



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO ANTIOXIDANTE DE LAS VAINAS DE
ACACIA FARNESIANA EN PLASMA DEL
JERBO (*MERIONES UNGUICULATUS*)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
MAYRA REBECA ESCRIBANO GÓMEZ



México, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CONTENIDO

i. Índice de cuadros	5
ii. Índice de ecuaciones	5
iii. Índice de figuras	6
iv. Índice de gráficas	6
v. Índice de imágenes	6
I. RESUMEN	7
II. ANTECEDENTES	8
II.1 Proceso de oxidación	8
II.2 Radicales libres, generación y consecuencias	8
II.2.1 Factores asociados con la formación de radicales libres	9
II.2.1.1 Reacción de Fenton	9
II.2.1.2 Radiaciones iónicas	9
II.2.1.3 Exposición a compuestos químicos.....	10
II.3 Reacciones de los radicales libres	11
II.4 Especies reactivas en sistemas biológicos.....	12
II.5 Estrés oxidante	14
II.6 Cadena respiratoria mitocondrial: Enzimas y sistema inmunológico asociado a radicales libres	15
II.6.1 Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NOX)	16
II.7 Actividad antioxidante	17
II.8 Compuestos antioxidantes: Naturales, endógenos y sintéticos.	18
II.8.1 Antioxidantes naturales	18
II.8.1.1 Antioxidantes endógenos	25
II.8.2 Antioxidantes sintéticos	26
II.9 Mecanismo de acción de los antioxidantes	28
II.10 Actividad prooxidante	30

II.11 Procedimientos para determinar la actividad antioxidante	30
II.11.1 Cuantificación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante.....	31
II.11.1.1 Actividad antioxidante determinada por el blanqueo del β -caroteno.	31
II.11.1.2 Actividad antioxidante por radical DPPH (2,2-difenilpicrilhidracilo)	32
II.11.1.3 Actividad antioxidante por radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfónico))	33
II.11.2 Pruebas <i>in vivo</i> de la actividad antioxidante	33
II.11.2.1 Prueba de actividad antioxidante de la sangre por atrapamiento del radical DPPH	34
II.11.2.2 Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC).....	34
II.12 Actividad de los polifenoles sobre las células sanguíneas.....	35
II.13 <i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd (AF).....	38
II.13.1 <i>Acacia farnesiana</i> como fuente de compuestos antioxidantes.....	40
II.13.2 Actividad antioxidante <i>in vitro</i> de <i>Acacia farnesiana</i>	42
II.13.3 Presencia de saponinas en <i>Acacia farnesiana</i>	43
II.14 El jerbo (<i>Meriones unguiculatus</i>) como modelo biológico	46
III. OBJETIVOS.....	47
III.1 General	47
III.2 Particulares	47
IV. JUSTIFICACIÓN.....	48
V. HIPÓTESIS	49
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
VI.1 Material vegetal	51
VI.2 Reactivos químicos, soluciones y materiales	51
VI.3 Análisis químicos	51
VI.3.1 Extracción del material vegetal	51
VI.3.2 Caracterización del extracto vegetal	52
VI.3.2.1. Determinación de polifenoles totales.....	52
VI.3.2.2 Determinación de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos a través de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	52
VI.3.2.2.1 Flavonoides	52
VI.3.2.2.2 Ácidos hidroxicinámicos	53

VI.3.3 Preparación de soluciones acuosas del extracto de <i>Acacia farnesiana</i> y determinación de su pH	53
VI.4 Actividad secuestrante de los extractos de las vainas de <i>Acacia farnesiana</i> frente al radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).....	54
VI.5 Modelo experimental, manejo y dosificación de extractos vegetales.....	54
VI.6 Manejo de la muestra sanguínea y eutanasia	55
VI.7 Actividad antioxidante en plasma por atrapamiento del DPPH'.....	56
VI.8 Actividad antioxidante en plasma por ensayo ORAC (capacidad de absorción de radicales oxígeno).....	57
VI. 9 Diseño estadístico del estudio	58
VII. RESULTADOS	59
VII.1 Rendimiento de las muestras de vainas de <i>Acacia farnesiana</i> respecto al secado y extracción	59
VII.2 Cuantificación de polifenoles totales y determinación de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	60
VII.3 Valoración de pH de las soluciones de dosificación.....	61
VII.4 Actividad secuestrante <i>in vitro</i> de las soluciones de dosificación de las diferentes muestras de vainas de <i>Acacia farnesiana</i> frente al radical libre DPPH	62
VII.5 Respuesta de los animales experimentales al manejo y registro de peso corporal.....	63
VII.6 Dosificación de las soluciones experimentales	64
VII.7 Capacidad secuestrante del plasma del jerbo, frente al radical DPPH.....	65
VII.8 Capacidad secuestrante del plasma del jerbo, frente al radical libre peroxil por método ORAC.....	66
VIII. DISCUSIÓN.....	69
VIII.1 Cuantificación de polifenoles totales y determinación de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	69
VIII.2 Actividad secuestrante <i>in vitro</i> de las soluciones de extracto de vainas de <i>Acacia farnesiana</i> frente al radical libre DPPH	72
VIII.3 Capacidad secuestrante en el plasma del jerbo, frente al radical DPPH.....	74
VIII.4 Capacidad secuestrante del plasma del jerbo, frente al radical libre peroxil por método ORAC	76
IX. CONCLUSIONES	81
X. ANEXOS.....	82
Anexo X.1. Localización de las muestras vegetales	82

Anexo X.2 Reactivos químicos, soluciones y materiales empleados en el estudio	82
Anexo X.3. Curva de calibración de ácido gálico como estándar de referencia en la determinación de polifenoles totales	84
Anexo X.4 Curvas de calibración de los flavonoides y ácido hidroxicinámicos utilizados en la determinación por HPLC.....	84
Anexo X.4.1 Epicatequina	84
Anexo X.4.2 Quercetina	84
Anexo X.4.3 Ácido cafeíco	85
Anexo X.4.4 Ácido clorógeno	85
Anexo X.4.5 Ácido gálico	85
Anexo X.5 Preparación de la solución salina balanceada de Hank (Hank's balance salt solution, HBSS).....	86
Anexo X.6 Preparación de las soluciones de fluoresceína	86
Anexo X.7 Preparación de soluciones patrón del estándar trolox.....	87
Anexo X.8 Curva de calibración del estándar trolox en la determinación de actividad antioxidante por ensayo ORAC	87
XI. REFERENCIAS	88

i. Índice de cuadros

Cuadro 1.	Reacciones de radicales libres	11
Cuadro 2.	Especies reactivas en sistemas biológicos.....	13
Cuadro 3.	Mecanismos de acción de los antioxidantes.....	29
Cuadro 4.	Contenido de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos (mg/100 g muestra) en especies del género <i>Acacia</i> , determinados en diversas fracciones vegetales.....	41
Cuadro 5.	Actividad antioxidante del extracto de vainas de <i>A. farnesiana</i> obtenido con metanol:agua (80:20, v/v) como disolvente, comparada con diferentes estándares.....	42
Cuadro 6.	Rendimiento (% p/p) del secado y de la extracción de 4 muestras de vainas de <i>Acacia farnesiana</i> (AF).....	59
Cuadro 7.	Concentración de polifenoles totales (mg de equivalentes de ácido gálico/g) en las muestras de <i>Acacia farnesiana</i> y sus extractos, además del contenido de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos (mg/g extracto final).....	60
Cuadro 8.	pH de tres soluciones (mg/ml) de polifenoles totales de diferentes muestras de AF administradas a los animales experimentales...	61
Cuadro 9.	Capacidad secuestrante <i>in vitro</i> (%) frente al radical DPPH para diferentes concentraciones de polifenoles (mg/ml) de vainas de <i>Acacia farnesiana</i> y soluciones estándar de ácido ascórbico y quercetina (mg/l).....	62
Cuadro 10.	Peso vivo (g) de los jerbos (<i>Meriones unguiculatus</i>).....	63

ii. Índice de ecuaciones

Ecuación 1.	Reacción de Haber-Weiss	12
Ecuación 2.	Etapas de la reducción de oxígeno molecular hacia agua con la generación de tres EROs	14
Ecuación 3.	Coeficiente de actividad secuestrante del radical DPPH.....	54

iii. Índice de figuras

Figura 1.	Defensa del organismo contra agentes externos.....	17
Figura 2.	Clasificación de los antioxidantes.....	18
Figura 3.	Estructura química del grupo funcional fenol y de algunos polifenoles dietarios como quercetina, ácido cafeico y procianidina...	21
Figura 4.	Estructura de general de flavonoides y ácidos fenólicos.....	23
Figura 5.	Estructura básica y tipos de flavonoides.....	24
Figura 6.	Estructura química de algunos antioxidantes sintéticos.....	28
Figura 7.	Mecanismo de acción de los antioxidantes primarios.....	28
Figura 8.	Reacción del radical DPPH.....	32
Figura 9.	Reacción del radical ABTS.....	33
Figura 10.	Esquema del principio del ensayo ORAC.....	35
Figura 11.	Estructuras básicas de saponinas.....	44
Figura 12.	Diagrama de bloques de la estrategia experimental.....	50

iv. Índice de gráficas

Gráfica 1.	Capacidad secuestrante (% atrapamiento de DPPH') y error estadístico del plasma del jerbo expuesto a diferentes tratamientos: polifenoles (mg/ml/100 g PC/día) de vainas de <i>Acacia farnesiana</i> (8, 16 y 32 mg), ácido ascórbico (500 mg/l) y agua (ml/100 g PC/día); además de un grupo basal frente al radical DPPH.....	65
Gráfica 2.	Capacidad secuestrante (μ M equivalentes trolox) y error estadístico de plasma de jerbo expuesto a diferentes tratamientos: polifenoles (mg/ml/100 g PC/día) de vainas de <i>Acacia farnesiana</i> (8, 16 y 32 mg), ácido ascórbico (500 mg/l) y agua (ml/100 g PC/día); además de un grupo basal frente al radical peroxil.....	67

v. Índice de imágenes

Imagen 1.	<i>Acacia farnesiana</i> L.Willd.....	39
Imagen 2.	Jerbo (<i>Meriones unguiculatus</i>).....	46
Imagen 3.	Arbustos y frutos secos de <i>Acacia farnesiana</i> muestreados.....	59

I. RESUMEN

En este estudio se determinó *in vitro* e *in vivo* el efecto antioxidante del extracto de cuatro muestras de vainas de *Acacia farnesiana* (AF). Las vainas de AF fueron recolectadas, secadas, molidas y sometidas a la extracción de su fracción polifenólica, empleando una mezcla de solventes metanol:agua (80:20 v/v) y se cuantificaron los compuestos polifenólicos totales como equivalentes de ácido gálico (EAG), así como algunos flavonoides y ácidos hidroxicinámicos. La determinación *in vitro* se realizó a través del ensayo de atrapamiento del radical DPPH (2,2-difenilpicrilhidracilo) a concentraciones 8, 16, ó 32 mg EAG/ml; ácido ascórbico (200 y 68 mg/l) y quercetina (100 mg/l) fueron empleados como estándares. *In vivo* los extractos de vainas de AF fueron administrados vía oral al jerbo (*Meriones unguiculatus*) en soluciones acuosas a tres diferentes concentraciones (8, 16 y 32 mg EAG/ml), durante 5 días; incluyéndose grupos control positivo (ácido ascórbico, 500 mg/l), control negativo (agua como placebo) y basal. El efecto antioxidante en el plasma se valoró a través de las pruebas de atrapamiento (%) del radical DPPH y por ensayo ORAC (μ M equivalentes de Trolox). El contenido promedio de polifenoles totales en los extractos de las vainas de AF fue 76.1 mg EAG/g. Los compuestos epicatequina, quercetina, ácidos gálico, cafeíco y clorogénico fueron detectados en los extractos estudiados en concentraciones de 0.32, 0.49, 0.12, 0.15 y 0.18 mg/g extracto, respectivamente. La actividad antioxidante *in vitro* frente a DPPH mostró valores similares para las concentraciones menores y un abatimiento de dicha propiedad para la solución 32 mg/ml. *In vivo* se presentó un incremento de la capacidad antioxidante en el plasma en relación a la dosis administrada; mostrándose cambios significativos para la muestra de vainas número 3 con la cual se disminuye la capacidad antioxidante particularmente cuando es valorada a 16 y 32 mg/ml. *Acacia farnesiana* tiene la capacidad de atrapar especies radicales en estudios *in vitro* e *in vivo*, siendo la respuesta determinada por la concentración.

II. ANTECEDENTES

II.1 Proceso de oxidación

La oxidación química es definida de manera general como la pérdida de electrones de una sustancia (Kotz *et al.*, 2003). Si bien dicha pérdida es comúnmente relacionada a la transferencia de oxígeno, existen procesos químicos en los que un átomo, ión o molécula pierde carga negativa sin estar involucrado el oxígeno e indistintamente se dice que se oxida (Konigsberg, 2008; Kotz *et al.*, 2003; Scheffer, 1992). La oxidación de una sustancia está ligada a la reducción (ganancia de electrones) de otra, implicando la transferencia de electrones entre especies químicas en un proceso conocido como sistema o par redox.

En la vida diaria gran cantidad de eventos involucran reacciones químicas de oxidación y los sistemas biológicos no son la excepción. Las plantas convierten la energía luminosa en compuestos químicos mediante la fotosíntesis, mientras la respiración en las células animales implica la combustión (oxidación) de oxígeno para liberar parte de la energía química disponible en alimentos (Hein y Arena, 2005).

II.2 Radicales libres, generación y consecuencias

Las moléculas que constituyen a la materia son un conjunto de átomos unidos entre sí por enlaces químicos conformados por pares de electrones compartidos, los cuales durante las transformaciones químicas se reacomodan para formar nuevos enlaces generando especies intermedias en el transcurso. Dependiendo de cómo se rompa el enlace pueden clasificarse en:

1. Rupturas heterolíticas donde el par de electrones permanece unido a uno de los átomos adquiriendo éste una carga negativa (anión) y su contraparte

desprovista del electrón presenta una carga positiva (catión); estas especies químicas con diferencia en sus cargas eléctricas son conocidas como iones.

2. Ruptura homolítica en cuyo caso cada electrón del enlace permanece unido a uno de los átomos que lo conformaron. La presencia de electrones desapareados da lugar a los radicales libres que son especies químicas capaces de mantener su existencia independiente a otras (Halliwell y Gutteridge, 2007). Los electrones desapareados hacen a los radicales libres especies muy inestables que tratarán de obtener el electrón faltante de cualquier otra con la que actúen, considerándose como sustancias altamente oxidantes.

II.2.1 Factores asociados con la formación de radicales libres

La ruptura homolítica puede presentarse por procesos como la incidencia de radiación de alta energía UV sobre los enlaces O-O de la molécula de H₂O₂ o tras la combustión de la mayoría de los compuestos orgánicos a temperaturas entre 450 y 600°C (Halliwell y Gutteridge, 2007). Además existen otros procesos que ocasionan la formación de radicales libres como la adición de un electrón único a una especie no radical, la reacción de una especie no radical frente a una especie radical o la transferencia de electrones mediada por reacciones enzimáticas en los sistemas biológicos (Sánchez y Mendoza, 2003). Algunas condiciones ambientales también dan lugar a la formación de radicales libres, vinculándose a importantes factores como los descritos a continuación:

II.2.1.1 Reacción de Fenton

Esta reacción de oxidación ocurre en presencia de hierro Fe (II) y mediada por peróxido de hidrógeno puede dar lugar a la formación de oxi-radicales como el hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) así como radicales libres de Fe (III) (Konigsberg, 2008; Ruíz, 2007).

II.2.1.2 Radiaciones iónicas

Cuando la energía de un fotón excede la energía necesaria para remover un electrón de una molécula, provoca una coalición molecular que genera iones.

Los rayos gamma (γ), rayos x, electrones de alta energía (partículas β), iones de He^{2+} (partículas α), neutrones de alta energía y fragmentos de fisión nuclear pueden producir radiación ionizante con la energía suficiente para ionizar a la mayoría de las biomoléculas (Zollo *et al.*, 2004). Estas radiaciones tienen efectos nocivos en las estructuras celulares de los sistemas biológicos. Esta energía se deposita en paquetes, favoreciendo la formación de radicales libres, entre los cuales el más abundante es el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) el cual es capaz de interactuar con la mayoría de los componentes celulares. En el ADN, las consecuencias químicas y biológicas de este tipo de radiaciones conducen a la manifestación de efectos tanto inmediatos como tardíos. Los primeros están caracterizados por las alteraciones de las membranas celulares, la oxidación de proteínas de membrana y enzimas. Los efectos tardíos generan rompimientos en el ADN de cadenas simples y dobles, daño de desoxirribosas, modificaciones de bases nucleicas y retraso de la mitosis (Konigsberg, 2008; Zollo *et al.*, 2004).

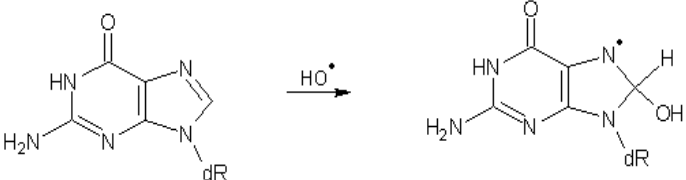
II.2.1.3 Exposición a compuestos químicos

La formación de radicales libres y otras especies reactivas se asocian con la exposición a óxidos de nitrógeno (presentes en el humo de cigarrillo, carnes ahumadas y a la parrilla) así como otras sustancias naturales como los metales. Si bien metales como el hierro son esenciales para la salud al participar en reacciones de transferencia electrónica en presencia de oxígeno y ser componentes importantes de enzimas y hemoglobina; metales y metaloides como el plomo (Pb), mercurio (Hg), cromo (Cr), cadmio (Cd) y arsénico (As) pueden perturbar la integridad estructural de la membrana interna mitocondrial, alterar su potencial y consecuentemente favorecer la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) tales como superóxido y peróxido de hidrógeno (Konigsberg, 2008; Montero, 1996). Asimismo, los plaguicidas que incluyen los insecticidas organoclorados y organofosforados, herbicidas, fungicidas, fumigantes y rodenticidas; cuando interactúan con los sistemas enzimáticos son convertidos en intermediarios altamente reactivos (ozono, dióxido de nitrógeno y azufre) que inducen la generación de radicales libres y daño oxidante (Konigsberg, 2008).

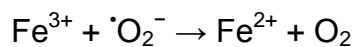
II.3 Reacciones de los radicales libres

Cuando los radicales libres se encuentran pueden reaccionar entre ellos uniéndose sus electrones desapareados para formar un enlace covalente. Dicho proceso recibe el nombre de dimerización, donde dos radicales ($\cdot R$) idénticos generan compuestos simétricos. Asimismo, en la reacción de desproporción dos radicales reaccionan para generar un alcano y una olefina. Por otra parte, muchas moléculas biológicas no son radicales, sin embargo cuando reaccionan con un radical libre pueden ocurrir diferentes reacciones (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Reacciones de radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 2007)

Reacción	Ejemplo
<p>Adición</p> <p>Un radical se puede adicionar a otra molécula, y el producto formado seguirá teniendo un electrón desapareado.</p> $X\cdot + Y \longrightarrow (X-Y)\cdot$	<p>Cuando el $\cdot OH$ se adiciona en la posición 8 del anillo de la estructura de la guanina en el ADN, el producto final es el radical 8-hidroxiguanina.</p> <p>Guanina 8-Hidroxiguanina</p> 
<p>Reducción y oxidación</p> <p>Un radical puede ser un agente reductor, donando electrones a una molécula no radical. También puede actuar como oxidante tomando un electrón de la molécula no radical.</p>	<p>El radical dióxido de carbono ($CO_2\cdot$) cuando reduce el cobre (Cu^{1+}) a Cobre (Cu).</p> $CO_2\cdot + Cu^+ \longrightarrow CO_2 + Cu$
<p>Abstracción</p> <p>Un radical puede abstraer un átomo de hidrógeno de un enlace carbono-hidrógeno (C-H).</p>	<p>El radical hidroxilo abstrae un átomo de hidrógeno de la parte hidrocarbonada de la cadena de los ácidos grasos.</p> $\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} CH + OH\cdot \longrightarrow \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} C\cdot + H_2O$

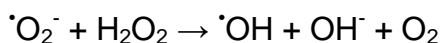
Asimismo en numerosos procesos químicos y biológicos la transferencia de electrones implica que parte del par electrónico en el orbital de un átomo quede desapareado generando radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 2007). Un ejemplo ocurre en la reacción de Haber-Weiss (**Ecuación 1**) que genera radicales hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno o superóxido en presencia de metales con electrones desapareados capaces de cederlos fácilmente, derivando en la reducción del peróxido de hidrógeno ya sea por el ión ferroso (reacción de Fenton) u otros metales como el cobre. Entonces, el primer paso del ciclo catalítico de la reacción de Haber-Weiss se produce por la oxidación del superóxido en presencia del catión férrico:



El segundo paso puede ser una reacción de Fenton:



La reacción neta es:



Ecuación 1. Reacción de Haber-Weiss (Haber y Weiss, 1932).

II.4 Especies reactivas en sistemas biológicos

Los radicales libres generados por la utilización del oxígeno en las células, ocurre como un proceso natural, inevitable y constante para mantener la homeostasis a nivel celular en los tejidos normales. Sin embargo un desequilibrio entre los factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes se asocian con la producción del estrés oxidante (Halliwell y Gutteridge, 2007; Miranda, 2008), el cual se retomará más adelante. Aunque existen especies reactivas formadas a partir de diversos elementos químicos como nitrógeno, cloro y bromo (**Cuadro 2**), las más notables por su variedad, abundancia e importancia biológica son las formadas a partir del oxígeno también llamadas EROs.

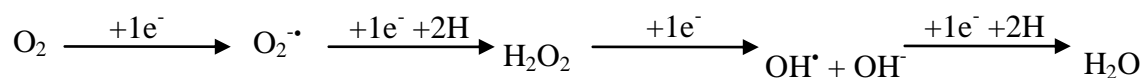
Cuadro 2. Especies reactivas en sistemas biológicos (Halliwell y Gutteridge, 2007)

Radicales libres	No radicales
Especies reactivas de oxígeno (EROs)	
Superóxido (O_2^-)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Hidroxilo ($\cdot OH$)	Ozono (O_3)
Hidroperóxido ($HO_2\cdot$)	Oxígeno singulete (O_2^1)
Carbonato ($CO_3^{\cdot-}$)	Peróxidos orgánicos (ROOH)
Peroxilo ($RO_2\cdot$)	Ácido hipocloroso (HOCl)
Alcoxilo ($RO\cdot$)	
Radical dióxido de carbono ($CO_2^{\cdot-}$)	
Oxígeno singulete ($O_2^1\Sigma g^+$)	
Especies reactivas de nitrógeno (ERNs)	
Óxido nítrico ($NO\cdot$)	Ácido nitroso (HNO_2)
Dióxido de nitrógeno ($NO_2\cdot$)	Nitroxil catión (NO^+)
Nitrato ($NO_3^{\cdot-}$)	Nitroxil anión (NO^-)
	Tetróxido de dinitrógeno (N_2O_4)
	Trióxido de dinitrógeno (N_2O_3)
	Peroxinitrito ($ONOO^-$)
	Peroxinitrato (O_2NOO^-)
	Ácido peroxinitroso ($ONOOH$)
	Alquil peroxinitritos (ROONO)
	Alquil peroxinitratos (RO_2ONO)
Especies reactivas del bromo (ERBs)	
Bromo atómico ($Br\cdot$)	Ácido hipobromoso (HOBr)
	Bromo gaseoso (Br_2)
Especies reactivas del cloro (ERCs)	
Cloro atómico ($Cl\cdot$)	Ácido hipocloroso (HOCl)
	Cloro nitrito (NO_2Cl)
	Cloro gaseoso (Cl_2)
	Cloraminas
	Dióxido de cloro (ClO_2)
	Cloruro de bromo ($BrCl$)

Del mismo modo, Sánchez y Mendoza en 2003 refirieron a la propia molécula de oxígeno (O_2) como un radical libre en potencia ya que presenta dos

electrones que en presencia de 4 electrones desapareados tiene la capacidad para generar una reducción que genera 3 EROs como se ilustra en la **Ecuación 2**

Ecuación 2. Etapas de la reducción de oxígeno molecular hacia agua con la generación de tres EROs (Sánchez y Mendoza, 2003; Galatro *et al.*, 2006)



II.5 Estrés oxidante

Las funciones fisiológicas de los organismos vivos implican procesos y reacciones de transformación de los compuestos químicos durante los cuales el cuerpo establece balances de óxido-reducción con la finalidad de mantener un equilibrio entre la formación de factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas. Debido a que las EROs tienen la capacidad de oxidar moléculas de ADN, proteínas y lípidos, son potencialmente peligrosas en los sistemas biológicos. El daño celular causado por un exceso de agentes oxidantes se ha definido como estrés oxidante (Dudonné *et al.*, 2009).

La presencia de EROs en los sistemas biológicos puede incrementarse de forma significativa por la exposición a toxinas ambientales presentes en el humo del tabaco y la contaminación, también por aquellas producidas en las actividades industriales y agricultura, así como agentes contaminantes como el ozono, el incremento en la temperatura y por radiaciones ionizantes. Asimismo el estrés oxidante puede ser provocado por la disminución en la transcripción de actividad del sistema enzimático celular en el que participan enzimas como: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px), glutatión reductasa (GR) o antioxidantes no enzimáticos como el glutatión reducido (GSH) y la vitamina E (Cadenas y Packer, 2002).

II.6 Cadena respiratoria mitocondrial: Enzimas y sistema inmunológico asociado a radicales libres

La mitocondria genera la mayor parte de la energía de las células animales, es uno de los principales sitios generadores de EROs y en ella se lleva a cabo la fosforilación oxidante, proceso mediante el cual los electrones pasan a través de una serie de moléculas transportadoras dispuestas en complejos enzimáticos multiproteínicos llamados cadena de transporte de electrones, donde el aceptor final de electrones es el oxígeno (O_2) que es transportado por la hemoglobina hasta las células y los electrones provienen de la nicotinamida adenina dinucleótido reducida, NADH (Konigsberg, 2008).

La cadena de transporte de electrones está formada por complejos respiratorios que se encuentran en la membrana interna mitocondrial y dos transportadores de electrones (ubiquinona y citocromo c); el ambiente semiaislado que provee la membrana lipídica permite la transferencia de un solo electrón (e^-) a través de los grupos prostéticos. Este tipo de compuestos generalmente contienen metales como el hierro (Fe) o el cobre (Cu) que pueden cambiar su estado redox y recibir o donar e^- sin alterarse (Fe^{3+} a Fe^{2+} , Cu^+ a Cu^{2+}); el hecho de que la cadena respiratoria esté constantemente transfiriendo electrones de uno en uno, sugiere que de existir una fuga en el sistema los electrones desapareados podrían generar radicales libres ya que el O_2 es un gas que difunde libremente a través de las membranas y es muy factible que su forma activada, oxígeno singulete (1O_2), se encuentre alrededor de la cadena respiratoria, por lo que de existir fugas, se favorecería la reducción monovalente del 1O_2 , generando así el radical superóxido, $O_2^{\cdot-}$ (Konigsberg, 2008).

La mitocondria cuenta con enzimas antioxidantes como la SOD y GSH-Px que transforman al radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en H_2O cuyas concentraciones normales estimadas son de alrededor de 1×10^{-10} y 5×10^{-9} M, respectivamente; si estas concentraciones se rebasan o las enzimas antioxidantes son insuficientes, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) podría convertirse en el radical

hidroxilo mediante la reacción de Fenton, catalizada por el hierro (Fe) o cobre (Cu) presentes en las enzimas mitocondriales. Este mecanismo se puede repetir, ya que la cadena respiratoria alterada aumenta la fuga de electrones, generando un mayor número de EROs perpetuando así este fenómeno y desestabilizando el equilibrio energético celular; de esta manera la producción de EROs puede generar tanto daños en las enzimas de la cadena respiratoria, la membrana y ADN mitocondrial (Konigsberg, 2008; Ruíz, 2007).

II.6.1 Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NOX)

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) además de presentarse como subproductos dañinos del metabolismo aeróbico, actúan en otros casos mediante un papel benéfico. Esto se ha comprobado al encontrarse enzimas cuya función es producir radicales libres y otras EROs; de esta manera, se encuentra la familia de las enzimas nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NOX) presentes en varios tejidos, de las cuales la más estudiada es la que se encuentra en las células fagocíticas. Esta NOX se activa ante una amenaza por agentes patógenos produciendo radicales libres para neutralizarlos (Konigsberg, 2008).

Las células fagocíticas constituyen una de las defensas más poderosas del sistema inmunitario. Estas células circulan por la sangre y migran a través de los capilares hacia los tejidos en donde avanzan lentamente en busca de agentes externos que posteriormente digieren. La generación de EROs mediada por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), catalizada por la NOX con la participación de proteasas, conllevan a la destrucción y muerte celular del patógeno; donde la NOX recibe un electrón de la NADPH, lo dona al oxígeno molecular y genera el radical O_2^- , éste a su vez puede convertirse en otras EROs, principalmente H_2O_2 que actúa oxidando compuestos aromáticos dando como resultado la formación de radicales libres para finalmente oxidar iones cloruro y convertirlos en el ácido hipocloroso (bactericida potente) o en el radical hidroxilo, mediante la reacción de Fenton, ilustrándose dicho proceso en la **Figura 1**.

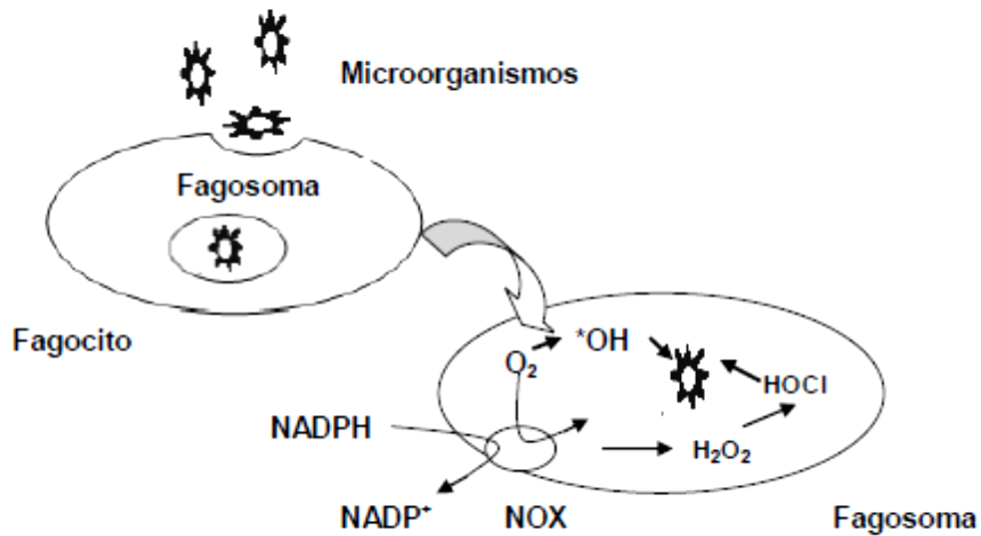


Figura 1. Defensa del organismo contra agentes externos (Konigsberg, 2008).

La activación de la NOX es un proceso tan importante como su inactivación, debido a que la generación excesiva de especies reactivas o bien su localización en un sitio inadecuado pueden ser causas del deterioro en el organismo (Konigsberg, 2008).

II.7 Actividad antioxidante

El entendimiento de los procesos de oxidación y su consecuente impacto en aspectos industriales, científicos y de la salud han orientado investigaciones hacia la utilización de sustancias antioxidantes. Los antioxidantes son compuestos capaces de retardar o inhibir la oxidación cuando se encuentran en concentraciones menores respecto a los sustratos oxidables. A través de distintos mecanismos, los antioxidantes impiden la oxidación en otras moléculas (Shahidi, 1996). Asimismo, en los organismos vivos es posible encontrar moléculas antioxidantes endógenas de protección frente a radicales libres (Konigsberg, 2008; Madhavi *et al.*, 1996; Pokorny, 2004).

II.8 Compuestos antioxidantes: Naturales, endógenos y sintéticos.

En la naturaleza se presentan moléculas antioxidantes cuya actividad es determinada por su composición y estructura química. Otros compuestos químicos sintetizados en laboratorio pueden ser utilizados como aditivos para la conservación de los alimentos. Shahidi (1996) destacó dos importantes grupos: los antioxidantes naturales y sintéticos; englobando dentro de los naturales, a los endógenos (Figura 2).

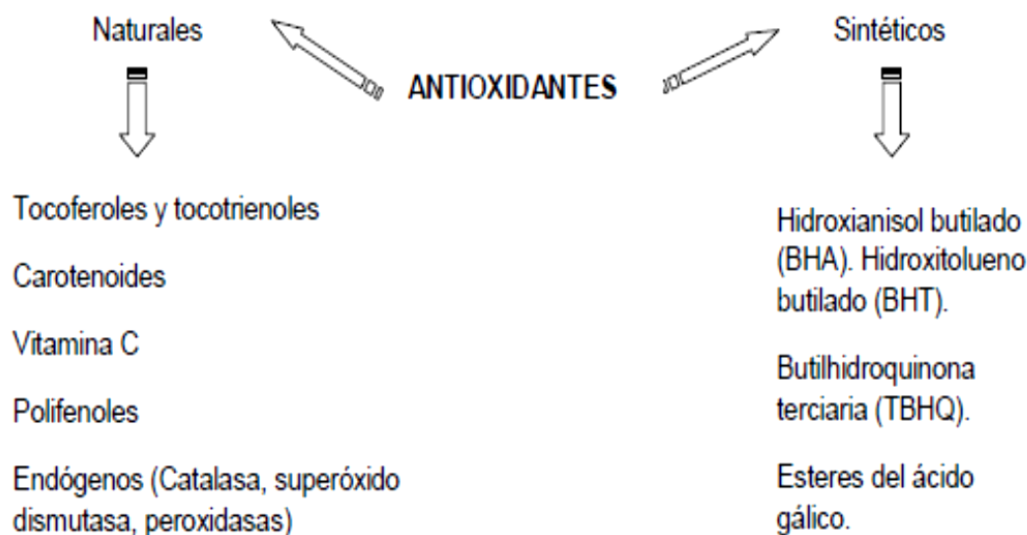


Figura 2. Clasificación de los antioxidantes (Shahidi, 1996).

II.8.1 Antioxidantes naturales

Diversos estudios enfatizan la importancia de los antioxidantes naturales tanto por su actividad en alimentos y como por su efecto en sistemas biológicos. El contenido intrínseco de antioxidantes en los alimentos cobra importancia debido a que mejora su conservación y supone una fuente de antioxidantes con efectos benéficos en el organismo (Madhavi *et al.*, 1996; Pokorny, 2004).

En numerosas especies del reino vegetal se han reportado compuestos con propiedades antioxidantes (Fennema, 1995). De ahí que se fije la atención en evaluar la actividad antioxidante de aquellas especies que poseen compuestos

biológicamente activos. Y ya desde 1979, Zilversmit relacionaba la presencia de fitoquímicos dietarios a la prevención de desórdenes como la aterogénesis previniendo la peroxidación lipídica, en particular de los quilomicrones.

En este sentido, compuestos dietarios como el ácido ascórbico presenta varias funciones en el organismo, destacándose como cofactor en diversas reacciones que facilita la transferencia de electrones a enzimas algunas de ellas con actividad antioxidante (Levine *et al.*, 1996); mientras que en muchos alimentos suelen utilizarse para proteger el sabor y color natural (por ejemplo en productos lácteos, frutas y verduras procesadas).

El ácido ascórbico es una cetolactona cuya absorción se realiza de manera casi completa por medio de difusión simple y transporte activo (dependiente a su vez de transportadores de sodio, hexosa así como de co-transportadores de sodio-ascórbato). Este proceso es saturable y dependiente de la dosis; por tanto, una ingesta mayor a los requerimientos fisiológicos causa pocas acciones demostrables, salvo en caso de padecer una deficiencia (Kallner *et al.*, 1977, Savini *et al.*, 2008; Rumsey *et al.*, 1997). La ingestión óptima en humanos de 90 mg/día de ácido ascórbico (Food and Nutrition Board, 2004) conlleva un grado de absorción entre 70 a 95% y la concentración plasmática alcanza 8 mg/l (45 mM). Un alto consumo de hasta 1.25 g al día implica una reducción de la absorción de hasta 33%, mientras que ante consumos menores a 200 mg la absorción puede alcanzar hasta el 98% (Levine *et al.*, 1996). A partir de ingestiones superiores a varios cientos de mg/día en seres humanos, se ha mostrado que el ácido ascórbico se acumula en el cuerpo hasta que los niveles plasmáticos alcanzan el umbral de reabsorción renal necesario para incorporarlo. Cuando se superan las concentraciones de ácido ascórbico en plasma, el cuerpo lo excreta rápidamente en la orina con una vida media de alrededor de 30 minutos. Sin embargo, ante niveles inferiores de ácido ascórbico en plasma, el umbral se mantiene y la vida media se elevan hasta por 83 días, tiempo coincidente con la aparición de manifestaciones de escorbuto que es una enfermedad relacionada a la deficiencia de este ácido (Oreopoulos *et al.*, 1993). Asimismo el ácido ascórbico asimilado en

el organismo humano se oxida de modos reversibles tanto por vías enzimáticas (oxidasa) como no enzimáticas pasando de L-ascórbato hacia ácido deshidroascórbico, forma en la cual posee actividad como vitamina C (Laurence *et al.*, 2010). El ascórbato que no se excreta directamente en la orina, sudor y heces como resultado de la saturación, es destruido a través de enzimas peroxidasa o polifenoloxidasas (Rose *et al.*, 1986).

Los seres humanos y otros primates, así como los cobayos y algunos murciélagos, son los únicos mamíferos conocidos incapaces de sintetizar ácido ascórbico; en consecuencia requieren obtenerlo a partir de la dieta para la prevención del escorbuto. En contraparte, animales como la rata no requieren ácido ascórbico dietético al ser capaces de sintetizarlo a partir de glucosa por medio de la formación intermediaria de ácido D-glucurónico, ácido L-gulónico, y L-gulonolactona (Mc Dowell, 2000).

Por otra parte, los polifenoles y los pigmentos carotenoides atraen la mayor parte de la investigación relacionada a los antioxidantes naturales. Al respecto, los polifenoles son compuestos orgánicos distribuidos en las especies vegetales sintetizados como resultado del metabolismo secundario de las plantas que intervienen en diversas funciones, por ejemplo antioxidante especialmente en las semillas evitando que el oxígeno deteriore al embrión (Del Pozo, 2011). También forman parte de componentes responsables del aroma, sabor y pigmento por tanto actuar como agentes de defensa entre la planta y el ambiente biológico como radiación UV o patógenos (Manach *et al.*, 2004; Del Pozo (2011)).

Estos productos naturales fueron identificados por las culturas más tempranas para su uso en los procesos de curtiduría en cuyo inicio eran llamados “taninos vegetales” (Van Driel-Murray, 2000). Desde entonces el interés por estos compuestos ha derivado en avances respecto a su definición, caracterización y propiedades químicas. Quideau *et al.* (2011) propusieron una definición actual a los polifenoles, denominándoles “metabolitos secundarios de las plantas derivados exclusivamente por la vía de los shikimato fenilpropanoides y/o los

policétidos, con más de un anillo fenólico y carentes de grupo funcional a base de nitrógeno en su estructura más básica de expresión”.

Una definición más incluyente, generaliza a los polifenoles (PF) como compuestos orgánicos cuya estructura química presenta grupos fenólicos consistentes en un anillo aromático enlazado a uno o más grupos hidróxilo (Manach *et al.*, 2004). De manera estricta se asigna el nombre de fenoles cuando presentan una sola fracción de hidroxilo, mientras que se nombran polifenoles para indicar la existencia de más de una de estas fracciones; sin embargo son usualmente conocidos como PF (**Figura 3**). Las estructuras de los polifenoles son heterogéneas presentando desde monómeros hasta polímeros.

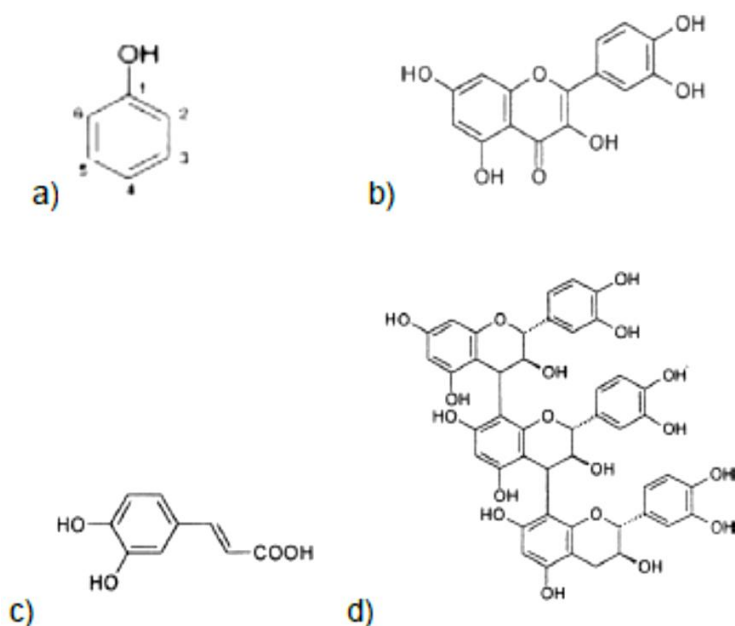


Figura 3. Estructura química del a) grupo funcional fenol y algunos polifenoles dietarios como b) quercetina, c) ácido cafeíco y c) procianidina (Scalbert *et al.*, 2006).

Sus múltiples grupos hidróxilo son responsables de interaccionar con moléculas polares confiriéndoles la capacidad de absorber una gran cantidad de radicales libres. En este sentido, la propiedad antioxidante de los PF está relacionada a factores tales como el potencial de ionización y tiempo de vida de

los radicales fenoxil, las propiedades redox de los compuestos (óxido/reducción de metales y moléculas de O₂) y la presencia de grupos funcionales capaces de quelar iones de metales de transición como el hierro y el cobre considerados prooxidantes; con ello evitan la generación de radicales libres en presencia de peróxido de hidrógeno. A su vez estos factores son influenciados por la estructura química del compuesto polifenólico, destacándose la presencia de grupo dihidroxilado en el anillo B (formando un grupo catecol), el cual fácilmente dona su hidrógeno (electrón) para estabilizar una especie reactiva; también la existencia de insaturaciones en las posiciones 2,3 que conjugados con el grupo 4- oxo- del anillo C permite la estabilización de su estructura a través de deslocalización de electrones (De Heer *et al.*, 1999; Bors *et al.*, 1990; Wright *et al.*, 2001; Sakihama *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2004; Djeridane *et al.*, 2006).

Diversas investigaciones señalan la importancia de los PF en la dieta humana debido a propiedades antioxidantes (Martin y Appel, 2010) y anticancerígenas (Liu *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2007), así como su capacidad de disminuir el estrés oxidante que inducen daños tisulares resultando en padecimientos crónicos (Bravo, 1998). En este sentido Shahidi (1996) señaló que la eficacia de los antioxidantes en la salud depende de la adecuada ingesta de alimentos ricos en estos compuestos, además de la presencia de ciertos micronutrientes que actúan a manera de cofactores, como el ácido ascórbico. Un ejemplo de la actividad antioxidante de un alimento rico en PF (0.930 mg equivalentes de ácido gálico/l) es el nopal hidrolizado, el cual registró actividad de atrapamiento *in vitro* sobre diversas especies reactivas como H₂O₂, O₂[•] y HOCl, sugiriendo que es buen atrapador de las especies (Ávila, 2012); asimismo un efecto altamente protector *in vivo* fue observado frente a radicales libres como el DPPH, lo que se puede sugerir una posible protección frente a diversas patologías (Dok-Go *et al.*, 2003; Hfaiedh *et al.*, 2008; Zourgui *et al.*, 2008).

Los PF abarcan una gran variedad de compuestos que se pueden dividir de acuerdo a sus diferencias estructurales en ácidos hidroxibenzoicos, ácidos

hidroxicinámicos, antocianinas, proantocianinas, flavonoides, flavonoles, flavones, isoflavonas, estilbencenos y ligninas (Cren-Olivé y Rolando, 2003).

En la **Figura 4** se ilustran ejemplos de la estructura de los grupos flavonoides y ácidos fenólicos.

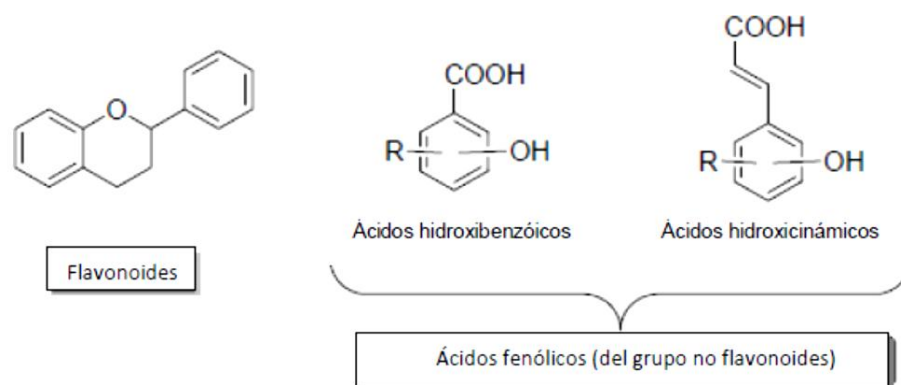


Figura 4. Estructura general de flavonoides y ácidos fenólicos (Martínez-Flores *et al.*, 2002).

Por su parte, Quideau *et al.* (2011) los clasifica en tres grupos:

1. **Proantocianidinas** (taninos condensados) tales como procianidinas, prodelfinidinas y profisetinidinas que son derivados de la oligomerización de las unidades flavan-3-oles, tales como: catequina, epicatequina, galato de epicatequina, epigallocatequina, galato de galoepicatequina, fisetinidol, galocatequina, galato de catequina, guibortinidol, mezquitol, robinetinidol.
2. **Galo y elagitaninos** (taninos hidrolizables), se derivan del metabolismo del ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) a través de la ruta del shikimato; son polímeros heterogéneos formados por ácidos fenólicos en particular ácido gálico y azúcares simples.
3. **Florotaninos**, son taninos presentes en las algas pardas (*Phyllum Phaeophyta*) y esencialmente se derivan de la oligomerización deshidrogenante del floriglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno); se clasifican en fualoles, floretoles, fucoles, fucofloretoles, ecoles y carmaloles.

En relación al grupo de los flavonoides se incluye a las flavonas, flavanoides, hidroflavonoides, isoflavonas, antocianidinas, proantocianidinas y chalconas, todos estos compuestos presentan una estructura básica C6-C3-C6 (Cren-Olivé y Rolando, 2003; Rice-Evans y Parker, 2003; Harborne y Williams, 2000). Algunas de sus estructuras se muestran en la **Figura 5**.

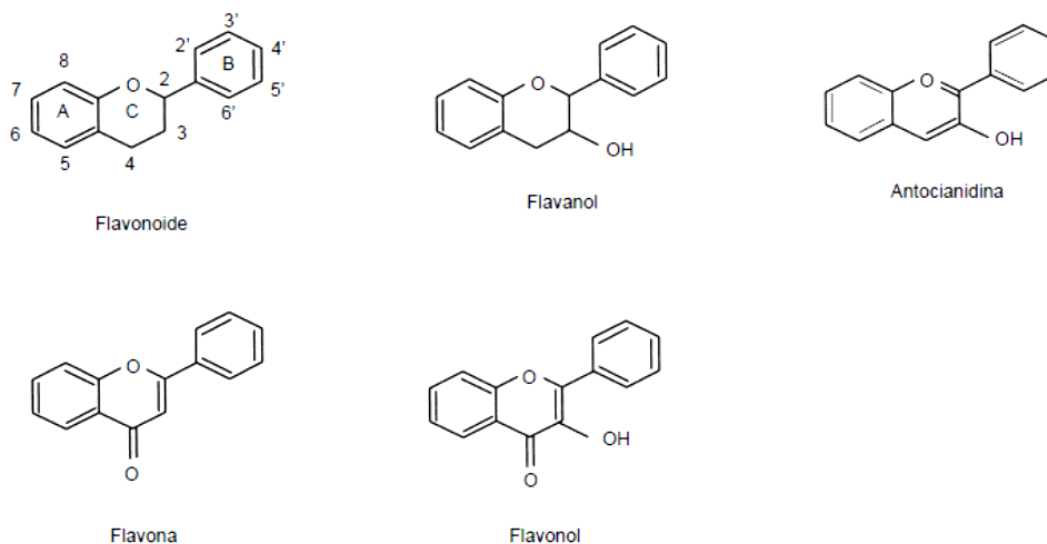


Figura 5. Estructura básica y tipos de flavonoides (Martínez-Flores *et al.*, 2002).

Los flavonoides desempeñan diferentes funciones dentro de la célula vegetal, responden a la luz UV captando fotones con lo cual se inicia el ciclo de la fotosíntesis; son reguladores del crecimiento y de la diferenciación de las plantas, confieren coloración, siendo bactericidas y fungicidas. Dentro de productos alimentarios los flavonoides pueden servir de protección antioxidante para los lípidos, aumentando así la vida de anaquel (Valverde *et al.*, 2000). En el organismo humano también tienen actividad antioxidante, lo cual hace que sean muy apreciados en el ramo de la salud pues ayudan a prevenir el riesgo de enfermedades cancerígenas y participan en la regulación de los procesos antioxidantes a través de la captación de radicales libres (Pier-Giorgio, 2000).

Asimismo, estudios realizados por Yao *et al.* (2007) y Miyamoto *et al.* (2011) indican que antioxidantes de origen natural como la quercetina inducen la

expresión y actividad de enzimas antioxidantes endógenas como: GR, GSH-Px, SOD, CAT, glutatión sintetasa y la hemo-oxigenasa.

Los ácidos hidroxicinámicos tienen aplicaciones en la salud debido a su actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, anticancerígena y prevención de aterosclerosis, mientras que en los alimentos dichos compuestos tienen implicación en el desarrollo de sabores y aromas. Por esto, en los últimos años ha aumentado el interés en el estudio y conocimiento de este tipo de compuestos considerados bioactivos (Valverde *et al.*, 2000). El ácido ferúlico lo podemos encontrar unido a diferentes polisacáridos y es parte importante de la pared celular (Mathew y Abraham, 2006). Los polifenoles, incluidos los flavonoides y ácidos hidroxicinámicos presentan solubilidad en agua a rangos de temperatura de 30-35°C mejorando dicha propiedad con mezcla de disolventes metanol-agua (80:20, v/v) (Cuchillo *et al.*, 2013).

II.8.1.1 Antioxidantes endógenos

De acuerdo con los reportes de Konigsberg (2008), los antioxidantes endógenos con los que cuenta el organismo pueden funcionar ya sea previniendo la formación de radicales, catalizando la síntesis o regeneración de antioxidantes no enzimáticos; dentro de estos antioxidantes, se encuentran principalmente las enzimas que se detallan a continuación:

1. **Superóxido dismutasa (SOD)**, es una metaloproteína presente en las células y fluidos extracelulares. Elimina el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), acelerando su conversión a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), al encontrarse presente en todos los organismos aeróbicos y en la mayoría de los compartimentos subcelulares, además de inactivarse a temperaturas superiores al resto de las enzimas antioxidantes, tiene un papel importante de defensa frente al daño oxidante (Yu, 1994).
2. **Glutatión peroxidasa (GSH-Px)**, es una selenoproteína que se encuentra en la matriz mitocondrial y en el citosol de las células. Se considera la enzima con mayor capacidad para eliminar peróxidos; actúa catalizando las

reacciones de reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los peróxidos lipídicos (Halliwell *et al.*, 1995). El selenio constituye uno de los micronutrientes esenciales para los organismos, siendo necesario un adecuado aporte de este elemento en la dieta para el mantenimiento de la salud y reproducción.

- 3. Catalasa (CAT)**, es una hemoproteína de amplia distribución intracelular, se encuentra principalmente en los peroxisomas y en las mitocondrias; descompone el peróxido de hidrógeno, principalmente en agua y oxígeno; desde el punto de vista cinético la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) posee mucha más afinidad por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que la catalasa pero esta última tiene la ventaja de no depender de la regeneración del glutatión (GSH) ni de consumo de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno estimulan la actividad de peroxidasas como la GSH-Px, mientras que la catalasa actúa a concentraciones mayores de H_2O_2 (Yu, 1994).

II.8.2 Antioxidantes sintéticos

Estos compuestos contienen sustituciones alquílicas para mejorar su solubilidad en grasas y aceites; su actividad antioxidante es dependiente de su composición química que a su vez influye sobre sus propiedades físicas como solubilidad y estabilidad térmica (Pokorny, 2004). Los antioxidantes sintéticos más utilizados en la industria alimenticia se ilustran en la **Figura 6** y corresponden a compuestos tales como:

- 1. Hidroxianisol butilado (BHA)**, formado por una mezcla de isómeros 3-terbutil-4-hidroxianisol y 2-terbutil-4-hidroxianisol, con fórmula molecular $C_{11}H_{16}O_2$ y olor característico; es un sólido blanco o amarillento, altamente soluble en grasas y aceites e insoluble en agua. Comercialmente es muy utilizado debido a su estabilidad a las variaciones de pH, alta eficacia y acentuado sinergismo con otros antioxidantes. No tiene acción mutagénica pero es capaz de modular el efecto de ciertos carcinógenos sobre animales

de experimentación, potenciando o inhibiendo la acción del carcinógeno evaluado (Carreras, 2004; Madhavi *et al.*, 1996).

2. **Butil hidroxi tolueno (BHT)**, también conocido como 3,5-di-terbutil-4-hidroxitolueno, metil-di-terbutilfenol o 2,6-di-terbutil-para-cresol y con fórmula molecular $C_{15}H_{24}O$; es un compuesto con propiedades similares al BHA. Se considera con mayor efectividad en grasas animales que en aceites vegetales y exhibe actividad antioxidante relativamente débil si no se combina con otros antioxidantes como el BHA y la butilhidroquinona terciaria (TBHQ), pero no con galato de propilo (Carreras, 2004; Madhavi *et al.*, 1996).
3. **Butilhidroquinona terciaria (TBHQ)**, es el antioxidante sintético más potente y efectivo para estabilizar aceites vegetales altamente insaturados (la mayoría de las grasas y aceites). Se trata de un sólido blanco, cristalino, moderadamente soluble en aceite e insoluble en agua (Carreras, 2004).
4. **Esteres del ácido gálico**, los cuales se basan en la estructura trihidroxil de este ácido (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico). Es un compuesto poco soluble en agua. Tienen una potencia antioxidante relativamente alta, pero su uso es limitado debido a su tendencia a unirse al hierro y por su sensibilidad al calor. Suelen aplicarse con compuestos sinérgicos como el ácido cítrico, que actúa como quelante del hierro; es un antioxidante poco útil para la preservación de los aceites de fritura o alimentos y grasas sometidas a altas temperaturas durante su procesamiento y fabricación, por lo que se utiliza con BHA para una mayor efectividad (Madhavi *et al.*, 1996).

El uso de antioxidantes sintéticos como aditivos incluye aspectos negativos debido a sus probables efectos tóxicos ya que al ser compuestos altamente lipofílicos requieren ser solubilizados en solventes orgánicos o aceites vegetales. Es un hecho reconocido que los solventes orgánicos apolares son altamente tóxicos para los mamíferos; por lo tanto la incorporación de estos antioxidantes debe ser limitada y normalizada (Madhavi *et al.*, 1996).

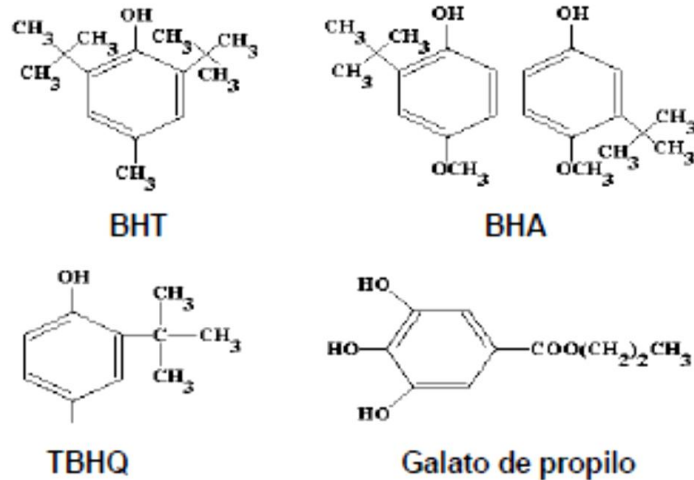


Figura 6. Estructura química de antioxidantes sintéticos (Madhavi *et al.*, 1996).

II.9 Mecanismo de acción de los antioxidantes

Los antioxidantes inhiben o retardan la oxidación de dos formas: captando radicales libres en cuyo caso se denominan antioxidantes primarios o por otros mecanismos en cuyo caso se conocen como antioxidantes secundarios. Los antioxidantes primarios inducen la ruptura de la cadena de propagación de la oxidación ya sea eliminando radicales libres o cediendo un protón al radical libre, este fenómeno se ilustra a continuación en la **Figura 7**. En los antioxidante primarios se incluye a los compuestos fenólicos, mismos que se destruyen durante el periodo de inducción; asimismo pueden ser liposolubles como la vitamina E y β -caroteno o hidrosolubles como el ácido ascórbico (Giese, 1996; Niki, 1987).

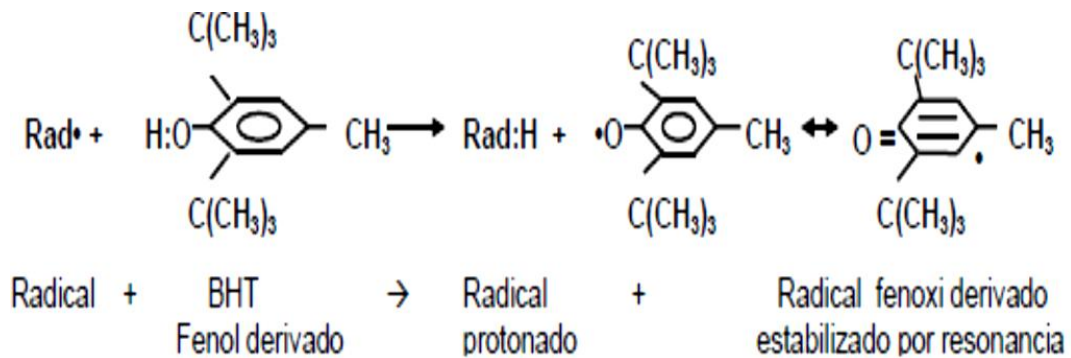


Figura 7. Mecanismo de acción de los antioxidantes primarios (Giese, 1996).

Por su parte, los antioxidantes secundarios operan a través de mecanismos que pueden involucrar su unión a metales pesados, la captación de oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de la radiación UV, desactivación del oxígeno singulete o inhibiendo la iniciación de la oxidación; este último mecanismo se presenta en las proteínas de transporte y almacenaje (transferrina, lactoferrina, albúmina, etc.) las cuales quelan iones metálicos evitando que actúen como catalizadores de la oxidación. Pertenecen a los antioxidantes secundarios el ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) y cítrico, así como enzimas antioxidantes: SOD, CAT y GSH-Px. Algunos antioxidantes sólo poseen actividad como tal en presencia de un segundo componente minoritario, como en el caso del ácido ascórbico que es efectivo en presencia de tocoferoles y otros antioxidantes primarios (Niki, 1987; Giese, 1996; Madhavi, 1996; Pokorny, 2004). Ejemplos de los mecanismos de acción antioxidantes se muestran en el **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Mecanismos de acción de los antioxidantes (Pokorny, 2004).

Tipo de antioxidante	Mecanismo de acción	Ejemplos de antioxidantes
Antioxidantes propiamente dichos	Inactivando radicales libres lipídicos	Compuestos fenólicos
Estabilizadores de hidroperóxidos	Previniendo la descomposición de hidroperóxidos a radicales libres	Compuestos fenólicos
Sinergistas	Promoviendo la actividad de los antioxidantes propiamente dichos	Ácido cítrico, ácido ascórbico
Quelantes de metales	Ligando metales pesados a compuestos inactivos	Ácido fosfórico, compuestos de Maillard, ácido cítrico
Extinguidores de oxígeno singulete	Transformando oxígeno singulete en oxígeno triplete	Carotenos
Sustancias que reducen hidroperóxido	Reduciendo hidroperóxidos por vías no radicalarias	Proteínas, aminoácidos

II.10 Actividad prooxidante

Los compuestos antioxidantes bajo ciertas condiciones actúan de manera antagonista a su actividad original denominándose como prooxidantes. Al respecto en 2002, Sakihama y colaboradores evaluaron la acción de polifenoles para dañar el ADN a través de la producción de radicales en presencia de Cu y O₂. Para ello eligieron tres ácidos hidroxicinámicos con estructuras químicas y potenciales redox similares: ácido clorogénico, cafeíco y dihidrocafeíco (DHCA) a diferentes concentraciones (0, 0.5, 1, 5, 10, 20 y 50 μM). La intensidad de los daños provocados al ADN varió considerablemente en el siguiente orden para los ácidos: DHCA > cafeíco > clorogénico. La exposición del ADN a los polifenoles dio como resultados daños dependientes de la dosis. Estos autores señalaron que dicho comportamiento se relacionó con la presencia de radicales fenoxil en los polifenoles en conjunto con la acción de metales como Al, Zn y Ca pueden iniciar la peroxidación lipídica. Pérez (2003) indicó la mutagenicidad y genotoxicidad de los flavonoides tanto en sistemas experimentales bacterianos como de mamíferos. Debido a sus características estructurales, los flavonoides poseen bajos potenciales de oxidación, que les permiten reducir Fe³⁺ y Cu²⁺ para sufrir una autooxidación o incluso involucrarse en un proceso redox, actuando de esta manera como agentes prooxidantes, lo que explica los efectos mutagénicos y genotóxicos de estos metabolitos vegetales. Algunos de los mecanismos a través de los cuales los flavonoides ejercen sus acciones prooxidantes incluyen la reducción temporal de Cu (II) a Cu (I), la generación de EROs, así como la afectación de las funciones de los componentes del sistema de defensa antioxidante nuclear: glutatión y glutatión-s transferasa.

II.11 Procedimientos para determinar la actividad antioxidante

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante. Las estrategias más aplicadas en las mediciones *in vitro* de la actividad antioxidante se basan en la generación de radicales libres cromóforos para simular especies

reactivas de oxígeno estabilizados frente a la adición del antioxidante a evaluar; dichos métodos ofrecen información diversa y en general permiten obtener buenas correlaciones entre la actividad antioxidante y la vida media de los productos, pero sólo tienen ligeras aproximaciones a los efectos protectores de la salud y de los métodos *in vivo* (Cadenas y Packer, 2002).

II.11.1 Cuantificación *in vitro* de la actividad antioxidante

La capacidad antioxidante en una mezcla es la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, sin embargo también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Las estrategias más aplicadas para evaluar de manera *in vitro* la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento consisten en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical cuya pérdida de color es proporcional con la concentración del radical cromóforo (Kuskoski *et al.*, 2005). Las determinaciones de actividad antioxidante requieren el uso de compuestos estándar como la catequina, α -tocoferol o vitamina C.

II.11.1.1 Actividad antioxidante determinada por el blanqueo del β -caroteno.

En este ensayo se determina la capacidad antioxidante debido a la oxidación (formación de radicales libres) del β -caroteno por las condiciones en que éste se encuentra (luz, temperatura, H_2O_2 y presencia de ácido linoleico). En su mecanismo de acción el β -caroteno pierde sus dobles enlaces, formando radicales inestables que posteriormente pueden ser estabilizados por compuestos antioxidantes (Matthäus, 2002).

El blanqueo de β -caroteno en presencia de ácido linoleico es ampliamente utilizado debido a su sensibilidad, bajo costo de los reactivos y poco tratamiento que requiere la muestra. Algunas de las desventajas que presenta el método son: la preparación de la emulsión debe darse bajo las mismas condiciones en cada ensayo ya que puede afectar la reproducibilidad de los resultados; al utilizar un lípido emulsificado, existe un gran número de variables que interfieren en la

oxidación que son difíciles de controlar; el efecto interfacial que se presenta afecta el comportamiento del antioxidante y el tiempo que requiere el ensayo es mucho mayor que el tiempo que toman otras pruebas (Prieto *et al.*, 2012).

II.11.1.2 Actividad antioxidante por radical DPPH (2,2-difenilpicrilhidracilo)

La determinación de la actividad antioxidante puede realizarse a través de la cuantificación del porcentaje de atrapamiento del radical DPPH (2,2-difenilpicrilhidracilo). Esta técnica es ampliamente utilizada debido a la rapidez, sensibilidad, excelente estabilidad del radical, reproducibilidad y bajo costo del ensayo. El DPPH es un radical cromóforo, que al reaccionar con un agente donador de electrones, es reducido a su forma DPPH-H. Un cambio en el color, púrpura (forma oxidada) a amarillo (forma reducida), indica que tan activo es el antioxidante que se está evaluando (Özcelik *et al.*, 2003).

La prueba cuantitativa consiste en hacer reaccionar una solución del radical DPPH con una solución del antioxidante a concentraciones conocidas y monitorear el cambio de color en un tiempo determinado registrando la absorbancia de la mezcla a 517 nm (Figura 8). Algunas desventajas de este método son que el DPPH[•] únicamente puede ser disuelto en medios orgánicos, especialmente en medios alcohólicos no acuosos, lo que representa una limitación importante del método para especies de naturaleza hidrofílica (Gülcin, 2006).

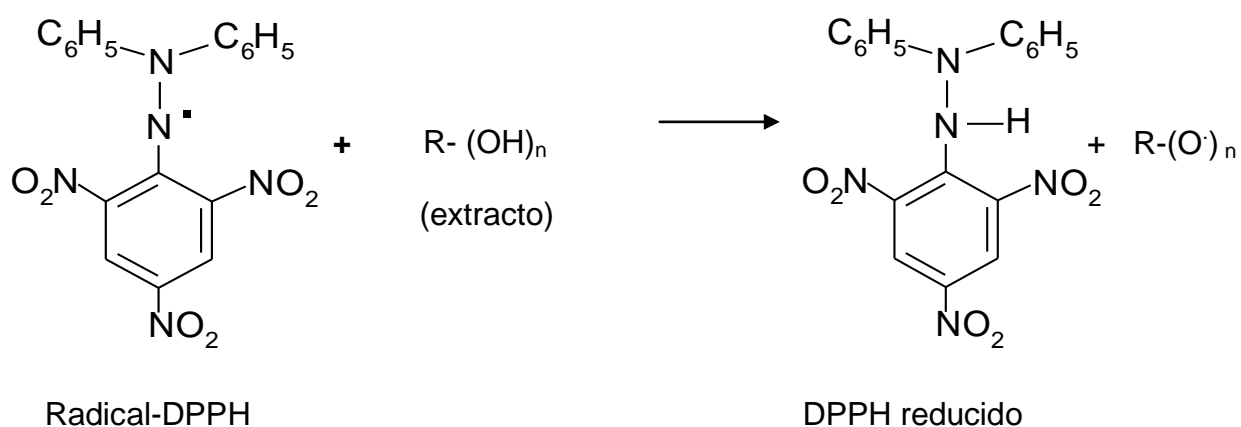


Figura 8. Reacción del radical DPPH (Taga *et al.*, 1984).

II.11.1.3 Actividad antioxidante por radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico))

Este método es semejante al ensayo con el radical DPPH, estableciendo una reacción entre el radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) y el antioxidante que es el donador de electrones. La única diferencia es que antes de reaccionar con el antioxidante, el radical ABTS deberá ser generado por oxidación del ABTS⁺. Esta reacción puede ser generada químicamente utilizando agentes oxidantes como persulfato de potasio o dióxido de manganeso y/o enzimáticamente empleando enzimas como mioglobina o peroxidasa tipo II (HRP) como se muestra en la **Figura 9**.

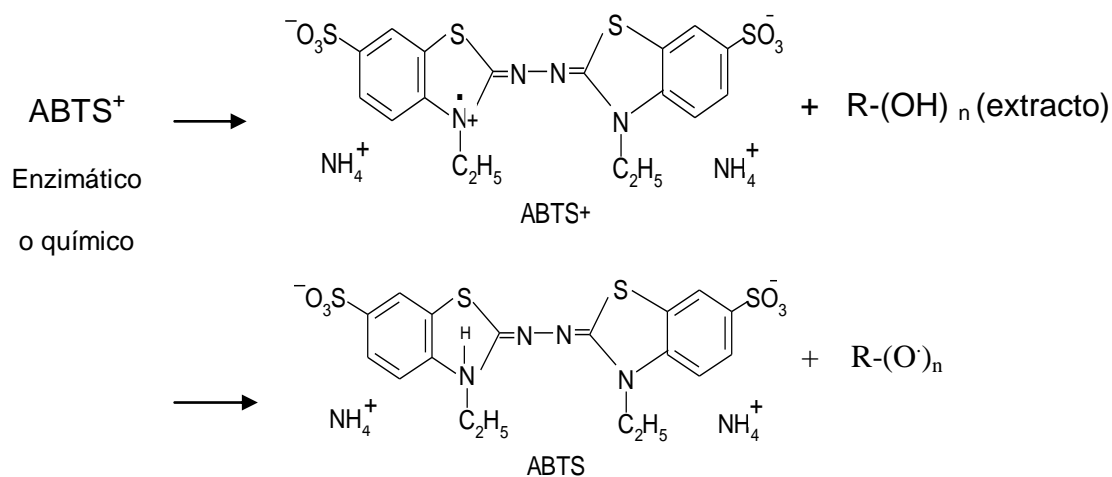


Figura 9. Reacción del radical ABTS (Re *et al.*, 1999).

II.11.2 Pruebas *in vivo* de la actividad antioxidante

Hoy en día existe fuerte evidencia de la protección antioxidante que los polifenoles proporcionan a la salud, provocando un incremento de la capacidad total de atrapamiento de las especies tipo radical por parte de la sangre ante la presencia de polifenoles en dicho componente corporal. Específicamente los polifenoles se complejan a la superficie de los eritrocitos y con ello favorecen la capacidad de secuestro de oxidantes existentes en la sangre, análogamente aumenta la capacidad antioxidante. Además de ser un buen atrapador de radicales libres *in vitro*, una de las propiedades más importantes de una sustancia

antioxidante es que pueda llegar al sitio de acción en su forma activa, actuar *in vivo* y como consecuencia atenuar o prevenir la oxidación de biomoléculas (Koren *et al.*, 2010; Ávila, 2012).

II.11.2.1 Prueba de actividad antioxidante de la sangre por atrapamiento del radical DPPH

Koren *et al.* en 2010 adaptaron el método de atrapamiento del radical libre DPPH para determinar la capacidad antioxidante de la sangre completa, plasma y eritrocitos; mostrando una gran eficiencia del uso de esta técnica.

En 2012, Ávila recurrió a esta adaptación del ensayo y determinó la capacidad antioxidante en componentes sanguíneos de individuos sanos los cuales consumieron durante tres días una dieta que cubrió sus requerimientos energéticos, al mismo tiempo que garantizó un consumo diario de entre 24 y 27 mg de polifenoles provenientes exclusivamente del nopal hidrolizado. El consumo del nopal mostró un incremento significativo de la actividad antioxidante en sangre, eritrocitos y plasma; registrándose en este último el incremento más significativo (20%) respecto a la dieta control. Los resultados sugirieron que el efecto antioxidante se debió al atrapamiento directo de especies reactivas como el DPPH.

II.11.2.2 Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)

El ensayo conocido como ORAC (capacidad de absorción de radicales oxígeno, por sus siglas en inglés) es una evaluación tanto *in vitro* como *in vivo* para determinar la capacidad antioxidante frente a los radicales libres. Su principio de acción se ilustra en la **figura 10** y se basa en el uso de la fluoresceína o proteína fluorescente R-ficoeritrina como sustrato oxidable y 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH), como generador de radicales peroxilo (ROO[•]). Este método es el único que registra la acción de la especie radical hasta el final a través del decremento de la fluorescencia y la integración de áreas bajo la curva (ABC) netas de cada sustancia evaluada; haciendo posible generar una curva de

calibración del estándar antioxidante trolox (ácido 6-hidroxy-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) usada para interpolar los valores de ABC de las muestras y cuantificar la capacidad antioxidante por su equivalencia respecto al comportamiento de este antioxidante específico. De esta manera, la técnica considera tanto el porcentaje como la extensión de la inhibición a un valor dado (Prior *et al.*, 2003; Glazer, 1990; Winston *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2005).

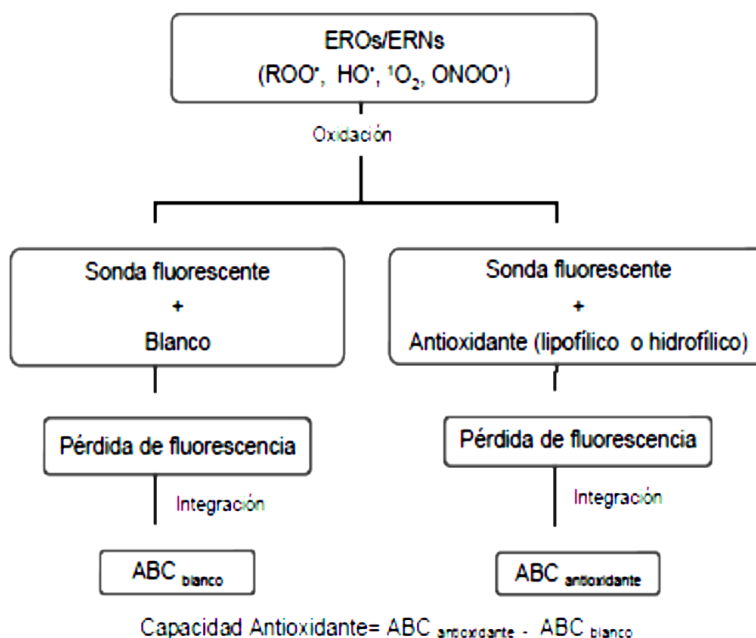


Figura 10. Esquema del principio del ensayo ORAC (Huang *et al.*, 2002).

II.12 Actividad de los polifenoles sobre las células sanguíneas

La presencia de hemoglobina en la sangre representa un factor de susceptibilidad al daño oxidante debido a que puede ser oxidada en sus centros Fe-S así como en su grupo hemo por el peróxido hidrógeno transformándola a las formas: metahemoglobina y metamioglobina que son poderosas promotoras de la continuidad del proceso oxidante. Así la hemoglobina oxidada al reaccionar nuevamente con la molécula de peróxido de hidrógeno, provocará una hemo-degradación y consecuentemente liberación de iones hierro capaces de prolongar y catalizar la formación de radicales libres y peroxidación lipídica (Hebbel, *et al.*,

1993; Vives *et al.*, 1995; Rice-Evans *et al.* 1986; van der Berg *et al.*, 1992; Puppo y Halliwell, 1988; Ando *et al.*, 1995; Konigsberg, 2008). Asimismo, se reconoce que el mayor deterioro celular es causado por el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el cual es generado como parte de la actividad redox del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), los cuales en presencia de adecuados metales de transición darán lugar a las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Samuni *et al.*, 1983; Ames *et al.*, 1993; Chevion, 1988; Halliwell *et al.*, 1992; Mao *et al.*, 1994). Al respecto, diversos reportes indican que en condiciones *in vitro*, los metales como el hierro, cobre, titanio, cobalto y cromo son altamente efectivos en la generación de radicales hidroxilo; mientras que *in vivo* lo son particularmente los iones de hierro; quienes presentan una alta efectividad catalítica para la formación de $\cdot\text{OH}$ a partir de proteínas, ácidos orgánicos, nucleótidos de adenina, sulfuro y ADN (Halliwell y Gutteridge, 1986, Bannister *et al.*, 1983; Baker y Gebicki, 1986; Floyd, 1981; Flitter *et al.*, 1983, Berglin y Carlsson, 1985).

Considerando que la transferrina es la proteína transportadora de hierro en el plasma, Maguire *et al.* (1982) y Baldwin *et al.* (1984) reportaron la habilidad de la unión transferrina-hierro para acelerar la formación de $\cdot\text{OH}$ a partir de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en un ambiente estricto con un pH de 7.8. Asimismo, Mc Cord y Day (1978) evaluaron el efecto del pH sobre la formación de $\cdot\text{OH}$ en esta proteína cargada de hierro, señalando que la generación de estos radicales se incrementa cuando el pH es de 7.4. Por su parte, Bannister *et al.* (1982), Motohashi y Mori (1983) y Burton *et al.* (1984), también reportaron la susceptibilidad de esta proteína transportadora al deterioro por efecto de lipoperoxidación, en presencia de estos factores. También, Auroma y Halliwell (1987) evaluaron la capacidad de formación de radicales hidroxilo a partir de proteínas sanguíneas en presencia de hierro a diferentes condiciones de pH, donde la adición de ácido ascórbico mostró que sólo a partir de valores inferiores de pH 5, existe un incremento en la generación de los radicales $\cdot\text{OH}$.

Ante el desencadenamiento del proceso de lipoperoxidación; las especies de hierro vulnerables al ataque del radical hidroxilo, pueden evitar ser oxidadas

ligándose a metabolitos intracelulares o componentes de la membrana como parte de mecanismos homeostáticos. Asimismo diversos polifenoles de plantas han mostrado su efecto protector *in vitro* sobre procesos oxidantes citotóxicos en hepatocitos, fibroplastos de pulmón y células rojas sanguíneas sugiriendo que los polifenoles se ligan a las moléculas de hierro de bajo peso molecular en lugar de realizar un ataque directo sobre el atrapamiento de los radicales hidroxilo que requeriría una alta concentración de antioxidantes (Morel *et al.*, 1993; Nakayama *et al.*, 1993; Grinberg *et al.*, 1994; Afanas'ev *et al.*, 1995; Hanasaki *et al.*, 1994; Halliwell *et al.*, 1992).

Al respecto, Grinberg y colaboradores (1997) evaluaron el efecto antioxidante *in vitro* de los polifenoles provenientes del té verde (catequina 71%) y té negro (catequina 42%, teafloavinas 9.3%) sobre células rojas tanto normales como con un daño inducido sobre la membrana celular. Los resultados demostraron que el efecto protector de los polifenoles es dependiente de la dosis y actúan como agentes quelantes del ion hierro. Asimismo reportaron que 10 µg/ml de polifenoles de los dos té, fueron capaces de inhibir hasta en 80% la lipoperoxidación de la membrana celular dañada y reducir hasta en un 50% el flujo de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$); bajo las condiciones de experimentación de estos autores se concluyó que no existió intercambio de electrones en el complejo redox de hierro. De manera similar, Tedesco *et al.* (2000) y Dai *et al.* (2006) reportaron no sólo la protección *in vitro* de los polifenoles para reducir daños en membrana (monitoreada por la lisis de células rojas) sino que indirectamente relacionan dicha protección con menores niveles de especies reactivas.

Adicionalmente a la utilización de polifenoles como compuestos quelantes que pueden interferir en el proceso de lipoperoxidación, autores como Bonarska-Kujawa *et al.* (2012) señalaron que la actividad antioxidante presentada por los eritrocitos está relacionada a su capacidad para enlazar a su superficie una gran variedad de polifenoles antioxidantes, debido a las interacciones electroestáticas de los grupos hidroxilo (presentes en la estructura química de los polifenoles) con los componentes de la superficie de la membrana de los eritrocitos, formando

complejos membrana-polifenol que los hace agentes antioxidantes más eficientes al poder atrapar diversas especies reactivas (Koren *et al.*, 2010). También, se ha señalado que los flavonoles podrían interactuar de forma sinérgica con el α -tocoferol (vitamina E), vitamina C y otros flavonoides, esto al reaccionar con los radicales peroxilo y detener la peroxidación retardando la lisis de eritrocitos y mejorado la actividad antioxidante (Herrmann, 1976; Jia *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2000).

Por tanto, la eficacia de la actividad antioxidante de los polifenoles en sangre y plasma está determinada tanto por las condiciones de iniciación de la oxidación (presencia de polifenoles, especies tipo reactivas y pH), como por la capacidad quelante, estructura molecular y las interacciones que establezcan estos fitoquímicos con la superficie de la célula y otras moléculas.

En efecto, los polifenoles han mostrado ser buenos antioxidantes contra la peroxidación lipídica iniciada por radicales libres actuando en diversas soluciones y matrices micelares, lipoproteínas humanas de baja densidad, células rojas, plasma y los microsomas de hígado de rata (Ma *et al.*, 2000; Jia *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2002). Por lo tanto, es justificado el interés en ampliar investigaciones relacionadas a polifenoles provenientes de la dieta y estudiar su actividad antioxidante (Herrmann, 1976; Jia *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2000).

II.13 *Acacia farnesiana* (L.) Willd (AF)

Acacia farnesiana (L.) Willd, conocida comúnmente como huizache, es una planta leguminosa considerada un producto forestal no maderable. Esta especie de leguminosa originaria de América tropical tiene un área de distribución heterogénea en todo el mundo tropical. En nuestro país se encuentra en la vertiente del océano pacífico desde el sur de Sonora hasta Chiapas y de manera discontinua en la vertiente atlántica a una altitud que va de los 36 a 2,500 msnm.

AF es una especie de fácil adaptación presentando tolerancia a suelos salinos y secos, aunque no soporta suelos calcáreos ni temperaturas menores a -5°C . Por lo general se desarrolla a orilla de caminos, arroyos, parcelas abandonadas, terrenos con disturbio y sitios ruderales. Se le encuentra donde predominan climas cálidos y semicálidos, en regiones que tienen hasta 900 mm de precipitación anual y temperaturas que varían de 5 a 30°C . Puede florecer durante todo el año y especialmente de noviembre a mayo; en Chamela Jalisco florece de diciembre a marzo, en Guerrero de julio a marzo fructificando de enero a abril (Zamora y Torres, 2001; CONABIO, 2008; Ochoa, 1984).

Acacia farnesiana se presenta como un arbusto espinoso o árbol pequeño, perennifolio o subcaducifolio de 1 a 2 metros de altura en la forma arbustiva y de 3 a 10 metros en la forma arbórea, de copa redondeada y hojas plumosas con flores en cabezuelas de color amarillo (**Imagen 1**). Por su parte, los frutos (vainas) muestran un color oscuro rojizo, siendo semiduras, subcilíndricas, solitarias o agrupadas en las axilas de las espinas, de 2 a 10 cm de largo, terminadas en una punta aguda, valvas coriáceas, fuertes y lisas, tardíamente dehiscentes. Permanecen en el árbol después de madurar dentro de las vainas, donde se ubican las semillas que pueden ser almacenadas por largos períodos sin pérdida de viabilidad. Presentan latencia física y cubierta impermeable. Sus semillas tienen una longevidad que oscila entre los 3 y 15 años (CONABIO, 2008).



Imagen 1. *Acacia farnesiana* (L.) Willd

A las partes de AF se les han encontrado diversos usos tales como adhesivo (tronco), aromatizante (flor), artesanal (madera), colorantes (flor y fruto), curtiente (fruto) y condimento (hojas); destacando la utilización de sus frutos, hojas y flores como recurso forrajero particularmente para cabras así como el empleo de su flor, raíz, tallo y corteza en la medicina tradicional. Debido a su gran adaptabilidad y presencia en las regiones tropicales donde la producción pecuaria tiene una marcada estacionalidad supeditada a las características climatológicas (Cuchillo *et al.*, 2010a); AF representa una fuente de ingreso y empleo para comunidades en áreas muy marginadas (Zamora y Torres, 2001).

Por otra parte, Meckes *et al.* (2004) presentaron un estudio realizado en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de productos naturales del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS en México, donde determinaron el efecto antiinflamatorio (en ratas) producido por extractos obtenidos de las hojas de diversas plantas, entre ellas AF, dando resultados positivos al disminuir el edema inducido hasta en un 72.8% al cabo de 3 horas de administrado el extracto de AF.

II.13.1 *Acacia farnesiana* como fuente de compuestos antioxidantes

Cuchillo *et al.* (2010b) reportaron un incremento de 15.6 veces del contenido de PFT en el queso suave de leche de cabra procedente de animales alimentados en pastoreo respecto al producto lácteo obtenido cuando las cabras estuvieron en estabulación total con una alimentación basada en alfalfa y concentrado de cereales. Cabe señalar que durante el pastoreo los animales tuvieron acceso al consumo de forraje y vainas de *Acacia farnesiana* al igual que a otros muchos recursos forrajeros. Asimismo el queso del pastoreo registró un aumento en la cantidad de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos determinados respecto al queso de estabulación. Posteriormente en 2013, Cuchillo *et al.* cuantificaron los PFT de vaina secas de AF reportando 38.1 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g a partir de la extracción con metanol:agua (80:20, v/v); así como la presencia de ácidos hidroxicinámicos y flavonoides principalmente epicatequina y catequina con 0.003 y 0.004 mg/100 g de vaina seca,

respectivamente. Por su parte, Xu *et al.* (2005) extrajeron de la pared celular de AF una cantidad importante de ácidos hidroxicinámicos mediante hidrólisis alcalina; mientras que Seigler (2003) encontró en vainas de AF compuestos fenólicos como flavonoides.

Estudios relacionados fueron realizados por Barranco en 2010, reportándose valores de PFT entre 1,754 a 2,524 mg de EAG/ 100 g de hojas de *Acacia farnesiana* y *Acacia cochliacantha*, respectivamente. Asimismo, con el uso de cromatografía de capa fina se mostró la presencia de: triterpenos (patrón de alfa-amirina), flavonoides (patrón de ácido clorogénicos) y ácidos hidroxicinámicos (ácido oleanólico). Por su parte, Hannachi y colaboradores (2011) al evaluar las características químicas de siete semillas del género de Acacia, reportaron un rango de PFT de 154.4 a 1217.9 mg EAG/100 g de materia seca. Cuantificaciones de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos determinados en diversas especies vegetales y fracciones del género Acacia se muestran en el **Cuadro 4**.

Cuadro 4. Contenido de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos (mg/100 g muestra) en especies del género Acacia, determinados en diversas fracciones vegetales.

Especie vegetal y fracción de estudio	Fuente	Contenido de mg/100 g muestra				
		Ácidos hidroxicinámicos			Flavonoides	
		Gálico	Clorogénico	Cafeíco	Quercetina	Epicatequina
<i>Acacia farnesiana</i>						
Extracto de vainas	Cuchillo	93.63	ND	ND	207.10	ND
Vaina seca	Cuchillo	35.36	-	-	78.22	-
Hojas	Barranco	24.08	36.33	74.34	1496.2	74.3
<i>Acacia schaffneri</i>						
Vaina seca	Cuchillo	0.56	ND	0.02	ND	ND
<i>Acacia cochliacantha</i>						
Hojas	Barranco	22.12	23.16	29.29	1409.0	77.2
ND= no determinado		Fuente: Barranco (2010), Cuchillo <i>et al.</i> (2010b)				

Para aquellos casos donde la información ofrecida en el cuadro anterior lo permite, observamos que el compuesto polifenólico específico más abundante en las vainas y hojas de las especies de Acacia fue la quercetina. Aspecto positivo toda vez que dicho flavonoide ha demostrado inducir la expresión de enzimas

antioxidantes, contribuyendo a la protección sobre patologías como el cáncer, hepatotoxicidad y procesos inflamatorios (Yao *et al.*, 2007; Miyamoto *et al.*, 2011; Konignberg, 2007).

II.13.2 Actividad antioxidante *in vitro* de *Acacia farnesiana*

Cuchillo *et al.* (2013) realizaron una comparación de extractos de vainas de AF obtenidos a partir de tres disolventes con distinta polaridad (metanol, metanol:agua y acetona) y con ello comprobaron cómo influye el medio de extracción sobre la eficacia antioxidante de los compuestos fenólicos procedentes de las vainas. Los resultados mostraron una mayor capacidad antioxidante a partir de la solución de metanol:agua (80:20, v/v). En este extracto se evaluó la actividad secuestrante cualitativa en una resuspensión acuosa (200 mg/l) mediante una cromatografía en capa fina (CCP), utilizando DPPH[•] al 2% como revelador; mostrando una actividad antioxidante parecida al antioxidante natural ácido p-cumarínico y a otros sintéticos. Esta suspensión del extracto también fue evaluada en ensayos frente a los radicales ABTS y DPPH, además de las pruebas del blanqueamiento de β-caroteno y liposomas; empleándose α-tocoferol, catequina, BHA y TBHQ como estándares de la eficacia protectora (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Actividad antioxidante del extracto (200 mg/l) de vainas de *A. farnesiana* obtenido con metanol:agua (80:20, v/v) como disolventes, comparada con diferentes estándares (Cuchillo *et al.*, 2013)

	Actividad antioxidante (%)			
	ABTS [•]	DPPH [•]	β-caroteno	Liposomas (% de inhibición de TBARS)
<i>Acacia farnesiana</i>	10.46	47.598	29.01	66.04
α-tocoferol	92.64	93.42	ND	ND
Catequina	91.42	ND	ND	ND
BHA	ND	92.36	ND	ND
TBHQ	ND	94.74	ND	ND

ABTS[•] = ácido 2, 2'azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico sal diamónica; DPPH[•] = 2-2-difenilpicrilhidracilo; TBARS= Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; BHA= Butilhidroxianisol; TBHQ= Ter-butilhidroquinona; ND= no determinado.

Al respecto, Cuchillo *et al.* (2013) concluyeron que el extracto de vainas de *Acacia farnesiana* obtenido por metanol-agua presenta actividad antioxidante secuestrando los radicales DPPH y ABTS así como un alto contenido de compuestos fenólicos; por tanto el fruto de esta especie contiene compuestos bioactivos con actividad antioxidante. En este sentido, Dudonné *et al.* (2009), determinaron una relación positiva entre el porcentaje de atrapamiento del DPPH y el contenido de polifenoles en diversas muestras vegetales, de las cuales 3 productos reportaron concentraciones mayores a 300 mg equivalentes de ácido gálico/100 g y altos valores de capacidad secuestrante; siendo el roble, corteza de pino y canela con 88.6%, 94.5% y 84.4% respectivamente. Por su parte, Hannachi *et al.* (2011) al valorar las características químicas de siete semillas del género *Acacia*; desafiaron distintas concentraciones en metanol de extractos de estas semillas, frente al radical DPPH y observaron que los más elevados valores de PFT no respondieron de manera directa al nivel de actividad antioxidante.

Adicionalmente, Puga *et al.* (2012) señalaron el efecto protector *in vitro* de tres extractos de vainas AF sobre células renales porcinas. Cada extracto se obtuvo con distintos disolventes: metanol, acetona y metanol:agua (80:20, v/v); mismos que fueron desafiados en tres concentraciones (50, 100 y 200 mg/l) frente al efecto oxidante provocado por peróxido de hidrógeno (20 mM) sobre las células. Los resultados mostraron una menor intensidad de daño celular en presencia del extracto de AF (metanol:agua) evaluado a 200 mg/l, dicha concentración exhibió la mejor protección frente a EROs respecto de las dos concentraciones restantes.

II.13.3 Presencia de saponinas en *Acacia farnesiana*

Francis y colaboradores, en 2002, sugirieron que las fracciones fenólicas sin purificar de *Acacia farnesiana* involucra un contenido de saponinas. Las saponinas son compuestos esteroides o triterpenoides glucosidados con efectos cianogénicos que pueden impactan negativamente en la nutrición humana y animal. Se presentan en numerosas plantas y productos vegetales con una amplia diversidad de estructuras, mostradas de manera general en la **figura 11**.

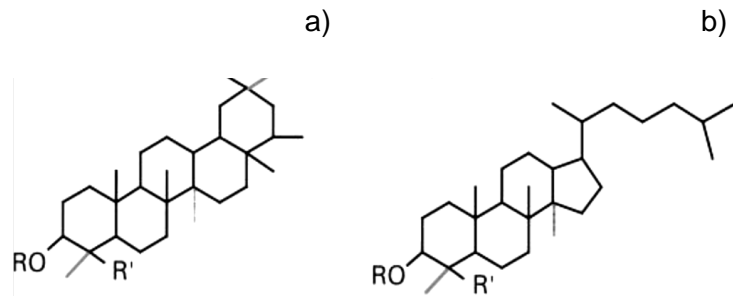


Figura 11. Estructuras básicas de saponinas: (a) esteroide, (b) triterpenoide (Francis *et al.*, 2002).

Numerosos efectos biológicos han sido adscritos a las saponinas, destacando su propiedad antioxidante, impacto en la digestión de proteínas, capacidad para secuestrar vitaminas y minerales, intervención en la permeabilidad de la membrana celular, así como ser causantes de hipoglucemia y mostrar propiedades inmunoestimulantes, hipocolesterolemicas y anticancerígenas. Asimismo al considerarse a las saponinas parte del “sistema de defensa” de la planta se le han atribuido actividad antifúngica, antiviral y capacidad de matar protozoarios y moluscos (Francis *et al.*, 2002); además de considerarse una fuente de monosacáridos (Barr *et al.*, 1998). Por los efectos antes mencionados, estos compuestos pueden repercutir en animales de manera tanto positiva como negativa.

Factores ambientales y edafológicos afectan el contenido de saponinas de las plantas. Informes realizados por Yoshiki *et al.* (1998) mencionan que las saponinas aumentan el desarrollo de plantas como la soja, alfalfa, frijol, y guisantes, mientras que disminuyen plagas como la polilla de frijol. También señalan que la disponibilidad de luz durante la germinación tiene un fuerte efecto estimulante sobre el contenido de saponinas. En general, se ha encontrado que las plantas inmaduras de una especie tienen mayor contenido de saponinas que plantas más maduras de la misma especie. La capacidad cianogénica de las saponinas varía entre especies vegetales y por la época de muestreo. Adicionalmente, Francis y colaboradores (2002) señalaron que la actividad antioxidante en saponinas está relacionada principalmente al residuo de azúcar

2,3-dihidro-2,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (DDMP) que permite a las saponinas secuestrar superóxidos mediante la formación de compuestos intermedios de hidroperóxido, evitando así daño a biomoléculas por radicales libres (Yoshiki y Okubo, 1995; Hu *et al.*, 2002). Este residuo DDMP está ampliamente distribuido entre legumbres como frijoles, cacahuates y garbanzos (Yoshiki *et al.*, 1998).

Acacia farnesiana presenta contenidos en el rango de 0.01 a 4.5 $\mu\text{mol/g}$ en peso seco de muestras obtenidas en diferentes épocas del año. Para que esta leguminosa sea tóxica por saponinas, es necesaria la presencia la β -glucosidasa, una enzima vegetal de acción extracelular, por lo que actúa sólo cuando la planta es destruida física o químicamente. A su vez, la β -glucosidasa puede ser inactivada por la saliva y los jugos gástricos. Asimismo se ha reportado la presencia de inhibidores de tripsina y de quimotripsina en las semillas de algunas leguminosas del género *Acacia* (Ochoa, 1984). Tampoco podemos ignorar el reporte de Velázquez *et al.* en 2011 donde las vainas de AF mostraron ser un factor antinutricio en cantidades de inclusión superiores al 30% en la dieta de ovinos Pelibuey con un contenido de taninos de 0.29% registrándose una disminución en la producción de gas, lo que impactó negativamente sobre el aporte de energía metabolizable aunque no presentó efecto negativo sobre la desaparición *in vitro* de la materia seca. Este fenómeno es debido, quizás, a la presencia de múltiples grupos hidroxilo de las moléculas de polifenoles que interactúan no sólo con las proteínas del alimento ingerido, sino con enzimas digestivas afectando la disponibilidad biológica de los nutrimentos, disminuyendo su absorción y metabolismo sumándose la formación de complejos con iones divalentes como el hierro que trae como consecuencia una baja biodisponibilidad de estos metales (Parr y Bolwell, 2002). De manera positiva al uso de esta planta, Ramírez y Lara (1998) obtuvieron resultados utilizando esta leguminosa en el Noreste de México como suplemento para ovejas, y así mejoraron el contenido proteínico aportando un 9.4% de proteína cruda, concluyendo que puede ser incorporada dentro de los sistemas de alimentación. Asimismo Ramírez *et al.*

(2000), mostró la efectiva degradabilidad de la pared celular de la *Acacia farnesiana* que contiene tanto un alto contenido proteínico del 21.2%, como de lignina con 14.3%.

II.14 El jerbo (*Meriones unguiculatus*) como modelo biológico

El jerbo (*Meriones unguiculatus*) conocido como jerbo de Mongolia, es un roedor que ha mostrado ser naturalmente sensible a condiciones de estrés ambiental y responde de manera ágil a la recuperación por daño inducido (Coral *et al.*, 2005); reflejándose de forma directa sobre las concentraciones de diferentes indicadores como peroxidasa o superóxido dismutasa (Capistrán y Flores, 2009).

El volumen total de sangre en jerbos adultos (71-80 g de peso corporal) es aproximadamente de 3.5-7.0 ml, por lo tanto, tomas de muestras sanguíneas mayores al 10% (0.3-0.7 ml) conllevan el riesgo de provocar choque hipovolémico (Morton *et al.*, 1993). Asimismo, desde el momento del destete los jerbos se mantienen en cajas con 4-6 animales de la misma camada y sexo, estableciendo jerarquías etológicas y no se recomienda alterar esta distribución.

En el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, se garantiza una producción continua y controlada de animales de acuerdo los reglamentos internos y externos lo que asegura la disponibilidad de jerbos para los estudios programados.



Imagen 2. Jerbo (*Meriones unguiculatus*)

III. OBJETIVOS

III.1 General

Determinar el efecto antioxidante del extracto de vainas de *Acacia farnesiana* (AF) *in vitro* e *in vivo*.

III.2 Particulares

III.2.1 Cuantificar polifenoles totales, flavonoides y ácidos hidroxycinámicos de los extractos de las vainas de *Acacia farnesiana*.

III.2.3 Determinar la actividad antioxidante *in vitro* frente al radical libre DPPH de soluciones acuosas de extractos de vainas de *Acacia farnesiana* a tres concentraciones (8, 16 y 32 mg de polifenoles totales/ml).

III.2.4 Determinar la actividad antioxidante *in vivo* en el plasma del jerbo (*Meriones unguiculatus*) dosificado oralmente con soluciones acuosas del extracto de vainas de *Acacia farnesiana* a tres concentraciones (8, 16 y 32 mg polifenoles totales/ml) frente al radical libre DPPH y peroxilo (ORAC).

IV. JUSTIFICACIÓN

Los frutos de *Acacia farnesiana* (AF) presentan diversos usos poco explotados, destacándose aquellos relacionados a la medicina tradicional y como recurso forrajero particularmente para animales rumiantes. Las condiciones silvestres que presenta este recurso vegetal para su reproducción y desarrollo conlleva una ayuda a la económica de quienes tienen necesidad de su empleo.

Numerosos reportes señalan relevantes concentraciones de compuestos polifenólicos en extractos de diversas fracciones de especies del género *Acacia*, incluyendo las vainas. Estos extractos presentan propiedades antioxidantes *in vitro*, sugiriendo el uso de las vainas de AF como fuente de compuestos bioactivos benéficos a la salud con potenciales aplicaciones terapéuticas en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades humanas sobre todo en aquellos padecimientos asociados al aumento del estrés oxidante. Asimismo, existe interés en la presencia o adición de compuestos antioxidantes de origen natural en alimentos para conservar la calidad sensorial y nutrimental así como reducir los riesgos a la salud que pueden implicar los compuestos sintéticos. Por otra parte se observa la importancia de los alimentos funcionales, donde el consumidor valora la presencia de compuestos bioactivos como un valor agregado que favorece a la salud.

Debido a la alta actividad antioxidante de las vainas de *Acacia farnesiana* demostradas *in vitro*, resulta conveniente la realización de pruebas *in vivo*. En este sentido el presente estudio tiene como parte de sus objetivos conocer el efecto protector de las vainas de *Acacia farnesiana* en el plasma, respecto a importantes compuestos y moléculas oxidantes.

V. HIPÓTESIS

La administración oral durante cinco días de diferentes concentraciones del extracto frutal de *Acacia farnesiana* (AF), no afectará la respuesta antioxidante en el plasma del jerbo (*Meriones unguiculatus*) frente a radicales libres.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó conjuntamente en las instalaciones de los Departamentos de Nutrición Animal e Investigación Experimental y Bioterio, ambos ubicados en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNZS), así como el laboratorio 209 del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

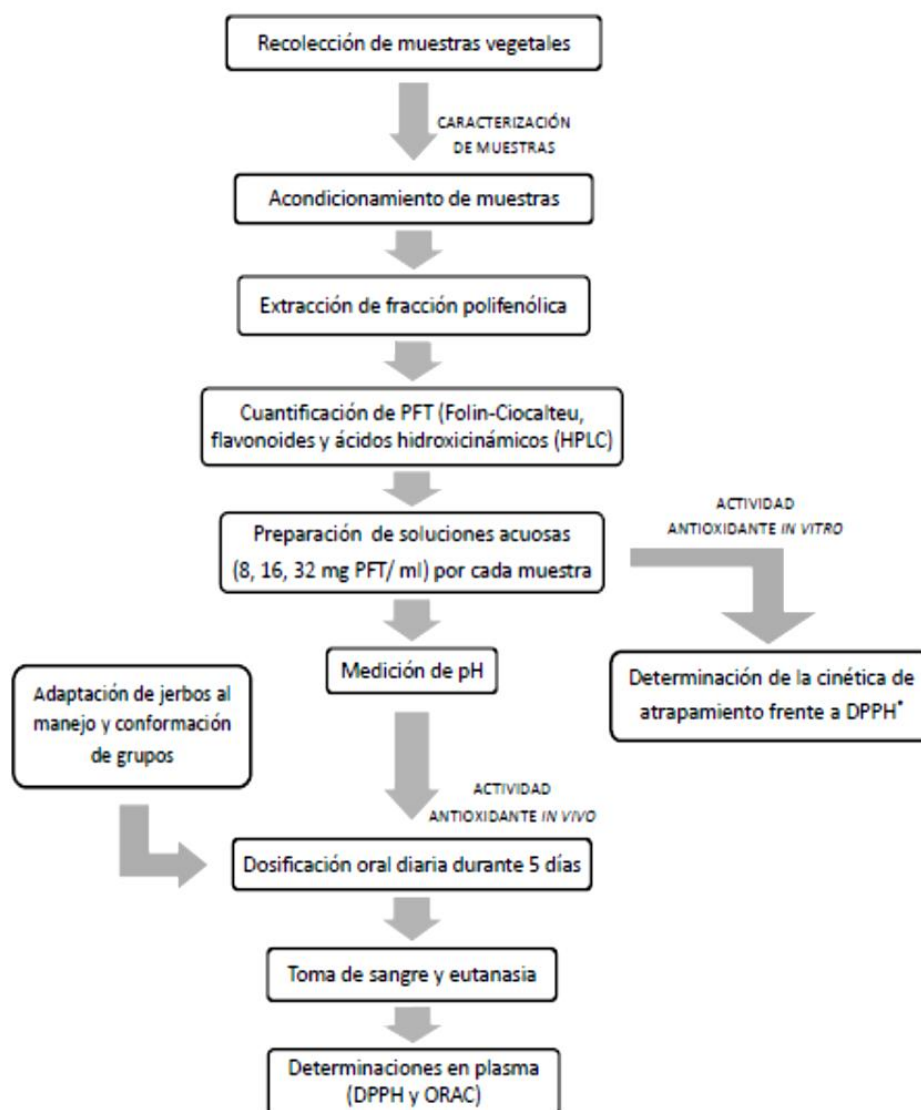


Figura 12. Diagrama de bloques de la estrategia experimental

VI.1 Material vegetal

Cuatro arbustos (2.5 ± 0.5 m de altura) de *Acacia farnesiana* (L.) Willd fueron identificados dentro del agostadero del rancho “La Magdalena”, situado en San Juan de Río, Querétaro, México (Anexo X.1). El clima es descrito como seco estepario, semiárido con lluvias escasas (precipitación media anual en verano de 460 mm) y un periodo de sequía de 6 a 8 meses (García, 1973). De estos arbustos fueron colectados 2 kilogramos de frutos (vainas) durante el mes de agosto de 2012. Las vainas de cada arbusto fueron identificadas como M1, M2, M3 y M4, siendo almacenadas individualmente en bolsas de papel protegiéndolas de la luz y permitiendo su aireación durante el transporte. Cada muestra fue secada durante 48 horas a 40°C usando una estufa de flujo atmosférico (Apex, A39092). Una vez secas, las vainas fueron molidas empleando un molino de cuchillas (Thomas Scientific, 174931) y tamizadas a tamaño de partícula de 1 mm. Finalmente, las muestras fueron almacenadas en un lugar fresco y seco resguardándose de la luz.

VI.2 Reactivos químicos, soluciones y materiales

En el anexo X.2 se presentan los reactivos químicos, soluciones y materiales empleados en el estudio, donde se detalla marca, catálogo y lote para cada uno.

VI.3 Análisis químicos

VI.3.1 Extracción del material vegetal

20 gramos de cada muestra de las vainas de *Acacia farnesiana* (L.) Willd fueron colocados en un matraz de Erlenmeyer de 250 ml, añadiéndose 100 ml de una solución de metanol-agua (80:20, v/v), dejándose en agitación por 24 horas a temperatura ambiente protegidas de la luz; transcurrido este periodo las muestras fueron filtradas usando papel filtro 0.22 mm marca Millipore y concentradas con un Rotavapor Büchi modelo R-205 empleando baño de agua a una temperatura menor a los 40°C. El extracto seco se trasvasó a viales protegidos de la luz, con lavados consecutivos usando la menor cantidad de metanol posible (10 ml totales) y colocados en un desecador con salida a vacío durante una semana. Los extractos

fueron almacenados protegidos de la luz y a temperatura de refrigeración (4°C) hasta su análisis.

VI.3.2 Caracterización del extracto vegetal

VI.3.2.1. Determinación de polifenoles totales

Para realizar la cuantificación de polifenoles totales se resuspendieron 0.5 g de cada extracto en 5 ml de metanol. Siguiendo el método de Folin-Ciocalteu descrito por Katalinic *et al.* (2006), a 0.5 ml del extracto previamente resuspendido y filtrado se le adicionaron 5 ml de una solución de HCl al 3%, tomándose una alícuota de 100 µl de la solución resultante y se agregaron 2 ml de una solución de Na₂CO₃ al 2%, al término de 2 minutos, fueron adicionados 100 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido con agua destilada (1:1); la solución resultante, se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, al término del periodo se realizó la medición de su absorbancia (750 nm) empleando un espectrofotómetro Beckman DU-65. Para calcular la concentración de fenoles totales se realizó una curva patrón empleando ácido gálico como estándar de referencia (Anexo X.3), los resultados fueron expresados en mg de equivalentes de ácido gálico/g muestra.

VI.3.2.2 Determinación de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos a través de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

VI.3.2.2.1 Flavonoides

Para la preparación de las soluciones estándar de epicatequina y quercetina, 10 mg de cada estándar y se colocaron por separado en matraces aforados de 10 ml color ámbar, aforándose con metanol para obtener una concentración 1 mg/ml. Para el acondicionamiento de las muestras de extracto, se tomaron 5 ml del extracto preparado anteriormente (0.5 g extracto/5 ml metanol) y se filtró con un filtro jeringa (25 mm, 0.45 mm, marca Corning Incorporated); el filtrado recuperado se diluyó 1:5 en metanol y se inyectó directamente en el equipo de análisis. El equipo de HPCL utilizado fue de la marca Waters e2695 (módulo de separación) y Waters 2489 (detector UV/Vis). Las condiciones del equipo para la

identificación de flavonoides fueron: Columna symmetry C18 (250 x 4.6 mm) de Waters (EUA), fase móvil: H₂O/acetonitrilo/metanol/acetato de etilo/ácido acético glacial (89:6:1:3:1, v/v/v/v), con un flujo de 1 ml/min, temperatura de 25 °C; sistema de detección UV 280 nm con inyecciones de 30 µl y tiempo de corrida de 30 minutos. Los valores de las curvas de calibración (anexos X.4.1 y X.4.2) y las concentraciones en las muestras vegetales fueron analizados con el programa Empower.

VI.3.2.2.2 Ácidos hidroxicinámicos

Se prepararon los estándares de ácidos hidroxicinámicos: ácido clorogénico, cafeico y gálico; empleando 10 mg de cada uno y se colocaron por separado en matraces de 10 ml de color ámbar, aforando con metanol a 1 mg/ml. Para la preparación de las muestras se tomaron 5 ml del extracto metanólico y se filtró con un filtro jeringa (25 mm, 0.45 mm, marca Corning Incorporated); el filtrado recuperado se diluyó 1:5 en metanol y se inyectó directamente en el equipo de análisis. El equipo de HPCL utilizado fue de la marca Waters e2695 (módulo de separación) y Waters 2489 (detector UV/Vis). Las condiciones de HPLC para la identificación de ácidos hidroxicinámicos fueron: Columna symmetry C18 (250 x 4.6mm) de Waters (EUA), empleando una fase móvil de metanol-ácido fosfórico 0.001M (23:77 v/v), con flujo de 1 ml/min, temperatura de 25°C; sistema de detección UV 280 nm inyectándose 30 µl de cada estándar con un tiempo de corrida de 30 minutos. Los valores de las curvas de calibración (anexos X.4.3, X.4.4 y X.4.5) y las concentraciones de ácidos hidroxicinámicos de las muestras vegetales fueron analizados con el programa Empower.

VI.3.3 Preparación de soluciones acuosas del extracto de *Acacia farnesiana* y determinación de su pH

Una vez conocido el contenido de polifenoles totales, se prepararon las soluciones acuosas a dosificar de cada extracto vegetal, obteniéndose 20 ml de solución acuosa en concentraciones de 8, 16, 32 mg de polifenoles totales (PFT)/ml por muestra vegetal. El efecto de disolución del extracto de *Acacia farnesiana* fue

facilitado utilizando agua a 30°C. Posteriormente se determinó el nivel de pH de estas soluciones a dosificar empleando un potenciómetro Hanna Instruments (23.7°C) previamente calibrado con soluciones buffer 4.0, 7.0, y 10.0.

VI.4 Actividad secuestrante de los extractos de las vainas de *Acacia farnesiana* frente al radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

Para determinar el valor de absorbancia de una solución definida como “blanco”, se transfirió 1 ml de la solución blanco a una celda de cristal de cuarzo, para realizar el ajuste de la absorbancia a cero, empleando un espectrofotómetro Beckman DU-65 donde la longitud de onda de la luz visible se ajustó a 517 nm.

Para las determinaciones de actividad antioxidante de las muestras, en tubos de ensaye (por triplicado) se agregaron 2 ml de solución de radical DPPH a concentración de $3.6 \times 10^{-5}M$ en metanol. Posteriormente se agregaron 0.2 ml de las soluciones a evaluar (distintas concentraciones acuosas de los extracto de AF), inmediatamente se transfirieron a celdas y se observó el cambio de la absorbancia cada 5 minutos en seis tiempos sucesivos. Se usaron como patrones de referencia quercetina (100 mg/l) y ácido ascórbico (68 y 200 mg/l). Con las absorbancias obtenidas se calculó el porcentaje de actividad secuestrante del radical DPPH de acuerdo a la siguiente ecuación:

Ecuación 3. Coeficiente de actividad secuestrante del DPPH' (Taga *et al.*, 1984)

$$\% \text{ actividad secuestrante del radical DPPH} = \frac{\text{Abs}_{\text{tiempo cero}} - \text{Abs}_{\text{tiempo final}}}{\text{Abs}_{\text{tiempo cero}}} * 100$$

Abs_{tiempo cero} = Absorbancia inicial del DPPH'

Abs_{tiempo final} = Absorbancia del DPPH' a 30 min.

VI.5 Modelo experimental, manejo y dosificación de extractos vegetales

Se emplearon un total de 72 jerbos (*Meriones unguiculatus*) integrados por machos y hembras de 10 a 18 semanas de edad comprendidos en un rango de peso corporal (PC) entre 65 y 89 g. El pie de cría procedió del Centro Charles River (EUA) y los jerbos utilizados fueron criados y manipulados de acuerdo al

Reglamento para la obtención, mantenimiento y utilización de animales para investigación del INCMNSZ, basado en la NOM-062-ZOO-1999, la Ley General de Salud (1985) y su reglamento (1988), así como en los lineamientos internacionales para la investigación biomédica con animales (Bankowski, Z., M.D. 1985). Los animales contaron con acceso libre al agua y al alimento para roedores (Laboratory Rodent Diet 5001; proteína: 23.0%, grasa: 4.5%, fibra: 6.0%, cenizas: 8.0%); alojándose en cajas de policarbonato transparente (56 x 28 x 23 cm) de piso sólido; provistas con viruta convencional que garantiza la absorción de orina, excremento y desperdicio de agua, además favorecer el aislamiento térmico y construcción de nido (NOM-062-ZOO-1999). La temperatura ambiental fluctuó entre los 21 y 23°C, con una humedad relativa de entre 40 y 60% y ciclos de luz-oscuridad de 12 x 12 horas. La adaptación de los animales incluyó el contacto físico durante el cambio de caja y registro de peso durante dos semanas previas al inicio de la dosificación.

Se conformaron un total de 15 grupos con una distribución aleatoria. Del total de grupos, 12 fueron experimentales a razón de 4 jerbos por grupo: para cada muestra vegetal se establecieron tres grupos correspondientes a las dosis 8, 16 y 32 mg polifenoles/ 100g de peso corporal/ día. Asimismo se asignaron 8 animales a cada grupo control: grupo 13 utilizado como testigo negativo recibió agua acidificada (empleada cotidianamente en el Bioterio con pH= 3.5) vía oral, en un volumen acorde a su peso (1ml/100 g PC/día); el grupo 14 que fue dosificado (también vía oral) con una solución acuosa de ácido ascórbico 500 mg/l (1ml/100 g PC/día), denominándose como control positivo; asimismo se asignó el grupo 15 que se utilizó como grupo basal, el cual NO recibió tratamiento alguno hasta el día del sacrificio. La dosificación se realizó con una sonda esofágica metálica (de 7 cm de longitud y punta redonda) a las 8:00 horas, diariamente, durante 5 días.

VI.6 Manejo de la muestra sanguínea y eutanasia

Una hora después de la última dosificación, los animales fueron inyectados intraperitonealmente con 1ml/100 g de peso corporal de una solución de ketamina/xilacina (7.0 y 0.8 mg/ml, respectivamente). Una vez perdidos los reflejos

ocular y patelar, se colocó al animal en posición decúbito dorsal sobre una superficie plana cubierta con papel absorbente, auxiliándose de cinta adhesiva para facilitar la separación de las extremidades del jerbo. El pelo de la región torácica fue humedecido para despejar el área de punción, misma que se realizó al corazón en una sola ocasión; obteniendo como mínimo 1 ml de sangre. Cada muestra de sangre fue colectada en un tubo con el anticoagulante (ácido etilendiaminotetraacético, EDTA, BD Vacutainer), asegurándose de garantizar el contacto de la muestra con el anticoagulante impregnado sobre las paredes del tubo. Por otra parte, para aseverar la eutanasia, los animales fueron dislocados cervicalmente y sus cadáveres descartados de acuerdo a las normas internas del Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del INCMNSZ.

VI.7 Actividad antioxidante en plasma por atrapamiento del DPPH'

Esta prueba de determinación de actividad antioxidante, se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por *Koren et al. (2010)*. Una vez obtenido el plasma, se prepararon por duplicado tubos de reacción con 25 µl de solución salina, 25 µl de plasma y 50 µl de la solución del radical libre DPPH (1 mmol/l, preparado previo al uso y protegido de la luz). Paralelamente a estos tubos, se acondicionaron los tubos de reacción "blancos de corrida" (realizados también por duplicado), donde el plasma fue sustituido con 25 µl de la solución "Hank's Balance Salt Solution" (Anexo X.5). Todos los tubos de reacción se incubaron durante dos minutos sin invertir, a temperatura ambiente en obscuridad. Posteriormente se agregaron 800 µl de metanol absoluto, se homogenizaron por inversión y nuevamente se incubaron dos minutos en las condiciones ya descritas. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 2680 rpm durante dos minutos y se determinó la absorbancia a 517 nm del sobrenadante de cada tubo por duplicado usando un equipo Synergy HT (Biotek, Winooski; VT, EUA) y software Gen 5.1.

La capacidad de atrapamiento de DPPH' del plasma se determinó como la diferencia porcentual entre densidades ópticas de cada plasma respecto a aquella mostrada por su correspondiente "blanco de corrida" o denominado solo "blanco".

El valor de densidad óptica (D.O.) del blanco es equivalente al porcentaje de generación máxima (100%) del radical DPPH, determinado por el siguiente cálculo:

$$\% \text{ generación blanco} = (\text{D.O. blanco}) * 100 / (\text{D.O. blanco}) = 100\%.$$

A su vez el porcentaje de atrapamiento de DPPH' del blanco es la resta:

$$100 - (\% \text{ generación blanco}) = 0\% \text{ atrapamiento blanco.}$$

Los porcentajes (%) de generación y atrapamiento de cada plasma, obedecen al siguiente cálculo:

$$\% \text{ de generación de la muestra} = (\text{D.O. muestra}) * 100 / (\text{D.O. blanco})$$

$$\% \text{ atrapamiento de la muestra} = 100 - (\% \text{ de generación muestra})$$

El % atrapamiento de cada plasma refleja su capacidad para secuestrar DPPH' respecto al 0% de capacidad de atrapamiento del blanco ya que en este último el DPPH' se encuentra íntegramente en su forma radical.

VI.8 Actividad antioxidante en plasma por ensayo ORAC (capacidad de absorción de radicales oxígeno)

Siguiendo el procedimiento del ensayo ORAC para compuestos hidrofílicos descrito por Huang *et al.* (2002), se prepararon soluciones estándares: una de fluoresceína 4 µM (Anexo X.6) y seis de trolox en concentraciones 4.0, 8.0, 20.0, 40.0, 60.0 y 80.0 µM (Anexo X.7), las soluciones fueron almacenadas a -80°C y a temperatura de refrigeración (4°C), respectivamente. Del mismo modo, con anterioridad se dispusieron en tubos de ensayo la cantidad de 0.0828 g de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) dihidrocloruro (AAPH) para ser llevados a solubilizar con 2 ml de amortiguador de fosfatos 75 mM pH=7.4, hasta el momento de su utilización. En cada ensayo, se realizó la dilución (1:400) de los plasmas a evaluar empleando la mencionada solución amortiguadora de fosfatos.

El ensayo ORAC se realizó en placas negras de fondo opaco (Corning, 3915), distribuyéndose por duplicado: 25 µl de cada concentración de estándar de trolox. Asimismo se colocaron 25 µl de solución amortiguadora de fosfatos 75 mM

(usada como blanco). Dentro de la misma placa pero en pozos diferentes a los mencionados se colocaron 25 μl de las muestras de plasma diluido, también por duplicado. Paralelamente, se agitó en un vortex la disolución del reactivo AAPH (previamente señalada) e inmediatamente se agregaron 25 μl en de cada pozo de reacción (estándares, blancos y muestra). Posteriormente, se agregaron 150 μl de fluoresceína 50 nM dentro de todos los pozos de reacción. En seguida, la placa fue colocada en el equipo Synergy modelo HT (marca Biotek) y leída cada minuto durante 1.5 horas a longitud de excitación de 485 nm y emisión de 530 nm. La lectura fue controlada por el software Gen 5.1.

La capacidad de atrapamiento de radicales peroxilo por parte de las sustancias (estándar, blanco o muestra), fue monitoreada a través de la cinética del decremento de la fluorescencia. Esta información fue usada para determinar los valores de áreas bajo la curva netas (ABC) de cada sustancia. Los valores de ABC correspondientes al blanco y las concentraciones del estándar de trolox generaron una curva de calibración (Anexo X.8) a partir de la cual se interpolaron los valores de ABC de las muestras y se determinó la equivalencia respecto a trolox.

VI. 9 Diseño estadístico del estudio

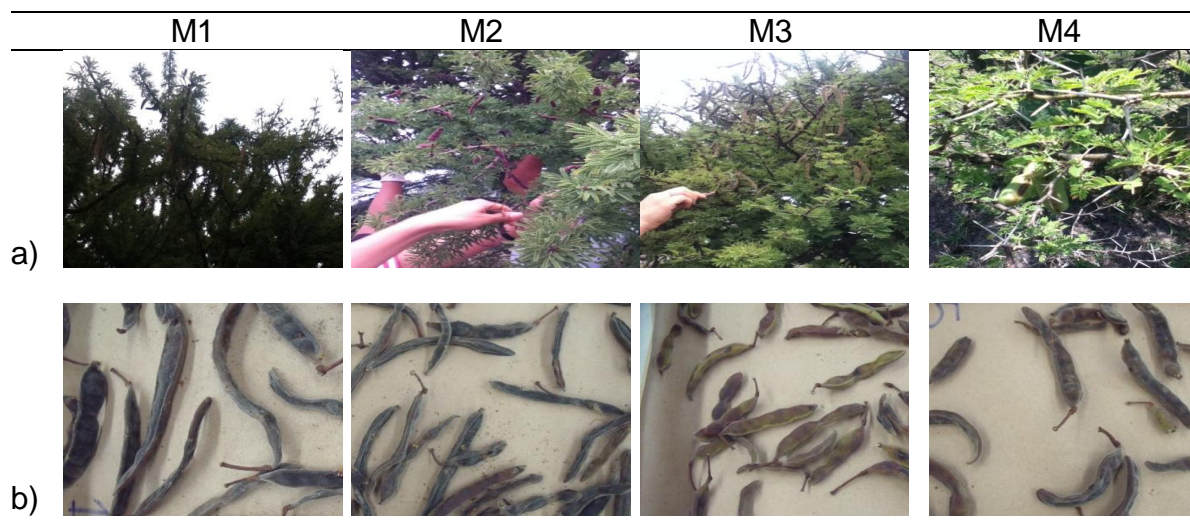
Los resultados de capacidad secuestrante *in vitro*, así como la capacidad antioxidante *in vivo* para los métodos de DPPH y ORAC, determinados en el total de las muestras de plasma; fueron procesados con el paquete estadístico Statistical Analysis System (2003) donde se probó la significancia de los tratamientos (dosis y controles), utilizando la prueba de Tukey con un nivel de $\alpha=0.05$. Donde se estableció la siguiente hipótesis nula para los distintos tratamientos, $H_0 = \mu_1 = \mu_2 \dots \mu_{14} = \mu_{15}$.

VII. RESULTADOS

VII.1 Rendimiento de las muestras de vainas de *Acacia farnesiana* respecto al secado y extracción

En las siguientes imágenes, se observan los arbustos del material vegetal identificado como *Acacia farnesiana* y sus frutos recolectados sometidos a secado.

Imagen 3. a) Arbustos y b) frutos secos de *Acacia farnesiana* muestreados



Concerniente al secado de las vainas frescas (cuadro 6), se observó que las muestras colectadas presentaron valores del 53.86 al 61.60% y un contenido humedad en el intervalo de 38.40 a 46.14% (p/p). Asimismo, con el método de extracción empleado se obtuvo un rendimiento promedio de la fracción polifenólica (extracto final) de $39.60 \pm 7.67\%$ (p/p) en base al material vegetal seco y molido.

Cuadro 6. Rendimiento (% p/p) del secado y de la extracción de muestras de vainas de *Acacia farnesiana*

Muestra	Rendimiento del secado	Humedad de vainas	Rendimiento de la extracción
M1	56.53	43.47	38.87
M2	59.29	40.71	30.30
M3	61.60	38.40	39.96
M4	53.86	46.14	48.15
Promedio	57.82 ± 3.35	42.18 ± 3.35	39.60 ± 7.67

VII.2 Cuantificación de polifenoles totales y determinación de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

A partir del extracto final se determinó (**cuadro 7**) la presencia de compuestos polifenólicos totales (PFT) en una concentración promedio de 76.13 ± 6.98 mg / g de extracto final, lo cual representa un contenido de 30.43 ± 7.80 /g de base seca y molida y 1.7% respecto al material húmedo. En este mismo cuadro, observamos el mayor contenido de polifenoles totales para la muestra M4, con 84.59 ± 1.22 mg de PFT/ g de extracto total.

Cuadro 7. Concentración de polifenoles totales (mg de equivalentes de ácido gálico/g) en las muestras de *Acacia farnesiana* y sus extractos, además del contenido de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos (mg/g extracto final)

Polifenoles Totales	Muestra 1 de vainas (M1)	Muestra 2 de vainas (M2)	Muestra 3 de vainas (M3)	Muestra 4 de vainas (M4)	Promedio
Vaina húmeda	16.51 ± 0.41	11.91 ± 0.24	19.30 ± 0.22	22.12 ± 0.32	17.46 ± 3.94
Vaina seca	29.21 ± 0.73	20.10 ± 0.41	31.34 ± 0.36	41.07 ± 0.59	30.43 ± 7.80
Extracto final	75.16 ± 1.87	66.34 ± 1.36	78.43 ± 0.90	84.59 ± 1.22	76.13 ± 6.98
Flavonoides					
Epicatequina	0.337 ± 0.003	0.254 ± 0.003	0.312 ± 0.003	0.395 ± 0.006	0.324 ± 0.058
Quercetina	0.510 ± 0.003	0.485 ± 0.003	0.507 ± 0.003	0.483 ± 0.004	0.496 ± 0.014
Ácidos hidroxicinámicos					
Ácido Gálico	0.144 ± 0.004	0.092 ± 0.003	0.125 ± 0.003	0.153 ± 0.001	0.121 ± 0.027
Ácido Cafeíco	0.209 ± 0.007	0.086 ± 0.004	0.145 ± 0.006	0.188 ± 0.003	0.157 ± 0.054
Ácido Clorogénico	0.224 ± 0.004	0.121 ± 0.003	0.218 ± 0.006	0.164 ± 0.004	0.182 ± 0.049

En relación a la identificación y cuantificación de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos a través de HPLC, permitió cuantificar distintos componentes (**cuadro 7**), de los cuales el compuesto flavonoide más abundante fue quercetina con 0.510 mg/g de extracto; mientras que para los ácidos hidroxicinámicos el mayor contenido correspondió al ácido clorogénico con 0.224 mg/g de extracto. Estos valores superiores de quercetina y ácido clorogénico se determinaron en la muestra de vainas identificadas como M1.

VII.3 Valoración de pH de las soluciones de dosificación

Respecto a la solubilidad del extracto, se observó una total disolución de las concentraciones 8, 16 y 32 mg PF/ml de agua tibia; cumpliendo con una de las propiedades planteadas por Bate-Smith y Swain (Haslam, 1998) quienes refieren a los compuestos polifenólicos como compuestos solubles en agua. Durante la preparación de las distintas soluciones del extracto se percibió un agradable aroma parecido a frutas, lo cual quizás favoreció su aceptación por parte de los jerbos. La valoración de pH de las soluciones administradas mostró un valor superior a 4 (**cuadro 8**) en todas la soluciones; estos valores estuvieron por encima del valor de acidez del agua de bebida (pH=3.5) suministrada normalmente en bioterio, reduciendo con ello el riesgo de lesión en la mucosa gástrica de los animales.

Cuadro 8. pH de tres soluciones (mg/ml) de polifenoles totales de diferentes muestras de AF administradas a los animales experimentales

Polifenoles totales	M1	M2	M3	M4	Promedio
8	4.27	4.43	4.50	4.48	4.42±0.10
16	4.29	4.44	4.48	4.49	4.42±0.09
32	4.43	4.45	4.51	4.55	4.48±0.05

VII.4 Actividad secuestrante *in vitro* de las soluciones de dosificación de las diferentes muestras de vainas de *Acacia farnesiana* frente al radical libre DPPH

En el **cuadro 9**, se muestran los resultados de la actividad secuestrante (%) *in vitro* de las muestras de vainas de AF frente al radical libre DPPH a las concentraciones 8, 16 y 32 mg PFT /ml; exponiendo una tendencia negativa promedio en relación a la concentración. Dicho efecto de abatimiento directo no se presentó en la M1 cuya concentración 16 mg/ml marcó el valor más alto de actividad antioxidante no sólo para sus otras concentraciones sino respecto al total de muestras evaluadas en las correspondientes concentraciones. En este sentido, la M1 a 16 mg de PFT fue superior estadísticamente ($P<0.05$) respecto al resto de las muestras pero no respecto de los estándares con valores de 92.38% para el ácido ascórbico (200 mg/l) y 82.58% para quercetina (100 mg/l).

Cuadro 9. Capacidad secuestraste *in vitro* (%) frente al radical DPPH para diferentes concentraciones de polifenoles de vainas de *Acacia farnesiana* (mg/ml) y soluciones estándar de ácido ascórbico y quercetina (mg/l)

Concentración	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Promedio
8	29.52 ^{dA}	29.10 ^{dA}	16.43 ^{dA}	29.20 ^{dA}	26.06
	±0.52	±2.37	±1.26	±1.02	±5.93
16	49.64 ^{cA}	22.11 ^{dB}	1.77 ^{fD}	13.96 ^{eC}	21.73
	±0.70	±2.38	±0.23	±2.27	±18.60
32	-17.66 ^{gC}	-6.29 ^{fA}	-0.91 ^{fB}	-4.91 ^{fB}	-7.44
	±0.45	±0.83	±1.99	±0.37	±6.56
Estándares					
Concentración	Ácido ascórbico		Quercetina		
200	92.3 ^a ±0.01		ND		
100	ND		82.58 ^b ±5.42		
68	74.91 ^c ±0.25		ND		

^{a,b,c,d,e,f,g} Literales diferentes en minúscula indican diferencia estadística significativa ($P<0.05$) entre las muestras a diferentes concentraciones y entre estándares. ^{A,B,C} Literales diferentes en mayúscula indican diferencia estadística significativa ($P<0.05$) entre las muestras a la misma concentración.

Al comparar la actividad antioxidante de la M1 a 16mg frente al ácido ascórbico 200 mg/ml, resulta interesante mencionar que ésta registró una equivalencia de 53.73% frente al estándar. Por otra parte, al observar la respuesta entre la misma concentración para las 4 muestras, es posible apreciar que a 8 mg de PFT los valores oscilaron entre 16.43 y 29.52% sin registrarse diferencias estadísticas significativas ($P>0.05$) apreciado por la igualdad de las literales mayúsculas; mientras que a 16 y 32 mg se registró un comportamiento muy variable.

VII.5 Respuesta de los animales experimentales al manejo y registro de peso corporal

En el **cuadro 10** se muestra el registro de peso promedio de los jerbos, donde se aprecia que la especie incrementa entre 0.1 y 0.5 g de peso a la semana. Ésta condición está determinada por la edad y el sexo del animal observándose que las hembras son mucho más ligeras en peso que los machos, lo que influyó para que las actividades de registro de peso, dosificación y toma de sangre se realizaran inicialmente con machos y continuaran con la inclusión de hembras; ello a fin de emplear grupos de trabajo conformados por animales con el peso suficiente para garantizar el abasto del volumen sanguíneo requerido.

Cuadro 10. Peso vivo (g) de los jerbos (*Meriones unguiculatus*)

Pesaje	Edad de los jerbos (días)	Peso promedio jerbos (g)		Número de animales
		Machos	Hembras	
1	70-84	77.8 ± 1.6	ND	16
2	85-98	78.7 ± 6.6	75.9 ± 5.1	20
3	99-112	79.6 ± 5.1	76.1 ± 3.6	20
4	>113	ND	76.2 ± 5.1	16

ND = No determinado

En este sentido, se observó un incremento de peso en la mayoría de los jerbos del estudio; coincidiendo con los reportes del Charles-River Center (2010).

En estos animales puede descartarse malestar provocado durante el sondeo al no existir variación de conducta. No obstante algunos individuos presentaron respuestas adversas generadas por la administración del extracto vegetal en los siguientes tratamientos: M1-16mg de polifenoles (1 jerbo), M1-32mg (1 jerbo), la muestra M4 para las dosis 8mg (1 jerbo) y 32mg (1 jerbo). Las conductas desfavorables respecto a integrantes de su mismo tratamiento y al grupo basal fueron: disminución de actividad física y exploratoria, aislamiento o posición encorvada, disminución del consumo de alimento con una consecuente disminución de peso y en algunos casos la muerte. Se descarta alguna irritación de mucosa gástrica o lesión física por ausencia de heces sanguinolentas o diarrea. Estos cuatro individuos afectados representan un 8.3 % de los 48 jerbos experimentales y un 5.5 % del total de 72 jerbos monitoreados.

La adaptación de los jerbos (excluyendo a los individuos correspondientes al grupo basal) durante dos semanas previas al inicio del experimento con el objetivo de disminuir la sensibilidad propia de la especie frente a modificaciones de su rutina; mostró efectivamente, una mejora de la respuesta del animal ante la sujeción, el marcaje y pesaje conforme avanzaron las sesiones. Cabe mencionar que esta especie es exploradora y continuamente recorre y olfatea el ambiente; mostrando una respuesta inmediata a los cambios en los sonidos del ambiente. Características que permitieron identificar si se establecían episodios de catalepsia; mismos que ocurrieron durante el pesaje, en los que claramente algunos animales permanecieron paralizados por algunos segundos al colocarlos en la canastilla de pesaje, sosteniéndose por varios segundos. Estos episodios de catalepsia son parte de la conducta propia de la especie ante situaciones de estrés y constituyen una forma de adaptación y supervivencia.

VII.6 Dosificación de las soluciones experimentales

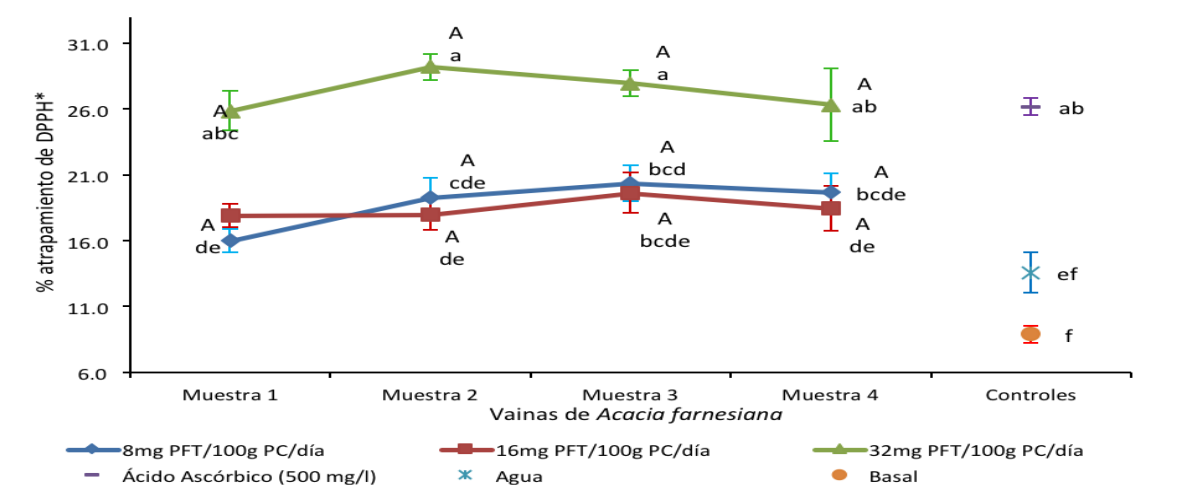
De acuerdo a las pruebas de llenado de la cavidad estomacal, se recomienda la dosificación vía oral de un volumen no mayor a 2 ml para un jerbo de 8 semanas de edad (73 g de peso corporal). Asimismo el uso de sonda

esofágica como material de administración ofreció resultados eficientes; garantizando una dosificación que se considera como “total”. A la edad adulta los jerbos (10 semanas) alcanzan un peso corporal de entre 71 y 80 g; alcanzando un volumen sanguíneo de entre el 3.5 a 7 ml. Una toma de sangre superior al 10% genera daños en la salud del animal (Morton *et al.*, 1993). Para los fines de este estudio, se requirió extraer un volumen de 2 ml a fin de garantizar un buen abastecimiento de muestra. Lo cual comprometió la vida del organismo y fue necesaria la realización de la eutanasia; procedimiento previamente señalado y autorizado por la Comisión de Investigación en Animales (CINVA) del INCMNSZ.

VII.7 Capacidad secuestrante del plasma del jerbo, frente al radical DPPH

En la **gráfica 1** se observa que las tres concentraciones estudiadas (8, 16 y 32 mg de PFT/ml) presentaron una tendencia similar para las cuatro muestras de vainas evaluadas, esta similitud fue estadísticamente válida cuando las concentraciones comparten la literal mayúscula, indicando que no existe diferencia significativa ($P>0.05$) de capacidad antioxidante entre muestras de vainas de AF para una misma concentración.

Gráfica 1. Capacidad secuestrante (% atrapamiento de DPPH*) y error estadístico de plasma de jerbo expuesto a diferentes tratamientos: polifenoles (mg/ml/100 g PC/día) de vainas de *Acacia farnesiana* (8, 16 y 32 mg), ácido ascórbico (500 mg/l) y agua (ml/100 g PC/día); además de un grupo basal frente al radical DPPH.



Literales distintas indican diferencia estadística significativa ($P<0.05$) entre los distintos tratamientos experimentales y controles (ácido ascórbico (500 mg/l), agua y basal). ^A Literales iguales indican que no existe diferencia estadística significativa ($P>0.05$) entre las muestras de vainas correspondientes a la misma dosis.

En este sentido, al comparar 8 y 16 mg de PFT respecto al control negativo (agua), se observó que la mayoría de las muestras no presentaron diferencia estadística significativa ($P>0.05$) respecto a dicho control; excluyendo únicamente de este comportamiento a los valores registrados por la muestra M3 (8 mg de PFT), la cual se diferenció estadísticamente del agua y basal al mismo tiempo que comparte literales con el ácido ascórbico (500 mg/l); sin embargo como se mencionó anteriormente, una misma dosis no presenta diferencia estadística significativa ($P>0.05$) en relación al resto de las muestras (literales mayúsculas). Asimismo al comparar el comportamiento de estas dosis, frente al tratamiento basal, se registró una diferencia significativa ($P<0.05$) para todas las muestras.

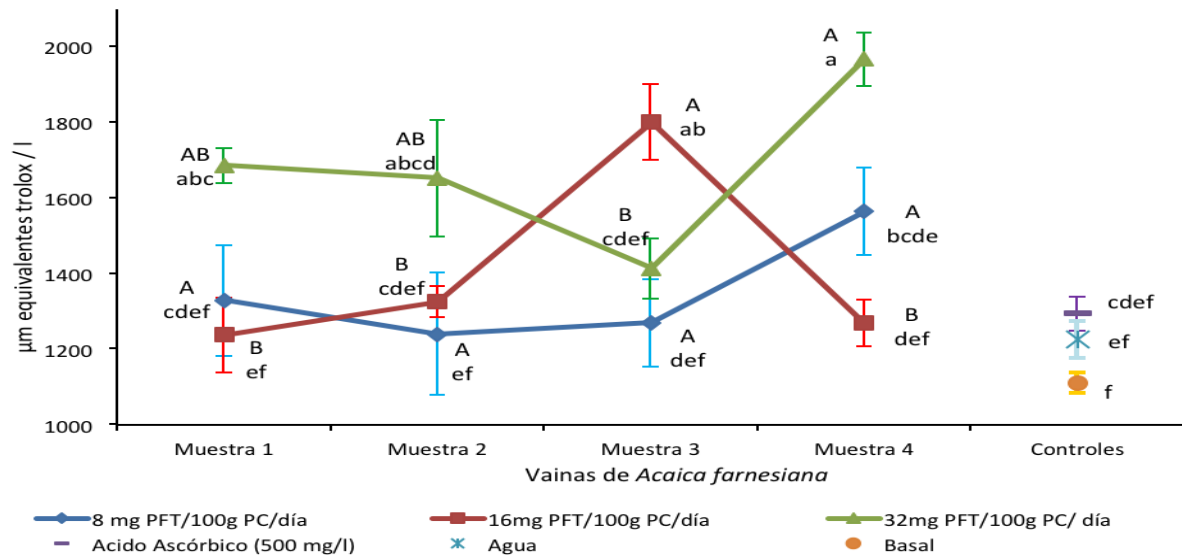
Al dosificar 32 mg de PFT/ml y evaluar su capacidad en plasma para secuestrar el radical DPPH, se observó que ésta fue similar a la registrada tras emplear el ácido ascórbico (500 mg/l) como estándar, siendo estadísticamente asimiles ($P>0.05$), comportamiento que se extendió a todas las muestras de las vainas evaluadas; destacando que los mejores resultados se presentaron en las muestras identificadas como 2 y 3.

VII.8 Capacidad secuestrante del plasma del jerbo, frente al radical libre peroxil por método ORAC.

Los resultados de este ensayo mostraron valores similares de concentración de equivalentes de trolox entre las concentraciones 8 y 16 mg de PFT, mientras que la concentración 32 mg de PFT alcanzó valores superiores para la mayoría de las muestras. Asimismo con los resultados obtenidos por la comparación entre muestras vegetales de AF para una misma concentración, se observa que 8 mg de PFT/ml no presentó diferencia estadística significativa entre las cuatro muestras ($P>0.05$); mientras que para 16 mg de PFT/ml, la muestra 3 alcanzó una diferencia estadística significativa ($P<0.05$) frente al resto de las muestras a la misma concentración, como se muestra en la **gráfica 2**. Siguiendo con estas comparaciones, 32 mg de PFT/ml mostró que las muestras 3 y 4

presentan diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre ellas, pero a su vez las muestras 1 y 2 fueron estadísticamente similares a las anteriores ($P > 0.05$).

Gráfica 2. Capacidad secuestrante (μM equivalentes trolox) y error estadístico de plasma de jerbo expuesto a diferentes tratamientos: polifenoles (mg/ml/100 g PC/día) de vainas de *Acacia farnesiana* (8, 16 y 32 mg), ácido ascórbico (500 mg/l) y agua (ml/100 g PC/día); además de un grupo basal frente al radical peroxil.



a,b,c,d,e,f Literales distintas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los distintos tratamiento experimentales y controles (ácido ascórbico (500 mg/l), agua y basal). ^{A,B}Literales iguales indican que no existe diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre las muestras de vainas correspondientes a la misma dosis de polifenoles.

Por otra parte, al comparar la concentración 8 mg de PFT en relación al grupo basal, control positivo y control negativo observamos que no existe diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) para las muestras 1, 2 y 3. Dentro de esta concentración destaca la muestra 4, la cual fue disímil estadísticamente respecto al tratamiento basal ($P < 0.05$) con la reserva de no presentar diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) respecto a los controles positivos ni negativo. En relación a la concentración 16 mg de PFT, la mayoría de las muestras no registraron discrepancia estadística significativa ($P > 0.05$) respecto a los controles negativo y positivo ni al grupo basal; diferenciándose únicamente la muestra 3.

Respecto a la concentración de 32 mg de PFT/ml, se observó un comportamiento similar para las muestras 1 y 2 las cuales estadísticamente fueron iguales respecto al ácido ascórbico ($P>0.05$) pero diferentes en relación a los grupos de basal y control negativo. Asimismo, las muestra 3 y 4 reflejaron un comportamiento independiente al observado en las muestras anteriores. En el primer caso, se registró un decaimiento de la concentración de equivalentes de trolox reflejándose estadísticamente sin diferencia significativa ($P>0.05$) con respecto al grupo basal, ácido ascórbico y agua. En el segundo caso, se registró un valor de $1966.8 \pm 68.0 \mu\text{M}$ de equivalentes de trolox, que representó una concentración superior ($P<0.05$) al estándar de referencia (ácido ascórbico, 500 mg/l), como al resto de las muestras y dosis.

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1 Cuantificación de polifenoles totales y determinación de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La presencia de compuestos polifenólicos totales en las plantas está determinada primordialmente por la especie vegetal e influida además por factores entre los que destacan las posibles interacciones nocivas con otros organismos (insectos, hongos simbióticos, bacterias patógenas y animales herbívoros), lo cual deriva en un incremento de estos compuestos caracterizados principalmente por sus propiedades antibióticas y anti-nutricias. Al mismo tiempo, la presencia de compuestos PFT está determinada por el nivel de estrés frente a radicales libres provenientes en su mayoría de radiación solar (UV-B), las condiciones geográficas y climatológicas que afectan internamente al vegetal; adicionalmente los factores como: reproducción, nutrición y crecimiento determinarán la presencia de estos compuestos (Zucker, 1983; Scalbert y Haslam., 1987; Hagerman, 1991; Northup *et al.*, 1995; Cooper-Driver y Bhattacharya., 1998; Harborne y Williams, 2000; Hättenschwiler y Vitousek, 2000; Treutter, 2006; Hatier y Gould, 2008; Lattanzio *et al.*, 2008; Moilanen y Salminen 2008; Baraza *et al.*, 2008; Lattanzio *et al.*, 2009). Las variaciones en el contenido de compuestos polifenólicos (totales y específicos) entre las muestras vegetales analizadas pudieron deberse a los factores mencionados anteriormente destacándose la diferencia en edad de los árboles y condiciones de estrés particulares (interacción con microorganismos, insectos y animales herbívoros). Es importante mencionar que la selección de los arbustos muestreados se realizó procurando homogenizar características tales como la maduración del arbusto y sus vainas, pudiendo presentarse diferencias no apreciables de manera visual al momento de la recolección. Asimismo la presencia de vainas en cantidad suficiente y el acceso para su muestreo influyeron en la elección de las mismas.

En este estudio se obtuvo un valor promedio de PFT de 30.4 mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de vaina seca de *Acacia farnesiana* (AF), valor cercano al reportado por Cuchillo *et al.* (2013) con 38.1 mg EAG/g de muestra para la misma especie, fracción vegetal y método de extracción, dichos autores concluyeron que el extracto de la mezcla de metanol: agua (80:20 v/v) del fruto de *Acacia farnesiana* presentó compuestos fenólicos bioactivos con actividad antioxidante. Por otra parte, el valor de PFT mostrado por los frutos de AF en el presente estudio, fue similar al reportado por Dudonné *et al.* (2009) para vainas de algarrobo (*Ceratonia siliqua*) y vainilla (*Vanilla planifolia*): 23.58 y 51.64 mg EAG/g de muestra, respectivamente. En dicho estudio, los valores más altos de registraron para madera de roble (397 mg EAG/g), corteza de pino (363 mg EAG/g) y canela (309 mg EAG/g).

Kuti (2004) reportó concentraciones de quercetina en cactáceas como *Opuntia ficus indica* (4.3 mg/100 g), *Opuntia lindheimeri* (9.0 mg/100 g) y *Opuntia streptacantha* (5.1 mg/100 g), las cuales fueron superadas por el valor reportado para vainas frescas de *Acacia farnesiana* (11.2 mg/ 100g) en este estudio. Este flavonoide ha demostrado inducir la expresión y actividad de enzimas antioxidantes endógenas como: GR, GSH-Px, SOD, CAT, glutatión sintetasa y la hemo-oxigenasa que contribuyen a la protección sobre diversas patologías como el cáncer, la hepatotoxicidad y los procesos inflamatorios (Yao *et al.*, 2007; Miyamoto *et al.*, 2011; Konignberg, 2007). Por otra parte, Cuchillo y colaboradores (2013) reportaron una concentración de epicatequina en vainas secas de *Acacia farnesiana* de 0.004 mg/100g, valor ampliamente inferior al reportado en el presente estudio que fue 7.47 mg/100 g de la misma muestra. Asimismo, Danila *et al.* (2007) reportaron un contenido de epicatequina en trigo sarraceno de 20.5 mg/100 g, el cual fue un valor superior al determinado en este estudio.

Reportes de Valverde *et al.* (2000) y Pier-Giorgio (2000) señalan que los flavonoides (incluidos quercetina y epicatequina) tienen actividad antioxidante en el organismo humano regulando el atrapamiento de radicales libres que ayudan a prevenir el riesgo de enfermedades cancerígenas. Asimismo, Valverde *et al.*

(2000) vincula los ácidos hidroxicinámicos con aplicaciones en la salud debido a que éstos poseen propiedad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, anticancerígena. Por esto, en años recientes ha aumentado el interés en el estudio y conocimiento de este tipo de compuestos considerados bioactivos.

Al respecto, las muestras de AF mostraron contenido promedio de ácidos hidroxicinámicos: 7.2 mg de ácido clorogénico, 6.4 mg de ácido cafeíco y 5.2 mg de ácido gálico/100 g vaina seca, siendo inferiores a los reportados por Cuchillo y colaboradores (2013) en la misma fracción vegetal de *Acacia schaffneri* y en particular para el ácido cafeíco (200 mg/100g) y ácido gálico (559 mg/100 g).

En este estudio, el ácido clorogénico fue el más abundante de estos compuestos, con 7.2 mg/100 g de vaina seca; al comparar este resultado con los reportados por Ayeling y Sabally (2013) se observó que fue muy inferior a los obtenidos por estos autores, quienes a través de HPLC registran un rango de entre 98.1 y 4,614 mg/100g en muestras de café en grano. Por otra parte, Olszewska en 2007 evaluó el contenido de este compuesto en las hojas de bayas negras (*Prunus serotina Ehrh.*) obteniendo 1.8 g/100g de hojas, un valor muy superior al encontrado en este estudio.

Por otra parte, el contenido de ácido cafeíco obtenido en este estudio (6.4 mg/100 g muestra) fue inferior a los valores reportados para 6 plantas aromáticas (romero, salvia, tomillo, menta, melisa y lavanda) que registraron valores de hasta 40 mg/100g de muestra (Wang *et al.*, 2004).

Como se mencionó anteriormente, la concentración de ácido gálico en el extracto final de AF fue de 12.8 mg/100g, valor inferior al reportado por Karamac y colaboradores en 2006 quienes obtuvieron 500 y 1600 mg/100 g de extractos provenientes de avellanas y semillas de uva. Por su parte Xu *et al.* (2005) evaluaron la concentración de ácido gálico en bagazo de caña, obteniendo valores de 0.007 mg/100 g, concentración muy inferior al valor reportado para las vainas secas de AF del presente estudio con 5.2 mg de ácido gálico/100 g. Por último Soares *et al.* (2008) evaluaron la presencia de este compuesto en la pulpa de

manzana registrando una concentración de 6.5 mg/100 g de muestra, siendo similar este valor al obtenido en este reporte.

VIII.2 Actividad secuestrante *in vitro* de las soluciones de extracto de vainas de *Acacia farnesiana* frente al radical libre DPPH

En numerosas especies del reino vegetal se han reportado compuestos con propiedades antioxidantes (Fennema, 1995). De ahí que se fije la atención en evaluar la actividad antioxidante de aquellas especies que poseen compuestos biológicamente activos como los polifenoles que son sintetizados como resultado del metabolismo secundario de las plantas, interviniendo en funciones por ejemplo antioxidante especialmente en las semillas (Del Pozo, 2011), evitando que el oxígeno deteriore al embrión. Los polifenoles también forman parte de componentes responsables del aroma, sabor y pigmento; por tanto tienen acción de agentes de defensa entre la planta y el ambiente como la radiación UV ó frente a factores patógenos biológicos (Manach *et al.*, 2004; Del pozo (2011)).

La actividad antioxidante evaluada *in vitro* en las soluciones de extracto de vainas de *Acacia farnesiana*, mostró una tendencia inversa en relación a la concentración de PFT (8, 16 y 32 mg/ml). En relación, Cuchillo *et al.* (2013) reportaron un 47.6 % de atrapamiento de DPPH' para una concentración de extracto de vainas de AF de 200 mg/l, este valor de actividad antioxidante fue superior al mostrado por la concentración de 8 mg de PFT/ml (263 g de extracto/l). Asimismo, dichos autores concluyeron que el extracto metanólico de la *Acacia farnesiana* en las condiciones evaluadas, presenta actividad antioxidante *in vitro* secuestrando los radicales DPPH y ABTS, actividad que se relaciona con el alto contenido de compuestos fenólicos; por tanto el fruto de esta especie contiene compuestos bioactivos con actividad antioxidante.

Asimismo, Ávila en el 2012 evaluó la actividad antioxidante de un extracto de nopal (*Opuntia ficus*) frente al radical DPPH, siendo la concentración de estudio *in vitro* de 500 mg/l y registrando un valor de actividad del 22.0%; dicho resultado

fue similar a los obtenidos en este estudio para las soluciones de 8 y 16 mg de PF/ml con 26.0 y 21.7%, respectivamente.

En este sentido, Dudonné *et al.* (2009) determinaron una relación positiva entre el porcentaje de atrapamiento del radical DPPH y el contenido de polifenoles en diversas muestras de vegetales, de las cuales 3 productos reportaron una concentración superior a los 300 mg PFT /100g así como altos valores de capacidad secuestrante del radical DPPH; siendo el roble, corteza de pino y canela con 88.6%, 94.5% y 84.4% respectivamente. Es importante mencionar que en dicho estudio no se menciona la concentración de las soluciones metanólicas evaluadas. Por su parte, Hannachi y colaboradores (2011) al evaluar las características químicas de siete semillas del género de Acacia, reportaron un rango de PFT de 154.4 a 1217.9 mg EAG/100 g de materia seca. Asimismo al enfrentar estos recursos en distintas concentraciones de sus extractos en metanol frente al radical DPPH, observaron que los valores de PFT más elevados no respondieron de manera directa al nivel de actividad antioxidante.

El abatimiento del porcentaje de atrapamiento del radical DPPH *in vitro* manifestado en este estudio, estuvo determinado por la estructura y el alto contenido de los PFT de las soluciones de vainas de AF evaluadas. El comportamiento antioxidante de los compuestos polifenólicos está relacionado con múltiples factores como el potencial de ionización, el tiempo de vida de los radicales fenoxil, las propiedades redox de los compuestos y su capacidad quelante. A su vez, estos factores son influenciados por la estructura química de los compuestos polifenólicos, involucrando la cantidad y posición relativa de los grupos fenólicos e hidroxifenólicos. En conjunto estos factores determinan las interacciones que se establecen con los radicales libres, derivando en mecanismos que incrementan (sinergismo) o disminuyen (inhibición) el efecto antioxidante (De Heer *et al.*, 1999; Wright *et al.*, 2001; Bors *et al.*, 2001; Sakihama *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2004; Djeridane *et al.*, 2006).

Asimismo, Hannachi *et al.* (2011) señalaron que el uso de recursos naturales como *Acacia spp.* podría ser útil no sólo en la producción de forrajes, medicamentos tradicionales y cosméticos sino también como un importante alimento funcional, auxiliar en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades humanas; enfatizando que el desarrollo de un alimento funcional es un largo y complejo proceso, que requiere enfoques multidisciplinarios. Actualmente los suplementos de semillas de *Acacia spp.* se encuentran en la etapa de desarrollo y requieren continuar con investigaciones. En este sentido, este reporte de investigación contribuye al entendimiento de las acciones derivadas por la incorporación de vainas de *Acacia* en un modelo *in vivo*, lo que permite continuar con el fortalecimiento de la investigación de estos recursos no convencionales.

VIII.3 Capacidad secuestrante en el plasma del jerbo, frente al radical DPPH

En esta prueba, las dosis de 8 y 16 mg de PFT administradas a jerbos mostraron una actividad antioxidante promedio en plasma sin diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control negativo (agua). A su vez este grupo control no presentó diferencia estadística significativa respecto a valores basales de 8.93%. En este sentido, podemos decir que los valores de actividad antioxidante mencionados fueron cercanos al determinado por Ávila en 2012, quien usando también el método descrito por Koren *et al.* (2010), reportó una actividad antioxidante del plasma basal de humano frente al DPPH' con un valor de 13%. En dicho reporte, se determinó la capacidad antioxidante debido al consumo de 300 g de nopal durante tres días Para ello 10 individuos sanos mantuvieron una dieta que cubrió sus requerimientos energéticos al mismo tiempo que garantizó un consumo diario de 24 a 27 mg de polifenoles provenientes exclusivamente de nopal hidrolizado; al final del periodo de consumo, el plasma mostró un considerable incremento en la actividad antioxidante, alcanzando valores por encima del 30%. Este resultado por la suplementación de nopal superó ligeramente los valores promedio obtenidos en el presente estudio empleando la dosis de 32 mg de PFT (27.3%) y el control positivo de ácido ascórbico (26.2%).

Al respecto, podemos decir que el desequilibrio en los niveles de radicales libres en plasma provocado por la adición del reactivo DPPH, pudieron favorecer reacciones cíclicas de formación de especies reactivas de hierro principalmente a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Hebbel *et al.*, 1993; Vives *et al.*, 1995; Rice-Evans *et al.*, 1986; Van Der Berg *et al.*, 1992; Puppo y Halliwell, 1988; Ando *et al.*, 1995; Samuni *et al.*, 1983; Ames *et al.*, 1993; Chevion, 1988; Halliwell *et al.*, 1992; Mao *et al.*, 1994). Sin embargo, la suplementación del extracto de vainas de AF derivó en un valor de capacidad de atrapamiento de radicales DPPH superior al obtenido por el grupo basal. Este efecto atribuido a los polifenoles de AF, en una relación casi directa a la dosis, pudo deberse al atrapamiento directo de los radicales libres o la donación de un protón para estabilizar estas especies reactivas. Asimismo pudo ocurrir que se sumaran factores como: la capacidad quelante de estos fitoquímicos sobre metales principalmente en el hierro, las interacciones que establecieron con la superficie de la célula y antioxidantes endógenos, así como el posible efecto sinérgico de entre los polifenoles que se pudo establecer durante los cinco días de suplementación (Bonarska-Kujawa *et al.*, 2012; Herrmann, 1976; Jia *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2000; Morel *et al.*, 1993; Nakayama *et al.*, 1993; Grinberg *et al.*, 1994; Afanas'ev *et al.*, 1995; Hanasaki *et al.*, 1994 y Halliwell *et al.*, 1992).

A partir de la similitud estadística presentada por la dosis de 32mg de polifenoles en relación con el grupo de ácido ascórbico, es posible quizás inferir que los PFT en dicha concentración presentan mecanismos antioxidantes equiparables a los mostrados por el componente naturalmente presente en sangre, ácido ascórbico (vitamina C) el cual en la concentración de administración, pudo posiblemente establecer interacciones sinérgicas con moléculas endógenas como enzimas, α -tocoferol, e incluso con otros flavonoides y en conjunto quizás contribuyeron a la reducir el fenómeno de peroxidación (Herrmann, 1976; Jia *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2000).

VIII.4 Capacidad secuestrante del plasma del jerbo, frente al radical libre peroxil por método ORAC

La actividad antioxidante promedio en la dosis de 32 mg de polifenoles (1679.2 $\mu\text{m/l}$ equivalentes de trolox) fue 1.5 veces mayor en relación al grupo basal (1,100.8 $\mu\text{m/l}$), así como superior respecto a los tratamientos con ácido ascórbico (1,294.4 $\mu\text{m/l}$) y agua (1,225.4 $\mu\text{m/l}$). Al respecto Leite *et al.* (2011) determinaron, también por el método ORAC, la capacidad antioxidante del plasma de rata suplementada con 0, 1, 2 y 4% de cáscara de jaborcaba (*Myrciaria jaborcaba* Vell Berg), una baya nativa de Brasil rica en antocianinas. Cuando se suplementó entre 1% y 2% de la baya, la capacidad antioxidante se incrementó alcanzando el valor máximo de 22.96 μm equivalentes de trolox/l particularmente cuando se suplementa 2%, valor que equivale a un aumento de 1.3 veces respecto al valor del control (17.0 μm equivalentes de trolox/l); mientras que con 4% de cáscara de este fruto no mostró efecto antioxidante.

Por otra parte, Cao *et al.* (1998) evaluaron el consumo (15 días) de una dieta rica en frutas y vegetales (10 porciones diarias) frente al atrapamiento de radicales oxígeno (ORAC) en el plasma de 36 participantes sanos (hombres y mujeres) conformándose grupos de entre 20 a 40 y de 60 a 80 años. El monitoreo de la actividad antioxidante mostró un incremento del 1.8 veces respecto al nivel promedio del día cero en ambos grupos. Los valores basales del día cero fueron de 599.8 $\mu\text{m/l}$ en el grupo de sujetos jóvenes y 590.55 $\mu\text{m/l}$ en el segundo grupo.

Huang *et al.* (2002) mostraron la eficacia de la prueba ORAC para determinar la capacidad antioxidante en un proceso completamente automatizado que permite mejorar la eficiencia del ensayo. Para ello evaluaron compuestos puros en solución, mezclas de compuestos, alimentos y fluidos biológicos incluido el plasma humano; mostrándose para este último, valores de capacidad antioxidante de 6.25×10^{-5} $\mu\text{m/l}$, el cual es un valor ampliamente inferior al promedio presentado en el presente estudio por el plasma basal de jerbo con un valor de 1,100.8 $\mu\text{m/l}$.

El aumento en los valores de concentración de equivalentes de trolox de la dosis de 32 mg de polifenoles respecto a los grupos basal y control negativo pudo estar relacionado a sus capacidades de influir sobre las condiciones de iniciación de la oxidación celular; reduciendo y/o inhibiendo la presencia de radicales libres y con ello los daños a hemoproteínas que darían lugar a especies del hierro reactivas que nuevamente catalizan la formación de radicales libres, hemodegradación y consecuentemente la peroxidación lipídica (Hebbel, *et al.*, 1993; Vives *et al.*, 1995; Rice-Evans *et al.*, 1986; van der Berg *et al.*, 1992; Puppo y Halliwell, 1988; Ando *et al.*, 1995). En este sentido, la técnica de ORAC permitió atribuir que la actividad antioxidante de los polifenoles está relacionada a la capacidad de éstos para atrapar al radical inducido peroxilo (ROO[•]), lo cual se mostró cuando los valores de concentración de equivalentes de trolox ($\mu\text{M/l}$) aumentaron en relación a la dosis de polifenoles administrados, esto en la mayoría de las muestra de vainas de AF.

Además del mencionado mecanismo de acción, se propone que los compuestos polifenólicos administrados fueron ligados a las moléculas de hierro de bajo peso molecular actuando como agentes quelantes (Sakihama *et al.*, 2002; Halliwell y Gutteridge, 1986; Bannister *et al.*, 1983; Baker y Gebicki, 1986; Floyd, 1981; Flitter *et al.*, 1983; Berglin y Carlsson, 1985); acción que como lo aseguraron Grinberg y colaboradores (1997), quienes evaluaron el efecto antioxidante *in vitro* de los polifenoles del té verde y té negro sobre células rojas; 10 $\mu\text{g/ml}$ de polifenoles fueron capaces de inhibir hasta en 80% la lipoperoxidación de la membrana celular y consecuentemente inhibir hasta en un 50% el flujo de radicales hidroxilo ([•]OH); bajo las condiciones de experimentación de estos autores se concluyó que no existió intercambio de electrones con el complejo redox del hierro. Asimismo, Tedesco *et al.* (2000) y Dai *et al.* (2006), reportaron no sólo la protección *in vitro* de los polifenoles para reducir daños en membrana (monitoreada por la lisis de células rojas) sino que indirectamente relacionan dicha protección con menores niveles de especies reactivas como podría ser los radicales peroxilo (ROO[•]) generados en el ensayo ORAC.

Adicionalmente a la atribución de polifenoles como compuestos secuestradores de radicales libres y/o quelantes que pueden interferir en el proceso de lipoperoxidación, autores como Bonarska-Kujawa *et al.* (2012) señalaron que la actividad antioxidante presentada por eritrocitos está relacionada a su capacidad para enlazar a su superficie una gran variedad de polifenoles antioxidantes, debido a las interacciones electroestáticas de los grupos hidroxilo (presentes en la estructura química de los polifenoles) con los componentes de la superficie de la membrana de los eritrocitos, formando complejos membrana-polifenol que los hace agentes antioxidantes más eficientes al poder atrapar diversas especies reactivas (Koren *et al.*, 2010).

También se ha señalado que los flavonoides podrían haber interactuado en forma sinérgica con el α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) y otros flavonoides, esto al reaccionar con los radicales peroxilo y detener la peroxidación retardando la lisis de eritrocitos y mejorado la actividad antioxidante (Herrmann, 1976; Jia *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2000). Esta acción puede explicar en parte, el incremento de concentración de equivalentes de trolox en el grupo dosificado con ácido ascórbico (500 mg/l) respecto al plasma basal, lo cual se relaciona con una mayor actividad antioxidante.

La muestra 3 de vainas de AF mostró un decaimiento del valor de equivalentes de trolox ante el aumento de la dosis de 16 a 32 mg PFT/ml; al respecto, Sakihama y colaboradores en 2002 demostraron que los compuestos polifenólicos tipo catecoles presentan capacidad prooxidante *in vitro* ante condiciones como la producción inducida de radicales $\cdot\text{OH}$ y presencia de Cu^{2+} . Dichos autores, seleccionaron los ácidos clorogénico, cafeíco y dihidrocafeíco debido a sus estructuras químicas y potenciales redox similares, evaluándolos en las concentraciones 0, 0.5, 1, 5, 10, 20 y 50 μM . La exposición del ADN a los polifenoles en las condiciones mencionadas dio como resultado un incremento en las rupturas de la cadena sencilla y cadena doble del ADN dependiente de la presencia de polifenoles sobre todo a partir de las concentraciones 5 o 10 μM . Los

autores de dicha investigación señalan que dicho comportamiento está relacionado con los radicales fenoxil de los polifenoles, los cuales en las concentraciones mencionados pueden contribuir a la peroxidación lipídica. En conexión con la presente investigación, los ácidos clorogénico y cafeíco fueron detectados en los extractos de AF y consecuentemente en la solución de prueba 8 mg PFT se presentaron en una concentración promedio de 53.4 μM y 91.6 μM respectivamente, siendo probable que tras ser dosificados sus concentraciones en plasma fueran suficientes para que en presencia de iones cobre (Cu^{2+}), quizás estuvieran involucrados en la generación del daño a ADN y posiblemente contribuir al fenómeno de lipoperoxidación como lo hicieran en las evaluaciones realizadas por Sakihama *et al.* (2002). Sin embargo, cuando se pretende comparar los valores iniciales de ácido clorogénico y cafeíco de los extracto dosificados de AF en relación a los efectos reportados por Sakihama *et al.* (2002) queda la posibilidad de que en plasma, estos ácidos hidroxicinámicos no hayan alcanzado las concentraciones que conllevan los efectos adversos mostrados *in vitro*, esto debido a las potenciales pérdidas de dichas sustancias a través de la asociación del extracto con el contenido gástrico, toda vez que los animales no fueron sometidos a ayunos previo a la dosificación, aun más es importante señalar que los sistemas *in vivo* son muy dinámicos y cambiantes ya que en este medio intervienen interacciones entre diferentes compuestos y las respuestas del organismo a la presencia de estas sustancias, además de los efectos de pérdidas por excreción. Es posible que de haber determinado el contenido de estos catecoles en el plasma de los animales experimentales, se hubiera podido establecer una comparación más estrecha entre los efectos reportado por Sakihama *et al.* (2002) y este estudio.

La similitud de valores de concentración de equivalentes de trolox (μM) presentada entre los grupos con tratamientos de ácido ascórbico y basal, puede estar relacionada a la capacidad del modelo biológico jerbo para sintetizar sus requerimientos de vitamina C a partir de glucosa proveniente de la dieta y al mismo tiempo desechar los excedentes a través de la orina. Por tanto, ingestas

de este compuesto mayores a los requerimientos fisiológicos conlleva una reducción en su absorción (Levine *et al.*, 1996; Rumsey *et al.*, 1997). Al respecto, Oreopoulos *et al.*, (1993) mencionan que ante ingestas superiores a varios cientos mg/día en seres humanos, el ácido se excreta rápidamente en la orina con una vida media de alrededor de 30 minutos. Asimismo, este valor de tiempo de excreción del ácido ascórbico es menor al tiempo de monitoreo aplicado en este experimento, haciendo posible que su presencia en plasma no tuviera efecto significativo sobre la actividad antioxidante determinada una hora después de su suplementación.

Por otra parte, la manipulación efectuada a los animales del grupo control negativo (administrado con agua) pudo desencadenar situaciones de estrés que quizás pudieron activar mecanismos endógenos antioxidantes para protección celular, incluyendo síntesis de compuestos como ácido ascórbico a partir de glucosa y su posterior transformación a ácido deshidroascórbico (vitamina C) la cual representa función de cofactor, facilitando la transferencia de electrones a enzimas antioxidantes que participan en la regulación de los procesos a través de la captación de radicales libres (Pier-Giorgio, 2000); sumándose la actividad sinérgica del ácido ascórbico con los compuestos fenólicos, vitamina E y β -caroteno (Giese, 1996; Niki, 1987). Asimismo es importante señalar que el ácido ascórbico en la concentración natural presente en el jerbo basal pudo ser suficiente para mostrar una actividad antioxidante con valores similares a los grupos controles, tanto positivo como negativo.

IX. CONCLUSIONES

Las soluciones de extracto de vainas de *Acacia farnesiana* mostraron un efecto de abatimiento de la actividad antioxidante *in vitro* en relación a la concentración de polifenoles. Asimismo el plasma del jerbo dosificado con estas soluciones presentó actividad antioxidante *in vivo*.

El extracto de las muestras de vainas de *Acacia farnesiana* mostró un contenido promedio de compuestos polifenólicos totales de 76.1 mg de EAG/g, así como la presencia de epicatequina, quercetina, ácido gálico, ácido cafeico y ácido clorogénico.

La actividad antioxidante *in vitro* de las soluciones acuosas de extractos de vainas de *Acacia farnesiana* presentó una tendencia promedio negativa en relación a la concentración de polifenoles, excluyéndose de dicho efecto a la muestra M1 que a una concentración de 16 mg/ml marcó el valor más alto de actividad antioxidante, no sólo en relación a las otras dos concentraciones de polifenoles para la misma muestra, sino también respecto al total de las muestras evaluadas en sus correspondientes dosis, mostrando un posible efecto prooxidante *in vitro* dependiente del contenido de polifenoles evaluado.

Para la determinación de actividad antioxidante *in vivo*, particularmente a través del atrapamiento de DPPH', únicamente la concentración 32 mg de polifenoles totales/día de *Acacia farnesiana* mostró un incremento significativo del efecto antioxidante (27.37%) respecto a basales y control negativo, a su vez dicho valor fue equiparable al logrado por el plasma dosificado con ácido ascórbico 500 mg/l (26.21%). Asimismo la actividad antioxidante *in vivo* monitoreada a través de ensayo ORAC, mostró un incremento en las concentraciones de 16 y 32 mg de polifenoles de vainas de *Acacia farnesiana*.

X. ANEXOS

Anexo X.1. Localización de las muestras vegetales

Muestra de vainas	Localización de la muestra
1	20°23'N, 99°67'O
2	20°16'N, 100°05'O
3	19°88'N, 99°07'O
4	20°22'N, 99°73'O

Anexo X.2 Reactivos químicos, soluciones y materiales empleados en el estudio

Reactivos	Marca	Catálogo	Lote
Extracción del material vegetal			
Metanol, °R	J.T. Baker	9049-02	6756-I
Caracterización			
Reactivo Folin-Ciocalteu	Fluka	47641	1338367
HPLC			
Epicatequina, HPLC 90%	Sigma	E1753	125K1450
Quercetina, HPLC 98%	Sigma	Q0125	015K1225
Ácido cafeíco, HPLC 98%	Sigma	C0625	065K1060
Ácido clorogénico	Sigma	150618	3520J
Acido cinámico	Aldrich	07226JD	128708
Ácido gálico	Sigma	C9008	095K134J
Acido ascórbico	Sigma	A5960	49H0410
Acetonitrilo	J.T. Baker	9017-02	G15C55
Metanol, HPLC	J.T. Baker	9093-02	6756-I
Acetato de etilo	J.T. Baker	9282-02	X35E00
Acido acético glacial	J.T. Baker	9515-03	L11A13
Acido fosfórico	J.T. Baker	0260-60	B13831
DPPH <i>in vitro</i>			
Metanol, °R	J.T. Baker	9049-02	6756-I

DPPH *in vivo*

DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)	Aldrich	D9132	-
Alcohol etílico absoluto	Macron	V569-06	

ORAC

AAPH (2,2'-Azobis (2-metilpropionamida) dihidrocloruro)	Aldrich	440914	-
Fluoresceína	Sigma	F6377	-
Trolox	Calbiochem	648471	B58819

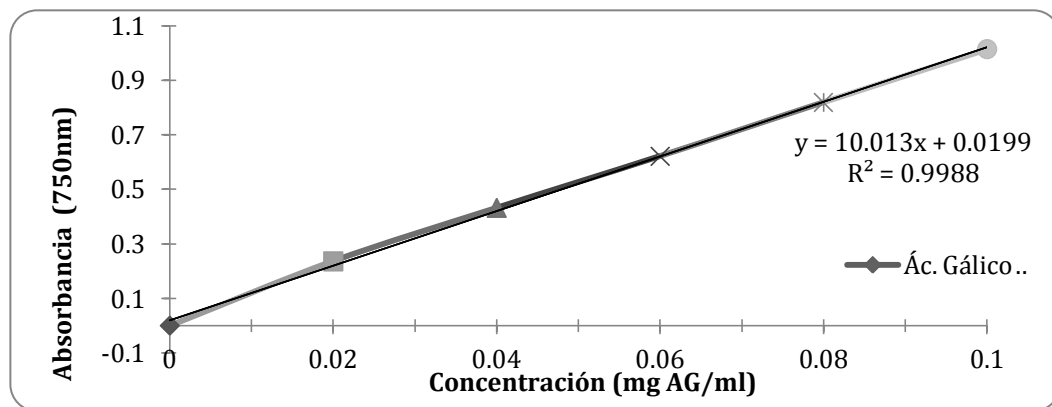
Reactivos anestésicos

(ketamina 100 mg/ml)	PiSA	7833-028	A062071
(Xilacina 20 mg/ml)	Bayer	Q-0615-035	KP00B8H

Soluciones	Marca	Catálogo	Lote
HBSS (Hank's balance salt solution)	pH=7.5		
HCl (3%)	Fermont	7647-01-0	-
Na ₂ CO ₃ (2%)	J.T. Baker	3506-01	T09336
Solución salina	KabiPac	EE0716-01	73F20202
Amortiguador de fosfatos 75µM	-	-	-

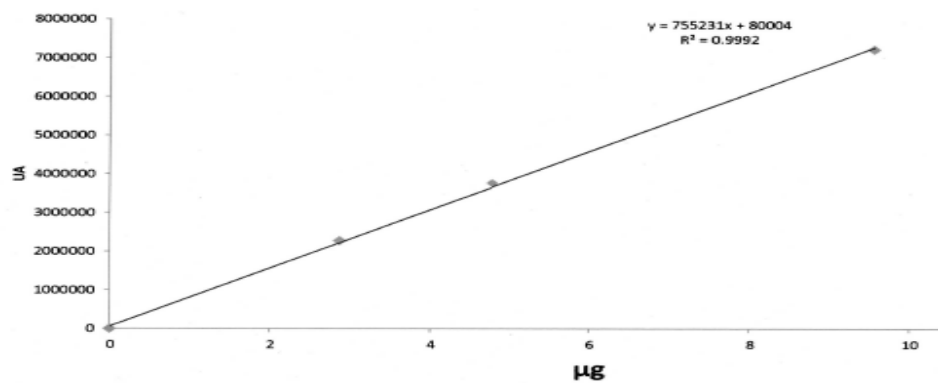
Materiales	Marca	Catálogo	Lote
Tubos recolección sangre	BD Vacutainer	367844	1334251
Tubos Eppendorf 1.5ml	Axygen	MCT-159-C	-
Celdas poliestireno	VitLab	146190	033378
Filtro jeringa (25 mm, 0.45 mm)	Corning Inc.	TMXHN2510	R4AN30463
Agua desionizada (Equipo local)	Milli-Q	Q-POD	-
Agua destilada (Equipo local)	Milli-Q	Integral 10	-
Placas de poliestireno de 96 pozos	Corning Inc Costar	3596	
Jeringas 3 ml	BD Plastipak	300132	9020273
Jeringas insulínicas 1 ml	BD Plastipak	300132	9020273

Anexo X.3. Curva de calibración de ácido gálico como estándar de referencia en la determinación de polifenoles totales

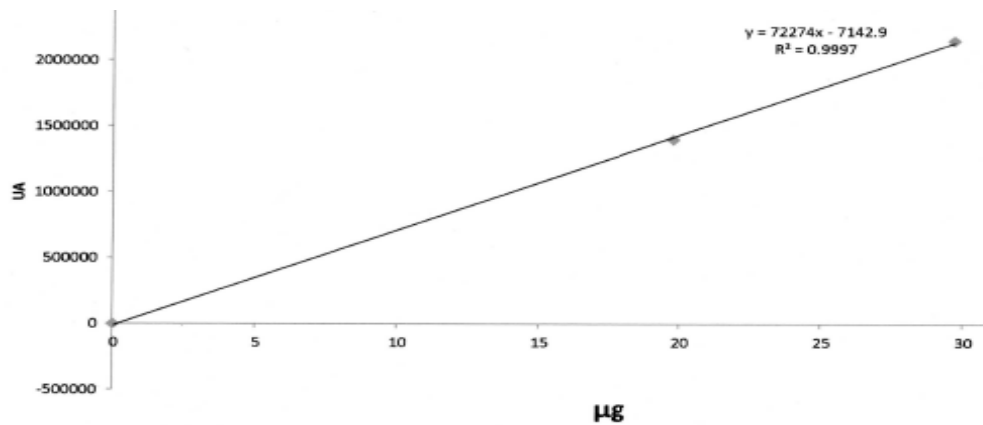


Anexo X.4 Curvas de calibración de los flavonoides y ácido hidroxicinámicos utilizados en la determinación por HPLC

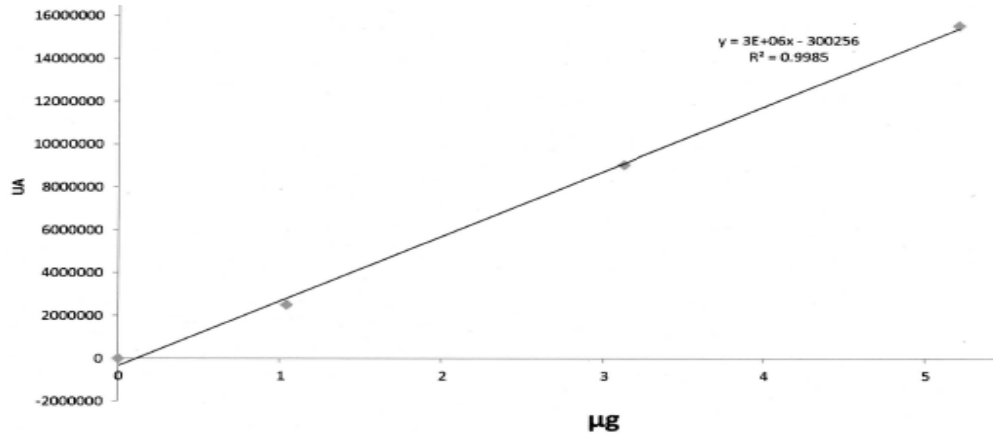
Anexo X.4.1 Epicatequina



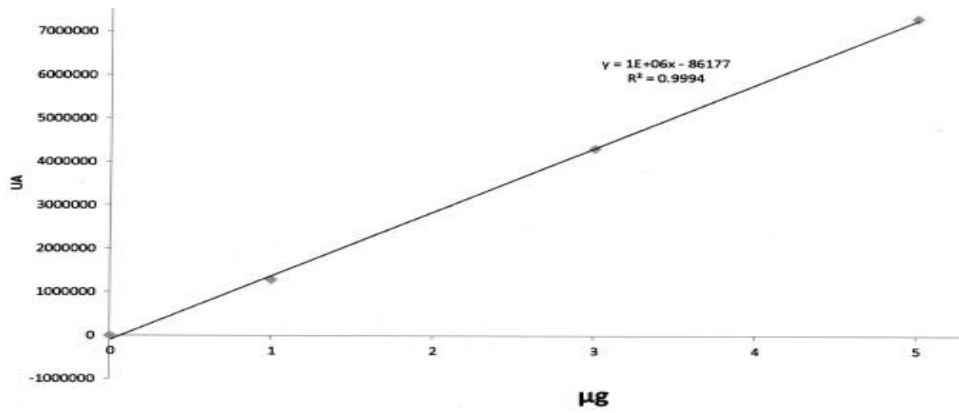
Anexo X.4.2 Quercetina



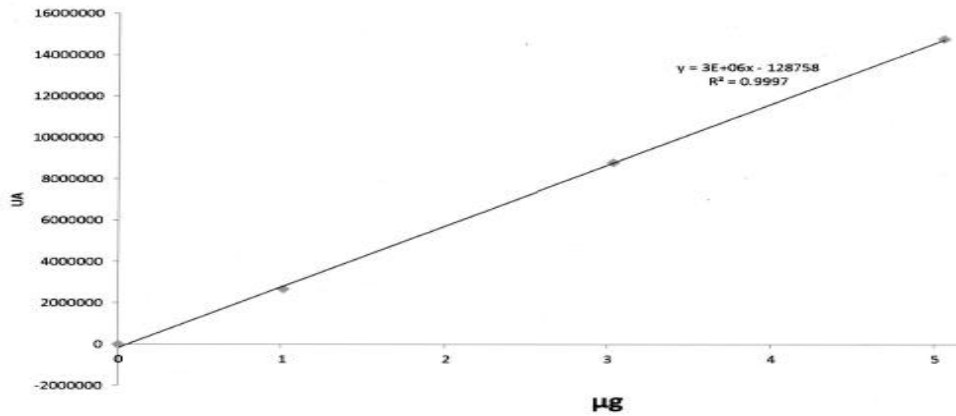
Anexo X.4.3 Ácido cafeíco



Anexo X.4.4 Ácido clorogénico



Anexo X.4.5 Ácido gálico



Anexo X.5 Preparación de la solución salina balanceada de Hank (Hank's balance salt solution, HBSS)

Pre-mezcla de las soluciones amortiguadoras

Solución 1: Disolver en 90ml de H₂O destilada, las siguientes sustancias: 8 g NaCl y 0.4 g KCl, aforar a 100 ml con H₂O destilada.

Solución 2: Disolver en 90ml de H₂O destilada, las siguientes sustancias: 0.358 g Na₂HPO₄ (anhídrido) y 0.6 g KH₂PO₄, aforar a 100 ml con H₂O destilada.

Solución 3: 0.72 g CaCl₂ llevar a aforo de 50ml con H₂O destilada.

Solución 4: 1.23 g MgSO₄·7H₂O llevar a aforo de 50ml con H₂O destilada.

Combine las soluciones en el siguiente orden: 10 ml solución 1, 1 ml solución 2, 1 ml solución 3, 86 ml H₂O destilada y 1 ml solución 4.

Antes de utilizar la solución HBSS, mezcle: 9.9 ml de la pre-mezcla de buffer con 0.1 ml de la solución 5.

Solución 5: 0.35 g NaHCO₃ llevados a aforo de 10ml con H₂O destilada.

Anexo X.6 Preparación de las soluciones de fluoresceína

Primera solución patrón de fluoresceína (1.32mM): Pesar 0.0828g del reactivo y diluir en 2ml de amortiguador de fosfatos 75mM pH 7.4. Esta solución es viable conservarla en congelación (-80°C) y protegida de la luz.

Segunda dilución (4µM): 30.1µl de la solución patrón de fluoresceína en 10 ml de amortiguador de fosfatos (75mM pH 7.4). Conservar en congelación a -80°C y protegida de la luz.

Tercera dilución (concentración final de 50nM): 130µl de fluoresceína 4µM y diluir en 10 ml buffer de fosfatos pH 7.4. Realizar esta dilución hasta el momento previo a su utilización.

Anexo X.7 Preparación de soluciones patrón del estándar trolox

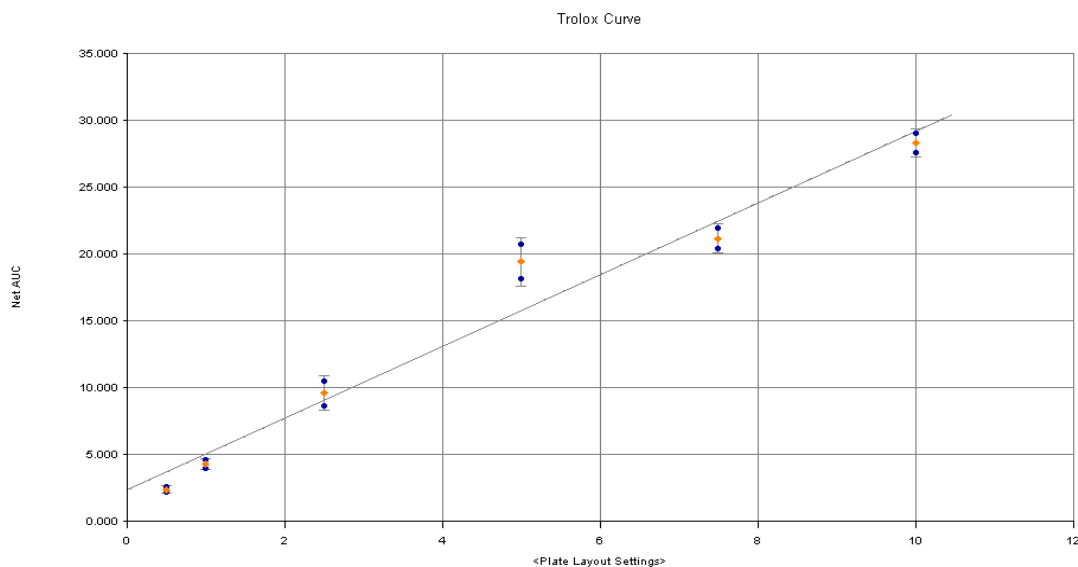
Primera solución estándar de trolox 1mM:

Pesar 2.503mg de trolox y adicionar a 10ml de amortiguador de fosfatos 75mM. Disolver perfectamente y conservar a -80°C

Preparación de las soluciones para curva patrón de trolox:

Concentración de trolox (μM)	Alícuota		Amortiguador de Fosfatos 75mM, pH 7.5 (μl)
	(μl)	Sol. agregada	
80	80	1mM	920
60	750	solución 80 μM	250
40	666	solución 60 μM	333
20	500	solución 40 μM	500
8	400	solución 20 μM	600
4	500	solución 8 μM	500
0 (blanco)	---	---	1000

Anexo X.8 Curva de calibración del estándar trolox en la determinación de actividad antioxidante por ensayo ORAC



XI. REFERENCIAS

- Afanas'ev, I.B., Ostrachovitch, E.A., Abramova, N.E., Korkina, L.G. 1995. Different antioxidant activities of bioflavonoid rutin in normal and iron-overloading rats. *Biochemical Pharmacology* 50: 627-635.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 7915–7922.
- Ando, K., Beppu, M., Kikugawa, K. 1995. Evidence for accumulation of lipid hydroperoxides during the aging of human red blood cells in the circulation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 18: 659–663.
- Auroma, O.I. y Halliwell, B. 1987. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation? *Biochemistry Journal* 241: 273–278.
- Ávila, N. A. 2012. Determinación de la actividad antioxidante del nopal (*Opuntia ficus indica*): estudios *in vitro* e *in vivo*. Tesis Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, INCMNSZ.
- Ayelnig, A., Sabally, K. 2013. Determination of Chlorogenic Acids (CGA) in Coffee Beans using HPLC. *American Journal of Research Communication* 1(2): 78-91.
- Baker, M. S. y Gebicki, J.M. 1986. The effect of pH on yields of hydroxyl radicals produced from superoxide by potential biological iron chelators. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 246 (2): 581-588.
- Baldwin, D. A., Jenny, E. R. y Aisen, P. 1984. The effect of human serum transferrin and milk lactoferrin on hydroxyl radical formation from superoxide and hydrogen peroxide. *Journal of Biology and Chemistry* 259: 13391-13394.
- Bankowski, Z., M.D. 1985. International guiding principles for biomedical research involving animals. Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS), World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Bannister, J. V., Bellavite, P., Davoli, A., Thornalley, P. J. y Rossi, F. 1982. The generation of hydroxyl radicals following superoxide production by neutrophil NADPH oxidase. *FEBS Letters* 150: 300-302.
- Bannister, W. H., Bannister, J. V., Searle, A. J. F., Thornalley, P. J. 1983. The reaction of superoxide radicals with metal picolinate complexes. *Inorganic Chimica Acta* 78: 139-142.

- Baraza, E., Angeles, S., Garcia, A., Valiente-Banuet, A. 2008. New natural resources as diet supplement for domestic goats during the dry season, in the Tehuacan Valley, Mexico. *Interciencia* 33: 891-896.
- Barr, I.G., Sjolander, A., Cox J.C. 1998. ISCOMs and other saponin based adjuvants Review. *Advanced Drug Delivery Reviews* 32: 247–271.
- Barranco P. K. 2010. Compuestos bioactivos en recursos alimenticios y forrajeros tropicales no convencionales. Estancia Estudiantil. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 10-13p.
- Berglin E. H. y Carlsson J. 1985. Potentiation by sulfide of hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 49: 538-543.
- Bonarska-Kujawa, D., Pruchnik, H., Kleszczyńska, H. 2012. Interaction of selected anthocyanins with erythrocytes and liposome membranes. *Cellular and Molecular Biology Letters* 17(2): 298-308.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology* 186: 343–355.
- Bors, W., Michel, C., Stettmaier, K. 2001. Structure-activity relationships governing antioxidant capacities of plant polyphenols. *Methods in Enzymology* 35: 166-180.
- Bravo L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56 (11): 317-333.
- Burton, K. P., McCord, J. M., Ghai, G. 1984. Myocardial alterations due to free-radical generation. *American Journal of Physiology* 246: 776-783.
- Cadenas, E. y Packer, L. 2002. Handbook of antioxidants. Segunda edición, Marcel Dekker, Nueva York, USA 235-249p.
- Cai, Y.J., Ma, L.P., Hou, L.F., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z.L. 2002. Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes. *Chemistry and Physics of Lipids* 120: 109– 117.
- Cao, G., Booth, S., Sadowski, J., Prior, R. 1998. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *American Journal of Clinical Nutrition* 68:1081–7.
- Capistrán G. J., Flores C. Ma. F. 2009. El nopal *Opuntia ficus indica* y su efecto regulador del estrés oxidativo en un modelo vivo. Tesis licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F. 26-27p.

- Carreras I. 2004. Influencia de la suplementación de antioxidantes y de la administración de endrofloxacin en la calidad y seguridad de la carne de ave. Universidad de Girona, Departamento de Química 36-37 pp.
- Charles-River Center. 2010. US Strain Origin and Pricing (actualizado: 29/mayo/2012); disponible en: http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_c_Mongolian_gerbils.pdf (último acceso 18/mayo/2013).
- Chen, Z.H., Zhou, B., Yang, L., Wu, L.M., Liu, Z.L. 2001. Antioxidant activity of green tea polyphenols against lipid peroxidation initiated by lipid-soluble radicals in micelles. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2*: 1835–1839.
- Chevion, M. 1988. A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: The essential role of redox-active transition metals. *Free Radical Biology and Medicine* 5: 27-37.
- CONABIO, 2008; consultada por última vez: 27-mayo-2013, 2:16 a.m. en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/mimosaceae/acacia-farnesiana/fichas/ficha.htm>
- Cooper-Driver, G. A., Bhattacharya, M. 1998. Role of Phenolic in Plant Evolution. *Phytochemistry*, 49: 1165 – 1174.
- Coral, H. G., Díaz, M. M., Huberman, W.A., Aburto, F.E. 2005. Variaciones de corticosterona y peróxidos lipídicos como respuesta al estrés en el jerbo (*Meriones unguiculatus*) y su relación con daño hepático. V Congreso Nacional AMCAL. III Reunión Centroamericana y del Caribe sobre animales de laboratorio. Comité Regional de las Américas ICLAS. Oaxaca.
- Cren-Olivé, C. y Rolando, C. 2003. Chapter 5. Synthesis, Identification, quantification, and chemical reactivity of methylated flavan-3-ols. 123-144p En Rice-Evans, C y Parker, L. 2003. *Flavonoids in health and disease*. Second Edition Marcel Dekker, USA: 467 pp.
- Cuchillo, H.M., Puga, D.C., Espinosa, M.J.G., Montaña, B.S., Wrage, N., Navarro-Ocaña, A., Díaz, M. M., Ledesma, J.A., Pérez-Gil, R.F. 2013. Chemical composition, antioxidant activity and bioactive compounds of vegetation species ingested by goats on semiarid rangelands. *Journal Animal Feed Science* 22 (2):79-89.
- Cuchillo, H.M., Puga, D.C., Wrage, N., Pérez-Gil, R.F. 2010a. Feeding goats on scrubby Mexican rangeland and pasteurization: Influences on milk and artisan cheese quality. *Tropical Animal Health and Production*. 42: 1127-1134.

- Cuchillo, H.M., Puga, D.C., Navarro, O.A, Pérez-Gil R.F. 2010b. Antioxidant activity, bioactive polyphenols in Mexican goat's milk cheeses on summer grazing. *Dairy Research* 77: 20-26.
- Dai, F., Miao, Q., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z. 2006. Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. *Life Sciences* 78: 2488 – 2493.
- Danila, A. M., Kotani, A., Hakamata, H., Kusu, F. 2007. Determination of Rutin, Catechin, Epicatechin and Epicatechin Gallate in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) by Micro-High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(4):1139–1143.
- De Heer, M. I., Korth, H.G., Mulder, P. 1999. Poly methoxy phenols in solution: O–H bond dissociation enthalpies, structures and hydrogen bonding. *Journal of Organic Chemistry*, 64: 6969 – 6975.
- Del Pozo, B. M. 2011. Descifrando las claves químicas que explican el aroma del vino; *Ciencia y Tecnología*, consultado el 26 febrero 2012 en: http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/claves_quimicas_aroma_cienc1010.htm
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97: 654–660.
- Dok-Go, H., Lee, K., Kim, H., Lee, E., Lee, J., Song, Y., Lee, Y., Jin, C., Lee, Y., Cho, J. 2003. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficusindica* var. *saboten*. *Brain Research* 965 (1-2): 130-136.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P. 2009. Comparative Study of Antioxidant properties and Total Phenolic Content of 30 plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1768-1774.
- Fennema, O. 1995. *Química de los alimentos*. Editorial Acribia SA. Segunda edición; España 330, 336-339 y 923 pp.
- Flitter, W., Rowley, D. A., Halliwell, B. 1983. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. *FEBS Letters* 15: 310-312.
- Floyd, R. A. 1981. DNA-ferrous iron catalyzed hydroxyl free radical formation from hydrogen peroxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 99: 1209-1215.

- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. 2004. Dietary Reference Intakes (DRIs): Estimated Average Requirements. National Academy of Sciences. United States.
http://www.iom.edu/Home/Global/News%20Announcements/~media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRIs/DRI_Summary_Listing.pdf. Consultado 5 -08- 2013.
- Francis, G., Kerem, Z., Harinder, P.S.M., Becker, K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition* 88: 587-605.
- Galatro, A., Rousseau, I., Puntarulo, S. 2006. Análisis de la concentración en estado estacionario del radical ascorbilo en plántulas de soja determinado por espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica. *Phyton* 75: 7-20.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. UNAM. México. 33pp.
- Giese, J. 1996. Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. *Food Technology* 50: 73-81.
- Glazer, A. 1990. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods enzymologic* 186:161-168.
- Grinberg, L., Rachmilewitz, E.A., Newmark, H. 1994. Protective effect of rutin against hemoglobin oxidation. *Biochemical Pharmacology* 48: 643-649.
- Grinberg, N.L., Newmark, H., Kitrossky, N., Rahamim, E., Chevion, M., Rachmilewitz, E.A. 1997. Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. *Biochemical Pharmacology* 54: 973-978.
- Gülcin, I. 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 217(2-3): 213-220.
- Gutteridge, J.M.C. 1986. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett* 201: 291-295.
- Haber, F. y Weiss, J. 1932. Über die Katalyse des Hydroperoxydes (On the catalysis of hydroperoxide). *Naturwissenschaften* 20 (51): 948–950.
- Hagerman, A. E. 1991. Buttlar in herbivores, their interaction with secondary metabolites, Vol. 1 En: Rosenthal, G. A., Berenbaum, M. R., Academic Press, San Diego, 355 – 388pp.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 246: 501-514.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119: 598-620.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, 4 Ed., Nueva York, EUA, 320-340pp.
- Halliwell, B., Murcia, M., Chirico, S., Aruoma, O. 1995. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. *Food Science and Nutrition* 35: 7-20.
- Hanasaki, Y., Ogawa S., Fukui, S. 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 16: 845-850.
- Hannachi, H., Elfalleh, W., Ennajeh, I., 2011. Chemical profiling and antioxidants activities of *Acacia* seeds. *Journal Medicinal Plants Research* 5 (31): 6869-6875.
- Harborne, J. B. y Williams, C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481 – 504.
- Harden, G.J. 1991. *Flora of New South Wales*, Volumen 2. Editorial Kensington. NSW: University de Nex South Wales Press, 601pp.
- Harris, C.S., Mo, F., Migahed, L., Chepelev, L., Haddad, P.S., Wright, J.S., Willmore, W.G., Arnason, J.T., Bennett, S.A.L. 2007. Plant phenolics regulate neoplastic cell growth and survival: a quantitative structure-activity and biochemical analysis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 85: 1124-1138.
- Haslam, E. 1998. *Practical polyphenols: from structure to molecular recognition and physiological action*. Cambridge University Prees, Cambridge, Reino Unido.
- Hatier J-H. B. y Gould K. S. 2008. En *Anthocyanins- Biosynthesis, Functions, and Applications* (Eds.: K. Gould, K. Davies, C. Winefield), Springer, New York, 2008, 1–20pp.
- Hättenschwiler, S., Vitousek, P. M. 2000. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 238–243.
- Hebbel, R.P., Beuzard, Y., Lubin, B.H. 1993. Effect of excess alpha-hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model beta-thalassemic erythrocytes. *Journal of Clinical Investestigation* 91: 1706–1712.
- Hein, M., Arena, S. 2005. *Fundamentos de química*; Editorial Thomson; 11ª edición, México: 428-429.

- Herrmann, K., 1976. Flavonols and flavones in food plants, a review. *Journal of Food Technology* 11: 433–448.
- Hfaiedh, N., Allagui, M., Hfaiedh, M., Feki, A., Zourgui, L., Croute, F. 2008. Protective effect of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladode extract upon nickel-induced toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology* 46 (12): 3759-3763.
- Hu, J., Lee, S.O., Hendrich, S., Murphy, P.A. 2002. Quantification of the group B soyasaponins by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2587–2594.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Prior, R. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(16):4437-44.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841–1856.
- Jia, Z.S., Zhou, B., Yang, L., Wu, L.M., Liu, Z.L. 1998. Antioxidant synergism of tea polyphenols and α -tocopherol against free radical induced peroxidation of linoleic acid in solution. *Journal of the Chemical Society* 2: 911–915.
- Kallner, A., Hartmann, D., Hornig, D. 1977. On the absorption of ascorbic acid in man, *International Journal of vitamin and nutrition researches* 47: 383-388.
- Karamać, M., Kosińska, A., Pegg, R. B. 2006. Content of gallic acid in selected plant extracts. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 15 (1): 55–58.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisis, T., Jukic, M. 2006. Screening of 70 medical plant extracts for antioxidants capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94: 550-557.
- Konigsberg, M. 2007. Nrf2: la historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica Universidad Autónoma de México* 26 (1):18-25.
- Konigsberg, M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones médicas*. Ed. Manual Moderno, México, D.F. 1-14, 49-58, 73-82 pp.
- Koren, E., Kohen, R., Ginsburg, I. 2010. Polyphenols enhance total oxidant scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 235(6): 689-699.
- Kotz, J. C., Treichel, P.M., Weaver, G.C. 2003. *Química y reactividad química*. Cengage Learning Editores, sexta edición, 1292pp.

- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology* 25 (4): 726-73.
- Kuti, J. 2004. Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food chemistry* 85: 527-533.
- Lattanzio, V., Cardinali, A., Ruta, C., Fortunato, I. M., Lattanzio, V. M. T., Linsalata, V., Cicco, N. 2009. Relationship of secondary metabolism to grow in oregano (*Origanum vulgare* L.) shoots cultures under nutrient stress. *Environmental and Experimental Botany* 65: 54 – 62.
- Lattanzio, V., Kroon, P., Quideau, S. D. 2008. Treutter in *Recent Advances in Polyphenol Research* Vol. 1. En F. Daayf, V., Lattanzio, Wiley-Blackwell, Editorial Oxford, 1–35pp.
- Laurence, L., Brunton, Bruce A., Chabner, Björn C. K. 2010. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw Hill Professional, Edición 20, EUA: 1984.
- Leite, A., Malta, M., Riccio, M. F., Eberlin, M., Pastore, G., Júnior, M.R. 2011. Antioxidant Potential of Rat Plasma by Administration of Freeze-Dried Jaboticaba Peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 2277–2283.
- Levine, M., Conry-Cantilena, C., Wang, Y., Welch, R.W., Washko, P.W., Dhariwal, K.R., Park, J.B., Lazarev, A., Graumlich, J.F., King, J., Cantilena, L.R. 1996. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proceeding National Academy of Sciences USA* 93 (8): 3704–3709.
- Liu, R.H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of Action. *Journal of Nutrition* 134: 3479-3485.
- Liu, Z.Q., Ma, L.P., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z.L. 2000. Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein. *Chemistry and Physics of Lipids* 106: 53–63.
- Ma, L., Liu, Z., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z.L. 2000. Inhibition of free radical induced oxidative hemolysis of red blood cells by green tea polyphenols. *Chinese Science Bulletin* 45: 2052– 2056.
- Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K. 1996. *Food antioxidants*. Marcel Dekker. New York, USA: 1-25, 67-82pp.

- Maguire, J. J., Kellogg, E. W., Packer, L. 1982. Protection against free radical formation by protein bound iron. *Toxicology Letters* 14: 27-34.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79: 727-747.
- Mao, G.D., Thomas, P.D., Poznansky, M.J. 1994. Oxidation of spin trap DMPO in an electron paramagnetic resonance study of the reaction of methemoglobin with hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine* 16: 493-500.
- Martin, K.R. y Appel, C.L. 2010. Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 2: 1-12.
- Martínez-Flórez, J., González-Gallego, J. M., Culebras y Tuñón, M.J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 17(6): 271-278.
- Mathew, S.T. y Abraham, E. 2006. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various *in vitro* models. *Food Chemistry* 94:520-528.
- Matthäus, B. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3444-3452.
- McCord, J. M. y Day, E. D. 1978. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Letters* 86: 139-142.
- McDowell, L.R. 2000. Vitamins in animal and human nutrition. Segunda edición. Editorial Iowa State University Press. Iowa EUA, 603-604 pp.
- Meckes, M., David-Rivera, A.D., Nava-Aguilar, V., Jimenez, A. 2004. Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine* 11: 446–451.
- Miranda, L. 2008. Química de los radicales libres. En Konigsberg, M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual Moderno. México, D.F. 3-20pp.
- Miyamoto, N., Izumi, H., Miyamoto, R., Kondo, H., Tawara, A., Sasaguri, Y., Kohno, K. 2011. Quercetin induces the expression of peroxiredoxins 3 and 5 via the Nrf2/NRF1 transcription pathway. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 52 (2):1055-1063.

- Moilanen, J., Salminen, J.-P. 2008. Ecologically neglected tannins and their biologically relevant activity: chemical structures of plant ellagitannins reveal their *in vitro* oxidative activity at high pH. *Chemoecology* 18: 73–83.
- Montero, M. 1996. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Revisión. ISSN 1025-5583, 57 (4) http://sisbib.unmsm.edu.pe/bVrevistas/Anales/v57_n4/radicales.htm
- Morel, I., Lescoat, G., Cogrel, P., Sergent, O., Padeloup, N., Brissot, P., Cillard, P., Cillard J. 1993. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochemistry and Pharmacology* 45:13-19.
- Morton, D.B., Abbot, D., Barclay, R., Close, B. S., Ewbank, R., Gask, D., Heath, M., Mattic, S., Poole, T., Seamer, J., Southee, J., Thompson, A., Trussell, B., West, C, Jennings, M. 1993. Removal of blood from laboratory mammals and birds. *Laboratory Animals* 27: 1-22.
- Motohashi, M. y Mori I. 1983. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radical catalyzed by transferrin. *FEBS Letters* 157: 197-199.
- Nakayama, T., Yamada, M., Osawa, T., Kawakishi, S. 1993. Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids. *Biochemistry and Pharmacology* 45: 265-267.
- Niki, E. 1987. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chemistry Physics of Lipids* 44: 227-253.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México: Diario Oficial de la Federación.
- Northup, R. R., Yu, Z., Dahlgren, R. A., Vogt, K. A. 1995. Polyphenol control of nitrogen release from pine litter. *Nature* 377: 227 – 229.
- Ochoa, E. S. 1984. Uso potencial del ensilaje del huizache (*Acacia farnesiana* (L.) Willd) en la alimentación de la cabra. Tesis UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México, D.F. 66pp.
- Olszewska, M. 2007. Quantitative HPLC analysis of flavonoids and chlorogenic acid in the leaves and inflorescences of *Prunus serotina* Ehrh. *Acta Chromatographica* 19: 253-269.

- Oreopoulos, D. G., Lindeman, R.D., VanderJagt, D.J., Tzamaloukas, A.H., Bhagavan, H.N., Garry, P.J. 1993. Renal excretion of ascorbic acid: effect of age and sex. *Journal of the American College of Nutrition* 12 (5): 537–42.
- Özcelik, B., Lee, J.H., Min, D.B. 2003. Effects of light, oxygen and pH on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. *Journal Food Science* 68:487–490.
- Parr, A.J., Bolwell, J.P. 2002. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of Sciences Food and Agricultural* 80: 985- 1012.
- Pérez, T. G. 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 22(1): 48-57.
- Pier-Giorgio, P. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal Natural Products* 63: 1035-1042.
- Pokorny, J. 2004. Antioxidantes en alimentos aplicaciones prácticas. Editorial Acribia, España, 110-140pp.
- Prieto, M.A., Rodríguez-Amado, I., Vázquez, J.A., Murado, M.A. 2012. β -carotene assay revisited. Application to characterize and quantify antioxidant and prooxidant activities in a microplate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (36): 8983-93.
- Prior, R. I., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M, Huang, D., Ou, B., Jacob, R. 2003. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{fl})) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3273-3279.
- Puga, D.C., Espinosa, J.D., Pedraza-Chaverri, J., Cuchillo, H.M., Díaz, M.M. 2012. Radical scavenging protection of *Acacia farnesiana* fruits extracts on porcine kidney cells. *Nutrition, Feeds, Feeding Program N-86. XI International Conference on Goats, IGA. Islas Canarias, España.* 329 p.
- Puppo, A. y Halliwell B. 1988. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is hemoglobin a biological Fenton catalyst? *Biochemistry Journal* 249: 185–190.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L. 2011. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* 50: 586 – 621.

- Ramírez, R.G. y Lara, J.A. 1998. Influence of native shrubs *Acacia rigidula*, *Cercidium macrum* and *Acacia farnesiana* on digestibility and nitrogen utilization by sheep. *Small Ruminant Research* 28: 39-45.
- Ramírez, R.G., Neira-Morales, R.R., Ledezma-Torres, R.A., Garibaldi-González, C.A. 2000. Ruminal digestion characteristics and effective degradability of cell wall of browse species from northeastern Mexico. *Small Ruminant Research* 36: 49-55.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9/10): 1231-1237.
- Rice-Evans, C. y Parker L. 2003. *Flavonoids in health and disease*. Second Edition Marcel Dekker, USA: 467 pp.
- Rice-Evans, C., Omorphos, S.C., Baysal, E. 1986. Sickle cell membranes and oxidative damage. *Journal of Haematology* 237: 265–269.
- Rose, R.C., McCormick, D.B., Li, T.K., Lumeng, L., Haddad, J.G., Spector R. 1986. Transport and metabolism of vitamins. *Federal Procedures* 45: 30-39.
- Ruíz, C. 2007. *Parámetros de estrés oxidativo en transplante renal y efecto modulador de atorvastatina y N-acetilcisteína*. Tesis doctoral. Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España, 58-70 pp.
- Rumsey, S.C., Kwon, O., Xu, G.W., Burant, C.F., Simpson, I., Levine, M. 1997. Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *Journal of Biology and Chemistry* 272 (30): 18982–18989.
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177: 67–80.
- Samuni, A., Aronovitch, J., Godinger, D., Chevion, M., Czapski, G. 1983. En The toxicity of vitamin C and metal ions. A site-specific Fenton mechanism. *European Journal of Biochemistry* 137: 119-124.
- Sánchez, R. M. A. y Mendoza, N. V. M. 2003. Tesis. *Envejecimiento, enfermedades crónicas y antioxidantes*. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 59-61, 136 pp.
- Savini, I., Rossi, A., Pierro, C., Avigliano, L., Catani, M.V. 2008. SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids* 34 (3): 347–55.
- Scalbert, A. y Haslam, E. 1987. Polyphenols and chemical defence of the leaves of *Quercus robur*. *Phytochemistry* 26: 3191 – 3195.

- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. 2006. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 287–306.
- Scheffer, F. 1992. Oxide reduction system. *Lehrbuch der Bodenkunde* 13a Ed. Editorial Enke. Stuttgart, Alemania: 72-79. Traducido por: Stechauner
- Seigler, D. S. 2003. Phytochemistry of *Acacia sensu lato*. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 845–873.
- Shahidi, F. 1996. Natural antioxidants. Chemistry, health effects and applications. AOCS Press, Champaign, Illinois: 1-6, 9, 18, 19pp.
- Soares, M. C., Ribeiro, E. T., Kuskoski, E. M., Gonzaga, L. V., Lima, A., Mancini, J., Fettsemima, R. 2008. Composition of phenolic acids content in apple (*Malus sp*) pomace. *Ciencias Agraria. Londrina* 29: 339-348.
- Taga, M. S., Miller, E. E., Pratt, D. E. 1984 Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist Society* 61: 928-931.
- Tedesco, I., Russo, M., Russo, P., Lacomino, G., Russo, G. L., Carraturo, A., Faruolo, C., Moio, L., Palumbo, R. 2000. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 11:114 –119
- Treutter, D. 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: A review. *Environmental Chemistry Letters* 4 (3): 147 – 157.
- Valverde, J., Periago, M. J. y Ros, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 50 (1): 5-18.
- Van der Berg, J.J.M., Op den Kamp, J.A.F., Lubin, B.H., Roelofsen, B., Kuypers, F.A. 1992. Kinetics and site specificity of hydroperoxide-induced oxidative damage in red blood cells. *Free Radical Biology and Medicine* 12: 487–498.
- Van Driel-Murray, C. 2000. *Ancient Egyptian Materials and Technology*. Editorial P. T. Nicholson, I. Shaw. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido: 299-319.
- Velázquez, A.J., González Ronquillo, M., Bórquez, J., Domínguez, I.A., Perezgrovas, R. 2011. Composición química y producción de gas *in vitro* de dietas con vainas de *Acacia farnesiana*. *Archivos de Zootecnia* 60 (231): 479-488.
- Vives, J.L., Miguel-Garcia, A., Pujades, M.A., Miguel-Sosa, A., Cambiazzo, S., Linares, M., Dibarrart, M.T., Calvo, M.A. 1995. Increased susceptibility of

- microcytic red blood cells to in vitro oxidative stress. *European Journal of Haematology* 55(5): 327–331.
- Wang H., Provan G. J., Helliwell K. 2004. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods* 87 (2): 307–311.
- Wilkinson, M. J. y Stara A. B. 1989. Producción comercial de cabras. Acribia, España: www.OIE - Revue E-160219.mht
- Williams, R.J., Spencer, J.P., Rice-Evans, C. 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology Medicine* 36 (7): 838-849.
- Winston, G., Regoli, F., Dugas, A., Fong, J., Blanchard, K. 1998. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical and Biological Medicine* 24:480-493.
- Wright J. S., Johnson E. R., DiLabio G. A. 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal American Chemistry Society* 123 (6): 1173 – 1183.
- Xu, F., Sun C. H., Sun, J., Liu, C. F., He, B. H., Fan, C. H., 2005. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. *Analytica Chemical Acta* 552: 207-217.
- Yao, P., Nussler, A., Liu, L., Hao, L., Song, F., Schirmeier, A., Nussler, N. 2007. Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *Journal of Hepatology* 47(2):253-2561.
- Yoshiki Y. y Okubo K. 1995. Active oxygen scavenging activity of DDMP (2,3-dihydro-2, 5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) saponin in soybean seed. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59, 1556–1557.
- Yoshiki, Y., Kudou, S., Okubo, K. 1998. Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean: Review. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 62: 2291–2299.
- Yu, B. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiology Review* 74: 139-162.

- Zamora, M. y Torres, J. M. 2001. Proyecto: información y análisis para el manejo forestal sostenible: integrando esfuerzos nacionales e internacionales en 13 países tropicales en América latina (GCP/RLA/133/EC). Análisis de la información sobre productos forestales no madereros en México. FAO. Santiago de Chile, 6pp.
- Zhou, B., Jia, Z.S., Chen, Z.H., Yang, L., Wu, L.M. Liu, Z.L. 2000. Synergistic antioxidant effect of green tea polyphenols with α -tocopherol on free radical initiated peroxidation of linoleic acid in micelles. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2*: 785– 791.
- Zhou, B., Wu, L.M., Yang, L., Liu Z.L. 2005. Evidence for α -tocopherol regeneration reaction of green tea polyphenols in SDS micelles. *Free Radical Biology and Medicine* 38: 78– 84.
- Zilversmit, D.B. 1979. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *American Heart Association* 60: 473-485 pp
- Zollo, A., Furno, F., Grandola, G., Totaro, M., Aloj, E. 2004. Factores ambientales generadores de radicales libres y factores clínico-sanitarios y ocupacionales de riesgo de irradiaciones: prevención y protección. *Higiene y Sanidad Ambiental* 4:65-71.
- Zourgui, L., El Golli, E., Bouaziz, C., Bacha, H., Hassen, W. 2008. Cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes prevent oxidative damage induced by the mycotoxin zearalenone in Balb/C mice. *Food and Chemical Toxicology* 46(5):1817-1824.
- Zucker, W. V. 1983. Tannins: does structure determine function: An ecological perspective. *The American Naturalist* 121: 335 – 365.