ensayos es diferente, sin embargo los resultados de ambos ensayos dan una idea muy sólida en cuanto a la capacidad antioxidante de una mezcla de compuestos. En el primero el radical-DPPH libre es un radical obtenido de síntesis y es un radical relativamente estable. En el segundo ensayo los radicales que se generan de la oxidación del β -caroteno son similares a los que se forman en un sistema lipofílico como los radicales peroxi, alcoxi y estos son muy reactivos.

Se encontró que si existe una relación entre los compuestos fenólicos reportados en los estudios de herbivoría y la actividad antioxidante de los extractos de las veintidós plantas. En la literatura se ha encontrado que los compuestos fenólicos forman parte de la estructura de antioxidantes conocidos como los flavonoides, fenoles ácidos, etc. Por lo que los resultados obtenidos de esta evaluación son un indicativo de la presencia de compuestos con actividad antioxidante.

RESULTADOS CUALITATIVOS

EXTRACTOS OBTENIDOS CON HEXANO

RADICAL-DDPH



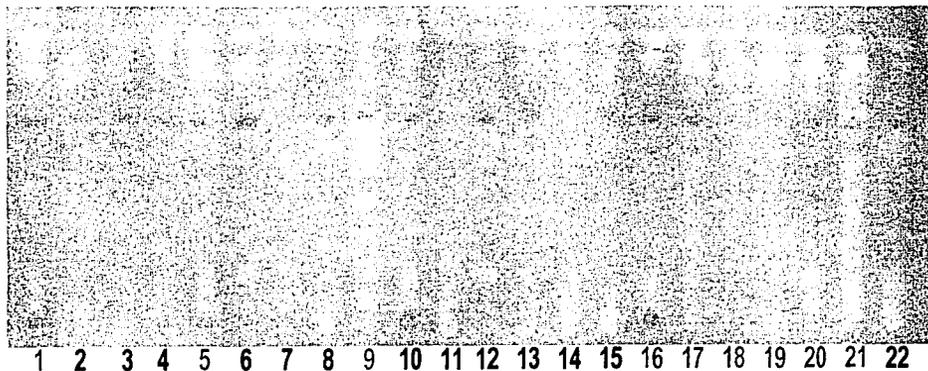
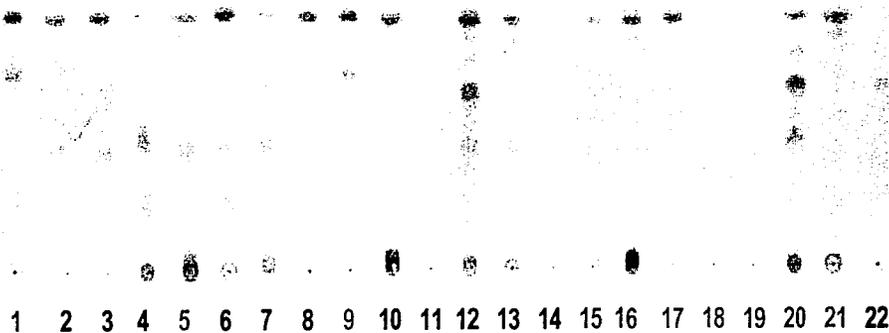
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

 β -CAROTENO

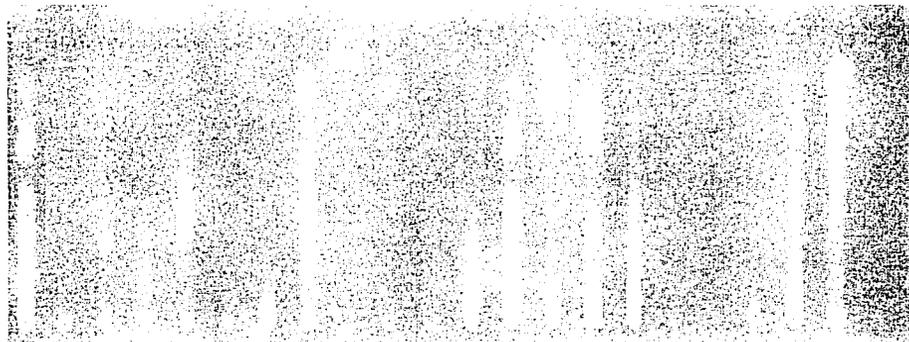
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

Cromatoplaça No. 1

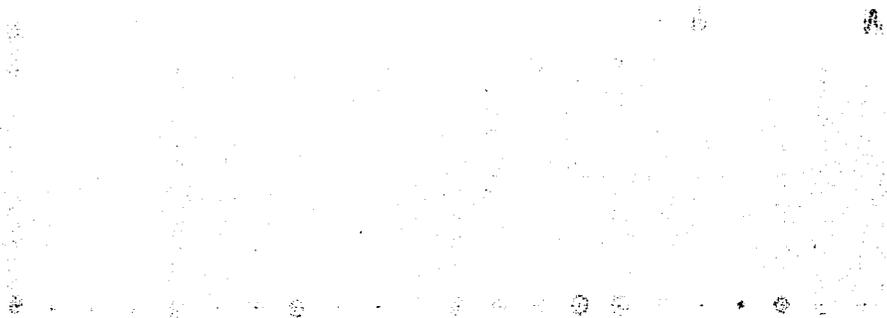
■ Extractos con mayor actividad antioxidante

EXTRACTOS OBTENIDOS CON ACETONA**RADICAL-DPPH****β-CAROTENO**

Cromatoplaça No. 2

RADICAL-DPPH **EXTRACTOS OBTENIDOS CON METANOL**

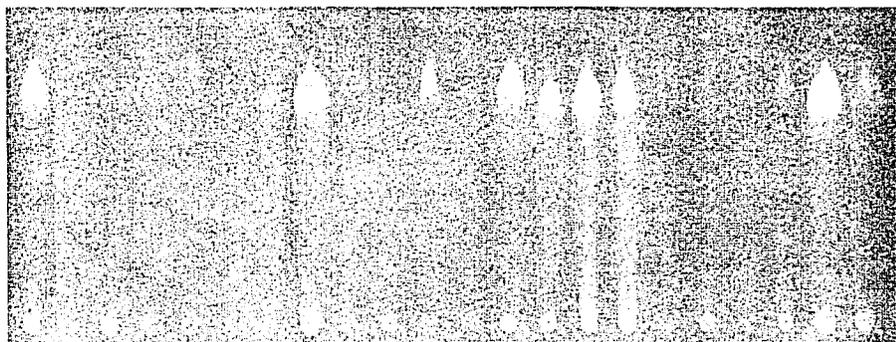
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

 β -CAROTENO

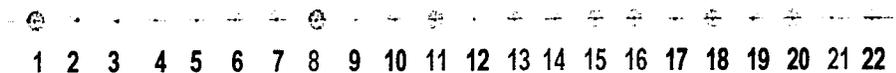
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

■ Extractos con mayor actividad antioxidante

Cromatoplaça No. 3

EXTRACTOS OBTENIDOS CON METANOL-AGUA**RADICAL-DPPH**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

 β -CAROTENO

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

■ Extractos con mayor actividad antioxidante

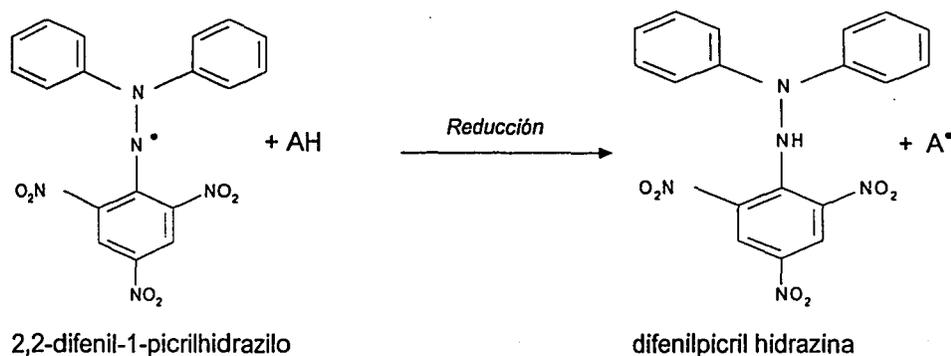
Cromatoplaça No. 4

6.1.4 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

6.1.4.1 Actividad secuestrante con el radical-DPPH

Para seleccionar las plantas con mayor actividad antioxidante, se realizó el análisis cuantitativo con la finalidad de hacer una comparación de la actividad de los extractos crudos obtenidos con metanol con patrones de referencia (BHA, BHT, TBHQ, ácido ascórbico, ácido ferúlico y quercetina) a concentración constante. Se utilizaron los ensayos de reducción del radical-DPPH y blanqueo del β -caroteno por espectrofotometría, ambos métodos son sensibles por detectar los compuestos con actividad antioxidante a bajas concentraciones. Se decidió trabajar a 200ppm ya que es la especificación para su uso en alimentos, en los Estados Unidos por la FDA (Giese, 1996) y la Secretaria de Salud. Para ambos ensayos la determinación se realizó por triplicado por cada planta, de las absorbancias obtenidas se realizó un análisis estadístico y se encontró que se tenía reproducibilidad.

Se tiene conocimiento que los antioxidantes inhiben la reacción en cadena de la autooxidación de lípidos, mediante la donación de átomos de hidrógeno o como secuestradores de radicales libres. La actividad de estos depende de muchos factores entre los más importantes se encuentra la solubilidad, concentración, impedimento estérico, de la facilidad de donación de los protones de acuerdo con su molécula, el medio que lo rodea, etc (Fennema, 1993). El método de la actividad secuestrante del radical-DPPH por espectrofotometría, mide el decrecimiento de la absorbancia del radical-DPPH, en presencia de un compuesto con actividad antioxidante (AH), mediante la donación de átomos de hidrógeno:



Este método es el más utilizado para evaluar cuantitativamente la actividad secuestrante por presentar las siguientes ventajas: es rápido, sencillo, requiere de pequeñas cantidades tanto del extracto crudo como del reactivo, es independiente de la polaridad de la muestra en estudio y produce resultados reproducibles, tal como lo demostró, Xiaojun, 2000. En sus estudios, evaluó la actividad secuestrante de los extractos de cloroformo, acetato de etilo, acetona, metanol y agua a partir de un grupo de un grupo de veintisiete plantas de diferente familia. Encontró que la actividad aumenta conforme se incrementa la polaridad de los extractos evaluados.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de la actividad secuestrante con el radical-DPPH (**gráfico 1**) muestran que de los veintidós extractos obtenidos con metanol, los que presentaron mayor actividad son: **5** *S. macrocarpum* (51.39%), **7** *A. squamosa* (50.41%), **1** *L. arborea* (46.39%), **11** *A. viminalis* (39.56%), **16** *B. grandifolia* (37.95%), **3** *B. cannesens* (37.60%), **6** *F. cotinifolia* (37.04%), **14** *S. bella* (35.24%) y **12** *H. patens* (34.29%), esto se debe a que estos extractos son ricos en compuestos polifenólicos como los flavonoides libres o glicosilados, estos compuestos tienen la habilidad de donar átomos de hidrógeno y reducir al radical-DPPH, mostrando una actividad secuestrante importante. Al compararse los nueve extractos con los patrones de referencia de la quercetina y TBHQ, presentan un mecanismo de acción similar para reducir al radical-DPPH. Se encontró que los extractos 5 y 7 muestran una actividad relativa con respecto al TBHQ (52.25%) y los extractos 1, 11, 16, 3, 6, 14 y 12 presenta una actividad comparable con la quercetina (36.48%). Caso contrario ocurre con el BHA (23.98%), ácido ascórbico (95.55%) y ácido ferúlico (68%) no son comparables en su modo de acción con los extractos que presentaron mayor actividad. La actividad obtenida para el BHA, es similar (27%) a la descrita por von Gadow, 1997. Es importante mencionar que de las veintidós muestras analizadas, el 40% presentó una actividad secuestrante importante.

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD SECUESTRANTE DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS CON PATRONES DE REFERENCIA POR EL MÉTODO DEL RADICAL-DPPH

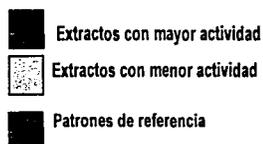
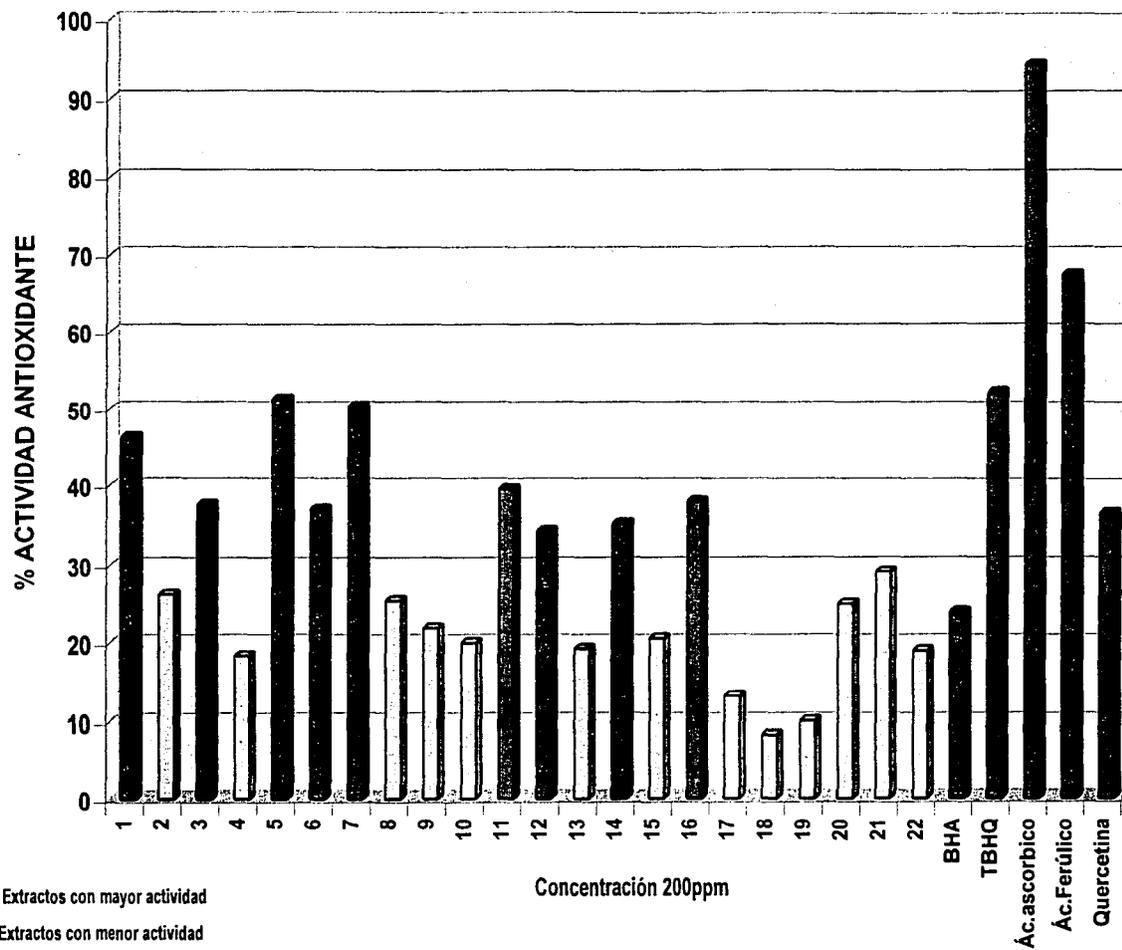


Gráfico 1

6.1.4.2 Actividad antioxidante con β -caroteno

El método del blanqueo del β -caroteno por espectrofotometría, confirma la actividad antioxidante de la muestra en estudio, los radicales libres que se forman son muy reactivos como los peroxi y alcoxi, similares a los que se generan en un sistema alimenticio que contiene ácidos grasos. Este método mide el decrecimiento de la absorbancia del β -caroteno en un sistema β -caroteno-ácido linoleico. Se basa en el decrecimiento del color amarillo de la molécula por la oxidación del ácido linoleico mediante la formación de radicales libres, pero en presencia de un compuesto con actividad antioxidante, se inhibe la formación de los radicales, evitando la decoloración del β -caroteno de amarillo a blanco. Esto va a depender de la facilidad que presente el antioxidante para donar átomos de hidrógeno o secuestro de los radicales libres (Fennema, 1993). Este método se seleccionó por presentar las siguientes ventajas es relativamente rápido, sencillo, requiere de pequeñas cantidades tanto del extracto crudo como del reactivo, produce resultados reproducibles. La desventaja que presenta es la polaridad de la muestra en estudio, tal como lo demostró Koleva en el 2001. En su estudio evaluó la actividad antioxidante de los extractos butil metil éter, butanol, acetato de etilo, metanol y agua a partir de un grupo de cinco plantas. Encontró que el extracto acuoso no presentó actividad, mostrando un efecto prooxidante. Moure en el 2000, también evaluó la actividad antioxidante de los extractos obtenidos con agua, metanol, etanol, acetona y dietil éter, a partir de la planta *Gevuina avellana*. Encontró que la actividad incrementa conforme disminuye la polaridad de la muestra en estudio.

En la cuantificación de la actividad antioxidante con β -caroteno (**gráfico 2**) se encontró, que de los veintidós extractos obtenidos con metanol los que presentaron mayor actividad para inhibir el blanqueo del β -caroteno son: **1** *Licania arborea* (36.01%), **14** *S. bella* (35.19%), **2** *F. obtusifolia* (34.35%), **12** *H. patens* (31.37%), **5** *S. macrocarpum* (29.23%), **3** *B. cannesens* (29.15%) y **4** *S. capiri* (26.87), esto se debe a que estos extractos son ricos en compuestos polifenólicos, ya que al compararse con el flavonoide de la quercetina (37%) muestran una actividad comparable, por lo que posiblemente el mecanismo de acción es similar. En general los extractos metanólicos evaluados, no son comparables con el BHA (79.75%), BHT (74.84%) y TBHQ (70.82%), ya que estos al ser lipofílicos, se concentran más cerca de la membrana de las micelas donde se lleva a cabo la oxidación mostrando una mayor actividad. En contraste con el ácido ferúlico que al ser un antioxidante hidrofílico su actividad se ve disminuida por la interacción con la parte polar de las micelas. Con base en lo anterior se obtiene que la actividad de los patrones de referencia

disminuye conforme se incrementa su polaridad BHA > BHT > THBQ > quercetina > ácido ferúlico, tal como se mencionó anteriormente en el estudio realizado por Moure, 2000. Es importante mencionar que la actividad obtenida de esta evaluación por el BHT (74.84%), es similar (68.8%) a la descrita por Koleva, 2001. Cabe resaltar que de las veintidós muestras analizadas, el 31% presentó una actividad antioxidante importante.

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS CON PATRONES DE REFERENCIA POR EL MÉTODO CON β -CAROTENO

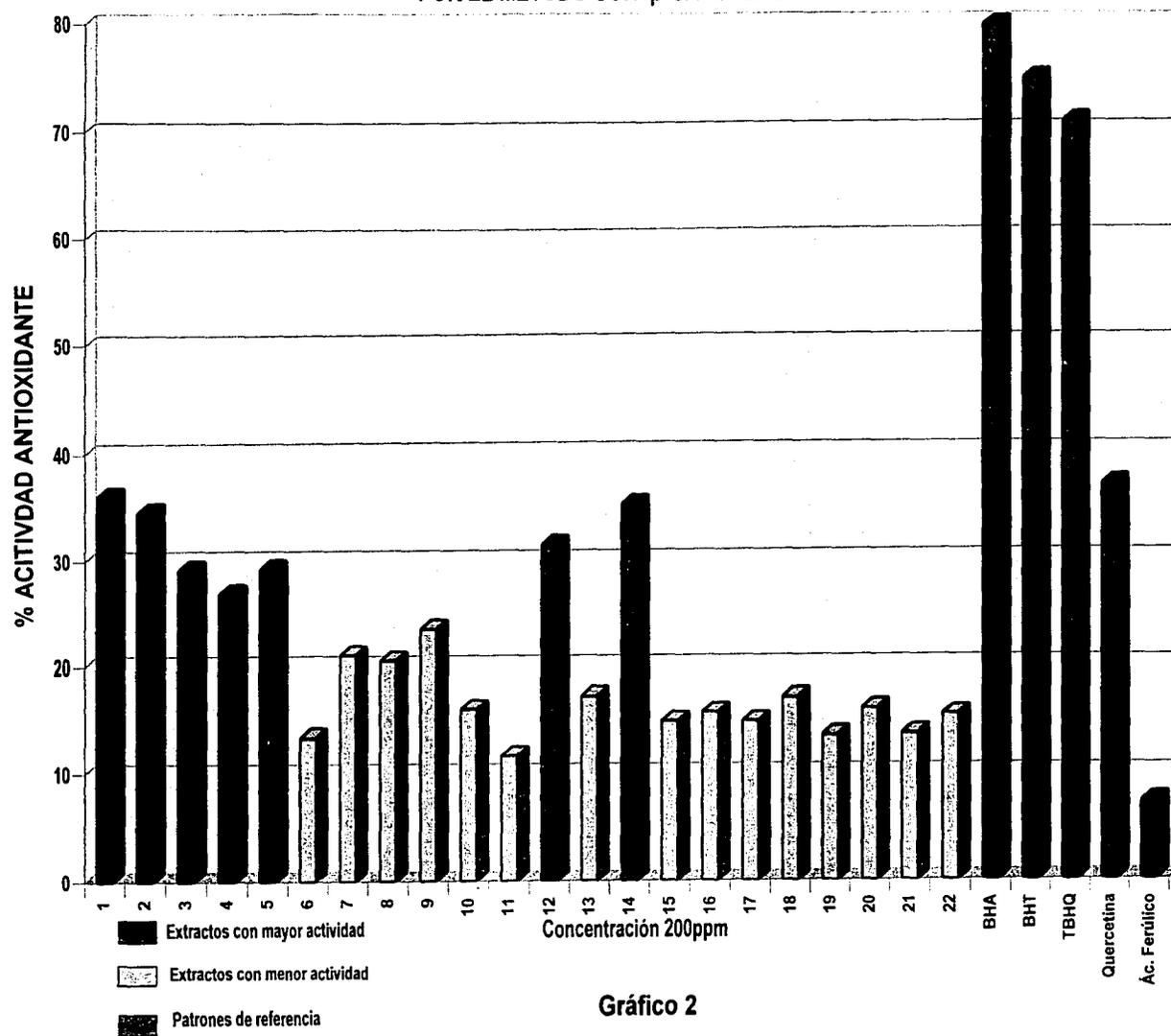


Gráfico 2

6.1.5 SELECCION DE LA FUENTE DE OBTENCIÓN DE ANTIOXIDANTES

Para seleccionar la planta de la cual se obtendrán los compuestos con actividad antioxidante, se tomaron en cuenta dos criterios. El primero los resultados obtenidos de la evaluación cuantitativa de los extractos metanólicos de las veintidós plantas con el radical-DPPH y blanqueo del β -caroteno. El segundo la evaluación cualitativa por CCF, para conocer la complejidad del extracto crudo obtenido con metanol.

Los resultados cuantitativos anteriormente descritos con el radical-DPPH, muestran que de las veintidós plantas evaluadas, las que presentaron mayor actividad secuestrante fueron: **5** *S. macrocarpum* (51.39%), **7** *A. squamosa* (50.41%), **1** *L. arborea* (46.39%), **11** *A. viminalis* (39.56%), **16** *B. grandifolia* (37.95%), **3** *B. cannesens* (37.60%), **6** *F. citrifolia* (37.04%), **14** *S. bella* (35.24%) y **12** *H. patens* (34.29%), y las que presentaron mayor actividad antioxidante con β -caroteno fueron: **1** *Licania arborea* (36.01%), **14** *S. bella* (35.19%), **2** *F. obtusifolia* (34.35%), **12** *H. patens* (31.37%), **5** *S. macrocarpum* (29.23%), **3** *B. cannesens* (29.15%) y **4** *S. capiri* (26.87%).

Ambos resultados no se pueden comparar debido a que son dos sistemas diferentes y el tipo de radical en ambos ensayos es diferente. En el primero el radical-DPPH libre es un radical obtenido de síntesis y es relativamente reactivo y en el segundo ensayo los radicales que se generan de la oxidación del β -caroteno son muy reactivos como el peroxi, alcoxi. Por lo tanto basándose en ambos resultados, se seleccionaron las tres primeras plantas con mayor actividad de ambos ensayos identificadas como: **5, 7, 1, 14, 2**, en importante mencionar que planta identificada como 1 en ambos ensayos fue una de las tres primeras con mayor actividad.

Una vez seleccionadas las cinco plantas con mayor actividad, se procedió a realizar el segundo criterio de selección. Para lo cual se realizó una evaluación cualitativa por CCF en gel de sílice, utilizando varios sistemas de elución en donde gradualmente se fue incrementando la polaridad, para conocer la complejidad del extracto crudo, empleando los reveladores del radical-DPPH, β -caroteno y sulfato cérico. Se encontró que de las cinco plantas evaluadas, la planta identificada como 1 presentó una mayor resolución y menor complejidad de la mezcla la compuestos con actividad antioxidante. Por lo tanto la planta que se seleccionó para la realización de la segunda etapa fue *Licania arborea*.

Es importante mencionar que el resto de las plantas que no fueron seleccionadas (5 *S. macrocarpum*, 7 *A. squamosa*, 11 *A. viminalis*, 16 *B. Grandifolia*, 3 *B. Cannesens*, 14 *S. bella*, 2 *F. obtusifolia*, 12 *H. patens*, 5 *S. macrocarpum*, 3 *B. cannesens* y 4 *S. capiri*, pueden ser potencialmente empleadas para la obtención de compuestos con actividad antioxidante. El estudio de estas plantas demuestra que es un campo de investigación abierto, el cual permitiría conocer la química de estas plantas, resaltando el tipo de familia al cual pertenecen (Chrysobalanaceae, Moraceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae, Annonaceae, Bignoniaceae, Burseraceae, Malphigiaceae, Apocynaceae).

6.2 SEGUNDA ETAPA: OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Licania arborea*

En la segunda etapa se realizó el fraccionamiento de los extractos obtenidos con acetona y metanol de *Licania arborea*, para el aislamiento, purificación y caracterización de algunos de los compuestos con actividad antioxidante, empleando las técnicas de cromatografía en columna y CCF preparativa.

6.2.1 PLANTA (*Licania arborea*)

Con la finalidad de tener una mayor cantidad de extracto crudo para la realización de los procesos de purificación, se realizó una colecta el 28 de Julio del 2001 de *Licania arborea* (Chrysobalanaceae), en la reserva de la biósfera de Huautla Morelos, La fecha de la colecta corresponde a la época de lluvias destacando la presencia de estrato herbáceo. La planta se recolectó de tal forma que no tuvieran daño.

6.2.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Licania arborea*

Del proceso de extracción se obtuvieron cuatro extractos crudos, de los cuales se encontró que se obtiene una mayor cantidad de extracto cuando se emplean disolventes polares, extrayéndose las siguientes cantidades con su respectivo rendimiento, partiendo de 2Kg de hojas secas. Con hexano (18.3g-0.91%), acetona (31g-1.55%), metanol (94.8g-4.74%) y metanol-agua (117.4g-5.87%). Cuando se emplearon disolventes polares se obtuvo un mayor rendimiento de extracto crudo. Los rendimiento que se obtuvieron fueron similares a los descritos para *Licania apetala* y *L. licaniaeflora* (Chrysobalanaceae), al obtenerse un mayor rendimiento conforme se incrementa la polaridad del extracto (Braca, 2002).

6.2.3 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO OBTENIDO CON ACETONA DE *Licania arborea*

6.2.3.1 Fraccionamiento del extracto obtenido con acetona

Para la obtención de los compuestos con actividad antioxidante, el extracto crudo obtenido con acetona (29.46g), se fraccionó en una columna cromatográfica utilizando como fase estacionaria gel de sílice, el sistema de elución se inició con hexano y posteriormente se utilizó un gradiente de hexano-acetato de etilo, acetato de etilo-metanol, para finalizar con metanol, el seguimiento de la columna se llevó a cabo por CCF en gel de sílice, y para reunir las fracciones correspondientes se utilizaron los reveladores radical-DPPH, β -caroteno, vainillina-ácido sulfúrico, cloruro férrico y sulfato cérico. Este procedimiento permitió obtener un total de doscientos treinta fracciones de las cuales se agruparon para obtener 32 fracciones combinadas (XXXII) (Tabla No. 7).

De éstas se seleccionó la fracción número II (203.8mg) la cuál presentó mayor actividad antioxidante al evaluarse por CCF, además de observarse dos bandas bien definidas.

6.2.3.2 Aislamiento y purificación de los poliprenoles

Debido a la cantidad obtenida de esta fracción (203.8mg) se decidió utilizar un proceso de purificación en CCF preparativa en gel de sílice utilizando como sistema de elución Hexano-Acetato de etilo (9.5:0.5) eluyéndose tres veces, estas condiciones fueron las óptimas para la separación de dos bandas, aparentemente compuestas de dos compuestos puros. Con base en los datos de los espectros obtenidos de RMN(^1H y ^{13}C) y de IR, se determinó que cada banda esta compuesta por una mezcla de dos poliprenoles, por lo que al estar impuros no se pudo llegar a conocer la estructura de estos dos compuestos, pero si la estructura básica (figura 14). Las señales registradas de los espectros de IR y RMN de los dos compuesto aislados, son señales básicas de los poliprenoles (Khidyrova, 2002). Para la separación de la mezcla de los dos poliprenoles se sugiere, emplear la metodología realizada por Khidyrova, 2002. Realizó una extracción a las hojas de la planta *Juniperus communis* (cupressaceae), por Soxhlet utilizando como disolvente acetona. El extracto es solubilizado con agua y posteriormente re-extraído con éter de petróleo. La fracción con éter de petróleo es fraccionada en una columna cromatográfica impregnada con dióxido de aluminio, utilizando como eluyente una mezcla (benceno-acetato de etilo 95:5).

Este tipo de compuestos conocidos también como alcoholes poliisoprenoides están formados por varias unidades de isopreno que van desde 5 hasta 25 o más, con un grupo hidroxilo al final de la cadena lineal (Rezanca, 2001). Hasta donde se tiene conocimiento, los poliprenoles no han sido aislados del género *Licania*, pero si se han encontrado en plantas como por ejemplo: *Gingko biloba*, *Cedrus deodora*, *Cryptomeria japonica*, *Pinus silvestris* y en microorganismo como: *Bacillus acidocaldarius*, *Aspergillus niger*, *Streptococcus mutants*, *Lactobacillus plantarum*, etc. Entre los principales poliprenoles que se han aislado se encuentran: C₁₀-prenoles (geraniol y nerol), C₁₅ (farnesol), C₂₀ (geranilgeraniol), C₂₅ (geranilfarnesol, solanesol), C₅₅₋₆₅ (castoprenols), etc. Se ha encontrado que estos compuestos están presentes de forma natural o se producen como un mecanismo de defensa por infestación con hongos (Rezanca, 2001; Khidyrova, 2002).

La obtención de estos poliprenoles de *Licania arborea* ha contribuido al aislamiento de dos compuestos con actividad antioxidante, dentro del género *Licania* que hasta el momento no han sido descritos. En la tabla No. 11 se muestran las propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los poliprenoles aislados.

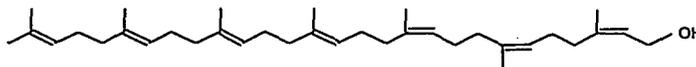


Figura 14. Estructura básica de los poliprenoles

Tabla No. 11 Propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los poliprenoles

	Poliprenol 1	Poliprenol 2
Fórmula molecular	$C_{36}H_{58}O_1$	
Peso molecular (g/mol)	506.85	
Peso (mg)	22.4	49.3
Apariencia	Resina	
Color	Anaranjado	
R.f (gel de sílice)	0.5	0.45
	Hex-AcOEt (9.5:0.5)	Hex-AcOEt (9.5:0.5)
Solubilidad	Hex, AcOEt, DCIM	
IR (cm ⁻¹)	835(C-H), 1000 (C-O), 1365 (C-H), 1450 (-C-H), 1660 (C-C), 2845, 2918 (-C-H), 2956 (-C-H), 3024 (-C- H), 3575 (-C-H), 3310 (OH)	
RMN- ¹³ C ppm (100 MHz, CDCl ₃)	32.01 (trans-cis), 32.25 (cis-cis), 39.72-39.74 (trans-trans)	
RMN- ¹ H ppm (300 MHz, CDCl ₃)	δ 2.0-2.1 (40H, -CHCH ₂ CH ₂ C-), 1.59 (12H, s, E- CMe=CH), 1.67 (21H, s, Z-CMe-CH)	

6.2.4 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO OBTENIDO CON METANOL DE *Licania arborea*

6.2.4.1 Fraccionamiento del extracto obtenido con metanol

Para la obtención de los compuestos con actividad antioxidante, el extracto crudo obtenido con metanol (25g), se fraccionó en una columna cromatográfica utilizando como fase estacionaria gel de sílice, el sistema de elución se inició con hexano y posteriormente se utilizó un gradiente de hexano-acetato de etilo, acetato de etilo-metanol, para finalizar con metanol, el seguimiento de la columna se llevó a cabo por CCF en gel de sílice y para reunir las fracciones correspondientes se utilizaron los reveladores radical-DPPH, β -caroteno, vainillina-ácido sulfúrico, cloruro férrico y sulfato cérico. Este procedimiento permitió obtener un total de 185 fracciones, de las cuales se agruparon 39 fracciones combinadas (XXXIX) (Tabla No. 8). De estas se separaron cinco fracciones que presentaron mayor actividad antioxidante: XVII, XIX, XX, XXVII y XXVIII. De la fracción No VII, precipitó un sólido cristalino, que aparentemente por CCF se trataba de un compuesto puro con capacidad antioxidante. Con base en los datos de los espectros obtenidos de espectrometría de masas y la CCF con muestras auténticas, permitió establecer que se trata de una mezcla de compuestos identificados como **estigmasterol** (figura 15) y **β -sitosterol** (figura 16). Este tipo de compuestos son conocidos como esteroides y se han encontrado en un gran número de plantas. El aislamiento del β -sitosterol ya se ha descrito en el género *Licania*, no así el del estigmasterol. En la tabla No. 12 se resumen las constantes físicas y espectrométricas de la mezcla del β -sitosterol y estigmasterol.

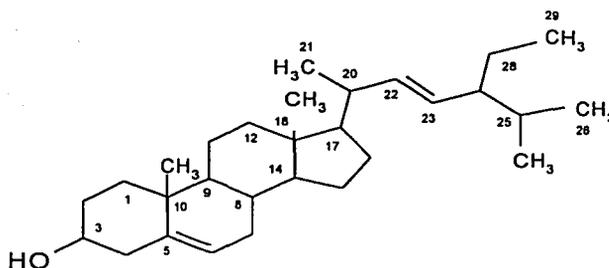
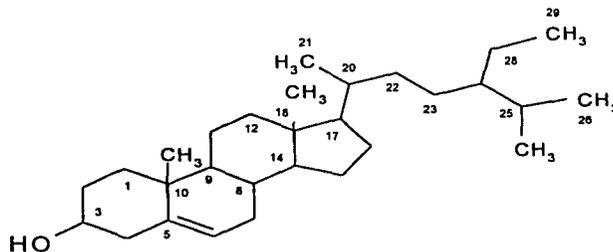


Figura 15. Estructura del estigmasterol

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Figura 16. Estructura del β -sitosterolTabla No. 12 Constantes físicas y espectrométricas de la mezcla de estigmasterol y β -sitosterol

	Estigmasterol	β -Sitosterol
Fórmula molecular	$C_{29}H_{48}O$	$C_{29}H_{50}O$
Peso molecular (g/mol)	412.7	414.7
Cantidad obtenida (mg)	4.8 mg	
Apariencia	Cristales	
Color	Blanco	
p.f (°C) experimental	137-141	
p.f (°C) teórico	136-141	
R.f (gel de sílice)	0.5 (Hex-AcOEt 9:1)	
Solubilidad	AcOEt, $CHCl_3$	
EM-IE m/z (intensidad relativa)	412 (M^+ , 100), 369 (10), 351 (12), 300 (18), 255 (23), 213 (13), 105 (38).	414 (M^+ , 100), 396 (37), 381 (21), 329 (22), 303 (26), 255 (16).

6.2.4.2 Evaluación cuantitativa de las fracciones con alta actividad antioxidante

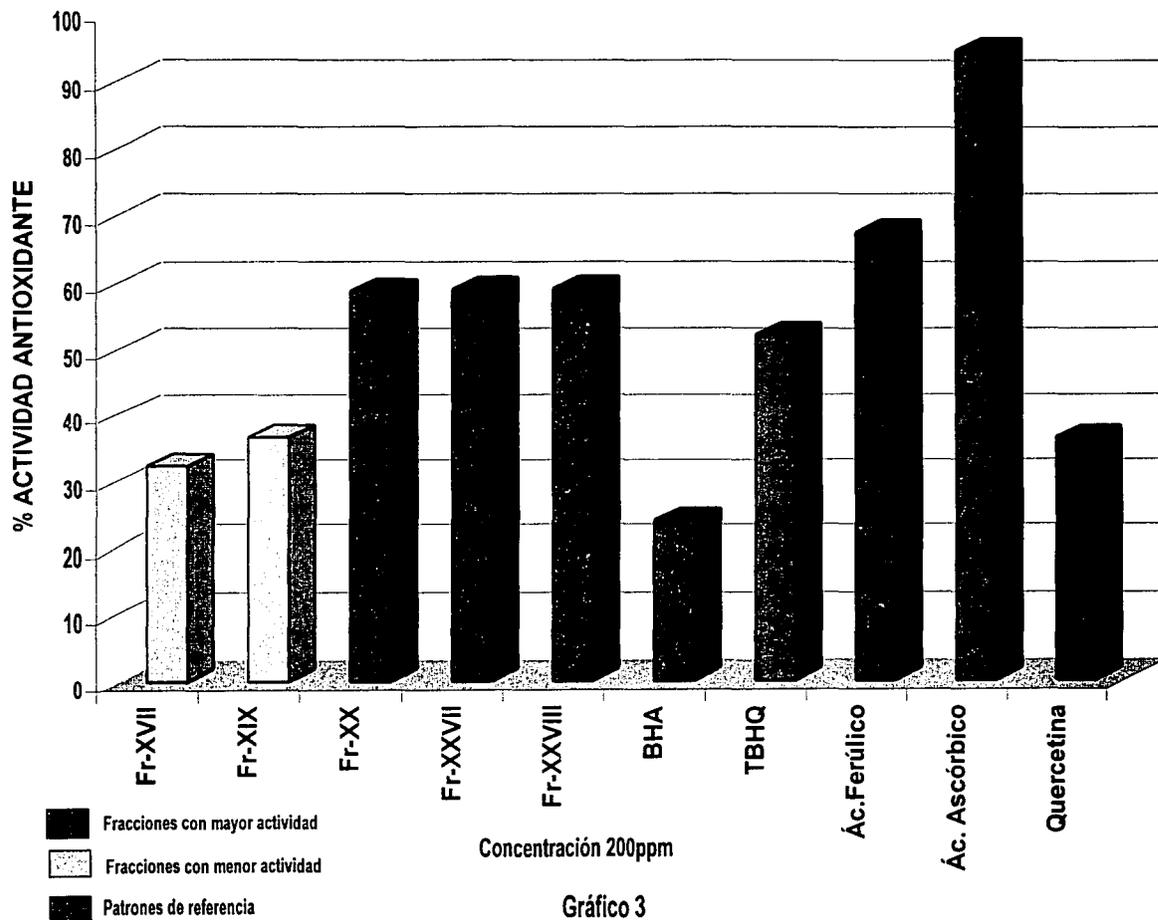
6.2.4.2.1 Actividad secuestrante del radical-DPPH

Para seleccionar las fracciones con mayor actividad, se realizó una comparación cuantitativa de las fracciones: XVII, XIX, XX, XXVII y XXVIII con patrones de referencia, por los métodos del radical-DPPH y blanqueo del β -caroteno, además se tomaron en cuenta otros criterios como su complejidad y la cantidad.

Los resultados obtenidos del análisis cuantitativo de la actividad secuestrante del radical-DPPH (**gráfico 3**) muestran que de las cinco fracciones evaluadas, las que presentaron mayor actividad son: fracción XXVIII (59.18%), XXVII (59.13%) y XX (58.85%), esta actividad se debe a la polaridad de la cuales fueron obtenidas del fraccionamiento con metanol. Al haberse obtenido de la mezcla de disolvente acetato de etilo-metanol, se extrajeron una mayor cantidad de compuestos polifenólicos en comparación a las fracciones XVII (32.26%) y XIX (36.54%), que al obtenerse de una polaridad media (acetato de etilo) se extrajeron una menor cantidad de compuestos polifenólicos reflejándose en su actividad.

La actividad de las fracciones XVII y XIX, son comparables con el mecanismo de acción para reducir el radical-DPPH con la quercetina (36.3%) y la actividad de las fracciones XXVIII, XXVII y XX son comparables con la actividad presentada por el TBHQ (52.25%).

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD SECUESTRANTE DE LAS FRACCIONES CON PATRONES DE REFERENCIA
POR EL MÉTODO DEL RADICAL-DPPH



6.2.4.2.2 Actividad antioxidante con β -caroteno

En la cuantificación de la actividad antioxidante con β -caroteno (**gráfico 4**), se observó que de las cinco fracciones evaluadas, las que presentaron mayor actividad son: XVII (36.96%) y XIX (35.15%), esta actividad se debe a la polaridad de las cuales fueron obtenidas durante el proceso de fraccionamiento, obteniéndose a partir del acetato de etilo 100%, esto se ve reflejado al obtener una actividad comparable con el flavonoide de la quercetina (37%). Se ha encontrado que cuando se emplean muestras de mediana polaridad la actividad es mayor y cuando se emplean muestras más polares su actividad decrece (Moure, 2000). Esto se ve reflejado en las fracciones XX (3.2%), XXVII y XXVIII (0%), las cuales fueron obtenidas de una polaridad mayor (acetato de etilo-metanol), y por lo tanto su actividad es menor o nula, esto influye en el método del β -caroteno ya que una de sus limitantes es la polaridad de la muestra (Koleva, 2001). En cuanto a los patrones de referencia se encontró el mismo comportamiento anteriormente descrito con las fracciones, al observarse un decrecimiento de la actividad conforme aumenta su polaridad: BHA (79.75%) > BHT(74.84%) > TBHQ (70.82%) > quercetina (37%) > ácido ferúlico (7.1%).

Para contrarrestar la limitante de la polaridad, se sugiere emplear un método que pueda medir muestras lipofílicas e hidrofílicas como el radical-ABTS^{•+}, es un radical parecido al radical-DPPH con la única diferencia que se tiene que generar por vía enzimática (peroxidasa, mioglobina) o químicamente (dióxido de magnesio, persulfato de potasio). Midiendo el decrecimiento de la absorbancia del radical-ABTS^{•+}, en presencia de un compuesto con actividad antioxidante, mediante la donación de átomos de hidrógeno (Armao, 2000).

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS FRACCIONES CON PATRONES DE REFERENCIA POR EL MÉTODO CON β -CAROTENO

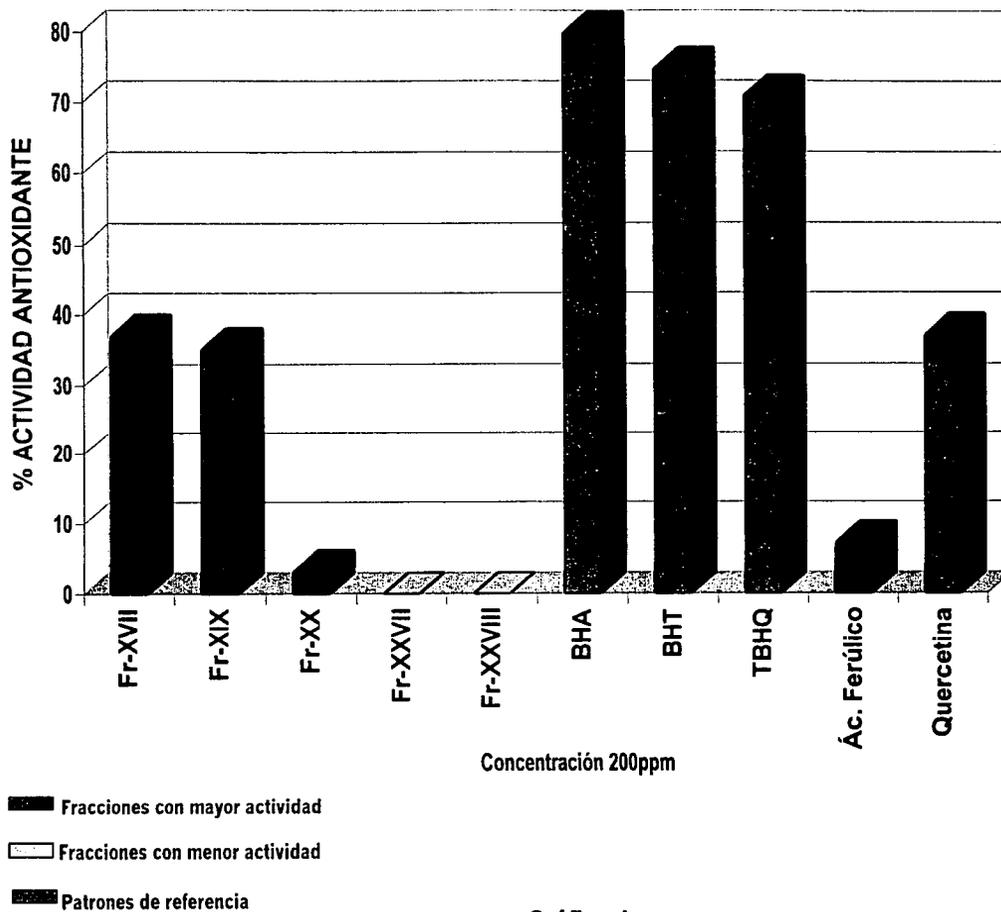


Gráfico 4

6.2.4.3 Selección de la fracción para la obtención de los antioxidantes

Los resultados que se obtuvieron de la cuantificación con el radical-DPPH, muestran que de las cinco fracciones evaluadas, las que presentaron mayor actividad secuestrante fueron: XXVIII (59.18%), XXVII (59.13) y XX (58.85%), y las que presentaron mayor actividad antioxidante con β -caroteno fueron: XVII (36.96%) y XIX (35.13%). Para conocer la complejidad de las cinco fracciones se evaluaron cualitativamente por CCF en gel de sílice. Se obtuvo que las fracciones XVII, XIX y XX presentaron una menor complejidad, por lo tanto las otras dos fracciones fueron discriminadas (XXVIII y XXVII). Además de la complejidad otro de los criterios que se consideró para seleccionar la fracción menos compleja, fue el de la cantidad de extracto, la fracción XIX (1.6g) es la que se seleccionó para la obtención de los compuestos responsables de dicha actividad. Es importante mencionar que las fracciones que no fueron seleccionadas (XVII, XX, XXVII y XXVIII), pueden ser estudiadas en investigaciones subsecuentes, para la obtención de los compuestos responsables de dicha actividad.

6.2.4.4 Aislamiento y purificación del catecol

La fracción (XIX) seleccionada, se fraccionó en una columna cromatográfica utilizando como fase estacionaria gel de sílice, el sistema de elución se inició con hexano y posteriormente se utilizó un gradiente de hexano-acetato de etilo, acetato de etilo-metanol, para finalizar con metanol, el seguimiento de la columna se llevó a cabo por CCF en gel de sílice, y para reunir las fracciones correspondientes se utilizaron los reveladores radical-DPPH, β -caroteno, vainillina-ácido sulfúrico, cloruro férrico y sulfato cérico. Este procedimiento permitió obtener un total de 158 fracciones de las cuales se agruparon 29 fracciones combinadas (Tabla No. 9). De la fracción identificada como LA-M12, se aisló un sólido cristalino. Con base en los datos de los espectros obtenidos de IR, UV, EM y RMN (^1H y ^{13}C), se caracterizó al catecol (figura 17). El catecol es un polifenol libre y hasta donde se tiene conocimiento este tipo de compuestos rara vez se han encontrado en plantas (Harborne, 1984). Hasta la fecha no se ha descrito la presencia del catecol dentro del género *Licania*. Es importante destacar la presencia de este compuesto de *Licania arborea*, por la contribución que aporta a este género. En la tabla No. 13 se muestran sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

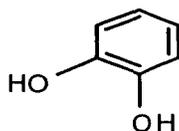


Figura 17. Estructura del catecol

Tabla No. 13 Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del catecol

	Catecol
Fórmula molecular	C ₆ H ₆ O ₂
Peso molecular (g/mol)	110.1
Cantidad obtenida (mg)	52.7
Apariencia	Cristales
Color	Blanco
p.f (°C) experimental	105-106
p.f (°C) teórico	105
R.f (gel de sílice)	0.6 (AcOEt)
Solubilidad	AcOEt, MeOH
IR (cm ⁻¹)	3450, 3325, 1618, 1513, 1363, 1255
UV λ max/nm	277.08
EM-IE m/z	110 (M ⁺ , 100), 92, 81, 64
RMN- ¹³ C (70 MHz, CDCl ₃)	144, 119, 115
RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃)	6.7, 4.83

6.2.5 IDENTIFICACIÓN Y OBTENCIÓN DE FLAVONOIDES A PARTIR DEL EXTRACTO OBTENIDO CON METANOL DE *Licania arborea*

6.2.5.1 Obtención de los extractos

La metodología que se empleó para la obtención de los extractos con acetato de etilo y n-butanol a partir del extracto crudo obtenido con metanol, fue con base en estudios previos realizados al género *Licania* (Braca, 2002). Se encontró que de estos extractos se han aislado flavonoides en su forma libre o glicosilado, siendo los más abundantes el kaemferol, quercetina, miricetina, epicatequina y catequina. Hasta el momento se ha descrito el aislamiento de 39 flavonoides del género *Licania* (tabla No. 3).

6.2.5.2 Identificación de flavonoides con actividad antioxidante

En la literatura se tienen reportadas diferentes técnicas para la identificación de polifenoles, una de ellas es la descrita por Prakas, 1998. En la que describe la identificación de estos compuestos por CCF empleando seis sistemas de elución con sus respectivos R.f, mostrando cierta coloración con los reveladores de vainillina-ácido sulfúrico y cloruro férrico (Tabla 14). Para la identificación de los polifenoles de los extractos obtenidos con acetato de etilo y n-butanol, se empleó la metodología de Prakas. Para este fin se realizó la evaluación cualitativa por CCF en celulosa, empleando como reveladores el radical-DPPH, vainillina-ácido sulfúrico y cloruro férrico (específicos para la identificación de algunos polifenoles). Se emplearon seis sistemas de elución: I) cloroformo-metanol-ácido acético 90:10:1, II) éter de petróleo-acetato de etilo-ácido fórmico 40:60:1, III) benceno-dioxano-ácido acético 85:15:1, IV) cloruro de metileno-metanol-ácido acético 50:50:1, V) tolueno-acetonitrilo-ácido fórmico 70:30:10, VI) éter de petróleo-metanol-ácido acético 90:10:1. Es importante mencionar que el extracto crudo obtenido con metanol y metanol-agua también se le realizó la evaluación de identificación de flavonoides para conocer su complejidad, la pureza y actividad con respecto al extracto de acetato de etilo y n-butanol.

Con base en los resultados de la evaluación por CCF con el radical-DPPH (**Cromatoplaca 5**), empleando como eluyente cloruro de metileno-metanol-ácido acético (50:50:1), se obtuvo que todos los extractos presentaron capacidad secuestrante, sin embargo el extracto obtenido con acetato de etilo mostró una mayor capacidad para donar átomos de hidrógeno, presentando mayor actividad. La complejidad del extracto **a** y **d** es mayor en comparación a los extractos **b** y **c**. En el **a** se puede observar

que después de la extracción por partición se obtienen extractos más puros y de menor complejidad (**b y c**). En el **d** se observa un barrido de los compuestos con actividad antioxidante, siendo más difícil la separación de sus compuestos, ya que al ser el más polar se obtiene compuestos de esa polaridad como los flavonoides con dos o más unidades de glicosilaciones. Con respecto a los dos reveladores empleados para la identificación de los polifenoles, se encontró que los R.f no corresponden a los descritos por Parcas, esto se debe a que los extractos al estar conformados por una mezcla de compuestos con actividad antioxidante interfieren con el R.f. Por lo que solamente se muestra las cromatoplasmas 6 y 7 con el sistema de elución IV (cloruro de metileno-metanol-ácido acético 50:50:1), ya que se observó una mejor resolución de los polifenoles. Los resultados obtenidos con el revelador del cloruro férrico (**Cromatoplasma 6**), se encontró la presencia de los siguientes polifenoles dando prueba positiva para catequina, epicatequina y pirogalol (coloración azul-verdoso). Sin embargo con el revelador de cloruro férrico (**Cromatoplasma 7**) se confirma la presencia de catequina y epicatequina (coloración anaranjado), pero no para pirogalol (coloración rosa). Es importante mencionar que al no corresponder los R.f, se concluye la presencia de flavonoides, ya que la catequina y epicatequina pertenecen al grupo de los flavan-3-oles. En la tabla 14 se muestran los polifenoles identificados en los extractos obtenidos con acetato de etilo y n-butanol.

Resultados de la evaluación cualitativa por CCF en celulosa

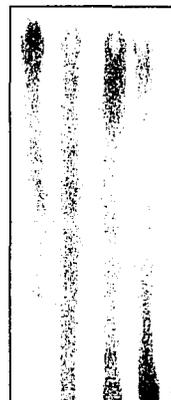
Cromatoplaca 5



a b c d

Revelador: radical-DPPH

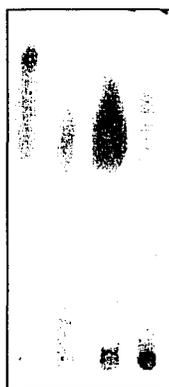
Cromatoplaca 6



a b c d

Revelador: vainillina-ácido sulfúrico

Cromatoplaca 7



a b c d

Revelador: Cloruro férrico

a (extracto crudo de metanol), b (extracto con n-butanol), c (extracto con acetato de etilo) y d (extracto crudo de metanol-agua)

Tabla No. 14 Identificación de polifenoles

Compuestos	Vainillina-ácido sulfúrico		Cloruro férrico	
	Acetato de etilo	n-Butanol	Acetato de etilo	n-Butanol
Ácido galico	x	x	x	x
Metil galato	x	x	x	x
Pirogalol	✓	✓	x	x
Floroglucinol	x	x	x	x
Catecol	x	x	x	x
Resorcinol	x	x	x	x
Hidroquinona	x	x	x	x
Catequina	✓	✓	✓	✓
Epicatequina	✓	✓	✓	✓
Ácido cinámico	x	x	x	x
Ácido p-cumárico	x	x	x	x
Ácido ferúlico	x	x	x	x

Prueba negativa (x) y Prueba positiva (✓)

Coloración de los compuestos para prueba positiva con:

Cloruro férrico: ácido galico y galato de metilo (púrpura), pirogalol, catequina y epicatequina (azul-verdoso), floroglucinol, resorcinol e hidroquinona (magenta), ácido cinámico (amarillo), ácido p-cumárico y ácido ferúlico (anaranjado).

Vainillina-ácido sulfúrico: ácido galico, galato de metilo y ácido p-cumarico (ligeramente púrpura), pirogalol y resorcinol (rosa), floroglucinol, catequina y epicatequina (anaranjado), catecol y ácido ferúlico (púrpura), hidroquinona (ligeramente amarillo) y ácido cinámico (nada).

6.2.5.3 Fraccionamiento del extracto obtenido con acetato de etilo

Los resultados obtenidos de la identificación de los flavonoides, se obtuvo que en los extractos de acetato de etilo y n-butanol se identificaron dos flavonoides. Para la obtención de estos compuestos, se decidió trabajar con el extracto de acetato de etilo por presentar mayor actividad. Para este fin el extracto (20g) se fraccionó, en una columna cromatográfica utilizando como fase estacionaria celulosa, el sistema de elución se inició con una mezcla de cloruro de metileno-metanol (8:2), posteriormente se utilizó cloruro de metileno-metanol (7:3), (1:1), metanol, metanol-agua (1:1), para finalizar con agua. El seguimiento de la columna se llevó a cabo por CCF, y para reunir las fracciones correspondientes se utilizaron los reveladores radical-DPPH, vainillina-ácido sulfúrico y cloruro férrico. Este procedimiento permitió obtener un total de 65 fracciones de las cuales se agruparon 13 fracciones combinadas (XIII) con actividad antioxidante. De las cuales se seleccionó la fracción IX, por presentar una mayor actividad antioxidante y una menor complejidad de los compuestos al observarse tres bandas bien definidas. La cual posteriormente se fraccionó.

6.2.5.4 Aislamiento y purificación de la miricetina-3-rutinoso

La fracción IX (300mg), se fraccionó en una columna cromatográfica, utilizando como fase estacionaria gel de sílice, empleando como sistema de elución una mezcla de cloruro de metileno-metanol-agua (3.5:1.3:0.2). El seguimiento de la columna se llevó a cabo por CCF en gel de sílice, y para reunir las fracciones correspondientes se utilizaron los reveladores: radical-DPPH, vainillina-ácido sulfúrico, cloruro férrico. Este procedimiento permitió obtener un total de diez fracciones. De las fracciones 6, 7 y 8 se aisló un compuesto sólido. Con base en los datos obtenidos de los espectros de RMN (^1H y ^{13}C), se determinó la estructura identificada como miricetina-3-rutinoso (figura 18). Las señales de los espectros, corresponden a las descritas en la literatura por Bilia en 1996. En sus estudios describe el aislamiento de varios flavonoides destacando la presencia de la miricetina-3-rutinoso del extracto obtenido con cloroformo-metanol (9:1), a partir de la planta *Licania carri* perteneciente a la familia Chrysobalanaceae, con un rendimiento del 0.044%, en el caso de *Licania arborea* el rendimiento que se obtuvo fue de 0.0028%. Con base en lo anterior podemos decir que en la planta *Licania arborea* la presencia de este compuesto se encuentra en menor cantidad.

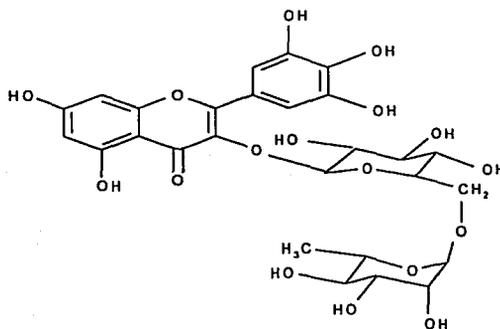


Figura 18. Estructura de la miricetina-3-rutinosa

Tabla No.15. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la miricetina-3-rutinosa

	Miricetina-3-rutinosa
Fórmula molecular	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇
Peso molecular (g/mol)	626.53
Cantidad obtenida (mg)	60
Apariencia	Sólido
Color	Amarillo
R.f (gel de sílice)	0.45 Cloruro de metileno-Metanol-Agua (3.5:1.3:0.2)
p.f (°C) experimental	190-192
p.f (°C) teórico	191
Solubilidad	MeOH, Agua
RNM- ¹ H (CD ₃ OD)	δ 0.84 (3h, d, J= 6.2 Hz, Me-6''), 3.05 (1H, br d, J= 9.6 Hz, H-6'' a), 3.87 (3H, s, OMe), 4.28 (1H, br s, H-1''), 5.75 (1H, d, J= 7.4 Hz, H-1'), 6.10 (1H, d, J= 1.9 Hz, H-6'), 6.37 (1H, d, J= 1.9 Hz, H-8), 6.96 (1H, d, J= 1.8 Hz, H-6'), 7.23 (1H, d, J= 1.8 Hz, H-2')
RNM- ¹³ C (DMSO-d ₆)	ppm 17.7 (C-6''); 67.1 (C-6''), 68.4 (C-5'''), 70.0 (C-4''); 70.3 (C-2''' o C-3'''); 70.5 (C-2''' o C-3'''); 71.9 (C-4'''); 73.9 (C-2'''), 76.3 (C-3''), 76.5 (C-5''), 93.5 (C-8); 98.7 (C-6); 100.4 (C-1'''); 101.0 (C-1''), 103.8 (C-10), 108.6 (C-2 y C-6'); 120.1 (C-1'), 133.5 (C-3), 136.7 (C-4'), 145.4 (C-3' y C-5'), 156.4 (C-2 y C-9); 161.2 (C-5); 164.4 (C-7); 177.8 (C-4)

6.2.6 EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LOS ANTIOXIDANTES AISLADOS

Es importante mencionar que los procesos de purificación permitieron aislar seis compuestos con actividad antioxidante (poliprenol 1, poliprenol 2, mezcla de β -sitosterol-estigmasterol, catecol y miricetina-3-rutinoso). De los cuales tres de ellos se analizaron cuantitativamente (poliprenol 1, poliprenol 2 y catecol), con la finalidad de hacer una comparación con patrones de referencia (BHA, BHT, TBHQ, ácido ascórbico, ácido ferúlico y quercetina) para conocer su capacidad antioxidante, utilizando los ensayos del radical-DPPH y blanqueo del β -caroteno. La mezcla de los compuestos estigmasterol y β -sitosterol no fue posible realizar su evaluación debido a la cantidad insuficiente de muestra, como se mencionó anteriormente en el proceso de purificación la cantidad que se obtuvo fue de 4.8mg, la cual se empleó para la caracterización del compuesto. Sin embargo se encontró en la literatura que estos compuestos presentan baja actividad antioxidante. En este estudio se comparó la actividad antioxidante con patrones de referencia por el método del tiocinato, encontrándose que el BHA (91%) y α -tocoferol (76%) presentaron mayor actividad antioxidante con respecto al β -sitosterol (21%) y estigmasterol (9%) (Chien-Ya, 2001). Con respecto a la miricetina-3-rutinoso, tampoco se pudo evaluar. No se encontraron datos en la literatura acerca de su actividad antioxidante.

6.2.6.1 Actividad secuestrante con el radical-DPPH

Los resultados de la evaluación cuantitativa con el radical-DPPH (gráfico 5), muestra que de los tres antioxidantes naturales evaluados, el catecol presentó una mayor capacidad para donar átomos de hidrógeno reduciendo más eficientemente al radical, mostrando una mayor actividad secuestrante (52.09%). Comparándolo con los patrones de referencia, su actividad es comparable con el TBHQ (52.25%), ambos antioxidante tienen en su estructura dos grupos OH, por lo tanto presentan un mecanismo de acción similar, para reaccionar con el radical-DPPH, en comparación al fenol monohídrico como el BHA, que al presenta impedimento estérico por el grupo terbutilo, su actividad es menor (23.98%). La actividad obtenida de esta evaluación por el BHA, es comparable con la descrita por von Gadow, 1997. En sus estudios realizó una comparación de la actividad secuestrante de diferentes extractos de la planta *Aspalathus linearis* con patrones de referencia (BHA, BHT). Encontró que la actividad secuestrante del extracto metanólico es mayor en comparación al BHA (27%). Con base en lo anterior podemos concluir que al obtenerse una actividad comparable entre un antioxidante sintético importante como el TBHQ, el

cual es muy utilizado en la industria alimentaria en los aceites vegetales y uno natural como el catecol. Sin embargo el catecol presenta una limitante su toxicidad.

Con respecto a la actividad de los poliprenoles. Se encontró que el poliprenol 1, presentó una actividad de 37.09%, la cual es comparable con la actividad de la quercetina (36.48%), esta similitud no se puede explicar en base a las estructuras de ambos compuestos, por lo que el mecanismo de acción es diferente y los valores encontrados son una coincidencia experimental. El poliprenol 2, presentó una actividad de 25.11%, la cual es comparable con el BHA (23.98%), al ser un antioxidante lipofílico, es más eficiente en las emulsiones aceite/agua (Belitz, 1997).

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD SECUESTRANTE DE LOS COMPUESTOS AISLADOS CON PATRONES DE REFERENCIA
POR EL MÉTODO CON RADICAL-DPPH

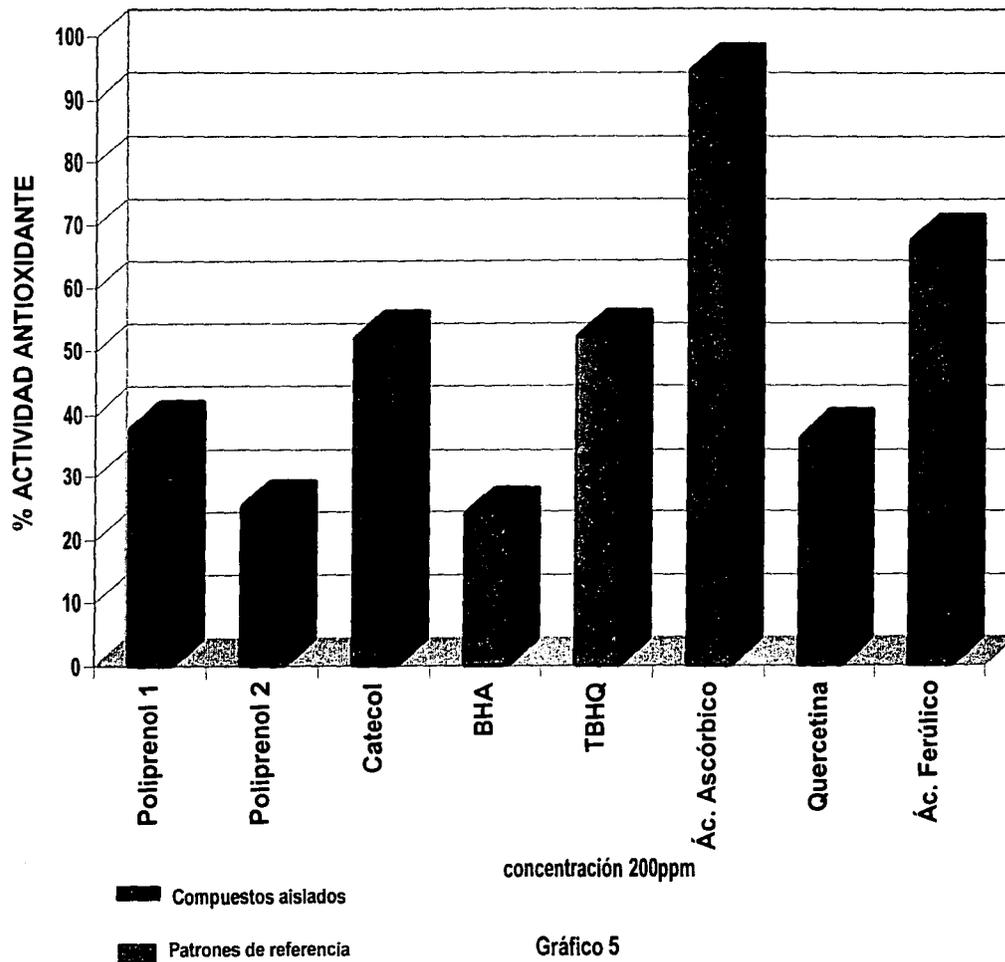
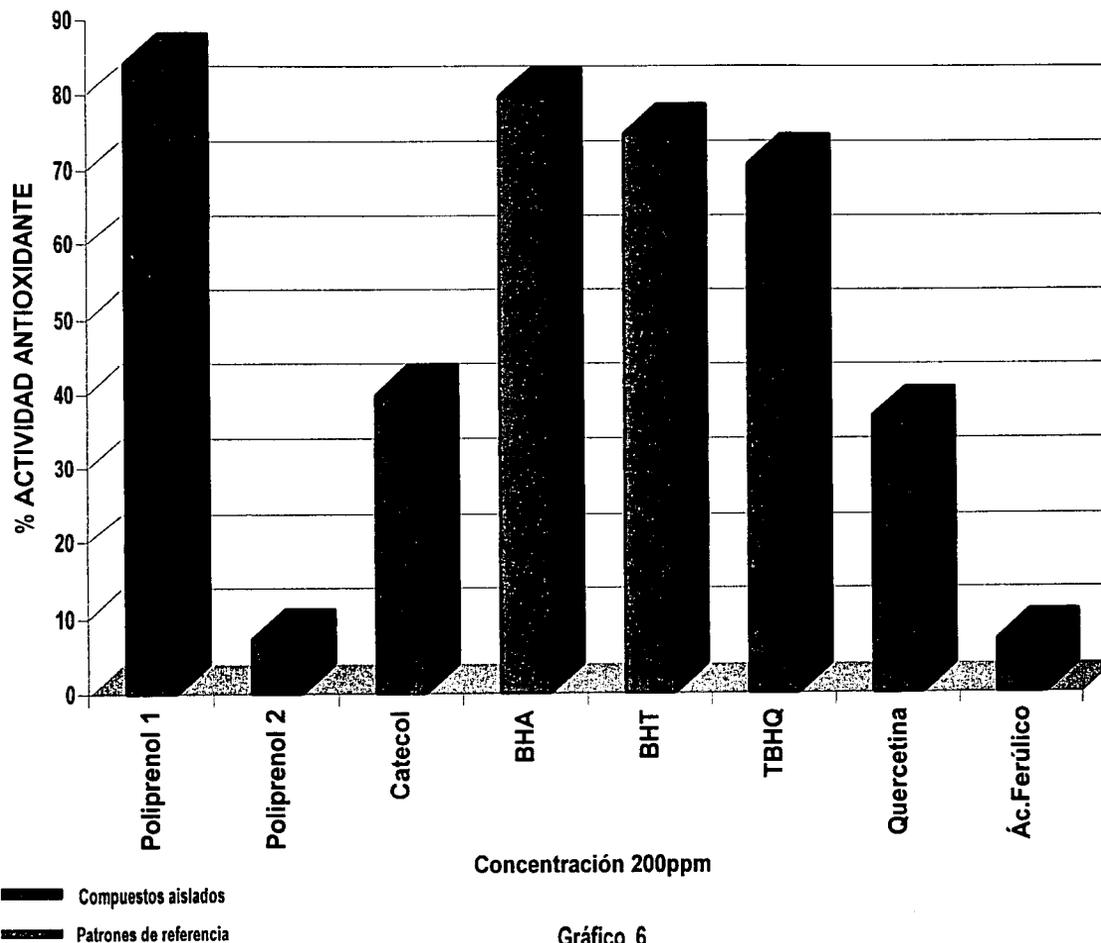


Gráfico 5

6.2.6.2 Actividad antioxidante con β -caroteno

En la cuantificación de la actividad antioxidante con β -caroteno (**gráfico 6**) muestra que de los tres antioxidantes naturales evaluados. El poliprenol 1 (84.34%) presentó una mayor actividad para inhibir la decoloración del β -caroteno, provocada por los radicales libres que se generan por la oxidación del ácido linoleico. La actividad del poliprenol 1, se debe a que se concentra más cerca de la membrana de las micelas donde se lleva a cabo la oxidación, mostrando mayor actividad. En contraste con el ácido ferúlico que al ser más polar, presenta una menor capacidad para inhibir la decoloración del caroteno al interaccionar más con la parte polar de las micelas. Se obtuvo que los patrones de referencia BHA, BHT y TBHQ presentan una actividad antioxidante relativa (79.75%, 74.84% y 70.82%, respectivamente), la cual es comparable con la actividad del poliprenol 1. En el caso de las emulsiones aceite/agua son más eficientes los antioxidante lipofílicos como el BHA y BHT. Por el contrario los antioxidantes polares como el TBHQ son especialmente activos en los aceites vegetales, por que se acumulan en la interfase grasa-aire. Es importante mencionar que la actividad obtenida de esta evaluación por el BHT (74.84%), es similar (68.8%) a la descrita por Koleva, 2001.

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS AISLADOS CON PATRONES DE REFERENCIA
POR EL MÉTODO CON β -CAROTENO



7. CONCLUSIONES

- El procedimiento empleado en la investigación constituye una alternativa rápida y sencilla para identificar compuestos con actividad antioxidante.
- Los compuestos fenólicos que se encuentran en el grupo de plantas presentan actividad secuestrante de los radicales libres y actividad antioxidante.
- De los extractos evaluados, se encontró que presentan una mayor actividad secuestrante y antioxidante cuando se emplean disolventes polares para su obtención.
- Se demostró cuantitativamente que la actividad secuestrante de los extractos obtenidos con metanol, de las plantas identificadas como: 1 *L. arborea*, 3 *B. cannesens*, 5 *S. macrocarpum*, 6 *F. citinifolia*, 7 *A. squamosa*, 11 *A. viminalis*, 12 *H. patens*, 14 *S. bella* y 16 *B. grandifolia* es mayor que la quercetina y BHA.
- Se demostró cuantitativamente que la actividad antioxidante de los extractos obtenidos con metanol, de las plantas identificadas como: 1 *Licania arborea*, 2 *F. obtusifolia*, 3 *B. cannesens*, 4 *S. capiri*, 5 *S. macrocarpum*, 12 *H. patens* y 14 *S. bella*, es mayor con respecto al ácido ferúlico, sin embargo son comparables con la actividad de la quercetina.
- La purificación de los extractos obtenidos con acetona y metanol de *Licania arborea*, permitió el aislamiento y caracterización de seis compuestos con actividad antioxidante (poliprenol 1, poliprenol 2, mezcla de estigmasterol- β -sitosterol, catecol y miricetina-3-rutinoso).
- Se demostró cuantitativamente que el catecol presentó mayor actividad secuestrante con respecto al BHA y quercetina, sin embargo es comparable con la actividad del TBHQ.
- Se demostró cuantitativamente que el poliprenol 1, presentó mayor actividad antioxidante con respecto a los patrones de referencia.
- Se contribuyó con la química de la planta *Licania arborea*, estableciéndose condiciones para el aislamiento y caracterización de compuestos con actividad antioxidante.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Arnao, B. M., Some methodological problems in the determination of antioxidants activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.* **2000**, 11:419-421.
2. Arnao, B. M., Cano, A. y Acosta, M., The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidants activity. *Food Chem.* **2000**, 73:239-244.
3. Barbut, S., Josephson, D. y Maurer, A., Antioxidant properties of rosemary oleoresin in turkey sausage. *J. Food Sci.* **1995**, 50:1356-1359.
4. Belitz, D. H. y Grosch, W., Química de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, España, **1997**.
5. Bilia, R. A., Ciampi, L., Mendez, J. y Morelli, I., Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids from *Licania pyrifolia*. *Pharm. Acta Helveticae.* **1996**, 71:199-204.
6. Bilia, R. A. y Morelli, I., New lupane derivatives from the leaves of *Licania pyrifolia*. *J. Nat. Prod.* **1996**, 59:297-300.
7. Bilia, R. A., Mendez, J. y Morelli, I., Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania carrii*. *Pharm. Acta Helveticae.* **1996**, 171:191-197.
8. Braca, A., Bilia, R., Mendez, J. y Morelli, I., Three flavonoids from *Licania densiflora*. *Phytochem.* **1999**, 51:1125-1128.
9. Braca, A., De Tommasi, N., Mendez, J., Morelli, I. y Pizza, C., Three flavonoids from *Licania heteromorpha*. *Phytochem.* **1999**, 51:1121-1124.
10. Braca, A., De Tommasi, N., Mendez, J. y Morelli, I., Flavonoids and triterpenoids from *Licania heteromorpha* (Chrysobalanaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **1999**, 27:527-530.
11. Braca, A., Sorino, C., Politi, M., Morelli, I. y Mendez, J., Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *J. Ethnopharmacology.* **2002**, 79:379-381.
12. Braca, A., Luna, D., Mendez, J. y Morelli, I., Flavonoids from *Licania apetala* and *Licania licaniaeflora* (Chrysobalanaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, 30: 271-273.
13. Breña, R. T., Obtención de antioxidantes naturales a partir del romero y sus aplicaciones en los alimentos. Tesis de Licenciatura, UNAM, México, D. F., **1998**.
14. Cano, A., Ruiz, H. J., Canovas, G. F., Acosta, M. y Arnao, B. M., An end-point method for estimation of the total antioxidants activity in plant material. *Phytochem. Anal.* **1998**, 9:196-202.
15. Cao, Z-F. y Zhu, X-Q., Antioxidant action of tetrandrine: An alkaloid from the roots of *Radix stephania tetrandra*, s moore. *J. Sci. Food Agric.* **1997**, 73:106-110.
16. Carrasco, C. V., Variación interespecífica en la herbivoría en plantas de fenología contrastante en la selva baja de Huautla. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F., **2002**.
17. Cavin, A., Hostettmann, K., Dialmyko, W. y Potterat, O., Antioxidant lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Med.* **1998**, 64:393-396.
18. Chang, S. S., Ostric-Matijasevic, B., Hsieh, O. A. y Huang, C-L., Natural antioxidants from rosemary and sage. *J. Food Sci.* **1997**, 42(4): 1102-1106.

19. Chen, Q., Shi, H. y Ho, C., Effects of rosemary and sage. *J. Food Sci.* **1997**, 42:1102-1106.
20. Chien-Ya, H. y Gow-Chin, Y., Extraction and identification of antioxidative components of Hsian-tsaio (*Mesona procumbens* Hemsl.). *Technol.* **2001**, 34: 306-311.
21. Dapkevicius, A., Rimantas, V. y Jozef, P., Antioxidant activity of extracts obtained of different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, 77:140-146.
22. De la Torre, B. y López, T., El papel de los antioxidantes. *Alimentaria.* **1997**, 34(283):19-27.
23. Fennema, O., Química de los Alimentos. Editorial Acribia, España, **1993**.
24. Giese, J., Special report: Vitamin and mineral fortification of foods. *Food Technol.* **1995**, 49(5): 110-122.
25. Giese, J., Special Report: Antioxidants, tools for preventing lipid oxidation. *Food Technol.* **1996**, 50(11): 73-80.
26. Halliwell, B., Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr. Rev.* **1994**, 52(8): 253-265.
27. Harborne, J. B., Williams, C. A., Advances in flavonoids reseearch since 1992. *Phytochem.* **2000**, 55:481-504.
28. Harborne, J. B. y Marby, J. T., The flavonoids. Part 1. Academic press. New York, San Francisco, **1994**.
29. Harborne, J. B. Phytochemical. Methods. A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman & Hall. London. **1984**
30. Houlihan, C. M., Ho, C-T. y Chang, S. S., The structure of rosmatiquinone a new antioxidant isolated from *Rosmarinus officinalis* L. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1985**, 62(1): 96-98.
31. Khidyrova, N. K. y Shakhidoyatov., Plant polyprenols and their biological activity. *Chem. Nat. Compounds.* **2002**, 38(2):107-121.
32. Koleva, I. Y., Van Breek, A. T., Linszen, H. P. Groot, A. y Evstatieva, N. L., Screening of plant extracts for antioxidants activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.* **2002**, 13:8-17.
33. Larson, R. A., Review article number 30. The antioxidants of higher plants. *Phytochem.* **1998**, 27(4):969-978.
34. Madhavi, D. L., Deshpande, S. S. y Salunkhe, D. K., Food Antioxidants. Technological, toxicological and health perspectives. Marcel Dekker, Inc. New York, **1996**.
35. Martínez, M., Nombres científicos y comunes de las plantas mexicanas. Fondo de cultura Económica, **1972**,
36. Mendez, J., Bilia, R. A. y Morelli, I., Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids from *Licania pyrifolia*. *Pharm. Acta Helvetiae.* **1995**, 70:223-226.
37. Miller, H. E., A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1971**, 48:91-97.
38. Morton, W. L., Caccetta, A. R., Puddey, B. I. y Croft, D. K., Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. *Clin. Exp. Pharm. Phys.* **2000**, 27:152-159.
39. Moure, A., Franco, D., Sineiro, J. Domínguez, H., Núñez J. M. y Lema, M. J., Evaluation of extracts from gevuina avellana hulls as antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48:3890-3897.
40. Moure, A., Cruz, M. J., Franco, D. Domínguez, M. J. Siniero. J. Domínguez, H., Núñez J. M. y Pajaro, C. J., Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* **2001**, 72:145-171.

41. Packer, L., Antioxidant Food Supplements in Human Health. Editorial Academic Press. 1999.
42. Pietta, G. P., Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000, 63:1035-1042.
43. Prakash, S. O., Krishan, B. T. y Bhupinder, S., Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid. *J. Chromatogr.* 1998, 822:167-171.
44. Prior, L. R. y Cao, G., Flavonoids: Diet and health relationships. *Nutr. Clin. Care.* 2000, 3:279-288.
45. Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H. y Kawacishi, S., The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci. Technol.* 1995, 6:75-82.
46. Rezanca, T. y Votruba, J., Chromatography of long chain alcohols (polyprenols) from animal and plant sources. *J. Chromatogr.* 2001, 95-110.
47. Rice-Evans, A. C., Miller, J. N. y Paganga, G., Structure antioxidants activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 1996, 20:933-956.
48. Rodríguez, P., Natural antioxidants. *Tecnología Alimentaria.* 1984, 19(6):26-28.
49. Sortwell, R. D., Selección y uso de antioxidantes fenólicos. *Industria Alimentaria.* 1997, 8(8):32-35.
50. Taga, S. M., Miller, E. E. y Pratt, E. D., Chia seeds as a source of natural: Lipid antioxidants. *J. Am. Oild Chem. Soc.* 1984, 61:928-931.
51. Von Gadown, A., Joubert, E. y Hansmann, C. F., Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT and BHA. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45:632-638.
52. Vichnevetskaia, D. K. y Roy, N. D., Oxidative stress an antioxidative defense with an emphasis on plants antioxidants. *Environ. Rev.* 1999, 7:31-51.
53. Xiaojun, Y., Tadahiro, N. y Xiao, F., Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plant Food Hum. Nutr.* 1998, 52:253-262.
54. Yan-Hwa, C., Chao-Lin, C. y Hsia-Fen, H., Flavonoids content of several vegetables and their antioxidants activity. *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80:561-566.