



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**“Actividad antioxidante y cinética de reacción de
compuestos bioactivos de hojas de *Rubus sparsiflorus*
(shiraca) frente a radicales libres”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias de la Salud

AUTOR

Henry GUIJA GUERRA

ASESOR

Luzmila Victoria TRONCOSO CORZO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Guija H. Actividad antioxidante y cinética de reacción de compuestos bioactivos de hojas de *Rubus sparsiflorus* (shiraca) frente a radicales libres [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2019.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado
Dirección General de Biblioteca y Publicaciones

Dirección del Sistema de Bibliotecas y Biblioteca Central

"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"



Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor (dato opcional):

<https://orcid.org/0000-0002-0698-4464>

Código ORCID del asesor o asesores (dato obligatorio):

<https://orcid.org/0000-0003-1075-874X>

DNI del autor: 09398610

Grupo de investigación: Antioxidantes, metabolismo nutricional y salud.

Institución que financia parcial o totalmente la investigación: -----

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y/o coordenadas geográficas: Instituto de Investigación de Bioquímica y Nutrición – Facultad de Medicina – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. (Av. Grau 755. Lima)

Año o rango de años que la investigación abarcó: 2017-2018



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
FACULTAD DE MEDICINA
VICEDECANATO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
SECCIÓN DOCTORAL



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR

En la ciudad de Lima, a los veinticinco días del mes de noviembre del año dos mil diecinueve siendo las **12.00 m**, ante el Jurado de Sustentación, bajo la Presidencia del DR. Jorge Luis Arroyo Acevedo y los Miembros del mismo, los Doctores:

DR. JORGE LUÍS ARROYO ACEVEDO	PRESIDENTE
DRA. MARIA MERCEDES SOBERÓN LOZANO	MIEMBRO
DRA. ALICIA JESUS FERNANDEZ GIUSTI	MIEMBRO
DR. MIGUEL HERNÁN SANDOVAL VEGAS	MIEMBRO
DRA. LUZMILA VICTORIA TRONCOSO CORZO	ASESORA

El postulante al Grado de Doctor en Ciencias de la Salud, es *MAGISTER EN NUTRICION CON MENCION EN ASPECTOS BIOLOGICOS DE LA NUTRICION*, don **HENRY GUIJA GUERRA** procedió a hacer la exposición y defensa pública de su Tesis titulada: "**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CINÉTICA DE REACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE HOJAS DE *Rubus sparsiflorus (shiraca) FRENTE A RADICALES LIBRES***", para optar el grado Académico de Doctor.

Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, después de la cual obtuvo la siguiente calificación "**B**" **MUY BUENO 18 (DIECIOCHO)** a continuación, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad de Medicina, proponga que se le otorgue al Magister **HENRY GUIJA GUERRA**, el Grado Académico de **DOCTOR CIENCIAS DE LA SALUD**.

Se expide la presente Acta en seis originales y siendo las 1:00 pm. se da por concluido el acto académico de sustentación.


DRA. MARÍA MERCEDES SOBERÓN LOZANO
MIEMBRO DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN


DRA. ALICIA JESÚS FERNÁNDEZ GIUSTI
MIEMBRO DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN


DR. MIGUEL HERNÁN SANDOVAL VEGAS
MIEMBRO DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN


DRA. LUZMILA VICTORIA TRONCOSO CORZO
ASESORA DE LA TESIS


DR. JORGE LUÍS ARROYO ACEVEDO
PRESIDENTE DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN

Esta tesis se ejecutó en el Instituto Centro de Investigación de Bioquímica
y Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor
de San Marcos

JURADO INFORMANTE

Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo
Dra. María Mercedes Soberón Lozano
Dra. Luzmila Victoria Troncoso Corzo

JURADO EXAMINADOR

Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo
Dra. María Mercedes Soberón Lozano
Dra. Alicia Jesús Fernández Giusti
Dr. Miguel Hernán Sandoval Vegas
Dra. Luzmila Victoria Troncoso Corzo

DEDICATORIAS

A mi adorado padre Emilio,
a quien le debo todo lo que he logrado en esta vida
y siempre sera el ejemplo a seguir.
Las palabras de agradecimiento que le tengo
nunca serán suficientes para con él.

A mi amada esposa Juana y a mi apreciado hijo Henry,
quienes siempre son mi mayor motivación para seguir
esforzándome y superándome;
gracias por todo el apoyo que me brindan siempre.

A mi querida hermana Patricia,
a mi ahijado Patrick y a mi sobrina Emily,
quienes siempre son mi inspiración y
me motivan a superarme.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Luzmila Troncoso Corzo
por su apoyo constante e incondicional en la realización de la presente tesis,
así como también en mi formación profesional.
Solamente le tengo palabras de agradecimiento por todas sus enseñanzas.

A mi padre Emilio,
quien es una fuente inagotable de conocimientos
y a quien admiro, por sus enseñanzas
y el invalorable apoyo que siempre me brinda.

ÍNDICE GENERAL

1. Lugar de ejecución	II
2. Jurados	III
3. Dedicatorias	IV
4. Agradecimientos	V
5. Índice general	VI
6. Lista de tablas	VII
7. Lista de figuras	VIII
8. Abreviaturas	IX
9. Resumen	X
10. Introducción	1
11. Marco Teórico	4
12. Metodología	20
13. Resultados	26
14. Discusión	47
15. Conclusiones	66
16. Recomendaciones	67
17. Referencias bibliográficas	68

LISTA DE TABLAS

<u>TABLAS</u>	Página
Tabla 1	26
Tabla 2	27
Tabla 3	28
Tabla 4	29
Tabla 5	38

LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURAS</u>	Página
Figura 1	30
Figura 2	31
Figura 3	32
Figura 4	34
Figura 5	35
Figura 6	36
Figura 7	39
Figura 8	40
Figura 9	41
Figura 10	43
Figura 11	44
Figura 12	45

ABREVIATURAS

NF- κ B	Factor Nuclear kappa B
Nrf2	Factor Nuclear Eritroide-2
JNK	Enzima C-Jun Kinasa
AP-1	Proteína Activadora-1
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
ERK	Señal Extracelular Regulado por Kinasas
p38MAPK	Proteína Kinasa p38 Activada por Mitógenos
GSK-3 β	Glucógeno Sintasa Kinasa-3 β
IKK β	I Kappa Kinasa β
Glut-4	Proteína Transportadora de Glucosa - 4
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
FRAP	Capacidad del Plasma para Reducir Ion Férrico
ABTS	2,2'-azino-bis(ácido-3-etilbonzotiazolina-6-sulfónico)
ORAC	Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno
EDTA	Etilendiamino tetraacético

RESUMEN

El *Rubus sparsiflorus* conocido como “shiraca” es una planta arbustiva que crece en la Cordillera de los Andes. **Objetivos.-** Determinar la actividad antioxidante y cinética de reacción frente a radicales libres de los compuestos bioactivos de hojas de *Rubus sparsiflorus* (“shiraca”). **Diseño de investigación.-** Analítico, experimental, longitudinal y prospectivo. **Metodología.-** Los contenidos de polifenoles y flavonoides se determinaron en la decocción acuosa y los extractos hidroalcohólico y metanólico de las hojas de *Rubus sparsiflorus*. También se realizaron las determinaciones analíticas de sus capacidades antioxidantes utilizando las técnicas FRAP, DPPH, Poder reductor, Poder quelante y la Capacidad para bloquear el Anión superóxido. **Resultados.-** El extracto metanólico de las hojas de *Rubus sparsiflorus* mostró el mayor contenido de polifenoles y flavonoides que la decocción acuosa y el extracto hidroalcohólico, así mismo, la evaluación de la capacidad antioxidante del extracto metanólico con la técnica FRAP exhibió el valor más elevado, en cambio, cuando se utilizó la técnica DPPH fue el extracto hidroalcohólico el que presentó la mayor capacidad antioxidante. Un análisis de la cinética de reacción usando la técnica FRAP se observó que el extracto metanólico produjo una reacción de mayor extensión habiéndose alcanzado el equilibrio a los 60 minutos. La evaluación cinética realizada utilizando el radical libre DPPH permitió observar que la decocción acuosa y el extracto metanólico mostraron una reactividad ligeramente mayor que el extracto hidroalcohólico. El extracto metanólico tuvo el mayor poder reductor expresado como equivalentes de ácido ascórbico. Con respecto al poder quelante las tres muestras exhibieron prácticamente el mismo valor quelante. En relación al comportamiento cinético frente al anión superóxido la decocción acuosa y los extractos hidroalcohólico y metanólico mostraron similar comportamiento, siendo éste de tipo sigmoideo. **Conclusiones.-** Los resultados de este estudio indican que las hojas del *Rubus sparsiflorus* son una fuente importante de compuestos antioxidantes, correspondiendo al extracto metanólico la mayor capacidad antioxidante.

Palabras clave: Radical libre, antioxidante, *Rubus sparsiflorus*, shiraca, cinética.

SUMMARY

The *Rubus sparsiflorus* known as "shiraca" is a shrub that grows in the Cordillera de los Andes. **Objectives.-** To determine the antioxidant and kinetic activity of reaction against free radicals of the bioactive compounds of *Rubus sparsiflorus* leaves ("shiraca"). **Research design.-** Analytical, experimental, longitudinal and prospective. **Methodology.-** The contents of polyphenols and flavonoids were determined in the aqueous decoction and the hydroalcoholic and methanolic extracts of *Rubus sparsiflorus*. Analytical determinations of their antioxidant capacities were also made using the techniques of FRAP, DPPH, reducing power, chelating power and the ability to block superoxide anion. **Results.-** The methanolic extract of the leaves of *Rubus sparsiflorus* showed the highest content of polyphenols and flavonoids, likewise, the evaluation of the antioxidant capacity of the methanolic extract with the FRAP technique showed the highest value, however, when the DPPH technique was used, it was the hydroalcoholic extract that had the highest antioxidant capacity. An analysis of reaction kinetics using the FRAP technique showed that the methanolic extract produced a longer reaction and that the reaction reached equilibrium at 60 minutes. The kinetic evaluation performed using the DPPH free radical allowed to observe that the aqueous decoction and the methanolic extract showed a slightly higher reactivity than the hydroalcoholic extract. The methanolic extract had the greatest reducing power expressed as ascorbic acid equivalents. With respect to the chelating power the three samples exhibit practically the same chelating power. In relation to the kinetic behavior against the superoxide anion, the aqueous decoction and the hydroalcoholic and methanolic extracts show similar sigmoidal behavior. **Conclusions.-** The results from this study indicate that the leaves of *Rubus sparsiflorus* are an important source of antioxidant compounds corresponding to the methanol extract, the highest antioxidant capacity.

Keywords: Free radical, antioxidant, *Rubus sparsiflorus*, shiraca, kinetic.

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

El estudio de plantas con propiedades medicinales es objeto de múltiples investigaciones en muchos laboratorios del mundo, este interés radica en la estrecha relación que existe entre la generación de radicales libres y diversas patologías en el ser humano (Frei 1994; Yu, 1994; Pryor, 1994; Cascales, 1999; Huang & Prior, 2005), por cuyo motivo, los compuestos necesarios para impedir el efecto nocivo que producen los radicales libres son las sustancias denominadas antioxidantes, compuestos químicos que se encuentran principalmente como componentes de los vegetales, ya sean éstos, alimentos o aquellos que se utilizan por sus propiedades medicinales (Cascales, 1999).

Los radicales libres se generan en el organismo humano de muy diversas maneras, siendo la mitocondria el principal lugar donde éstos se producen (Barja, 2005). Se han identificado dos lugares en la cadena respiratoria mitocondrial donde se genera el radical libre denominado anión superóxido, por transferencia de un electrón al oxígeno molecular (Cascales, 1997). El anión superóxido podría ser transformado por la enzima superóxido dismutasa en peróxido de hidrógeno, compuesto que no es un radical libre pero tiene la propiedad de reaccionar muy rápidamente con el ion ferroso o el ion cuproso y generar el radical hidroxilo, que es una especie reactiva de oxígeno muy reactiva y altamente perjudicial para la célula. Con la finalidad de evitar la reacción antes mencionada, la célula dispone de la enzima catalasa que tiene la propiedad de descomponer el peróxido de hidrógeno (Cascales, 1999).

El anión superóxido también puede generarse por acción de la enzima NADPH oxidasa y posteriormente transformarse en peróxido de hidrógeno, compuesto que tiene la posibilidad de reaccionar con el óxido nítrico y generar el peroxinitrito, que es un fuerte oxidante y en consecuencia dañar la célula. Así mismo, el anión superóxido puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno y formar el radical hidroxilo (Cascales, 1997).

Otra de las reacciones que reviste particular importancia es aquella en que participa la vitamina C; cuando esta vitamina reacciona con metales de transición como el ion cúprico o ion férrico genera el radical hidroxilo que es el más nocivo para la célula, esta reacción se realiza a través de varias etapas en las que se reduciría el metal de transición, se

formaría peróxido de hidrógeno y finalmente como consecuencia de esta reacción el peróxido de hidrógeno generado reaccionaría con el metal de transición reducido y se formaría el radical hidroxilo (Inoue & Hirobe, 1986).

La defensa antioxidante que dispone el ser humano está conformada por compuestos enzimáticos como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, pero también posee un sistema antioxidante constituido principalmente por el glutatión, transferrina, ceruloplasmina, ácido úrico, entre otros (Cascales, 1997). El sistema antioxidante del que están premunidos los humanos no es lo suficientemente eficiente para neutralizar los efectos nocivos que ocasionan los radicales libres, razón que torna necesario que en su dieta ingiera sustancias antioxidantes como la vitamina E, vitamina C, β -caroteno, polifenoles, antocianinas, flavonoides, etc. (Cascales, 1997).

Las considerables modificaciones de los patrones alimentarios producidas desde los años 60 en el ser humano, así como, las modificaciones de las condiciones ambientales, ha ocasionado un deterioro apreciable de su salud, hechos que constituyen un reto para profundizar los estudios sobre los mecanismos íntimos a nivel molecular que conduzcan al inicio y desarrollo de las diversas patologías como la diabetes mellitus, hipertensión, cáncer, obesidad, etc., que se están incrementando considerablemente en estos últimos años (Johnson et al., 2007).

Las enfermedades antes mencionadas tienen un estrecho vínculo con la generación de radicales libres, (Keher & Smith, 1994) hecho que torna el estudio de estos efectos nocivos para el ser humano de particular importancia, lo que ha conducido a una mejor comprensión de la etiopatogenia de varias enfermedades, así como, una descripción más precisa de los mecanismos moleculares de los metabolitos secundarios de muchas plantas con propiedades medicinales (Rains & Jain, 2011).

Las hojas de muchas plantas se caracterizan por tener un elevado contenido de compuestos antioxidantes (Samaniego-Sanchez et al., 2011), probablemente sean sintetizados como parte de los mecanismos de defensa que tienen las plantas para hacer frente a los efectos nocivos de los rayos solares; esta es la razón del intenso estudio que se realiza sobre las actividades antioxidantes que muestran los metabolitos secundarios de muchas plantas (Rice-Evans, Miller & Paganga, 1996; Procházková, Bousová & Wilhelmmová, 2011; Schattenberg & Czaja, 2014; Quijano, Trujillo, Castro & Trostchansky 2016), la caracterización de los metabolitos secundarios, su reactividad, la

naturaleza de la reactividad, el efecto que despliegan sobre las vías de señalización celular, así como el efecto sobre la homeostasis redox que debe prevalecer en un organismo para mantener su condición saludable.

El estudio de las propiedades antioxidantes de una muestra biológica como son las hojas de las plantas implica la utilización de diversos procesos de preparación de los extractos vegetales, que tienen estrecha vinculación con la naturaleza de los metabolitos componentes de dichos extractos, así mismo, es necesario describir la cinética de reacción que muestran los antioxidantes que integran los extractos frente a radicales libres o a la naturaleza cinética de sus propiedades reductoras. Posteriormente será necesario describir los efectos que ejercen los compuestos que muestren comportamientos altamente eficientes como antioxidantes en condiciones patológicas, utilizando modelos de animales de laboratorio.

Las consideraciones anteriormente descritas nos permiten formularnos la siguiente interrogante: ¿Las hojas del *Rubus sparsiflorus* (shiraca) tienen efecto antioxidante frente a radicales libres?

Objetivo General

Determinar la actividad antioxidante y cinética de reacción de los compuestos bioactivos de hojas de *Rubus sparsiflorus* (shiraca) frente a radicales libres.

Objetivos Específicos

1. Determinar la actividad antioxidante de los compuestos bioactivos de las hojas de *Rubus sparsiflorus* (shiraca).
2. Establecer la cinética de reacción de los compuestos bioactivos de la decocción acuosa de las hojas de *Rubus sparsiflorus* (shiraca) frente a radicales libres.
3. Mostrar la cinética de reacción de los compuestos bioactivos del extracto hidroalcohólico de hojas de *Rubus sparsiflorus* (shiraca) frente a radicales libres.
4. Identificar la cinética de reacción de los compuestos bioactivos del extracto metanólico de hojas de *Rubus sparsiflorus* (shiraca) frente a radicales libres.

CAPITULO 2.- MARCO TEORICO

Marco Epistemológico

La investigación científica constituye una de las más importantes actividades del ser humano, los resultados experimentales incrementarán el conocimiento científico lo que posteriormente servirá para tener una mejor concepción del universo. Una mirada retrospectiva a la historia de la humanidad nos revela que los seres humanos hemos sufrido una gran diversidad de enfermedades cuya prevención y curación se ha desarrollado probablemente desde la edad de piedra (Frei 1994).

El desarrollo científico, así como el tecnológico, han sido los pilares que han permitido abordar el cuidado de la salud con una estrategia nueva. En este contexto el estudio de los vegetales es una opción que está brindando, a través del aislamiento y la identificación de compuestos bioactivos, que son de mucha utilidad para la preservación de la salud, pero cuyo estudio requiere el uso de cultivos celulares, animales de experimentación, etc.

El estudio de las plantas con potenciales efectos benéficos para la salud incluye la determinación cuantitativa de su probable contenido de vitaminas, minerales, metabolitos secundarios, compuestos tóxicos, compuestos con actividad antibiótica, etc. Así mismo, es necesario realizar el estudio de la capacidad antioxidante (Frei 1994) ya que una gran diversidad de enfermedades crónicas no transmisibles se encuentra estrechamente vinculadas con la generación de radicales libres.

El estudio de los radicales libres se inició a comienzos del siglo pasado pero a mediados de dicho siglo empezó el estudio de estos compuestos en los seres vivos habiéndose mostrado el efecto tóxico del oxígeno pero sin el sustento apropiado (Gerschman, Gilbert, Nye, Dwyer & Fenn, 1954), pero posteriormente, el descubrimiento de la superóxido dismutasa constituyó un considerable avance que permitió explicar la presencia de radicales libres en sistemas biológicos (Mc Cord & Fridovich, 1969), inclusive por aquel entonces se enunció la teoría del envejecimiento basado en la acción nociva de los radicales libres (Harmand, 1956).

Actualmente se tiene conocimiento de que muchas patologías están vinculadas con la generación de los radicales libres, por cuyo motivo, se torna en un área de particular interés cuando las más importantes investigaciones relacionan a los radicales libres con enfermedades como la aterosclerosis, diabetes mellitus, obesidad, cáncer, psoriasis, etc (Cascales, 1997). Estas estrechas relaciones de los radicales libres con las enfermedades han permitido desarrollar estrategias que incluyen su estudio en las diversas vías de señalización celular (Susuki, Forman & Sevanian, 1997), que son utilizados en el descubrimiento de los nuevos medicamentos.

Esta es una de las razones para encausar las investigaciones en plantas con un potencial contenido de antioxidantes, ya que el estrés oxidativo en el ser humano constituye una de las etapas que anteceden al desarrollo de ciertas patologías, para cuyo propósito, es necesario realizar el estudio de las plantas medicinales con esta perspectiva a fin de establecer su probable utilización posterior en la prevención de enfermedades e inclusive en el tratamiento de ellas (Lobo, Patil, Phatak & Chandra, 2010).

Los antioxidantes de tipo sintético natural son utilizados de manera rutinaria para proteger los alimentos de la oxidación. Los antioxidantes naturales tienen la ventaja de tener un bajo costo, ser compatible con los alimentos y carecer de efectos indeseables para el ser humano. Se han realizado muchos estudios sobre el potencial antioxidante de frutas como la manzana, naranja, camu camu, uva, etc., así como, de verduras como espinaca, tomates, legumbres, etc., y plantas medicinales como, anís, mate, atansia, cola de caballo, etc. habiéndose descrito la presencia de un elevado contenido de polifenoles, flavonoides, antocianinas, vitamina C, licopeno, β -caroteno, etc. La determinación de polifenoles tiene una particular importancia en las plantas con propiedades medicinales; diversas especies como *Zanthoxylum alatum* con un contenido de polifenoles no muy elevado (Karmakar, Haldar, Chakraborty, Dewanjee & Haldar, 2015) es utilizado con fines medicinales, mientras que la *Moringa oleífera* posee una elevada concentración de polifenoles (Funmilayo, Oluseyi & Olayinka, 2014) |y se le utiliza en el tratamiento de la disentería y hepatitis. Se ha descrito el contenido de polifenoles de diversas especies del género *Selaginella* (Sivaraman, Johnson, Parimelazhagan, & Irudayaraj, 2013), que es muy utilizada en enfermedades cardiovasculares.

Otro de los metabolitos secundarios cuyo estudio reviste particular importancia son los flavonoides, con tal propósito se ha determinado el contenido de este metabolito en *Hypericum triquetrifolium*, *Pistacia palaestina*, *Arbutus andrachne* y *Rosmarinus officinalis*, plantas medicinales que han mostrado tener un contenido considerable de flavonoides (Bilto, Alabdallat & Salim, 2015); así mismo, la *Mirabilis jalapa* una planta medicinal utilizada como vermífugo y diurético tiene un contenido muy discreto de flavonoides (Zachariah, Aleykutty, Viswanad, Jacob & Prabhakar, 2011), en cambio, la *Moringa oleífera* es una de las plantas que posee un mayor contenido de flavonoides (Funmilayo et al., 2014) aún más elevado que aquellas plantas con propiedades medicinales.

El elevado contenido de compuestos antioxidantes que se han descrito en alimentos y plantas medicinales mantienen estrecha relación con la capacidad antioxidante evaluada con técnicas como FRAP, DPPH, ORAC, etc. Un aspecto importante en la evaluación de las propiedades antioxidantes de una fuente biológica es la cinética de reacción de sus componentes bioactivos, las observaciones realizadas en raíces de *Aristolochia clematitis* indican que reaccionan con el radical DPPH con una velocidad considerablemente elevada (Benmehdi, Behilil, Memmou & Amrouche, 2017) al inicio de la reacción seguida de una fase lenta; de manera análoga se ha observado que el ácido gálico reacciona con el DPPH muy rápidamente, comportamiento que también lo hace el ácido cafeico y la catequina (Anissi, El Hassouni, Ouardaoui & Sendide, 2014), en cambio, los residuos obtenidos después de extraer el jugo de tomate (Savatovic, Cetkovic, Canadanovic-Brunet & Djilas, 2012) tiene un comportamiento caracterizado por reaccionar lentamente con el DPPH.

Un análisis cinético de extractos obtenidos de alimentos como los hongos con el TPTZ muestran una primera fase de elevada reactividad seguido de una fase lenta que dura entre 30 y 60 minutos; un comportamiento similar ocurre con los extractos de la cáscara de manzana de las variedades Pink lady y Red delicious (Henríquez, López-Alarcón, Lutz & Speisky, 2011). Compuestos como la quercetina, ácido gálico y resveratrol reaccionan muy rápidamente con el TPTZ y una posterior fase lenta observada hasta los 30 minutos (Pulido, Bravo y Saura-Calixto, 2000), mientras que el ácido ferúlico mostró una primera fase de reacción considerablemente rápida, pero sin un incremento posterior como en los casos anteriores.

La evaluación del poder reductor de las diversas especies vegetales resulta un poco difícil de analizar, ya que no existe una definida unidad de comparación; el extracto acuoso de *Tremurus himalaicus* alcanzó su mayor poder reductor (Mushtaq, Masoodi, Wali & Ganai, 2017) considerando la densidad óptica alcanzada cuando se le utiliza en un rango entre 50 y 250 $\mu\text{g/mL}$, en cambio, el *Prasium majus* tiene un poder reductor (Chaouche, et al., 2013) expresado como valor IC_{50} de 350 $\mu\text{g/mL}$.

El valor quelante constituye una manera de evaluar la propiedad de una sustancia para reaccionar con un metal de transición como el hierro evitando de esta manera que el metal participe en reacciones generadoras de radicales libres. Existen diversas maneras de expresar el poder quelante de una muestra de estudio; la *Cynara cardusculus* posee un poder quelante (Baali et al., 2014) expresado como IC_{50} de 118.91 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la *Euphorbia fusiformis* se le asigna un valor de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Kamalanathan, Srinibasan. Pratheeba, Yuvarajan & Natarajan, 2015) con un efecto quelante de 45.48 %, en cambio a la *Selaginella tenera* (Sivaraman et al., 2013) tiene un poder quelante de 3.11 mg equivalentes de EDTA/g. Conforme puede apreciarse no existe manera alguna de establecer comparaciones entre muestras de diversa procedencia.

La capacidad para reaccionar con el radical anión superóxido constituye otra de las propiedades que es necesario evaluar en un estudio sobre propiedades antioxidantes; una evaluación realizada con la *Euphorbia fusiformis* (Kamalanathan et al., 2015), indica que una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ produce una reacción con el anión superóxido de 90.70 %, mientras que el *Zanthoxylum alatum* reaccionó con el anión superóxido ((Kamalanathan et al., 2015) con una eficiencia expresada como IC_{50} de 19.8 $\mu\text{g/mL}$ y la *Stevia rebaudiana* a una concentración de 1 mg/mL bloqueó la acción del anión superóxido en 38.26% (Chaouche, et al., 2013), de manera análoga a los casos anteriores no existen unidades de referencia para expresar los resultados experimentales y estar en capacidad de proceder a establecer las diferencias correspondientes.

Antecedentes de la investigación

La existencia de radicales libres en una reacción química fue descrito por primera vez por el profesor Gomberg, (1900) en un artículo publicado en la revista *Journal of the American Chemical Society*. El profesor Gomberg se encontraba intentando sintetizar el tetrafenilmetano, compuesto que aparentemente era inestable por razones de índole estérico, pero logró la mencionada síntesis admitiendo que ello era posible gracias a la formación del radical libre trifenilmetilo, sugerencia que posteriormente fue admitida.

Las investigaciones sobre las oxidaciones de las moléculas orgánicas divalentes implicaban la formación de compuestos intermediarios como los radicales libres, habiéndose mostrado la formación de semiquinonas en las reacciones de oxidación de las benzoquinonas, posteriormente Michaelis (1946) propuso una teoría destinada a explicar la transferencia de electrones en reacciones biológicas mediante la reducción univalente del oxígeno que debería ocurrir a través de un mecanismo de transferencia de un solo electrón con la formación del anión superóxido; naturalmente que esta explicación era opuesta a la propuesta de Otto Warburg quien sostenía que los electrones en la cadena transportadora mitocondrial se conducían en pares, de tal manera que no era posible la formación del anión superóxido.

La reducción parcial del oxígeno propuesta por Michaelis, (1946) no sería considerado de aplicación a fenómenos de tipo biológico, por cuyo motivo, podría considerarse como un concepto de tipo teórico ya que en aquel entonces prevalecía la propuesta de Warburg, quien además se le había otorgado el premio Nobel de Medicina por sus aportes en la identificación del fermento respiratorio, que posteriormente se conoció como el “fermento amarillo de Warburg” o citocromo oxidasa.

Los estudios sobre el efecto tóxico del oxígeno se realizaron utilizando enzimas como pepsina, catalasa, colinesterasa y anhidrasa carbónica, (Stadie, Riggs & Haugaard, 1945) habiéndose observado que ninguna de las enzimas antes citadas era afectada por el oxígeno. En este estudio se incluyó a la colinesterasa, que era un ejemplo de enzima con grupo sulfhidrilo cuya actividad no fue afectada por el oxígeno. En otro trabajo, Stadie & Haugaard, (1945) observan que enzimas que participan en reacciones de óxido-reducción como la citocromo oxidasa y la citocromo *c* tampoco son afectadas por la alta tensión de

oxígeno, en cambio, la succínico deshidrogenasa de hígado, riñón y cerebro de rata son modificadas levemente por una presión de oxígeno de siete atmósferas.

Con posterioridad a estos resultados experimentales, Gerschman et al. (1954) realizaron un estudio utilizando ratas las que fueron sometidas a un ambiente de oxígeno puro, pudiendo observar que todos los animales morían al tercer día de exposición, y que el efecto nocivo del oxígeno se incrementaba cuando se aumentaba la presión de oxígeno. Estos resultados le permitió sugerir que la toxicidad que mostraba el oxígeno sobre los tejidos, se realizaba mediada por la formación de radicales libres, explicación que se concibió considerando que la reducción del oxígeno se podría realizar por la transferencia de un solo electrón al oxígeno, tal como lo había propuesto anteriormente Michaelis, (1946); las observaciones de Harmand, (1956) sobre el efecto nocivo de los rayos X sobre los tejidos, ocurría por acción de los radicales hecho que le permitió emitir una teoría sobre el envejecimiento basada en los efectos de los radicales libres.

Después de 15 años, la descripción de la enzima superóxido dismutasa aislada de eritrocitos por Mc Cord & Fridovich, (1969) permitió corroborar la propuesta realizada por Gerschman et al. (1954) en el sentido de asignar a los radicales libres, como el anión superóxido, el daño ocasionado a las ratas en el experimento sobre el efecto nocivo del oxígeno en animales de experimentación. La superóxido dismutasa utiliza al anión superóxido como sustrato formando como productos peróxido de hidrógeno y oxígeno.

Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas que se caracterizan por poseer uno o varios electrones desapareados (Fehér, Csomós & Vereckei, 1987). Esta característica torna a un gran número de radicales libres en compuestos altamente reactivos, debido a su natural tendencia a aparear su electrón; pero también existen radicales libres muy estables, condición que se debe a su estabilización por resonancia. Según la definición anterior, el oxígeno molecular es un bi-radical, ya que posee 2 electrones desapareados, aunque es eléctricamente neutro. Cuando se le incorpora 1 electrón, éste se apareará con uno de los electrones desapareados, originándose de esta manera el anión superóxido, el que tiene una carga eléctrica negativa y 1 electrón desapareado.

En el ser humano los radicales libres más comunes e importantes son aquellos que se generan a partir del oxígeno molecular, por cuyo motivo, un apropiado conocimiento de la estructura electrónica de este elemento, permite comprender las diferentes

transformaciones que sufre como consecuencia de reacciones de oxidación y reducción (Hernández-García, Wood, Castro-Obregón & Covarrubias, 2010). Las diversas especies moleculares que se forman a través de los procesos antes mencionados no necesariamente son radicales libres, tal como sucede con el oxígeno singulete y el peróxido de hidrógeno.

La reacción de reducción constituye uno de los eventos más importantes que experimenta el oxígeno y que posibilita la formación de diversas especies reactivas de este elemento, cuya formación en el organismo se produce en cantidades discretas durante el metabolismo celular, principalmente en la mitocondria (Fehér et al., 1987). El transporte de electrones a través de la cadena respiratoria conduce a la formación de agua, reacciones en cuya etapa final interviene la enzima citocromo oxidasa que cataliza la reducción tetravalente del oxígeno (Frei, 1994). Si el oxígeno es reducido a través de un proceso secuencial univalente, se formarán moléculas reactivas intermedias, siendo la primera de ellas el radical superóxido, luego el peróxido de hidrógeno y finalmente el radical oxhidrilo. En la cadena respiratoria se han identificado dos lugares que cederían un electrón al oxígeno para formar el anión superóxido, los complejos respiratorios I cuyos componentes serían los centros hierro sulfurados (Herrero & Barja, 1997) y el complejo respiratorio III cuyo componente sería la semiquinona (Turrens & Boveris, 1980).

El aislamiento de la superóxido dismutasa de eritrocito por Mc Cord & Fridovich, (1969) constituyó un avance de considerable importancia en la bioquímica y fisiología de los radicales libres en sistemas biológicos. Esta enzima cataliza una reacción de dismutación, es decir, utilizando dos moléculas de anión superóxido oxida una de ellas y lo convierte en oxígeno, mientras que la otra es reducida y genera el H_2O_2 . Otra enzima no menos importante es la catalasa, que tiene la propiedad de descomponer el peróxido de hidrógeno formando $H_2O + O_2$; la participación de ambas enzimas en los procesos donde se generan los aniones superóxido forman la defensa antioxidante (Fridovich, 1975), es decir, estas enzimas tienen la propiedad de eliminar al anión superóxido y al peróxido de hidrógeno, y de esta manera evitar la formación del radical hidroxilo el más peligroso en el ser humano.

La concepción y comprensión de la reducción univalente del oxígeno con la formación del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($HO\bullet$) (Frei, 1994), así como, la participación de la superóxido dismutasa permitió identificar un proceso de índole biológico que ofrecía la posibilidad de proyectarse al ámbito clínico,

y como ocurre en la actualidad, las técnicas analíticas que se disponen permiten establecer correlaciones de la generación de radicales libres y una gran diversidad de patologías.

El ácido ascórbico tiene como principal función la de comportarse como un eficiente antioxidante, pero en condiciones en las que se encuentra presente un metal de transición como el hierro o cobre, se comporta como un pro-oxidante (Inoue & Hirobe, 1986) conforme ocurre en una reacción donde el ácido ascórbico en presencia de iones cúprico escinde los puentes disulfuro de la insulina. Esta reacción se explica en un proceso donde al ascorbato en presencia de oxígeno genera el peróxido de hidrógeno y cuando reacciona con el ion cúprico lo reduce a ion cuproso, para finalmente al reaccionar el peróxido de hidrógeno con el ion cuproso se forma el radical hidroxilo que es el responsable de escindir los puentes disulfuro de la insulina.

La descripción del factor relajante del endotelio (EDRF) realizada por Furchgott & Zawadzki, (1980) compuesto que era sintetizado y liberado por las células endoteliales y la posterior demostración de otra sustancia que era liberada por células endoteliales de aorta de cerdo (Palmer, Ferrige & Moncada, 1987) que tenía las mismas propiedades, que era la de producir vasodilatación, condujeron a demostrar que esta sustancia descubierta posteriormente correspondía al radical libre óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) y que era indistinguible del EDRF, permitieron concluir que ambos compuestos eran la misma sustancia.

El óxido nítrico es sintetizado por la óxido nítrico sintasa (NOS) enzima que existe en varias isoformas, el mencionado compuesto tiene la propiedad de activar la guanilato ciclasa incrementando los niveles de GMPc que en las células musculares lisas y en las plaquetas actúa produciendo vaso dilatación y como antiagregante plaquetario. El óxido nítrico sintetizado tiene la propiedad de reaccionar con el anión superóxido y formar peroxinitrito (Beckman, 1990) hizo posible reconocer al peroxinitrito como uno de los mecanismos moleculares de la citotoxicidad de macrófagos y polimorfonucleares, así mismo, se estableció un nexo entre los radicales libres de oxígeno y los radicales libres de nitrógeno, además, permitió vincular al anión superóxido en el proceso de regulación de la presión arterial.

El “estallido respiratorio” se produce en las células polimorfonucleares y los macrófagos como respuesta con un agente infeccioso y consiste en un consumo muy elevado de oxígeno, proceso que ocurre en la membrana plasmática con participación del complejo enzimático NADPH oxidasa (Bellavite, 1988), esta enzima genera el radical anión

superóxido que en presencia de iones cloro forma hipoclorito utilizado para la eliminación del agente infeccioso.

El ser humano dispone de un sistema antioxidante que está conformado por compuestos enzimáticos y no enzimáticos. La superóxido dismutasa es una enzima que tiene como función eliminar el anión superóxido transformándolo en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Esta enzima cataliza esta reacción con una constante de velocidad de $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, es decir, a una velocidad limitada por difusión, la enzima descrita por McCord & Fridovich, (1969) es aquella que se sintetiza en el citosol y corresponde a la SOD Cu-Zn, que es una enzima dimérica y utiliza el cobre para realizar la dismutación, mientras que en la mitocondria existe la SOD-Mn que es de naturaleza tetramérica, solamente la SOD mitocondrial no es inhibida por cianuro.

Otra de las enzimas que forman parte del sistema antioxidante son las catalasas, enzimas que tienen la propiedad de convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Esta enzima muestra una elevada acción catalítica habiéndose evidenciado que posee un número de intercambio de 93,333 moléculas de peróxido de hidrógeno transformadas por segundo, constituyéndose en una de las enzimas con la más elevada actividad molecular (Cascales, 1997). Esta enzima es de naturaleza tetramérica y cataliza la reacción de tipo óxido reducción con participación directa del fierro.

La glutatión reductasa es otra de las enzimas que conforman el sistema antioxidante en los humanos y tienen la propiedad de reducir el glutatión oxidado a dos moléculas de glutatión reducido, para cuyo propósito utiliza NADPH (Cascales, 1997). La importancia de esta reacción radica en el hecho de que el glutatión reducido se encuentra en concentraciones limitadas en las células, por cuyo motivo, cuando se eleva la relación glutatión oxidado/glutatión reducido, condición altamente tóxica en la célula, la actividad de esta enzima resulta muy beneficiosa para la célula.

La glutatión peroxidasa es la enzima que tiene como función eliminar los hidroperóxidos utilizando para dicho propósito al glutatión reducido. Esta enzima existe en varias formas enzimáticas, una de ellas es tetramérica y requiere de selenio para su actividad, tiene la propiedad de eliminar hidroperóxidos y peróxido de hidrógeno, su localización es preferencialmente mitocondrial (Cascales, 1997). También existe una glutatión peroxidasa de naturaleza dimérica y no posee selenio, su actividad consiste en eliminar hidroperóxidos orgánicos.

Las enzimas antioxidantes están reguladas en respuesta al estrés oxidativo, en este proceso participan factores de transcripción que son capaces de detectar modificaciones en el estrés oxidativo (Harris, 1992). En estos procesos se activan diversos factores de transcripción como el NF- κ B, Nrf2, JNK, etc.

La defensa antioxidante en el ser humano está constituida principalmente por el glutatión, que es un tripéptido constituido por glutamato, glicina y cisteína, cuya capacidad reductora radica en su grupo sulfhidrilo (Neeraj, Pramod, Sing & Sing, 2013). El glutatión puede actuar por la propiedad que tiene de impedir la oxidación de aquellas proteínas que poseen como grupos esenciales a grupos sulfhidrilo, así mismo, participan conjuntamente con enzimas como la glutatión peroxidasa, conforme se citó anteriormente, para eliminar los hidroperóxidos orgánicos, pero también el glutatión tiene la propiedad de reaccionar directamente con el anión superóxido y con el radical hidroxilo (Espinoza-Diez et al., 2015). Otro de los antioxidantes que sintetiza el ser humano es el ácido úrico, compuesto que se encuentra en mayores concentraciones que otros antioxidantes en el plasma, pero el ácido úrico se sintetiza como un producto de excreción del metabolismo de las purinas.

Debido a que la defensa antioxidante en los humanos no es lo suficientemente eficiente para evitar la acción nociva de los radicales libres, éste debe ingerir alimentos como las frutas y verduras para incrementar la eficiencia de su defensa antioxidante. En tal sentido, la (OMS) Organización Mundial de la Salud, (2002) recomienda el consumo de frutas y hortalizas con la finalidad de reducir los factores de riesgo de contraer enfermedades no transmisibles como el cáncer, diabetes mellitus, aterosclerosis, etc.

Los radicales libres tienen la propiedad de dañar oxidativamente a proteínas, evento que constituye uno de los procesos destinados en el proceso evolutivo a eliminar proteínas oxidadas (Halliwell & Gutteridge, 2007). Todas las proteínas no tienen la misma susceptibilidad a la acción oxidativa de los radicales libres, ello depende del tipo, número y localización de los residuos de aminoácidos fácilmente oxidados. Otro de las reacciones en los que participan los radicales libres es la oxidación de los ácidos grasos; este proceso ocurre en tres fases denominadas iniciación, propagación y terminación, como consecuencia de ello se producen por fragmentación malondialdehído, 4-hidroxinonal o alcanos, así mismo, se forman una gran diversidad de sustancias como hidroperóxidos y peróxidos cíclicos. El ADN es otro de los componentes celulares con los que reaccionan los radicales libres con participación del oxígeno (Cascales, 1997). En el daño oxidativo

del ADN en el núcleo el hierro juega un papel importante. En la mitocondria el proceso oxidativo ocurre con una intensidad mayor, tanto por la cercanía del ADN a los lugares en que se generan los radicales libres, así como, la carencia de histonas que protejan a este tipo de ADN.

Cuando se produce un desbalance entre la generación de radicales libres y la eficiencia del funcionamiento de la defensa antioxidante, se produce el estrés oxidativo lo que conduce al daño a proteínas, lípidos y ADN, es decir, se produce el daño oxidativo (Storey & Wu, 2013, Ursini, Maiorino & Forman, 2016). El estrés oxidativo puede producirse como consecuencia de un disminuido accionar de la defensa antioxidante o una inadecuada expresión de las enzimas antioxidantes. Sin embargo, debe considerarse que cuando ocurre el daño oxidativo un gran número de proteínas que cumplen importantes funciones en la célula no podrán asumir dichas funciones (Sies, 2015), análogamente, cuando se produce la lipoperoxidación las membranas celulares serán afectadas lo que traerá consigo disfunción mitocondrial o celular, así mismo, la alteración del ADN puede significar mutaciones que conducirán a cambios en la expresión génica de muchas proteínas y conducir a la muerte celular o a una diversidad de patologías como el cáncer.

Diversos investigadores han mostrado que los radicales libres no solamente actúan modificando oxidativamente a las proteínas, lípidos y ADN, sino que también afectan de una manera muy importante las vías de señalización celular (Schreck, Rieber & Baeuerle, 1991; Susuki et al., 1997), habiéndose descrito la utilización de vías en las que participan el NF- κ B, JNK, AP-1, p38MAPK, ERK, Nrf2, etc., compuestos que activan o inhiben la transcripción de genes en las que están codificadas proteínas que se expresan en respuesta a la acción de los radicales libres.

Existe el criterio que el mantenimiento del nivel de glucosa en condiciones de ayuno en una persona normal debe ser menor de 100 mg/dL, pero cuando se sobrepasa a niveles mayores de 125 mg/dL, puede considerarse como una condición de “pre-diabetes” y cuando los niveles en ayunas exceden los 125 mg/dL la persona puede diagnosticarse como diabética (Patti & Corvera, 2010). El transporte de glucosa en el tejido muscular en los seres humanos es regulado por la insulina, esta hormona interacciona con su receptor y a través de vías de señalización modula el desplazamiento de GLUT-4 hacia la membrana del sarcolema. El estrés oxidativo juega un rol importante en los procesos que conducen a la resistencia a la insulina (Henriksen, Diamond-Stanic & Marchionne, 2011),

el primero de ellos es la formación de peróxido de hidrógeno mitocondrial y el segundo es la activación de la NADPH oxidasa. En estos procesos se sugiere que p38 MAPK sea una de las quinasas activadas por estrés, ya que podría incluirse a JNK, GSK-3 β y probablemente IKK β .

Una enfermedad inflamatoria crónica cuya etiopatogenia está vinculada con el estrés oxidativo y la respuesta inmune es la aterosclerosis; esta enfermedad está relacionada con la morbimortalidad cardiovascular que incluye la enfermedad cerebrovascular e infarto de miocardio (Galkina & Ley, 2009). Una de las hipótesis mejor aceptadas sobre la aterosclerosis, es aquella que asigna un rol importante al estrés oxidativo que comprende la participación de LDL oxidada, macrófagos que poseen receptores de LDL modificadas, disfunción endotelial, etc. El estrés oxidativo está vinculado con la generación del anión superóxido el cual reacciona con el óxido nítrico y forma el peroxinitrito que es un radical muy dañino.

El cáncer es una enfermedad caracterizada por un crecimiento y proliferación celular descontrolada, el tratamiento convencional de esta enfermedad incluye la radioterapia y la quimioterapia; ambos tratamientos son caros y están acompañados de efectos secundarios tales como: diarrea, vómitos, alopecia, así como, toxicidad renal, pulmonar y cardíaca. Se ha sugerido que aproximadamente un 60% de los medicamentos que se utilizan para el tratamiento del cáncer han sido aislados de productos naturales principalmente del reino vegetal como las plantas. El estudio destinado al descubrimiento de plantas con propiedades anti-cancerígenas (Cui, Nan, Tian, Guo, Zhao & Wang, 2010, Alonso-Castro, Villarreal, Salazar-Olivo, Gomez-Sanchez, Domínguez & García-Carranca, 2011) incluye el cribado, la información quimio-taxonómica y el conocimiento etnobotánico, en este sentido diversos extractos vegetales han mostrado tener efectos que podrían constituirse en fuentes promisorias de efectos anticancerosos como la *Albizia occidentalis*, *Calophyllum genus*, *Gimnosperma glutinosum*, *Heterotheca inuloides*, *Montana leucantha*, etc.

El síndrome metabólico es una condición caracterizada por una inadecuada utilización y almacenamiento de energía, constituido por varios componentes patológicos como la diabetes mellitus, hipertensión arterial, obesidad, bajos niveles de HDL, etc.; no existe una definición única que haya sido aceptada por la comunidad científica. El estrés oxidativo también constituye un factor de riesgo para el síndrome metabólico (Hopps,

Noto, Caimi & Aversa, 2010; Mitchell & Darley-USmar, 2012), por cuyo motivo, se han realizado diversas propuestas para su prevención (Gao et al., 2015), una de ellas sugiere la combinación de diversos antioxidantes naturales, como extracto de proantocianidinas de semillas de uva, polifenoles de té verde, vitamina C y vitamina E.

Existe una gran diversidad de enfermedades en las que uno de los participantes de la condición patológica son los radicales libres, así mismo, ocurren situaciones en las que los antioxidantes han ejercido efectos beneficiosos. Situaciones patológicas en las que se generan radicales libres incluyen la enfermedad cardiovascular (Ho, Galougahi, Liu, Bhindi & Figtree, 2013), psoriasis, hipertensión arterial, isquemia-reperfusión, artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, obesidad, pancreatitis, etc. (Pérez, Pereda, Sabater & Sastre, 2015; Pryor, 1994; Rains, Agarwall & Maki, 2011)

Las plantas constituyen una importante fuente de antioxidantes como vitamina C, flavonoides, polifenoles, vitamina E, antocianinas, β -caroteno, etc., siendo los polifenoles los metabolitos secundarios más abundantes (Cheynier, Tomas-Barberan & Yoshida, 2015) habiéndose desarrollado diversas técnicas para su determinación cuantitativa cuya expresión en equivalentes de un determinado estándar constituye la manera más usual de mostrar los resultados experimentales, aunque no es lo más apropiado. En un considerable número de plantas existe una elevada correlación entre el contenido de polifenoles y su actividad antioxidante, relación que también se observa con el contenido de flavonoides.

La actividad potencial de los extractos metanólicos de *Mirabilis jalapa*, (Zachariah et al., 2011) muestra que la actividad antioxidante, evaluada utilizando la técnica DPPH, es lineal en razón a la concentración de flavonoides de la parte aérea de la mencionada especie. Así mismo, en un estudio realizado en 14 plantas medicinales utilizadas en la China (Zhang et al. 2011), se pudo observar que el contenido de flavonoides en el extracto hidroalcohólico era generalmente mayor en un mayor número de plantas que el del acuoso, mientras que los contenidos de polifenoles en las plantas estudiadas que corresponden a aquellas en que se extrajo con etanol fueron similares a las plantas en que la extracción se realizó utilizando agua destilada.

El efecto antioxidante de los extractos acuoso, hidroalcohólico, metanólico y aquel preparado con éter de petróleo (Coolborn, Bolatito, Omolara & Adetuyi, 2015), revela que el extracto hidroalcohólico exhibe las más elevadas concentraciones de fenoles y flavonoides, siguiéndole en eficacia el extracto acuoso. La evaluación de compuestos

fenólicos y flavonoides de cuatro plantas seleccionadas de la India (Biju, Sulaiman, Satheesh & Reddy, 2014) muestran que la planta conocida como Chucra posee el mayor contenido de polifenoles y flavonoides que las cuatro plantas restantes, observándose un predominio del contenido de polifenoles sobre el de flavonoides. La determinación de los contenidos de polifenoles y flavonoides en las hojas de *Trichosanthes dioica* (Sharma et al., 2009) revela una concentración mayor de polifenoles que flavonoides, responsables de su actividad antioxidante.

La actividad antioxidante del extracto metanólico de *Lophira lanceolata* Tiegh evaluada en ratas (Oussou et al., 2016) fue fraccionado posteriormente utilizando varios solventes orgánicos, habiéndose obtenido una mayor concentración de compuestos fenólicos y flavonoides en aquella obtenida utilizando acetato de etilo. De manera análoga, diversas plantas utilizadas para el tratamiento de la obesidad, como *Aloe vera*, *Simaba ferruginea*, *Baccharis trimera*, *Garcinia cambogia* y *Toumefortia paniculata*, fueron escogidas para estudiar sus contenidos de compuestos antioxidantes (Simao et al., 2013) tales como polifenoles, flavonoides, vitamina C, carotenoides, β -caroteno y licopeno. Estas determinaciones se realizaron en los extractos hidroalcohólico y acuoso, que fueron utilizados para preparar el material biológico, habiéndose observado que la *Toumefortia paniculata* era la planta que mostró una moderada actividad antioxidante, comparada con las otras.

Las evidencias mostradas anteriormente muestran que las propiedades benéficas para la salud tienen una elevada correlación con el contenido de diversos metabolitos secundarios que se encuentran en determinadas plantas utilizadas con propósitos medicinales (Hou, Huang & Shyur, 2011; Jankovic et al., 2015; Kim, Quon & Kim, 2014; Lee, Koo & Min, 2004; Liu et al., 2012; Park, Lee, Lee & Kim, 2013; Verma, Raina, Sultana, Prawez & Jamwal, 2013; Virgili & Marino, 2008; Xiao et al., 2014; Zhang, Li, Xu Wang & Wang, 2016), por cuyo motivo resulta de particular importancia el estudio de la naturaleza de estos metabolitos, los que constituyen potenciales usos benéficos para la salud, ya sea como preventivos o curativos.

Bases Teóricas

Antioxidante.- Es cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones, comparadas con aquellas de un sustrato oxidable, retarda significativamente o previene la oxidación de dicho sustrato. Estos compuestos son generalmente de origen biológico, pero también son obtenidos por síntesis. Su uso está muy extendido en la industria química y en la de alimentos.

Radical libre.- Molécula caracterizada por poseer uno o más electrones desapareados. Esta condición los torna altamente reactivos. En los seres biológicos se presentan diversos tipos como: radical hidroxilo, anión superóxido, peroxinitrito, etc. Debido a su elevada reactividad tienen una vida media extremadamente pequeña.

Compuesto bioactivo.- Sustancia química que se encuentra en pequeñas cantidades en las plantas, ejerciendo efectos beneficiosos para la salud. Entre los compuestos bioactivos se encuentran los carotenoides, polifenoles, terpenos, saponinas, etc. Estos compuestos bioactivos pueden actuar como antioxidantes, así como, intervenir activando o inhibiendo vías de señalización celular.

Vía de señalización.- Está referido a un grupo de moléculas que funcionan de una manera ordenada para controlar una o más funciones de las células como la proliferación o la muerte celular. En las células, dependiendo de las funciones que éstas cumplen, existen diversas vías de señalización que se activan o reprimen en respuesta a estímulos.

Factor de transcripción.- Es una proteína que tiene como función unirse a secuencias específicas de ADN controlando de esta manera la transcripción o copia del gen por la ARN polimerasa. Estas proteínas reconocen posiciones en la región promotora de ADN y controlan la expresión de genes a través de la síntesis del ARN mensajero.

Defensa antioxidante.- Se denomina a un grupo de compuestos químicos que tienen como función impedir la oxidación de moléculas biológicamente importantes como: proteínas, lípidos y ADN. Su acción antioxidante se manifiesta de muy diversa manera, impidiendo la generación de radicales libres o neutralizando directamente al radical libre. Este sistema está constituido por compuestos enzimáticos y no enzimáticos.

Estrés oxidativo.- Es una alteración del balance entre agentes oxidantes y antioxidantes en la célula, con predominio de los primeros, conduciendo a un daño potencial. El estrés oxidativo acompaña a un considerable número de enfermedades crónicas no trasmisibles como cáncer, diabetes mellitus, psoriasis, etc.

Metabolito secundario.- Se denomina a aquellos compuestos químicos que son sintetizados por las plantas y que cumplen funciones no esenciales para ella. Una planta puede prescindir de su presencia, situación que no es letal para ella.

Capacidad antioxidante.- Es la propiedad de una molécula de origen biológico o sintético para neutralizar la acción ejercida por un radical libre. Esta cualidad puede medirse utilizando diversas técnicas, cuya evaluación se expresa de acuerdo a la técnica utilizada.

CAPITULO 3.- METODOLOGIA

Tipo de estudio: Analítico, experimental, longitudinal y prospectivo.

Preparación del material biológico.-

Las hojas del *Rubus sparsiflorus* se colectaron en tres oportunidades directamente de la planta, la que crece de una manera silvestre en el departamento de Abancay; luego fueron conducidas a Lima donde se recibieron y se lavaron con agua destilada, se colocaron en la estufa a una temperatura de 40°C hasta peso constante, luego se sometieron a un proceso de pulverización por un tiempo de 30 segundos utilizando una licuadora. El extracto acuoso se preparó pesando 1.0 g de las hojas secas pulverizadas las que se dispersaron en 100 mL de agua destilada, luego se sometió a ebullición durante 10 minutos, a cuyo término se dejó en reposo hasta que alcanzara la temperatura ambiente, luego se filtró a través de papel Whatman N° 1 el cual se lavó tres veces con agua destilada y finalmente se restituyó el volumen inicial con agua destilada (Katalinic, Milos, Kulisic & Julic, 2006). El extracto hidroalcohólico se preparó pesando 1.0 g de las hojas secas y se trató con 50 mL de etanol al 70% el que se mantuvo durante 3 días en reposo a temperatura ambiente, luego se filtró a través de papel Whatman N° 1, el residuo se trató con 30 mL de etanol al 70% proceso que se repitió dos veces, luego se reunieron los extractos y se llevó a un volumen de 80 mL (Venkat, Vijay, Rama, Krishna & Narsimha, 2015). El extracto metanólico se preparó pesando 1.0 g del polvo de las hojas secas y se trató con 30 mL de metanol y se maceró durante 3 días a temperatura ambiente, luego se filtró utilizando papel Whatman N° 1, el residuo se trató con metanol de la misma manera que el proceso anterior, el que se repitió dos veces adicionales, finalmente se llevó a un volumen de 70 mL (Rajib, Monitul, Jahan, Ashik & Haque, 2009).

Determinación del contenido de polifenoles.-

La determinación se realizó añadiendo a un tubo de ensayo 1.0 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu al 10%, luego un volumen conocido de la muestra problema y finalmente 1.0 mL de una solución de carbonato de sodio al 7.5%. Se llevó al baño maría a una temperatura de 45° C durante 15 minutos. La densidad óptica se leyó a 725 nm, paralelamente se preparó un blanco que no llevó muestra (Singleton & Rossi, 1965). La

concentración de los polifenoles se calculó utilizando una curva estándar preparada con concentraciones variables de ácido gálico.

Fundamento:

El fundamento de esta técnica radica en la reacción que se produce entre los compuestos caracterizados por tener un grupo funcional hidroxilo ligado a un anillo bencénico, con el reactivo Folin-Ciocalteau en medio alcalino, produciendo un compuesto de color azul que absorbe a 765 nm.

Determinación del contenido de flavonoides.-

Los flavonoides se determinaron utilizando un volumen apropiado de muestra en un tubo de ensayo, al que se agregó 75 μ L de nitrito de sodio al 5%, luego se añadió 150 μ L de una solución al 10% de cloruro de aluminio y después de 6 minutos de reposo se agregó 0.5 mL de una solución 1.0 M de NaOH y finalmente agua destilada en volumen suficiente para 2.5 mL. La densidad óptica se leyó a 510 nm en un espectrofotómetro, el blanco se preparó simultáneamente y no llevó muestra problema (Jia, Tang & Wu, 1999). Para realizar los cálculos se preparó una curva de calibración utilizando concentraciones variadas de catequina.

Fundamento:

Los flavonoides contenidos en la muestra reaccionan con el nitrito y el cloruro de aluminio en un medio fuertemente alcalino formando un complejo de color pardo oscuro cuya intensidad depende del contenido de flavonoides.

Determinación de la capacidad antioxidante utilizando el método del DPPH.-

En varios tubos de ensayo se midieron 1.0 mL una solución metanólica de DPPH cuya absorbancia era de 2.0, diferentes volúmenes de la muestra problema y finalmente se añadió metanol en volumen suficiente para 2.0 mL. Se agitó vigorosamente utilizando un vortex y se dejó en reposo durante 30 minutos en la oscuridad (Suja, Jayalekshmy & Arumughan, 2004). Al mismo tiempo se preparó el tubo control que no llevó muestra y

un tubo blanco al que no se le añadió la solución de DPPH. Al finalizar los 30 minutos de reposo se leyó la densidad óptica a 515 nm. Los resultados se expresan en miligramos/mL de la muestra que inhibe 50%.

Fundamento:

El DPPH es un radical libre estable de intensa coloración azul de fórmula 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo que cuando reacciona con compuestos antioxidantes se convierte en la hidrazina correspondiente que es incolora, esta disminución en la intensidad del color se mide a 515 nm y es proporcional a la concentración de antioxidantes.

Determinación de la capacidad antioxidante utilizando la técnica del FRAP.-

Se añadió 1.0 mL del reactivo FRAP a un tubo de ensayo, luego un volumen determinado de muestra y agua destilada en cantidad suficiente para 2.0 mL, se colocó en baño maría a 37° C durante 15 minutos a cuyo término se leyó la densidad óptica a 593 nm, paralelamente se preparó un tubo blanco que no contenía muestra (Szollosi & Varga, 2002). Para realizar los cálculos cuantitativos se preparó una curva patrón con diferentes concentraciones de cloruro ferroso.

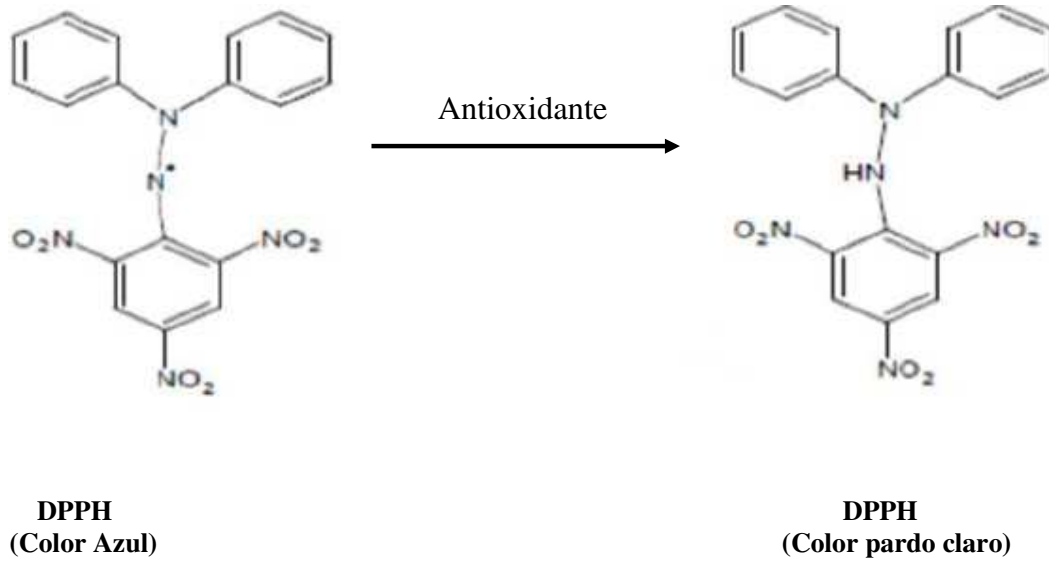
Fundamento:

Esta técnica se fundamenta en la reacción que se produce entre el complejo formado por el reactivo 2,4,6-tri-piridil-s-triazina (TPTZ) con el Fe^{3+} que es de color pardo claro, con las sustancias antioxidantes que tienen la propiedad de reducir a dicho complejo a su forma TPTZ- Fe^{2+} que es de un color azul intenso.

Cinética de reacción con el radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

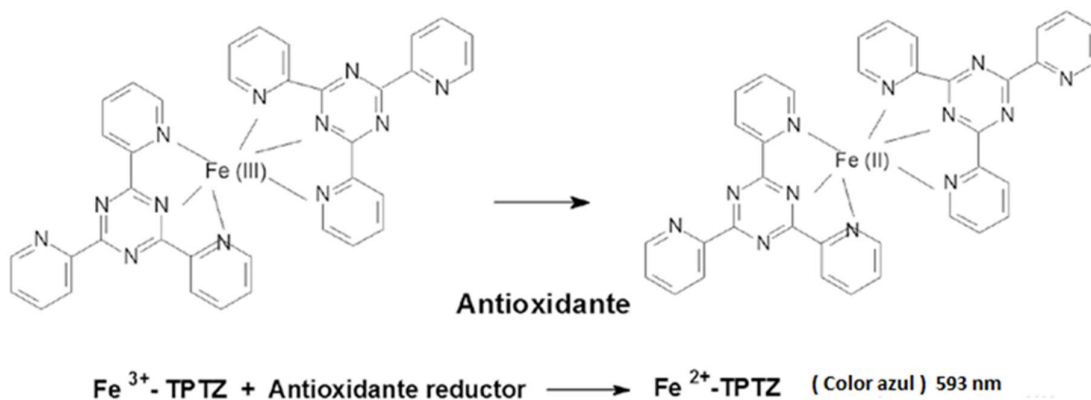
El medio de ensayo en un volumen final de 2.0 mL estuvo constituido por el reactivo 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) cuya densidad óptica inicial fue de 1.000 ± 0.50 , al cual se adicionó diferentes concentraciones de los extractos de las hojas de la shiraca. La reacción se inició por la adición del extracto y se midió las variaciones de la densidad óptica a una longitud de onda de 515 nm durante 50 minutos. También se midió la

densidad óptica de una muestra que no contenía muestra en los tiempos en que se midió la densidad óptica de la muestra problema.



Cinética de reacción con el reactivo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ).

En un medio de reacción constituido por 1.0 mL del reactivo (TPTZ) 2,4,6-tripiridil-s-triazina en tampón acetato pH 3.6 en un volumen final de 2.0 mL se procedió a adicionar el extracto de las hojas de shiraca y se midió la densidad óptica a 593 nm en diferentes intervalos de tiempo medidos hasta los 80 minutos. La reacción se inició por la adición del extracto correspondiente. Paralelamente se midió la densidad óptica de un medio de ensayo que no contenía muestra, en el intervalo de tiempo en que duró el experimento.



Determinación del poder reductor.

La determinación del poder reductor se realizó en medios de ensayo que contenían diversas concentraciones de los extractos de las hojas de shiraca, agua en un volumen necesario para 3.0 mL, 0.1 mL tampón fosfato de potasio 0.2 M pH 6.6 y 1.0 mL de ferricianuro de potasio al 1%; este medio se incubó a 50°C durante 20 minutos a cuyo término se adicionó 1.0 mL de ácido tricloroacético al 10%, luego se midió 2.0 mL del medio de ensayo se adicionó 0.5 mL de agua destilada y finalmente 0.5 mL de cloruro férrico al 0.1% (Oyaizu, 1986). Las lecturas de la densidad óptica se realizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 700 nm. Paralelamente se preparó un tubo blanco que no contenía muestra.

Fundamento.

La determinación del poder reductor tiene como fundamento la conversión del ferricianuro de potasio en ferrocianuro de potasio por acción de los compuestos reductores que se encuentran en los extractos, luego en medio ácido el ferrocianuro reacciona con el ion férrico y forma un compuesto de color verde, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración del compuesto reductor.

Determinación del poder quelante.

El poder quelante de los extractos se determinó midiendo en un tubo de ensayo diferentes volúmenes de muestra a las que se adicionó 1.0 mL de una solución de sulfato ferroso 0.125 mM y finalmente 1.0 mL de una solución de ferrozina 0.312 mM, en un volumen final de 3.0 mL (Yen & Wu, 1999). El tubo control no contenía muestra y paralelamente se preparó el tubo blanco correspondiente. Se dejó en reposo durante 10 minutos y se leyó a 562 nm en un espectrofotómetro.

Fundamento.

El fundamento de esta técnica reside en la capacidad de los componentes del extracto de la planta de reaccionar mediante quelación con el ion ferroso. La ferrozina es un compuesto sintético que reacciona con los iones ferrosos libres formando un complejo que absorbe a 562 nm.

Cinética de reacción con el radical anión superóxido.

El medio de reacción estuvo constituido por 1.0 mL de tampón fosfato 0.1 M pH 7.4, 0.2 mL de NADH 0.78 mM, 0.2 mL de NBT (azul de nitrotetrazolio) 0.25 mM, diversos volúmenes de los extractos de shiraca y se inició la reacción mediante la adición de 0.2 mL de PMS (fenazina metosulfato) 0.1 mM. Se midió la densidad óptica a 560 nm en diversos intervalos de tiempo hasta los 12 minutos. Al mismo tiempo se midió la densidad óptica de un tubo blanco que no contenía muestra.

Fundamento.

El fundamento de la técnica radica en la generación del anión superóxido por la reacción del NADH con la fenazina metosulfato en presencia de oxígeno molecular, el cual tiene la propiedad de reducir al azul de tetrazolio produciendo una disminución en la intensidad de la coloración azul que se mide a una longitud de onda de 560 nm.

Análisis estadístico.

Se emplearon diferentes estadísticos:

- Estadísticas descriptivas: Promedio y desviación estándar.
- Pruebas de normalidad: se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.
- Estadística inferencial: debido a que la distribución fue normal se empleo pruebas paramétricas como el análisis de varianza con un alfa < 0.01
- Se utilizaron graficos de correlación entre concentración y porcentaje de inhibición.
- Se empleó el programa SPSS versión 20 para realizar el procesamiento de los datos.

CAPITULO 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

RESULTADOS.

El estudio del efecto antioxidante de las hojas de *Rubus sparsiflorus* sobre las especies reactivas de oxígeno incluyó la determinación cuantitativa de los componentes antioxidantes, así como, la cinética de interacción de estos compuestos sobre los radicales libres.

Las determinaciones de polifenoles se realizaron en la decocción acuosa y los dos tipos de extractos: hidroalcohólico y metanólico, habiéndose observado que el extracto metanólico tenía un mayor contenido de polifenoles cuyo valor fue de 118.68 ± 2.59 mg equivalentes de ácido gálico/g de hoja seca, mientras que la decocción acuosa mostró un valor ligeramente menor, en cambio, el extracto hidroalcohólico conforme se muestra en la tabla 1, tuvo el valor más bajo 93.85 ± 2.31 mg equivalentes de ácido gálico/g de hoja seca.

Tabla 1. Contenido de polifenoles de la decocción acuosa y los extractos hidroalcohólico y metanólico de hojas de *Rubus sparsiflorus*.

Clase de extracto	Contenido de polifenoles (mg equivalentes de ácido gálico/g de hoja seca)
Decocción acuosa	102.11 ± 1.34^a
Extracto hidroalcohólico	93.85 ± 2.31^b
Extracto metanólico	118.68 ± 2.59^c

p < 0.01

- Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar (n=3) sobre la base de hojas secas.

El contenido de flavonoides en las hojas de *Rubus sparsiflorus* fue dependiente del solvente utilizado en la preparación del extracto, cuando se usó metanol se obtuvo un extracto con un contenido de flavonoides mayor que el extracto hidroalcohólico o la decocción acuosa, en la tabla 2 puede observarse que el extracto preparado utilizando metanol mostró un contenido de 35.74 ± 1.34 mg equivalentes de catequina/g de hoja seca, que es mayor que el contenido de este metabolito en el extracto hidroalcohólico y la decocción acuosa cuyos valores fueron notablemente menores.

Tabla 2. Contenido de flavonoides de la decocción acuosa y los extractos hidroalcohólico y metanólico de hojas de *Rubus sparsiflorus*.

Clase de extracto	Contenido de flavonoides (mg equivalentes de catequina/g de hoja seca)
Extracto acuoso	21.99 ± 1.24^a
Extracto hidroalcohólico	26.52 ± 1.70^b
Extracto metanólico	35.74 ± 1.34^c

$p < 0.01$

- Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar (n=3) sobre la base de hojas secas.

El comportamiento de los componentes antioxidantes frente al radical libre DPPH se evaluó utilizando varias concentraciones de los extractos hidroalcohólico, metanólico y la decocción acuosa, los resultados obtenidos se expresan como valor IC₅₀, que corresponde a la concentración de la muestra que inhibe 50% del DPPH presente en el medio de reacción. En la tabla 3 se observa que el extracto hidroalcohólico tiene el menor valor IC₅₀ que corresponde a 36.33 ± 1.26 µg/mL, lo que indica que es el más eficiente que los otros dos extractos que muestran valores mayores.

Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(Ac - Ax)}{Ac} \times 100$$

Donde: Ac es la absorbancia del DPPH control y Ax es la absorbancia de la muestra problema.

Tabla 3. Capacidad antioxidante evaluada con la técnica DPPH de la decocción acuosa y los extractos hidroalcohólico y metanólico de hojas de *Rubus sparsiflorus*.

Clase de extracto	Capacidad antioxidante (Técnica DPPH) IC ₅₀ (µg/mL)
Decocción acuoso	43.60 ± 1.27 ^a
Extracto hidroalcohólico	36.33 ± 1.26 ^b
Extracto metanólico	49.97 ± 0.90 ^c

p < 0.01

- Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar (n=3) sobre la base de hojas secas.

La capacidad antioxidante de las hojas de *Rubus sparsiflorus* se evaluaron utilizando la técnica FRAP, cuyos resultados se muestran en la tabla 4, donde se observa que el extracto

metanólico tiene mayor capacidad antioxidante que los otros extractos, correspondiendo el menor valor a la decocción acuosa.

Tabla 4. Capacidad antioxidante evaluada con la técnica FRAP de la decocción acuosa y los extractos hidroalcohólico y metanólico de hojas de *Rubus sparsiflorus*.

Clase de extracto	Capacidad antioxidante (Técnica FRAP) (mmoles equivalentes de Fe-II/g de hoja seca)
Decocción acuosa	1.447 ± 0.003 ^a
Extracto hidroalcohólico	1.665 ± 0.034 ^b
Extracto metanólico	1.773 ± 0.049 ^c

p < 0.01

- Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar (n=3) sobre la base de hojas secas.

La reactividad de los componentes antioxidantes de los extractos de las hojas de *Rubus sparsiflorus* se evaluaron utilizando el radical libre DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazilo), este radical tiene la propiedad de ser estable lo que permite evaluar la eficiencia de reacción de los compuestos con propiedades antioxidantes. En la figura 1 se observa que la decocción acuosa reacciona con el DPPH a través de un proceso que es dependiente de la concentración y del tiempo de reacción, proceso que alcanza el más bajo valor a partir de los 30 minutos. Conforme puede apreciarse en la figura 1, no es posible calcular la constante de velocidad de los antioxidantes con el DPPH.

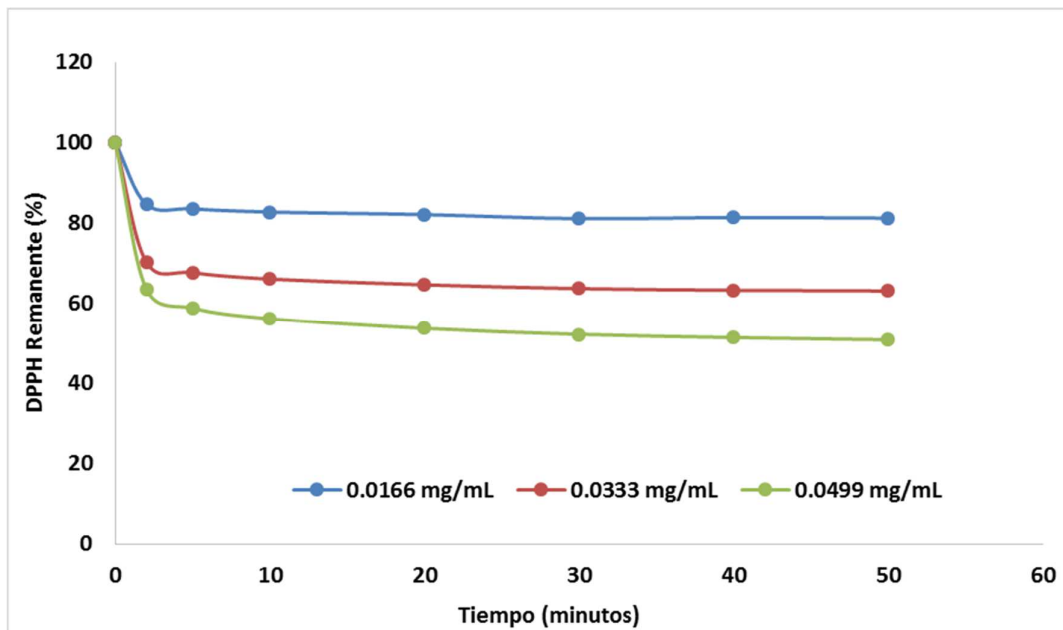


Figura 1. Comportamiento cinético de la decocción acuosa de hojas de *Rubus sparsiflorus* frente al radical libre DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazilo).

En la figura 2 se aprecia que la velocidad de la reacción es bastante elevada en los primeros minutos, la que depende de la concentración del extracto hidroalcohólico alcanzando el valor más bajo a partir de los 30 minutos, efecto que se mantiene hasta los 50 minutos en que duró la observación. La reactividad del extracto hidroalcohólico también es bastante elevada al inicio de la reacción, por cuyo motivo, no es posible calcular la constante de velocidad de ésta.

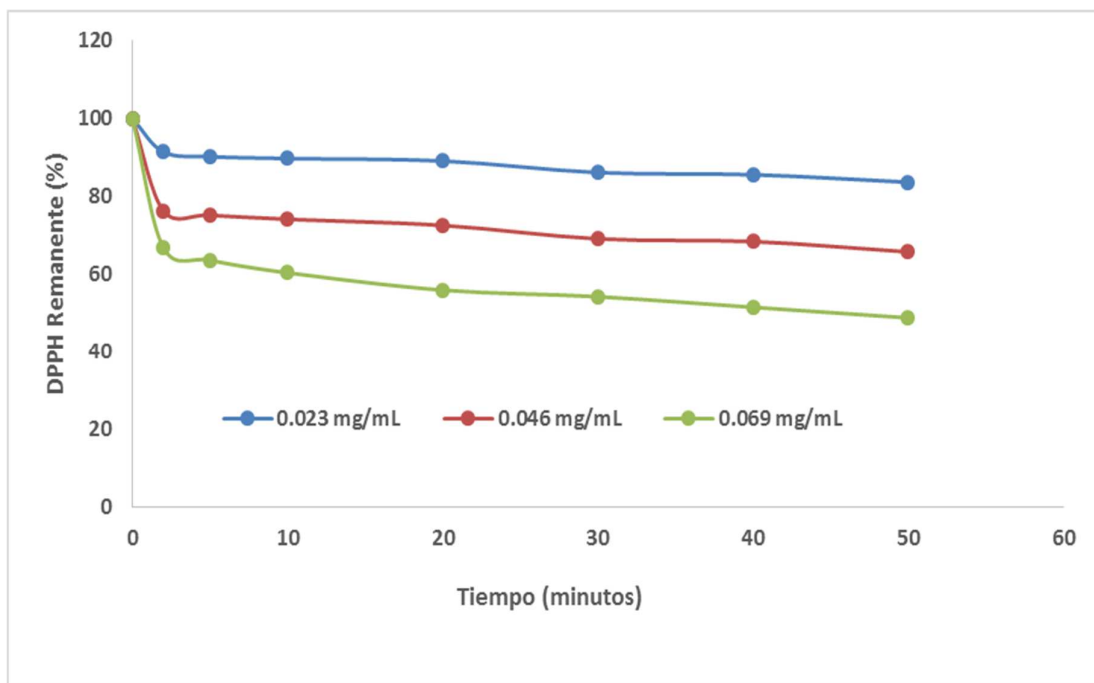


Figura 2. Comportamiento cinético del extracto hidroalcohólico de hojas de *Rubus sparsiflorus* frente al radical libre DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazilo).

El extracto metanólico mostró un comportamiento similar a las anteriores observaciones, es decir, la velocidad en los primeros minutos de la reacción fue bastante elevada alcanzando el equilibrio aproximadamente a los 30 minutos, conforme se observa en la figura 3. Como en los casos anteriores, no puede calcularse la constante de velocidad, pero sí es posible determinar el nivel alcanzado por cada concentración del extracto metanólico, valor que se utiliza para determinar el IC_{50} .

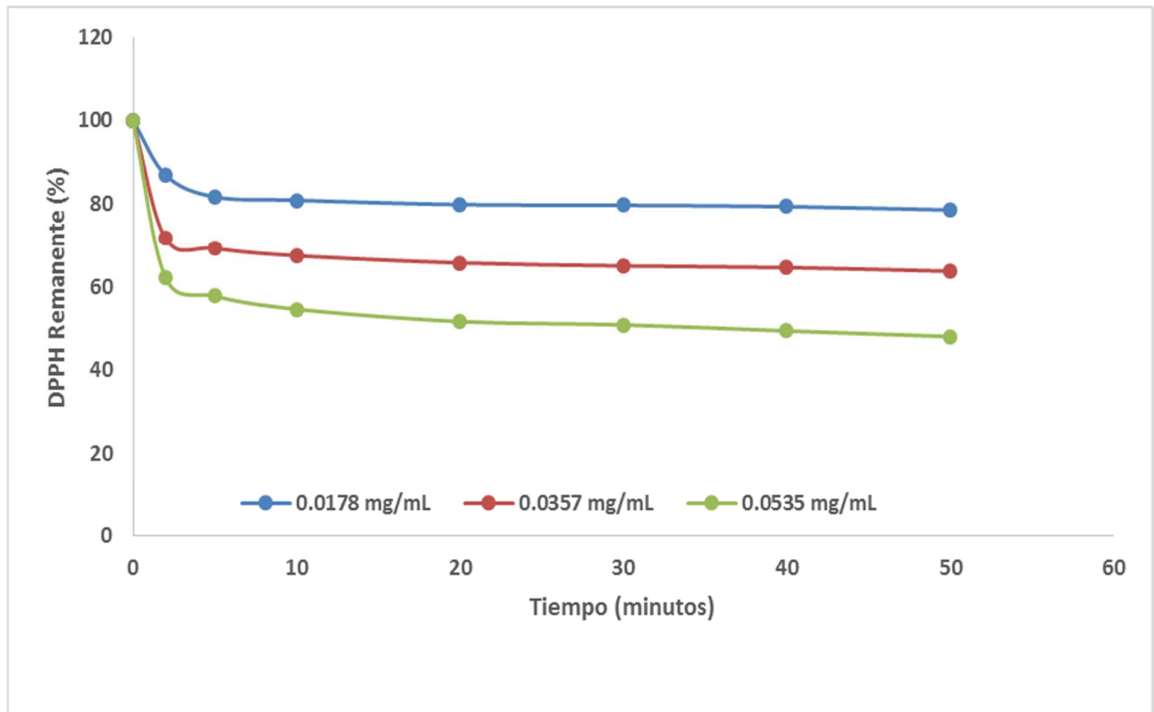


Figura 3. Comportamiento cinético del extracto Metanólico de hojas de *Rubus sparsiflorus* frente al radical libre DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazilo).

La constante de velocidad de segundo orden de la cinética antioxidante obedecería a la siguiente ecuación:

$$-\frac{d[\text{DPPH}]}{dt} = k_2 [\text{RH}] [\text{DPPH}]$$

$$\text{donde: } k_1 = k_2 [\text{RH}]$$

Correspondiendo $[\text{RH}]$ a la concentración de *Rubus sparsiflorus*.

En las tres clases de preparaciones de *Rubus sparsiflorus* puede observarse que la reacción es muy rápida y prácticamente culmina durante los primeros segundos aun cuando se utilicen concentraciones muy bajas. En este tipo de reacción no se considerarían aspectos de índole estequiométrico debido a que se utilizan decocción y extractos hidroalcohólico y metanólico; por cuyo motivo, la ecuación que describiría el comportamiento cinético de las muestras de la shiraca donde la concentración del DPPH está en exceso, obedecería a la ecuación:

$$C_o = Y_o - Y_s$$

Donde:

C_o = Concentración de DPPH*

Y_o = Porcentaje inicial de DPPH*

Y_s = Porcentaje de DPPH* que no ha reaccionado con el antioxidante

De tal manera, que al graficar % de reducción del DPPH en función de la concentración de las concentraciones de la shiraca se obtendría una línea recta que nos permite calcular el valor IC_{50} .

El comportamiento cinético de los antioxidantes de los extractos de las hojas de *Rubus sparsiflorus* se evaluaron utilizando el reactivo TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-tiazina), en la figura 4 puede observarse que la reactividad de los compuestos antioxidantes de la decocción acuosa se incrementa de manera hiperbólica en función del tiempo alcanzando el más elevado valor de la absorbancia a los 80 minutos, el cual fue aproximadamente 2.0. La reactividad de los compuestos antioxidantes con el reactivo TPTZ es extremadamente rápida lo que no permite calcular la constante de velocidad.

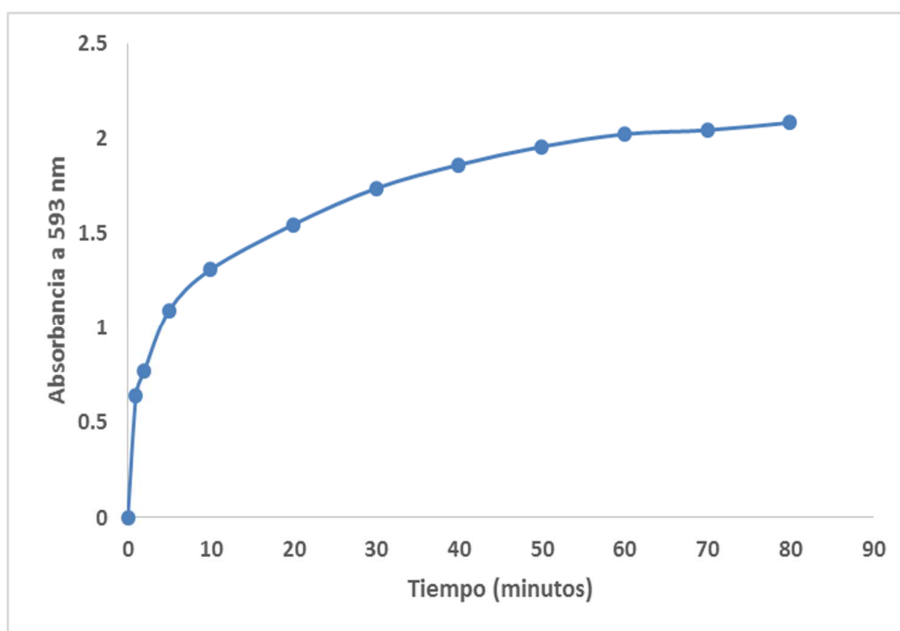


Figura 4.- Comportamiento cinético antioxidante de la decocción acuosa de hojas de *Rubus sparsiflorus* frente al reactivo TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-tiazina), La concentración de la decocción fue de 0.06 mg/mL.

Cuando reaccionó el extracto hidroalcohólico frente al reactivo TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-tiazina) se pudo observar que la reacción era muy rápida lo que no permitía calcular la constante de velocidad. La concentración del extracto hidroalcohólico utilizado fue 0.031mg/mL, por cuyo motivo, la absorbancia comparativamente es ligeramente mayor a la decocción acuosa, resultado que se puede observar en la figura 5.

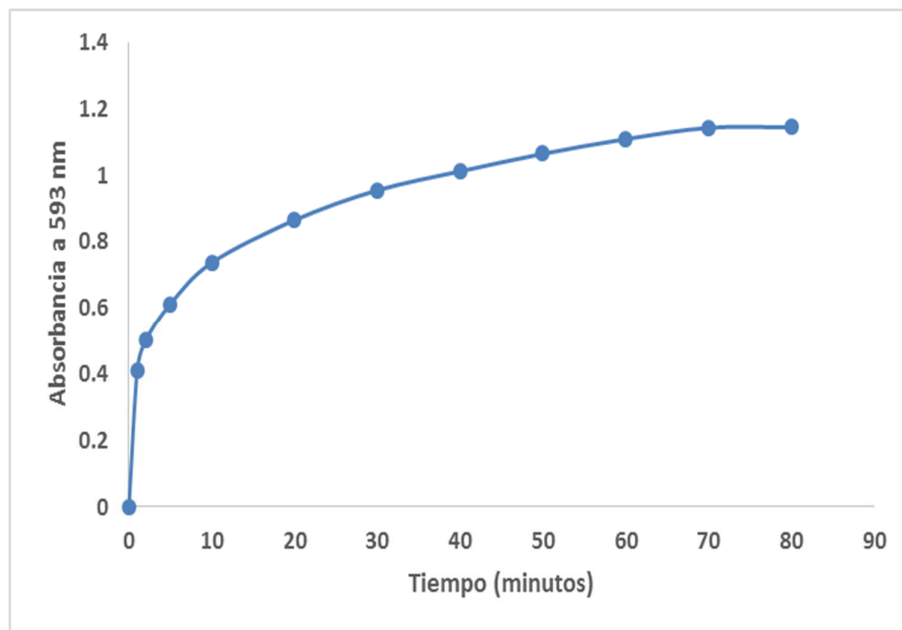


Figura 5.- Comportamiento cinético antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Rubus sparsiflorus* se evaluaron frente al reactivo TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-tiazina). La concentración del extracto hidroalcohólico fue de 0.031 mg/mL.

De manera análoga, en la figura 6 se puede apreciar que la reacción del extracto metanólico tuvo un comportamiento similar a la decocción acuosa y al extracto hidroalcohólico, habiéndose alcanzado la máxima absorbancia a los 80 minutos. Considerando que se utilizó una concentración de 0.0357 mg/mL, la absorbancia alcanzada fue mayor a los obtenidos con la decocción acuosa y con el extracto hidroalcohólico.

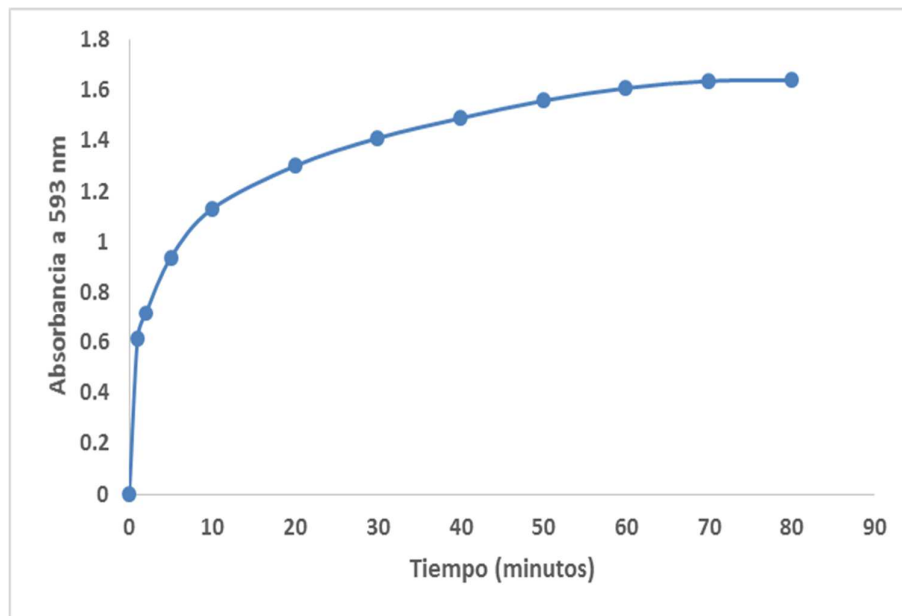


Figura 6.- Comportamiento cinético antioxidante del extracto metanólico de hojas de *Rubus sparsiflorus* se evaluaron frente al reactivo TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-tiazina). La concentración del extracto fue de 0.0357 mg/mL.

Los extractos de *Rubus sparsiflorus* reaccionarían con el TPTZ a través de la siguiente ecuación:

$$v = k [\text{TPTZ}] [\text{RSH}]$$

donde:

v = velocidad de la reacción

k = Constante de velocidad

TPTZ = Concentración del reactivo FRAP

RSH = Concentración del antioxidante

Pero debido a que la concentración de TPTZ se encuentra en exceso durante el curso de la reacción, la velocidad será:

$$v = k' [\text{RSH}] \quad \text{donde: } k' = k [\text{TPTZ}]$$

Considerando la ecuación anterior la reactividad de los compuestos antioxidantes frente al TPTZ es bastante elevada, pero después del primer minuto se observa un incremento lento de la reacción, aún a los 60 minutos en que la reacción es prácticamente completa. Un análisis de los incrementos de la actividad antioxidante permite observar que la decocción acuosa se incrementa 1.7 veces desde el primer minuto hasta los cinco minutos de reacción, este incremento es mayor a los 30 minutos que es de 2.7 veces, mientras que a los 80 minutos es de 3.2 veces.

Los incrementos de la reactividad de los antioxidantes de los extractos hidroalcohólico y metanólico con el TPTZ fueron prácticamente iguales, correspondiendo 1.5 veces desde el primer minuto hasta el minuto 5 de reacción y 2.3 veces hasta los 30 minutos; pero a los 80 minutos en que duró la observación, el extracto hidroalcohólico se incrementó 2.8 veces y el metanólico lo hizo 2.7 veces, es decir, prácticamente igual.

Así mismo, el análisis cinético considerando el porcentaje de incremento de la reacción entre el minuto 5 y el minuto 30, se observa que el extracto metanólico es de 50%, el hidroalcohólico 56% y la decocción acuosa 58 %. En cambio, el incremento observado entre los minutos 30 y 60 fue de 16% para la decocción acuosa y el extracto hidroalcohólico, pero fue ligeramente menor para el extracto metanólico que solo alcanzó el 13%.

La evaluación del poder reductor de los extractos de hojas de *Rubus sparsiflorus* se realizaron en los tres extractos, habiéndose observado que el extracto metanólico mostró el mayor poder reductor expresado como mg equivalentes de ácido ascórbico/g de hoja seca. Esta clase de expresión del poder reductor no existe en la literatura revisada, en los trabajos en que se realizan estas determinaciones se grafican absorbancia en función de la concentración de la muestra motivo de la investigación y se compara con el gráfico obtenido con diversas concentraciones de vitamina C o Trolox. En la Tabla 5 se observa que el extracto metanólico es el que tiene mayor poder reductor cuyo valor fue de 105.36 ± 3.60 mg equivalentes de ácido ascórbico/g de hoja seca, mientras el extracto hidroalcohólico tiene el valor más bajo con 88.08 ± 1.82 mg equivalentes de ácido ascórbico/g de hoja seca.

Tabla 5. Poder reductor de la decocción acuosa y los extractos hidroalcohólico y metanólico de hojas de *Rubus sparsiflorus*.

Clase de extracto	Poder reductor (mg equivalentes de ácido ascórbico/g de hoja seca)
Decocción acuosa	94.35 ± 1.99^a
Extracto hidroalcohólico	88.08 ± 1.82^b
Extracto metanólico	105.36 ± 3.60^c

$p < 0.01$

*Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar (n=3) sobre la base de hojas secas.

La determinación del poder quelante frente al hierro permitió observar que la decocción acuosa a una concentración de 0.5 mg/mL inhibió de manera limitada, pero a partir de esta concentración el porcentaje de inhibición se incrementa más rápidamente que lo previsto como se observa en la figura 7.

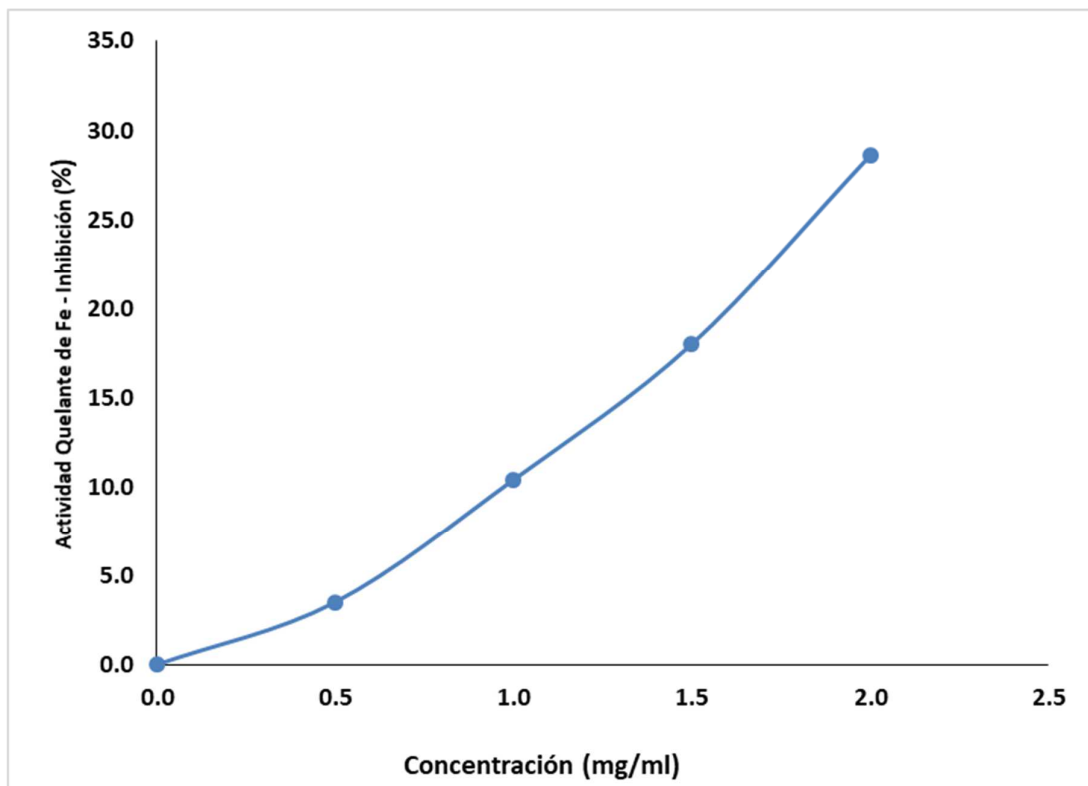


Figura 7. Actividad quelante de hierro de la decocción acuosa de hojas de *Rubus sparsiflorus*

En la figura 8 se puede observar que el extracto hidroalcohólico muestra un comportamiento similar a la decocción acuosa, es decir, a una concentración de 0.3 mg/mL la inhibición es discreta, pero a partir de esta concentración el porcentaje de inhibición no mantiene relación directa con las concentraciones utilizadas.

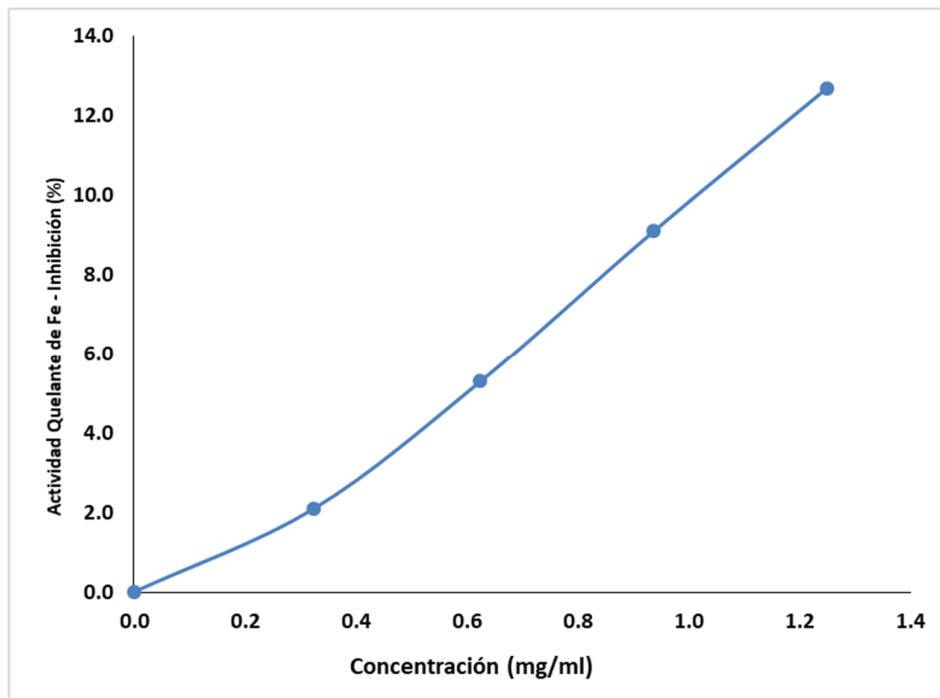


Figura 8. Actividad quelante de hierro del extracto hidroalcohólico de hojas de *Rubus sparsiflorus*

La utilización del extracto metanólico también tiene un comportamiento similar a los anteriores, en la figura 9 se aprecia que el incremento de la actividad quelante tiene valores similares a las observaciones realizadas con la decocción acuosa y con el extracto hidroalcohólico.

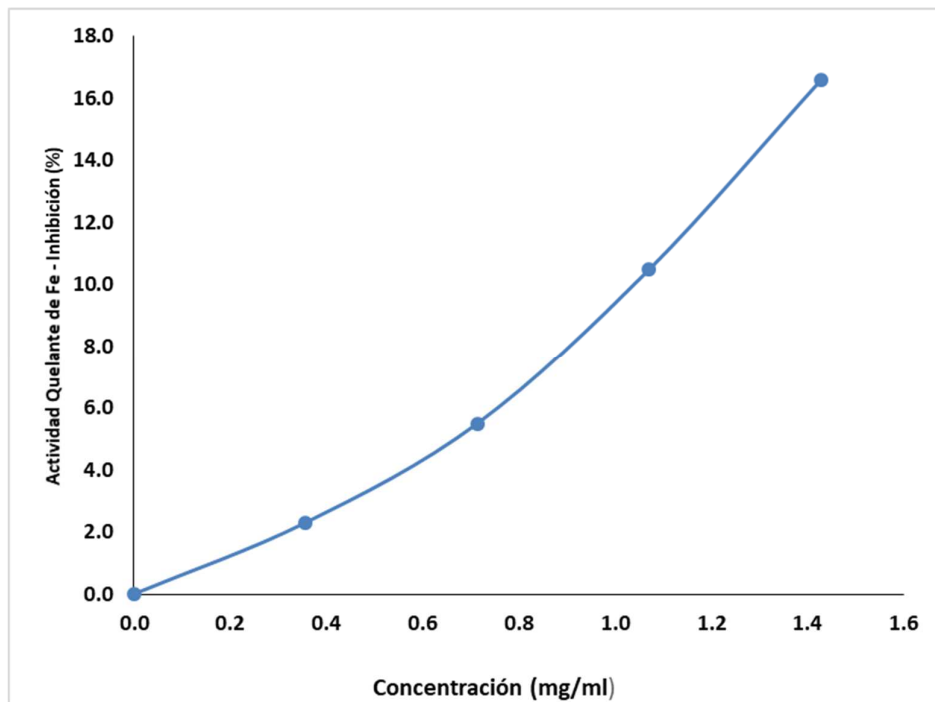


Figura 9. Actividad quelante de hierro del extracto metanólico de hojas de *Rubus sparsiflorus*

Los gráficos observados anteriormente se caracterizan por mostrar una desviación positiva, en que la inhibición procede de una manera más rápida que la esperada, es decir, que aquella cuando se utiliza una baja concentración de los extractos. Las reacciones descritas son más que una reacción de primer orden con respecto a la concentración del reactante que constituye la variable independiente, por cuyo motivo, es necesario añadir un término adicional a la ley de la velocidad para tener en consideración el inusitado incremento observado. La manera más sencilla consiste en dividir cada valor observado por la concentración de los extractos utilizados, comportamiento que obedecería a la siguiente ecuación:

$$\frac{Inh (\%)}{[RS]} = m [RS] + b$$

Con respecto a la capacidad de los extractos de las hojas de *Rubus sparsiflorus* para bloquear el anión superóxido se pudo apreciar que la decocción acuosa tenía un comportamiento de tipo sigmoideo, tal como se observa en la figura 10, en la que se aprecia que cuando se utilizan concentraciones de 0.1 y 0.2 mg/mL la captación del anión superóxido ocurre de una manera bastante limitada, pero se incrementa el porcentaje de inhibición con las concentraciones 0.3 y 0.4 mg/mL, mientras que a la concentración de 0.5 mg/mL tiende a alcanzar un valor máximo de inhibición del anión superóxido.

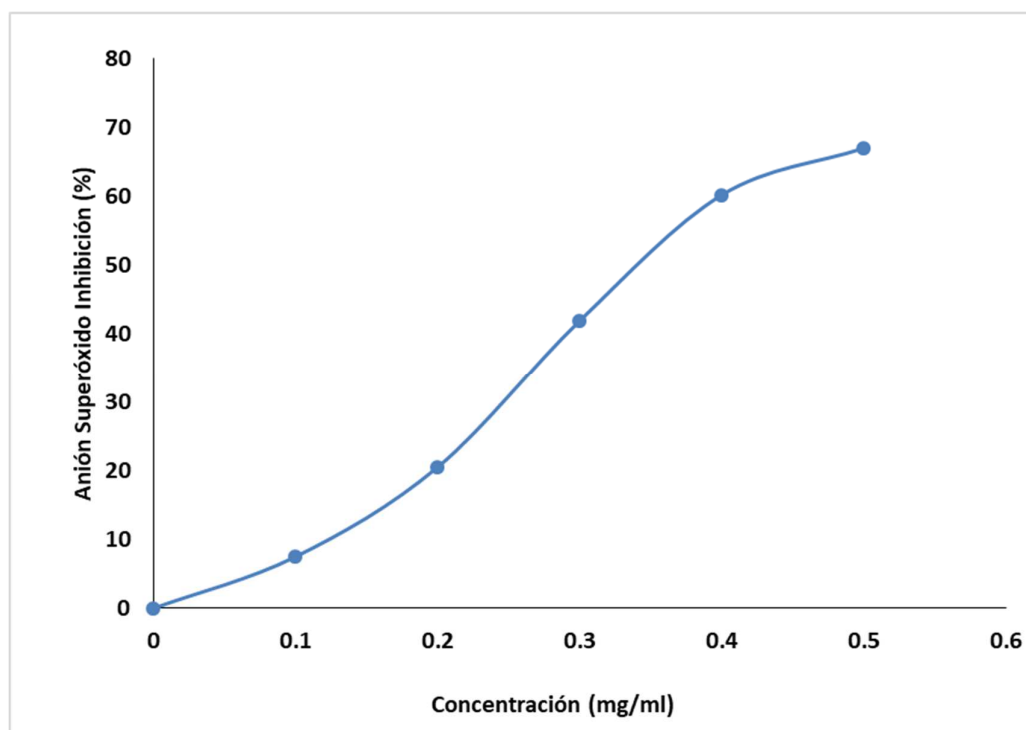


Figura 10. Comportamiento cinético de la decocción acuosa de hojas de *Rubus sparsiflorus* frente al anión superóxido.

En la figura 11 se puede observar que el porcentaje de inhibición del anión superóxido tiene valores notablemente bajos a concentraciones menores a 2.0 mg/mL, comportamiento que cambia perceptiblemente cuando se utilizan concentraciones mayores al valor antes citado, y cuando se utilizan concentraciones alrededor de 5.0 mg/mL el porcentaje de inhibición tiende a alcanzar un valor máximo.

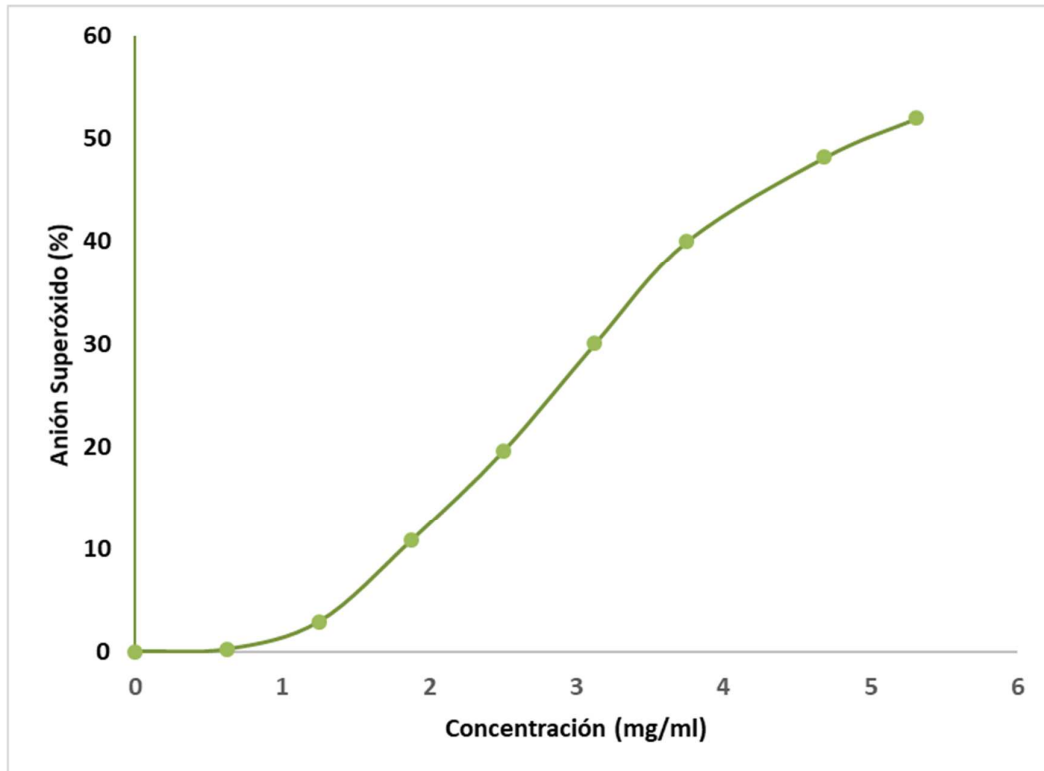


Figura 11. Comportamiento cinético del extracto hidroalcohólico de hojas de *Rubus sparsiflorus* frente al anión superóxido.

El extracto metanólico tuvo un comportamiento similar al mostrado por el extracto hidroalcohólico ya que a concentraciones menores a 2.0 mg/mL el porcentaje de inhibición es limitado, pero que se incrementa a valores mayores, alcanzando prácticamente valores de máxima inhibición a concentraciones mayores a 4.0 mg/mL como se muestra en la figura 12.

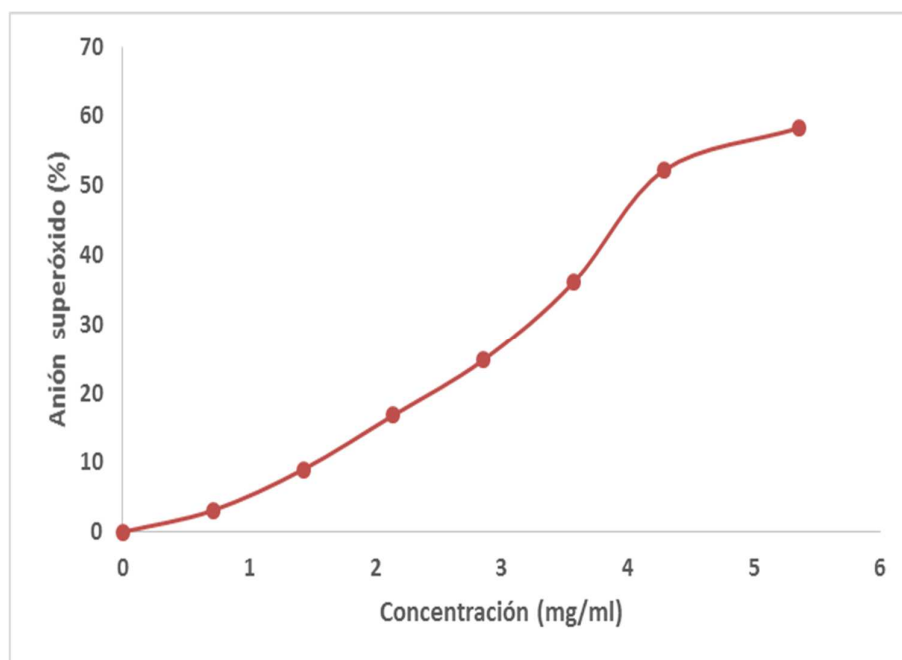


Figura 12. Comportamiento cinético del extracto metanólico de hojas de *Rubus sparsiflorus* frente al anión superóxido.

Los gráficos que muestran los comportamientos del *Rubus sparsiflorus* de la decocción acuosa y los extractos hidroalcohólico y metanólico son de naturaleza sigmoidea, lo que sugiere que las muestras reaccionarían de acuerdo a la ecuación:



y la graficación obedecería a la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{[\text{RS}]^n}{1 + [\text{RS}]^n}$$

Cuando las concentraciones de los compuestos antioxidantes de las muestras se encuentran a bajas concentraciones su reactividad sería muy pequeña y la inhibición de la reacción del anión superóxido con el NBT también sería muy limitada, es decir, no se observaría una relación lineal, probablemente debido a que los componentes antioxidantes de las muestras reaccionarían débilmente con el anión superóxido, pero cuando se utiliza una concentración mayor de las muestras antioxidantes, éstas adquirirían una mayor reactividad y reaccionarían con el anión superóxido ejerciendo un elevado efecto inhibitor que finalmente alcanzaría una inhibición máxima a elevada concentración.

DISCUSION.-

Los compuestos antioxidantes son de diversa índole y se encuentran en la naturaleza en las distintas partes de una planta, raíces, corteza, flores, frutos y hojas, el estudio de las propiedades antioxidantes de estos componentes de la planta resulta de particular importancia cuando su contenido y reactividad son de una magnitud similar o superior a las descritas hasta el presente.

Los polifenoles son compuestos con propiedades antioxidantes, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, su capacidad para neutralizar la acción nociva de los radicales libres reside en sus grupos hidroxilos cuya reactividad depende de la posición que tienen en la molécula, por cuyo motivo, la presencia de estos compuestos en las plantas medicinales y específicamente su eficiencia para bloquear los radicales libres dependerá fundamentalmente de su estructura química tridimensional.

Las plantas medicinales constituyen una promisoriosa fuente de compuestos con propiedades antioxidantes que son muy útiles en la prevención y curación de ciertas patologías. La *Cynara cardunculus* es una planta que crece en el Mediterráneo en forma natural se utiliza como alimento y por sus propiedades etnomedicinales en afecciones hepáticas, así mismo, previene la oxidación de las LDL y tiene propiedades anti-genotóxicas. La evaluación del contenido de polifenoles muestra que esta planta posee 303.66 mg equivalentes de ácido gálico/g del extracto butanólico (Baali et al., 2014). El contenido de polifenoles en los extractos metanólicos muestra que la especie *Abarema cochliacarpos* es la que posee el valor más elevado, siendo éste de 120.39 mg equivalentes de ácido gálico/g, siguiéndole en concentración el *Stryphnodendron pulcherrimum* con un contenido de 86.67 mg equivalentes de ácido gálico/g, valores que son similares a los contenidos de polifenoles de los tres extractos de *Rubus sparsiflorus*, mientras que el extracto metanólico de *Myroxylum peruiiferum* (Neto et al., 2016) tuvo un contenido de polifenoles de 42.18 mg equivalentes de ácido gálico/g, el extracto de *Tanaecium cyrtanthum* 30.16 y el *Croton corchoropsis* tuvo un contenido de 28.84 mg equivalentes de ácido gálico/g, valores que son menores al encontrado en las hojas de *Rubus sparsiflorus*. Las hojas de *Lophira lanceolata* son utilizadas en países como Senegal, Camerún y Sudán (Oussou et al., 2016) para el tratamiento de la infertilidad femenina, disentería, dolor de cabeza, diarrea, hipertensión, etc., y tiene un contenido de

polifenoles en el extracto metanólico de aproximadamente 7.5 mg equivalentes de ácido gálico/g que es mucho menor al observado en el *Rubus sparsiflorus*.

El género *Boerhavia* consiste de 40 especies distribuidas en la India, China, Ceylán, Australia, Sudán, África y América; la especie *Boerhavia diffusa* es utilizado en la India con fines medicinales, (Bhardwaj R, Yadav & Sharma R, 2014) el extracto metanólico de las hojas de esta planta tiene un contenido de polifenoles de 25.5 mg equivalentes de ácido gálico/g. El *Astocarpus altilis* es una de las 50 especies del género *Astocarpus* ampliamente distribuida en las regiones tropical y sub-tropical, cuyas hojas se utilizan por sus propiedades antibacterianas, antifúngica, antiplaquetaria, antiartrítica, etc. El extracto hidroalcohólico de las hojas de esta planta (Sikarwar et al., 2014) tuvo un contenido de polifenoles de 26.2 mg equivalentes de ácido gálico/g, muy por debajo de los tres extractos de las hojas de *Rubus sparsiflorus*. De manera análoga, la investigación de la actividad antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L se realizó preparando dos tipos de extractos: extracto acuoso y extracto hidroalcohólico (Sen, Ertan & Isbilir, (2016). El contenido de polifenoles del extracto acuoso fue de 47.94 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto, mientras que el extracto hidroalcohólico tuvo un valor de 53.15 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto.

En un estudio sobre las propiedades antioxidantes realizado con plantas medicinales comúnmente utilizadas en Jordania (Bilto et al., 2015), pudo observarse que la especie *Pistacia palaestina* tenía un contenido de polifenoles de 149 mg equivalentes de catecol/g de extracto, la *Hypericum triquetrifolium* poseía 124 mg equivalentes de catecol/g de extracto, el *Arbutus andrachne* 105 mg equivalentes de catecol/g de extracto, que son similares encontrados en los extractos de *Rubus sparsiflorus*, en cambio, la *Mentha spicata* con un valor de 91 mg equivalentes de catecol/g de extracto, *Rosmarinus officinalis* 66 mg equivalentes de catecol/g de extracto, *Salvia triloba* 64 mg equivalentes de catecol/g de extracto y la *Verbena triphylla* 52 mg equivalentes de catecol/g de extracto, tienen valores que se encuentran por debajo del mostrado por los extractos de *Rubus sparsiflorus*.

La evaluación comparativa de las propiedades antioxidantes de los extractos hidroalcohólicos de tres especies del género *Swietenia* (Preciado, Lobo-Echeverri, Pereañez, Zapata & Rojano 2016), permitieron observar que el contenido de polifenoles era más elevado en la especie *Swietenia macrophylla* con un valor de 290.5 mg

equivalentes de ácido gálico /g de extracto, mientras que en la *Swietenia humilis* era de 250.9 mg equivalentes de ácido gálico /g de extracto y en la *Swietenia mahagoni* fue de 146.4 mg equivalentes de ácido gálico /g de extracto. Diversos estudios muestran que la *Zanthoxylum alatum* tiene propiedades antihelmíntica, desinfectante, digestiva, etc. (Karmakar et al., 2015), la evaluación de sus propiedades antioxidantes muestra que el extracto alcohólico de las hojas tiene un contenido de polifenoles de 89.2 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto, valor que es ligeramente inferior a los valores que hemos encontrado en los tres extractos de las hojas de *Rubus sparsiflorus*.

La *Moringa oleífera* (Funmilayo et al., 2014) es utilizada en la medicina popular para el tratamiento de la diabetes mellitus, disentería, hepatitis, etc., el extracto metanólico de las hojas tiene un contenido de polifenoles de 541.0 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto. La determinación cuantitativa del contenido de polifenoles de *Eremurus himalaicus* (Mushtaq et al., 2017) revela que el extracto acuoso alcanza un valor de 240.0 mg equivalentes de ácido gálico/g, mientras que el extracto metanólico 270.0 mg equivalentes de ácido gálico/g, todos estos valores se encuentran por encima de aquellos del *Rubus sparsiflorus*, cuyos valores estuvieron comprendidos entre 93.85 y 118.68 mg equivalentes de ácido gálico/g. Se han descrito alrededor de 700 especies del género *Selaginella*, generalmente son utilizadas en el extremo oriente para el tratamiento del cáncer y enfermedades cardiovasculares (Sivaraman et al., 2013). El extracto hidroalcohólico ha sido preparado para el estudio de sus propiedades antioxidantes, la evaluación del contenido de polifenoles señalan a la especie *Selaginella involvens* como aquella con el más elevado de estos antioxidantes con una concentración de 128.41 mg equivalentes de ácido gálico/g, le sigue la *Selaginella intermedia* con 123.33 mg equivalentes de ácido gálico/g, luego la *Selaginella tenera* con 95.07 mg equivalentes de ácido gálico/g y finalmente la *Selaginella inaequalifolia* con 91.26 mg equivalentes de ácido gálico/g. Los extractos de *Rubus sparsiflorus* tienen valores que son similares a aquellos mostrados en estos estudios.

La determinación cuantitativa del contenido de polifenoles en los extractos hidroalcohólicos de hojas de plantas cultivadas en Malasia (Clarke, Ting, Wiart & Fry, 2013) mostró diversos valores, como ocurre con la *Apama tricornutum* que tuvo un contenido de 59.6 mg equivalentes de quercetina/g y la *Marsypopetallum pallidum* 76.9 mg equivalentes de quercetina/g, mientras que la *Archidendron ellipticum* 97.3 mg equivalentes de quercetina/g, *Pipturus argenteus* 119.2 mg equivalentes de quercetina/g,

tienen valores similares a los extractos de *Rubus sparsiflorus*; valores mayores que los extractos de las hojas de la planta motivo de nuestro estudio como la *Dysoxylum dumosum* con 182.7 mg equivalentes de quercetina/g y la *Duabanga grandiflora* con 476.8 mg equivalentes de quercetina/g, poseen valores que están por encima del *Rubus sparsiflorus*.

El *Prasium majus* es una planta utilizada como infusión en enfermedades gastrointestinales, el extracto metanólico de esta planta (Chaouche, et al., 2013) tuvo un contenido de polifenoles de 64.25 mg equivalente de ácido gálico/g de muestra seca, valor que está muy por debajo del extracto metanólico del *Rubus sparsiflorus* que es de 118.68 mg equivalente de ácido gálico/g de muestra seca. La evaluación de las propiedades antioxidantes del extracto acuoso de las hojas de *Stevia rebaudiana* (Kim, Yang Lee & Kang, 2011) indica un contenido de polifenoles de 130.67 mg equivalentes de catequina/g, valor que es mayor al extracto acuoso de *Rubus sparsiflorus* que es de 102.11. Existen 99 especies del género *Tabernaemontana* de las cuales 44 se encuentran en América, la especie *Tabernaemontana catharinensis* cultivada en Brasil sirvió para preparar el extracto crudo con etanol (Boligon et al., 2013), para cuyo propósito se utilizaron las hojas de esta planta, la que mostró un contenido de polifenoles de 135.57 mg equivalentes de ácido gálico/g, valor que es mayor al extracto hidroalcohólico de *Rubus sparsiflorus* cuyo valor es de 93.85.

El *Cladosporium velox* es un hongo que crece como huésped de la planta *Tinospora cordifolia*, se ha sugerido que los microorganismos residentes en una determinada planta podrían poseer similares propiedades a ella, probablemente como consecuencia del intercambio genético y evolución de una prolongada relación. La evaluación del contenido de polifenoles del *Cladosporium velox* es de 730 µg equivalentes de ácido gálico/mL del extracto, (Singh et al., 2016) este valor como puede apreciarse está muy por debajo de aquellos observados en las hojas de las plantas medicinales anteriormente descritas. Los estudios sobre las propiedades antioxidantes y citotóxicas de *Gmelina arborea* (Hussein S, et al., 2014) muestran que el extracto metanólico de las hojas tienen un contenido de polifenoles de 330.22 mg equivalentes de ácido gálico/g, que son más elevadas que el extracto metanólico de *Rubus sparsiflorus*.

Los flavonoides constituyen un importante grupo de compuestos con una elevada propiedad antioxidante, cuyo estudio es de suma importancia si consideramos que

diversos flavonoides han mostrado poseer un efecto beneficioso sobre algunas patologías como cáncer, psoriasis, dislipidemias, aterosclerosis, etc. Es decir, existe la imperiosa necesidad de realizar estudios que conduzcan hacia el conocimiento de compuestos bioactivos con propiedades que sean beneficiosas para la salud.

El estudio de las propiedades antioxidantes de cinco plantas de la flora brasileña, se realizó utilizando el extracto metanólico de las hojas, estudio que se hizo basado en las propiedades etnobotánicas disponible en la literatura; el contenido de flavonoides de estas especies también es variable y se observa que el extracto metanólico de *Myroxylum peruiferum*, *Abarema cochliacarpus*, *Stryphnodendron pulcherrimum*, *Tanaecium cyrtanthum* y el *Croton corchoropsis* mostraron contenidos de flavonoides notablemente menores al del *Rubus sparsiflorus*, mientras que el *Myroxylum peruiferum* posee el valor más alto con 10.52 mg equivalentes de quercetina/g, correspondiendo el contenido menor de flavonoides al *Tanaecium cyrtanthum* con 3.84 mg equivalentes de quercetina/g, (Neto et al., 2016) estos valores se encuentran por debajo de aquellos correspondiente al del *Rubus sparsiflorus* cuyo extracto acuoso fue de 21.66. El contenido de flavonoides de las hojas de *Lophira lanceolata* es alrededor de 50 mg equivalentes de quercetina/g (Oussou et al., 2016), así mismo, la concentración de flavonoides en la *Boerhavia diffusa* fué 79.86 mg equivalentes de quercetina/g, (Bhardwaj et al., 2014) valores que son mayores al que se encuentran en el *Rubus sparsiflorus*, cuyo mayor contenido corresponde al extracto metanólico con 35.64 mg equivalentes de quercetina/g.

Con referencia al contenido de flavonoides de otras fuentes de plantas medicinales, se pudo observar que la *Hypericum triquetrifolium* tenía un contenido de flavonoides de 171 mg equivalentes de rutina/g de extracto, la *Pistacia palaestina* 115 mg equivalentes de rutina/g de extracto, el *Arbutus andrachne* 112 mg equivalentes de rutina/g de extracto, la *Mentha spicata* 104 mg equivalentes de rutina/g de extracto, el *Rosmarinus officinalis* 67 mg equivalentes de rutina/g de extracto, la *Salvia triloba* 66 mg equivalentes de rutina/g de extracto, la *Verbena triphylla* 65 mg equivalentes de rutina/g de extracto, (Bilto et al., 2015) valores que son notablemente mayores que los tres extractos del *Rubus sparsiflorus*. De manera análoga, cuando se evaluó el contenido de flavonoides en el género *Swietenia*, la especie que tuvo el valor más elevado de este metabolito fue la *Swietenia mahagoni* con 286.8 mg equivalentes de catequina/g de extracto, la siguió en contenido la *Swietenia macrophylla* con 225.1 mg equivalentes de catequina/g de extracto y el menor valor correspondió a la *Swietenia humilis* con 165.5 mg equivalentes

de catequina/g de extracto, (Preciado et al., 2016), todos estos valores son considerablemente mayores al que hemos observado en el *Rubus sparsiflorus*.

El *Zanthoxylum alatum* posee un contenido de flavonoides de 63.8 mg equivalentes de quercetina/g de extracto (Karmakar et al., 2015), en cambio, el contenido de flavonoides de la *Moringa oleífera* es 645.0 mg equivalentes de pirocatecol/g de muestra seca (Fumilayo et al., 2014), valor que es considerablemente más elevado comparado con el contenido de muchas especies con propiedades medicinales. El extracto acuoso de *Eremurus himalaicus* muestra un contenido de flavonoides de 85.0 mg equivalentes de quercetina/g y el extracto metanólico tiene un valor de 65.0 mg equivalentes de quercetina/g (Mushtaq et al., 2017), ambos valores son notablemente mayores que los respectivos extractos del *Rubus sparsiflorus*. La *Mirabilis jalapa* es una planta utilizada en la medicina popular como antiespasmódico, estimulante digestivo, vermífugo, diurético, etc. El extracto metanólico de las hojas de esta planta (Zachariah et al., 2011) tiene un contenido de flavonoides de 4.41 mg equivalentes de floroglicinol/g de extracto seco, que es mucho menor que el del extracto metanólico de *Rubus sparsiflorus* cuyo valor es de 35.74 mg equivalentes de quercetina/g.

En relación al contenido de flavonoides del género *Selaginella*, la *Selaginella intermedia* posee el mayor contenido con 184.44 mg equivalentes de ácido gálico/g, comparado con otras especies de este género, le sigue la *Selaginella involvens* con 159.55 mg equivalentes de ácido gálico/g, la *Selaginella inaequalifolia* con 138.44 mg equivalentes de ácido gálico/g y finalmente la que tiene un menor contenido es la *Selaginella tenera* con 125.55 mg equivalentes de ácido gálico/g, (Sivaraman et al., 2013) todos estos valores son mayores a los tres extractos: acuoso, hidroalcohólico y metanólico de *Rubus sparsiflorus*. El contenido de flavonoides de *Prasium majus* (Chaouche et al., 2013) fue de 31.56 mg equivalentes de catequina/g de muestra seca. La *Stevia rebaudiana* (Kim et al., 2011) tiene un contenido de flavonoides de 15.64 mg equivalentes de quercetina/g, ambos valores son similares al que hemos hallado en el *Rubus sparsiflorus*, que se encuentran comprendidos entre el valor correspondiente a la decocción acuosa que es de 21.66 mg equivalentes de quercetina/g y el extracto metanólico de 35.64 mg equivalentes de quercetina/g. El contenido de flavonoides de *Tabernaemontana catharinensis* (Boligon et al., 2013) es de 78.06 mg equivalentes de quercetina/g. en cambio el contenido de flavonoides de *Gmelina arbórea* mostró un valor de 61.99 mg equivalentes

de rutina/g; que es considerablemente mayor a los valores de la decocción acuoso, extracto hidroalcohólico y metanólico de *Rubus sparsiflorus*.

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de las muestras biológicas, básicamente estas técnicas tienen como fundamento la capacidad que posee una muestra biológica para ceder electrones o para ejercer un efecto reductor mediante la cesión de un átomo de hidrógeno. Entre las técnicas más utilizadas se encuentran la técnica del DPPH, FRAP, ABTS y el ORAC, de éstas, la que más se utiliza con muestras biológicas es la técnica del DPPH; este compuesto es un radical libre relativamente estable que es reducido por los compuestos antioxidantes que son evaluados a través de una reacción en la que reaccionan directamente con un radical libre.

Con respecto a la evaluación de la capacidad antioxidante utilizando la técnica DPPH, se observa que la *Cynara cardunculus* (Baali et al., 2014) muestra un valor IC_{50} de 29.32 $\mu\text{g/mL}$. Cuando se realiza la evaluación de la capacidad antioxidante utilizando la técnica DPPH, es necesario tener en consideración que los valores más bajos corresponden a una mayor capacidad antioxidante. Un estudio de la evaluación de la capacidad antioxidante de varias plantas medicinales utilizando esta técnica mostró que las especies *Abarema cochliacarpus*, *Stryphnodendron pulcherrimum* y *Myroxylumperuiferum* tenían valores IC_{50} de 31.62, 35.47 y 37.26 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, resultados que indican que la *Abarema cochliacarpus* es la especie con la mayor capacidad antioxidante; en cambio, el *Tanaecium cyrtanthum* y *Croton corchoropsis* mostraron los valores más elevados, 43.77 y 87.84 respectivamente, lo que indica que poseen una menor capacidad antioxidante que las anteriores especies, (Neto et al. 2016) estos valores son similares a los obtenidos con la decocción acuosa, y los extractos hidroalcohólico y metanólico de *Rubus sparsiflorus* que mostraron valores IC_{50} de 43.6, 36.33 y 49.97 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. La evaluación in vitro de las propiedades antioxidantes del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ficus racemosa* determinada con la técnica del DPPH, mostraron un valor IC_{50} de 150 $\mu\text{g/mL}$, (Khan et al., 2017) resultado que indica que la capacidad antioxidante de esta especie es considerablemente menor que aquellas citadas anteriormente.

La evaluación de la capacidad antioxidante de *Lophira lanceolata* usando la técnica del DPPH dio un valor IC_{50} de 2.54 $\mu\text{g/mL}$, (Oussou et al., 2016) mientras que la actividad antioxidante de *Boerhavia diffusa* utilizando la misma técnica mostró un valor IC_{50} de 195.25 $\mu\text{g/mL}$, (Bhardwaj et al., 2014) de manera análoga, la capacidad antioxidante de

Astocarpus altilis evaluada utilizando la técnica del DPPH mostró un valor IC_{50} de 140.54 $\mu\text{g/mL}$. (Sikarwar et al., 2014). Estos resultados muestran que la *Boerhavia diffusa* y la *Astocarpus altilis* tienen capacidades antioxidantes considerablemente menores que la *Lophira lanceolata* (IC_{50} de 2.54 $\mu\text{g/mL}$) pero no es posible tener una clara idea de la magnitud de las diferencias encontradas, de manera análoga los valores IC_{50} de los extractos del *Rubus sparsiflorus* son menores que las plantas citadas anteriormente, con excepción de la *Lophira lanceolata*.

Las hojas de *Spathodea campanulata* (Coolborn et al., 2015) son utilizadas por la medicina popular de Nigeria para el tratamiento de enfermedades renales, inflamación de la uretra, etc. La evaluación de la capacidad antioxidante realizada usando la técnica del DPPH, permite observar que el extracto hidroalcohólico de las hojas de esta planta era de 1.57 mg de ácido ascórbico/g de muestra seca, mientras que el extracto metanólico tuvo un valor de 0.40 mg de ácido ascórbico/g de muestra seca y el extracto acuoso fue de 1.44 mg de ácido ascórbico/g de muestra seca; estos últimos resultados no permiten realizar comparaciones con otros estudios debido a que su expresión se realiza de una manera muy diferente al mostrado por un gran número de autores que se observa en la literatura.

La determinación de la capacidad antioxidante del extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa* usando la técnica del DPPH mostró un valor IC_{50} de 0.355 mg/mL y el extracto hidroalcohólico tuvo un valor IC_{50} de 0.376 mg/mL, (Sen et al., 2016) estos valores se encuentran muy por encima de aquellos obtenidos con el *Rubus sparsiflorus*, lo que significa que poseen una menor capacidad antioxidante. Con respecto a la evaluación de la capacidad antioxidante utilizando la técnica del DPPH se obtuvieron los siguientes valores IC_{50} , para la *Pistacia palaestina* 9.5 mg/mL, *Hypericum triquetrifolium* 18 $\mu\text{g/mL}$, *Arbutus andrachne* 19 $\mu\text{g/mL}$, *Mentha spicata* 30 $\mu\text{g/mL}$, *Rosmarinus officinalis* 41 $\mu\text{g/mL}$, *Salvia triloba* 46 $\mu\text{g/mL}$ (Bilto et al., 2015), como puede percibirse, con excepción de la primera especie estudiada, el resto de especies tienen valores IC_{50} similares a los diferentes extractos del *Rubus sparsiflorus*. En otro estudio realizado para evaluar la capacidad antioxidante usando la técnica del DPPH mostró que la especie más eficiente fue la *Swietenia humilis* con un valor IC_{50} de 89.0 $\mu\text{moles de Trolox/g de extracto}$, en segundo lugar estuvo la *Swietenia mahagoni* con un valor IC_{50} de 107.1 $\mu\text{moles de Trolox/g de extracto}$ y finalmente la *Swietenia macrophylla* con un valor IC_{50} de 161.9 $\mu\text{moles de Trolox/g de extracto}$; (Preciado et al., 2016) esta manera de expresar

los resultados utilizando la técnica DPPH, solamente lo usa un pequeño grupo de investigadores, argumentando que el Trolox es la forma sintética soluble de la vitamina E, pero otros investigadores no utilizan el Trolox para expresar sus resultados debido a que el Trolox es un compuesto obtenido por síntesis, es decir, no es un compuesto de naturaleza biológica.

La evaluación de la capacidad antioxidante de *Euphorbia fusiformis* realizada con la técnica del DPPH, mostró un valor IC_{50} de 48.99 $\mu\text{g/mL}$ (Kamalanathan et al., 2015), así mismo, la determinación de la capacidad antioxidante utilizando esta misma técnica permite observar que la *Moringa oleífera* tuvo un valor IC_{50} de 67.16 $\mu\text{g/mL}$ (Florence et al., 2014) y el *Zanthoxylum alatum* fue de 3.63 $\mu\text{L/mL}$. (Karmakar et al., 2015). La evaluación de la capacidad antioxidante de *Mirabilis jalapa* usando la técnica DPPH indica un valor IC_{50} de 3723 $\mu\text{g/mL}$ (Zachariah et al., 2011), de manera análoga, las especies del género *Selaginella* evaluadas con esta técnica indicaron que la especie *Selaginella involvens* tuvo la mayor capacidad antioxidante con un valor IC_{50} de 71.84 $\mu\text{g/mL}$, luego la *Selaginella intermedia* con un IC_{50} de 73.75 $\mu\text{g/mL}$, la *Selaginella tenera* con un IC_{50} de 77.52 $\mu\text{g/mL}$ y la de menor capacidad antioxidante correspondió a la *Selaginella inaequalifolia* con un IC_{50} de 103.53 $\mu\text{g/mL}$ (Sivaraman et al., 2013) los tres extractos de las hojas de *Rubus sparsiflorus* poseen valores IC_{50} menores que las especies citadas anteriormente lo que indica que posee una mejor capacidad antioxidante.

La utilización de la técnica DPPH para evaluar la capacidad antioxidante de frutas, verduras, medicamentos, bebidas, etc., se encuentra bastante difundida, así tenemos que la determinación de la capacidad antioxidante con esta técnica mostró para el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Apama tricornutum* un valor IC_{50} de 2740 $\mu\text{g/mL}$, *Dysoxylum dumosum* un valor IC_{50} de 476 $\mu\text{g/mL}$, *Marsypopetallum pallidum* un valor IC_{50} de 1530 $\mu\text{g/mL}$, *Archidendron ellipticum* un valor IC_{50} de 1,310 $\mu\text{g/mL}$, *Pipturus argenteus* un valor IC_{50} de 340 $\mu\text{g/mL}$ y la *Duabanga grandiflora* un valor IC_{50} de 140 $\mu\text{g/mL}$; (Clarke et al. 2013) las plantas antes citadas tienen valores IC_{50} más elevados que los extractos de *Rubus sparsiflorus*, lo que nuevamente indica que el *Rubus sparsiflorus* tiene una mayor capacidad antioxidante. La evaluación de la capacidad antioxidante de *Prasium majus* usando la técnica del DPPH mostró un valor IC_{50} de 7.95 $\mu\text{g/mL}$, (Chaouche et al., 2013) que es el menor valor y que corresponde a la especie con

mayor capacidad antioxidante y que naturalmente es mejor a todos los extractos del *Rubus sparsiflorus*.

La evaluación de la capacidad antioxidante usando la técnica del DPPH indicó que la *Stevia rebaudiana* produjo un porcentaje de inhibición alrededor del 40%, valor que fue alcanzado cuando se utilizó una concentración de 1mg/mL, (Kim et al., 2011) esta manera de expresar los resultados cuando se usa la técnica DPPH no es la más apropiada ya que no permite realizar comparaciones con otras investigaciones cuyos resultados se expresan de manera muy diferente, tal como sucede con la capacidad antioxidante de *Tabernaemontana catharinensis* la que se evaluó con la técnica del DPPH dando un valor IC₅₀ de 27.78 µg/mL (Boligon et al., 2013), así mismo, La capacidad antioxidante del *Cladosporium velox* determinada con esta misma técnica tuvo un valor IC₅₀ de 22.5 µg/mL (Singh et al., 2016), que indica que son menores al *Rubus sparsiflorus* y en consecuencia tienen una mejor capacidad antioxidante.

La determinación de la capacidad antioxidante utilizando la técnica FRAP permite observar que la especie *Swietenia macrophylla* tuvo la mayor capacidad antioxidante con un valor de 276.7 mg de ácido ascórbico/g de extracto, la especie *Swietenia mahagoni* tuvo un valor de 192.5 mg de ácido ascórbico/g de extracto y la *Swietenia humilis* mostró un valor de 152 mg de ácido ascórbico/g de extracto (Preciado et al., 2016). Esta expresión de resultados utilizando la técnica FRAP es inusual, ya que la técnica inicialmente descrita lo expresa referido al ion ferroso (Fe-II) generado. El uso de la técnica FRAP para evaluar la capacidad antioxidante permite mostrar que el extracto metanólico de *Salvia limbata* tiene un valor de 43.89 mM de Fe-II/100 g de muestra seca, la *Scutellaria tornefortii* 22.87 mmoles de Fe-II/100 g de muestra seca, la *Stachys byzanthina* 39.52 mmoles de Fe-II/100 g de muestra seca, la *Salvia hypoleuca* 65.48 mmoles de Fe-II/100 g de muestra seca, la *Lomatopodium staurophyllum* 27.85 mmoles de Fe-II/100 g de muestra seca, la *Pimpinella tragioides* 153.02 mmoles de Fe-II/100 g de muestra seca y la *Salvia macrosiphon* 404.12 mmoles de Fe-II/100 g de muestra seca (Gohari, Hajimehdipoor, Saeidnia, Ajani y Hadjiakhoondi, 2011), con excepción de la capacidad antioxidante de la *Pimpinella tragioides*, la capacidad antioxidante evaluada con la técnica FRAP permite mostrar que los tres extractos del *Rubus sparsiflorus*: acuoso 144.7 mmoles de Fe-II/100 g, hidroalcohólico 166.5 mmoles de Fe-II/100 g y el extracto metanólico con 177.3 mmoles de Fe-II/100 g son notablemente mayores que las especies anteriormente citadas.

La valoración de la capacidad antioxidante de algunas especies del género *Selaginella* utilizando la técnica FRAP, indicó a la *Selaginella tenera* como la especie con mayor capacidad antioxidante con un valor de 1352.77 $\mu\text{moles (Fe-II)/mg}$, luego la *Selaginella involvens* con 1122.77 $\mu\text{moles (Fe-II)/mg}$; estos valores son ligeramente menores a aquellos obtenidos con el *Rubus sparsiflorus*, en cambio, la *Selaginella intermedia* con un valor de 896.66 $\mu\text{moles (Fe-II)/mg}$ y la especie con menor capacidad antioxidante la *Selaginella inaequalifolia* con 839.44 $\mu\text{moles (Fe-II)/mg}$, (Sivaraman et al., 2013) son apreciablemente menores a los obtenidos con los tres extractos del *Rubus sparsiflorus* cuyos valores estuvieron comprendidos entre 1447 y 1773 $\mu\text{moles (Fe-II)/mg}$. La evaluación de la capacidad antioxidante realizada utilizando la técnica FRAP permitió mostrar que el extracto hidroalcohólico de la *Apama tricornutum* tenía un valor de 1617 μg equivalente de Fe(II)/mL, la *Dysoxylum dumosum* 337 μg equivalente de Fe(II)/mL, *Marsypopetallum pallidum* 1380 μg equivalente de Fe(II)/mL, *Archidendron ellipticum* 1130 μg equivalente de Fe(II)/mL, *Pipturus argenteus* 940 μg equivalente de Fe(II)/mL y la *Duabanga grandiflora* 110 μg equivalente de Fe(II)/mL, (Clarke et al. 2013) estos valores expresados como μg equivalente de Fe(II)/mL, no permiten realizar comparaciones con otros resultados experimentales ya que es necesario conocer otros datos que los autores no lo muestran.

Los experimentos cinéticos con el DPPH destinados a evaluar la acción neutralizadora de los radicales libres en función del tiempo, muestran que la velocidad de la reacción es dependiente de la concentración de cada uno de los extractos de *Rubus sparsiflorus* utilizados y siendo relativamente estable el radical libre DPPH los experimentos realizados permiten observar que en la fase inicial la reactividad de los compuestos bioactivos es muy elevada que no es posible determinar su constante de velocidad, en cambio, el estado estacionario se alcanza aproximadamente a los 30 minutos. Un comportamiento análogo ocurre con los extractos de las raíces de *Aristolochia clematitis* (Benmehdi et al., 2017) cuya velocidad de reacción es considerablemente elevada al inicio y tampoco es posible determinar la constante de velocidad.

Las observaciones realizadas utilizando equipos como el espectrofotómetro de flujo detenido para analizar los comportamientos de los compuestos reaccionantes en la fase extremadamente rápida de una reacción química (Anissi et al., 2014) permiten mostrar que la primera etapa que es muy rápida sea atribuida a la oxidación de antioxidantes por

el DPPH y probablemente la posterior etapa lenta ocurra debido a reacciones secundarias de los antioxidantes oxidados. La tasa de reacción de los compuestos intermediarios del DPPH en la etapa inicial pueden seguir una reacción de pseudo primer orden o de segundo orden, hecho que será dependiente de la naturaleza de los antioxidantes, en el caso del ácido gálico sigue una cinética de pseudo primer orden, mientras que el ácido cafeico y la catequina muestran una cinética de segundo orden, el *Rubus sparsiflorus* muestra una cinética muy rápida en la primera fase de la reacción que torna improbable calcular la constante de velocidad.

Conforme han sugerido algunos autores las reacciones que se producen entre los antioxidantes y el DPPH pueden ocurrir de tres maneras diferentes: a través de una cinética rápida, cinética rápida seguida de una fase lenta y cinética lenta. Aquellos antioxidantes que participan en una reacción cinética rápida se caracterizan por poseer grupos anti-radicales con capacidad para transferir un átomo de hidrógeno de una manera rápida pero son incapaces de realizar transferencias lentas de hidrógeno (Sendra, Sentandreu & Navarro, 2006). Así mismo, los autores sugieren que esta actividad anti-radical reacciona de manera irreversible con el DPPH; de acuerdo a estos autores las muestras de *Rubus sparsiflorus* sigue una cinética rápida y posteriormente una fase muy lenta que se estabiliza a los 30 minutos de iniciada la reacción.

En el estudio cinético de la reacción que se produce entre el eugenol y el DPPH pudo observarse que la absorbancia en el primer minuto de reacción era dependiente de la concentración del antioxidante; (Gotmare & Tambe, 2018) para este experimento se utilizaron concentraciones de 20 ppm y 50 ppm, esta disminución de la absorbancia se producía lentamente y era seguida posteriormente por una reacción algo más lenta que prácticamente se estabilizó a los 25 minutos y finalmente se mantuvo estable a los 30 minutos, tiempo que duró la observación, por cuyo motivo, los autores consideran que 30 minutos es el tiempo óptimo para medir la actividad antioxidante, comportamiento que son similares a las observadas con las muestras de *Rubus sparsiflorus*.

El comportamiento cinético de residuos de seis genotipos de tomate que se obtuvieron como productos secundarios de los procesos destinados a obtener jugo de tomate, muestran que estos residuos poseen significativos contenidos de ácido ascórbico, antioxidantes hidrofílicos y polifenoles, compuestos que son los responsables de la actividad antioxidante (Savatovic et al., 2012). Los seis extractos hidroalcohólicos

reaccionaron con el DPPH de una manera muy lenta, observación que se realizó durante 180 minutos habiendo alcanzado algunas de las muestras el estado estable, mientras que otros extractos aún continuaban reaccionando. Este comportamiento de los productos secundarios del proceso de obtención de jugo de tomate difiere considerablemente al observado con el *Rubus sparsiflorus* caracterizado por tener una fase inicial muy rápida.

De manera similar se ha observado que los extractos metanólicos de cinco plantas silvestres: *Rhizophora mangle*, *Krameria erecta*, *Forchammeria watsonii*, *Vallesia glabra* y *Lycium berlandieri*, muestran una cinética de actividad antioxidante con el DPPH que es dependiente de la composición de los compuestos antioxidantes de cada una de las plantas (Moran-Palacio *et al.*, 2014), siendo improbable medir la constante de velocidad debido a que la reacción se produce de una manera muy rápida de manera análoga al observado con el *Rubus sparsiflorus*.

En un estudio sobre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante de hongos comestibles (Álvarez-Parrilla, de la Rosa, Martínez & González, 2007), evaluada utilizando la técnica FRAP pudo observarse que después de una rápida reacción con el reactivo TPTZ, este proceso continúa lentamente aún hasta los 30 minutos, tiempo en que la reacción prosigue de una manera similar a la que observamos en el *Rubus sparsiflorus*. El incremento de la capacidad antioxidante que observaron estos autores entre los 4 y 30 minutos estuvo comprendido entre 32 y 97 %, mientras que con el *Rubus sparsiflorus* el incremento ocurrido con las tres preparaciones entre el minuto 5 y el minuto 30 mostró valores que estuvieron en el rango del 50 a 58%. De manera análoga, en los hongos comestibles el aumento de la capacidad antioxidante entre los 30 y 60 minutos fue menos del 20%, valor que es similar al obtenido con el *Rubus sparsiflorus* que estuvo entre el 13 y 16%. Es decir, la reactividad de los compuestos antioxidantes en el *Rubus sparsiflorus* reaccionaron más rápidamente que el de los hongos comestibles.

La evaluación cinética de la actividad antioxidante de polifenoles dietéticos, como quercetina, ácido cafeico, ácido gálico, ácido tánico, catequina y resveratrol, utilizando la técnica FRAP, mostró una primera fase considerablemente rápida y una segunda fase más lenta evaluada hasta los 30' minutos de reacción (Pulido *et al.*, 2000). En esta última fase de la reacción pudo observarse que el ácido cafeico y el ácido gálico incrementaron su reactividad con el TPTZ aproximadamente en 30% entre los minutos 4 y 30 en que duró el experimento, mientras que el ácido tánico se incrementó aproximadamente 280%, en

cambio, el ácido ferúlico tuvo una fase rápida considerablemente menor que el ácido cafeico y el ácido gálico y no tuvo un incremento posterior a esta fase rápida. En el caso del *Rubus sparsiflorus* la evaluación de la actividad antioxidante comprende la medición de una mezcla heterogénea de sustancias activas y los valores obtenidos dependerán de la concentración, actividad y las condiciones en que se mida la actividad antioxidante.

La determinación de la capacidad antioxidante utilizando la técnica FRAP, de la rutina, quercetina y ácido clorogénico (Álvarez-Padilla, de la Rosa, Torres-Rivas, Rodrigo-García & Gonzalez-Aguilar, 2005), mostró como en otras investigaciones que la primera fase de la reacción es muy rápida seguida posteriormente por una fase lenta, cuya cinética depende de la naturaleza del compuesto activo. Los autores también observan que los tres compuestos citados anteriormente incrementan el valor FRAP evaluados a los 4 y 30 minutos entre 45 y 120% para la quercetina y la rutina respectivamente, mientras que para las preparaciones de *Rubus sparsiflorus* los incrementos estuvieron comprendidos entre el 50 y el 58%.

Un análisis del curso de la reacción de diversas variedades de manzanas y bayas con la técnica FRAP se pudo observar que la reacción se incrementaba en función del tiempo correspondiendo el mayor aumento a la cáscara de la manzana que al mesocarpio de ésta. El comportamiento cinético de las cáscaras de diversas variedades de manzanas con la técnica FRAP (Henríquez et al., 2011) permitió observar que el incremento de la capacidad antioxidante en el primer minuto fue muy rápido, pero el aumento observado entre los 4 y 30 minutos fue de 12 a 53% que correspondieron a las variedades Pink lady y Red delicious respectivamente, comportamiento que tuvo cierta semejanza con el *Rubus sparsiflorus*. La elevada velocidad de reacción al inicio de ésta, torna muy difícil medirla, por cuyo motivo, resulta más apropiado comparar los incrementos de la absorbancia.

La evaluación del comportamiento cinético del *Rubus sparsiflorus* realizado utilizando la técnica FRAP muestra que el extracto acuoso reacciona de una manera muy rápida que impide medir la constante de velocidad, siendo el extracto acuoso el que muestra una mayor reactividad en el curso de la reacción, mientras el extracto metanólico lo realiza a una menor reactividad siendo aún menor el extracto hidroalcohólico; un comportamiento similar se observa en un estudio sobre la actividad antioxidante de dos variedades de guayaba rosada (*Psidium guajava*) conocidas como Sungkai y Semenyih procedentes de Malasia, (Musa, Abdullah & Subramaniam, 2015) mostraron ser una fuente importante

de compuestos antioxidantes, como flavonoides y polifenoles. El comportamiento cinético de estas variedades evaluadas con la técnica FRAP, muestran un rápido incremento de la reacción especialmente el de la cáscara del fruto, mientras que el mesocarpio es más lento, habiéndose observado que la reacción alcanza su valor máximo después de los 60 minutos, comportamiento que no permite medir la constante de velocidad al inicio de ésta.

El ensayo del poder reductor del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ficus racemosa* muestra un incremento dependiente de concentración cuando se utilizan concentraciones de los extractos comprendidos entre 25 y 200 µg/mL (Khan et al., 2017). La determinación del poder reductor del extracto hidroalcohólico de *Spathodea campanulata* (Coolborn et al. 2015) mostró un valor de 1.69 mg de ácido ascórbico/g de muestra seca, el extracto metanólico 1.74 mg de ácido ascórbico/g de muestra seca y el extracto acuoso 1.19 mg de ácido ascórbico/g de muestra seca. La determinación del poder reductor del extracto acuoso y del extracto hidroalcohólico de *Hibiscus sabdariffa* (Sen et al., 2016) muestran que la expresión de los resultados experimentales no corresponde a una relación lineal, entre la concentración de las muestras utilizadas y la absorbancia a 700 nm, hecho que no permite realizar comparación alguna.

La determinación del poder reductor de cada una de las especies vegetales se evaluó comparándola con la densidad óptica de una solución de ácido ascórbico (Bilto et al., 2015) mostrando una mayor densidad óptica la *Pistacia palaestina* y en orden decreciente se dispusieron las otras especies de la siguiente manera, *Hypericum triquetrifolium*, *Arbutus andrachne*, *Mentha spicata*, *Rosmarinus officinalis* y *Salvia triloba*. La determinación del poder reductor de *Zanthoxylum alatum* (Karmakar et al., 2015) indica que este efecto es dependiente de la concentración del extracto metanólico utilizado en un rango de concentración comprendido entre 5 y 100 µg/mL. La evaluación del poder reductor de *Eremurus himalaicus* (Mushtaq et al., 2017) muestra que el extracto acuoso tendría el mayor poder reductor, ya que alcanzó una mayor densidad óptica cuando eran utilizadas en un rango de concentración comprendido entre 50 y 250 µg/mL, comparado con el extracto metanólico utilizado en el mismo rango de concentraciones.

La determinación del poder reductor de *Prasium majus* mostró un valor IC₅₀ de 350 µg/mL (Chaouche et al., 2013); esta expresión es poco usual, pero constituye un intento que permitiría comparar valores encontrados en las diversas especies estudiadas. La

evaluación del poder reductor teniendo como referencia el valor de la absorbancia a 700 nm que se alcanzó en un medio de ensayo que contenía muestras entre 2.5 y 10.0 mg, tampoco constituye una manera de expresar resultados que permita realizar comparaciones con otros estudios de la misma naturaleza.

Consideramos que la carencia para expresar los resultados de la evaluación del poder reductor de las muestras biológicas de una manera apropiada nos conduce a proponer la expresión de los resultados experimentales como miligramos equivalentes de vitamina C/gramo de muestra seca. Esta propuesta obedece al hecho de que la vitamina C es un eficiente antioxidante, ejerce sus funciones en el organismo humano comportándose como un compuesto reductor por excelencia, tal como sucede en la reacción que permite la recuperación de la vitamina E como antioxidante. Expresando nuestros resultados con la propuesta antes descrita el extracto acuoso de *Rubus sparsiflorus* tendría un poder reductor de 160.0 mg equivalentes de vitamina C/g de muestra seca, al extracto hidroalcohólico le correspondería 139.0 mg equivalentes de vitamina C/g de muestra seca y al extracto metanólico le correspondería un valor de 194.3 mg equivalentes de vitamina C/g de muestra seca; es decir, el extracto metanólico sería aquel que muestra el poder reductor más elevado, siguiéndole en eficacia la decocción acuosa y el de menor poder reductor sería el extracto hidroalcohólico, la fácil comparación que brevemente hemos descrito con la decocción acuosa, el extracto hidroalcohólico y el extracto metanólico del *Rubus sparsiflorus*, permitiría hacer extensiva esta comparación con cualquier otra muestra biológica ya sea que corresponda a un fruto, verdura, alimento procesado, etc.

La evaluación del poder quelante de un alimento, planta medicinal, alimento procesado, medicamento, etc., constituye una forma de evaluar la capacidad de una muestra para reaccionar con un metal de transición como el hierro o cobre, e impedir que estos elementos puedan generar radicales libres. Con respecto al poder quelante del extracto butanólico de la *Cynara cardunculus* se obtuvo un valor IC_{50} de 118.91 $\mu\text{g/mL}$, valor que con fines de comparación se realiza con el estándar EDTA cuyo valor IC_{50} fue de 17.40 $\mu\text{g/mL}$ (Baali et al., 2014). En otra investigación la evaluación del poder quelante se realizó determinando el valor IC_{50} del EDTA que mostró un valor 17.3 $\mu\text{g/mL}$; este valor sirvió de comparación con aquellos obtenidos con las plantas medicinales; *Pistacia palaestina* IC_{50} 119 $\mu\text{g/mL}$, *Arbutus andrachne* IC_{50} 124 $\mu\text{g/mL}$, *Hypericum triquetrifolium* IC_{50} 154 $\mu\text{g/mL}$, *Mentha spicata* IC_{50} 156 $\mu\text{g/mL}$ (Bilto et al., 2015) los

extractos de *Rubus sparsiflorus* mostraron un poder quelante más eficientes que las plantas antes mencionadas conforme se puede apreciar con los valores IC_{50} de la decocción acuosa, extracto hidroalcohólico y extracto metanólico que fueron: 43.6, 56.8 y 50.0 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Las hojas de *Euphorbia fusiformis* (Kamalanathan et al., 2015) se utilizan en la India por sus propiedades hepatoprotectora, antiinflamatoria y antimicrobiana. La determinación analítica del poder quelante del extracto metanólico de esta especie muestra que una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ ejerce un efecto quelante de 45.48 %. La determinación del poder quelante de las especies del género *Selaginella* se realizó utilizando como estándar de comparación al EDTA (Sivaraman et al., 2013), la especie que tuvo el más elevado poder quelante fue la *Selaginella inaequalifolia* con un valor de 4.56 mg equivalentes de EDTA/g, luego fue la *Selaginella tenera* con 3.11 mg equivalentes de EDTA/g, la *Selaginella intermedia* con 2.50 mg equivalentes de EDTA/g y finalmente la *Selaginella involvens* con el más bajo poder quelante con un valor de 0.30 mg equivalentes de EDTA/g.

La decocción acuosa, y los extractos hidroalcohólico y metanólico de las hojas de *Rubus sparsiflorus* muestran un bajo efecto quelante, no existiendo una forma apropiada de expresar el poder quelante que permita comparar con los resultados obtenidos por otros autores, hemos considerado la posibilidad de expresarlo en función del porcentaje de inhibición que ejerce una concentración de 1.0 mg/mL de los extractos antes mencionados, es decir, acorde con esta propuesta el porcentaje de inhibición que produciría una concentración de 1.0 mg/mL de la decocción acuosa sería 10.2%, el extracto hidroalcohólico 10.0% y el extracto metanólico 9.5%; como puede observarse, el poder quelante es muy similar para los tres extractos, y debido al bajo poder quelante no resulta apropiado expresarlo como valores IC_{50} .

El anión superóxido es un radical libre que se forma principalmente en la mitocondria, por reducción del oxígeno realizado por los componentes respiratorios I y III de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, este radical libre al reaccionar con el óxido nítrico forma el peroxinitrito, radical libre que es muy nocivo para el organismo humano.

La determinación de la capacidad de esta planta para captar el anión superóxido generado por la fotorreducción de riboflavina detectada con NBT (azul de nitrotetrazolio) (Khan et al., 2017), mostró un valor IC_{50} de 100 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto hidroalcohólico de las

hojas de *Ficus racemosa*. La *Euphorbia fusiformis* a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ produjo una reacción con el anión superóxido de 90.70 % (Kamalanathan et al., 2015) mientras que el *Zanthoxylum alatum* tuvo una capacidad para inhibir el anión superóxido expresado como valor IC_{50} de 19.8 $\mu\text{g/mL}$ (Karmakar et al., 2015). Una concentración de 1mg/mL de *Stevia rebaudiana* (Chaouche et al., 2013) logró impedir la acción del anión superóxido en un 38.26%; los valores IC_{50} de los extractos acuoso, hidroalcohólico y metanólico de las hojas de *Rubus sparsiflorus* tuvieron valores más elevados que los valores IC_{50} de las plantas antes citadas, lo que significa que tienen menor capacidad para captar el anión superóxido. El extracto metanólico de *Rubus sparsiflorus* tuvo el menor valor IC_{50} (479 $\mu\text{g/mL}$) que el extracto hidroalcohólico y la decocción acuosa.

Los ésteres de fitoesteres con ácido ferúlico son compuestos bioactivos de naturaleza lipídica que se encuentran en los granos de maíz, arroz y avena. La evaluación de sus propiedades antioxidantes comprendió el estudio de ocho ésteres de fitoesteres naturales y dos obtenidos por síntesis, este estudio se realizó examinando la propiedad del antioxidante para competir con el NBT (Zhu, Sánchez-Ferrer & Nystrom 2016); por el anión superóxido; con este propósito se utilizaron concentraciones de 40, 80 y 160 μM habiéndose observado que la constante de velocidad fue más bajo cuanto mayor era la concentración del antioxidante. Con algunos ésteres de fitoesteres la disminución fue gradual, mientras que otros mostraban una modificación brusca, así mismo, se observó que algunos de los compuestos estudiados producían alrededor de 30% de interferencia con el NBT cuando se utilizaban concentraciones de 40 y 160 μM . Estos comportamientos de los antioxidantes frente a un radical libre como el anión superóxido nos muestra la necesidad de profundizar las investigaciones para comprender mejor la naturaleza de estas interacciones. La reactividad de las muestras de *Rubus sparsiflorus* frente al anión superóxido tuvieron un comportamiento que difieren ligeramente de aquellas observadas con los ésteres de fitoesteres, ya que a bajas concentraciones muestran muy baja reactividad pero cuando se incrementa la concentración tiende a alcanzar un valor máximo conforme ocurre con los ésteres de fitoesteres, cuyas constantes de velocidad no se incrementan proporcionalmente pero alcanzan un valor máximo.

Conforme se ha mostrado anteriormente, varias de las técnicas utilizadas para evaluar la capacidad antioxidante no establece una forma única para expresar los resultados experimentales, hecho que dificulta establecer de una manera apropiada las comparaciones sobre las bondades de un fruto, verdura, planta medicinal, alimento procesado, medicamento, etc., ya que algunos autores inclusive modifican las condiciones de ensayo y expresan los resultados de forma distinta hecho que complica aún más el panorama que presentan las técnicas para evaluar la capacidad antioxidante. Estos aspectos, al parecer de poca importancia, no permiten tener una visión más amplia de un estudio que tenga como objetivo la evaluación de las propiedades antioxidantes de un alimento, planta medicinal, medicamento, alimento procesado, etc.

CONCLUSIONES

1.- La decocción acuosa y los extractos hidroalcohólico y metanólico de las hojas de *Rubus sparsiflorus* son una fuente importante de polifenoles y flavonoides, lo que le hace poseer una elevada capacidad antioxidante (FRAP, DPPH)

2.- La cinética de reacción de los compuestos bioactivos del *Rubus sparsiflorus* evaluados con las técnicas FRAP y DPPH muestran una primera fase de reacción muy rápida seguida de una fase considerablemente lenta.

3.- La evaluación de la acción reductora del *Rubus sparsiflorus* permitió realizar una nueva propuesta para expresar cuantitativamente la acción reductora de una muestra biológica, que consiste en expresarla como miligramos equivalentes de ácido ascórbico/g de muestra.

4.- El comportamiento cinético del *Rubus sparsiflorus* frente al anión superóxido se realizaría a través de un proceso de tipo sigmoideo que implicaría la formación de moléculas antioxidantes más activas, que a elevadas concentraciones alcanzarían una inhibición máxima.

RECOMENDACIONES

- 1.- Profundizar las investigaciones dirigidas a identificar las moléculas responsables de la elevada reactividad y capacidad antioxidante de las hojas de *Rubus sparsiflorus*.
- 2.- Incentivar el cultivo del *Rubus sparsiflorus*, una planta que crece de manera silvestre, lo que permitiría utilizar sus hojas para la extracción de compuestos antioxidantes.
- 3.- Realizar investigaciones “*in vivo*” con la finalidad de evaluar sus potenciales propiedades antioxidantes en modelos de enfermedades crónicas no transmisibles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.-

- Alonso-Castro, A.J., Villarreal, M.L., Salazar-Olivo, L.A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., y Garcia-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cáncer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133:945-972.
- Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa LA., Torres-Rivas F., Rodrigo-García J y González-Aguilar G. (2005). Complexation of apple antioxidants: chlorogenic acid, quercetin and rutin by β -cyclodextrin (β -CD). *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 53:121-129.
- Alvarez-Parrilla E., de la Rosa LA., Martínez NR y González Aguilar GA. (2007). Total phenols and antioxidant activity of commercial and wild mushrooms from Chihuahua, México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5(5):329-334.
- Anissi J., El Hassouni M, Ouardaoui A y Sendide K. (2014). Comparative study of the antioxidant scavenging activity of green tea, black tea and coffee extracts: A kinetic approach. *Food Chemistry*. 150:438-447.
- Baali N, Belloum Z, Menad A, Ameddah S, Benadache F y Benadache S. (2014). Antioxidant and protective effect of *Cynara cardunculus* against paracetamol induced liver mitochondria oxidative stress. *International Journal of Phytomedicine*, 6:601-607.
- Barja G. (2005). Radicales libres de origen mitocondrial y longevidad. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 71:783-798.
- Beckman, J.S. (1990). Ischaemic injury mediator. *Nature* 345:27-28.
- Bellavite, P. (1988). The superoxide-forming enzymatic system of fagocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 4:225-261.
- Benmehdi H, Behilil A, Memmou F, Amrouche A. (2017). Free radical scavenging activity, kinetic behavior and phytochemical constituents of *Aristolochia clematitis* L. roots. *Arabian Journal of Chemistry*, 10:S1402-S1408.
- Bhardwaj R, Yadav A y Sharma R. (2014). Phytochemicals and antioxidant activity in *Boerhavia diffusa*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(1):344-348.
- Biju J, Sulaiman CT, Satheesh G y Reddy VRK. (2014). Total phenolics and flavonoids in selected medicinal plants from Kerala. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(1):406-408.
- Bilto YY, Alabdallat NG y Salim M. (2015). Antioxidant properties of twelve selected medicinal plants commonly used in Jordan. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 6(2):121-130.

- Boligon AA, Borba de Freitas R, Faccim de Brum T, Piana M, Belke BV, Teixeira da Rocha JB y Athayde ML. (2013). Phytochemical constituents and in vitro antioxidant capacity of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *Free Radicals and Antioxidants*, 3(2):77-80.
- Cascales M. (1997). *Bioquímica y Fisiopatología del estrés oxidativo*. Madrid, España: Fundación José Casares Gil.
- Cascales M. (1999). *Estrés oxidativo envejecimiento y enfermedad*. Madrid, España: Instituto de España.
- Chaouche TM, Haddouchi F, Ksouri R, Medini F, El-Haci IA, Boucherit Z, Sekkal FZ y Atik-Bekara F. (2013). Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of phenolic extract of *Prasium majus* L. *Free Radicals and Antioxidants*, 3(2):43-46.
- Cheyrier V, Tomas-Barberan FA y Yoshida K. (2015) Polyphenols: from plants to a variety of food and nonfood uses. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 63(35):7589-7594.
- Clarke G, Ting KN, Wiart C y Fry J. (2013). High correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, ferric reducing activity potential and total phenolics content indicates redundancy in use of all three assays to screen for antioxidant activity of extracts of plants from the Malaysian rainforest. *Antioxidants*. 2(1):1-10.
- Coolborn AF, Bolatito B, Omalara AB y Adetuyi FC. (2015). Phytochemical and antioxidant effect of *Spathodea campanulata* leaf extracts. *International Journal of Biochemistry Research and Review*, 7(3):148-159.
- Cui J, Nan KJ, Tian T, Guo YH, Zhao N, Wang L.. (2007). Chinese medicinal compound delisheng has satisfactory anti-tumor activity and is associated with up-regulation of endostatin in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 in three-dimensional culture. *World Journal of Gastroenterology*, 13(41):5432-5439.
- Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S y Lamas S. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustment to oxidative stress. *Redox Biology*. 6:183-197.
- Fehér J, Csomós G y Vereckei A. (1987). *Free Radicals Reactions in Medicine*. Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin.
- Frei B, (1994). *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*. London, United Kingdom. Academic Press.
- Fridovich, I. (1975). Oxygen: boon and bane. *American Science*, 63(1):64-59.
- Funmilayo I, Oluseyi A y Olayinka I. (2014). Comparative evaluation of in vitro antioxidant properties of *Cajanus cajan* seed and *Moringa oleifera* leaf extracts. *International Journal of Biochemistry Research and Review*, 4(2):163-172.

- Furchgott, R.F., y Zawadzki, J. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789):373-376.
- Galkina E., y Klaus L. (2009). Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annual Review of Immunology*, 27:165-197.
- Gao, M., Zhao, Z., Lv, P., Li, Y.F., Gao, J., Zhang, M., y Zhao, B. (2015). Quantitative combination of natural anti-oxidants prevents metabolic syndrome by reducing oxidative stress. *Redox Biology*, 6:206-217.
- Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. (1954). Oxygen poisoning and X-radiation: A mechanism in common. *Science*, 119(3097):623-626.
- Gohari AR, Hajimehdipoor H, Saeidnia S, Ajani Y y Hadjiakhoondi H. (2011). Antioxidant activity of some medicinal species using FRAP assay. *Journal of Medicinal Plants*, 10(37):54-60.
- Gomberg M. (1900). An instance of trivalent carbon: Triphenylmethyl. *Journal of American Chemical Society*, 22(11):757-771.
- Gotmare S y Tambe E. (2018). Chemical kinetics study and evaluation of antioxidant activity in clove, cumin, cinnamon and cardamom oils using DPPH radical. *International Journal of Recent Scientific Research*. 9(6):27593-27597.
- Halliwell, B., y Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.
- Harmand D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3):298-300.
- Harris, E.D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB Journal*, 6(9):2675-2683.
- Henriksen, E.J., Diamond-Stanic, M.K., y Marchionne, E.M. (2011). Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5):993-999.
- Henríquez C, López-Alarcón C, Gómez M, Lutz M, Speisky H. (2011). Time-dependence of ferric reducing antioxidant power (FRAP) index in Chilean apples and berries. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61(3):323-332.
- Hernández-García D, Wood CD, Castro-Obregón S y Covarrubias L. (2010). Reactive oxygen species: A radical role development?. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(2):130-143.
- Herrero, A., y Barja, G. (1997). Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mechanisms of Ageing and Development*, 98(2):95-111.

- Ho E, Galougahi KK, Liu CC, Bhindi R y Figtree GA. (2013). Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology* 1(1):483-491.
- Hopps E, Noto D, Caimi G y Averna MR, (2010). A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20(1):72-77.
- Hou CC, Huang CC y Shyur LF. (2011). Echinacea alkamides prevent lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute hepatic injury through JNK pathway-mediated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(22):11966-11974.
- Huang D, Ou B y Prior R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6):1841-1856.
- Hussein S, Hassan M, Laila R, Mona M, Amal S y Mosad G. (2014). Antioxidant and cytotoxic activities of *Gmelina arborea* ROXB leaves. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 4(1):125-144.
- Inoue, H., e Hirobe, M. (1986). Disulfide cleavage and insulin denaturation by active oxygen in the copper (II)/ascorbic acid system. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 34(3):1075-1079.
- Jankovic A, Korac A, Buzadzic B, Otasevic V, Stancic A, Daiber A y Korac B. (2015). Redox implications in adipose tissue (dys)function-A new look at old acquaintances. *Redox Biology*, 6:19-32.
- Jia Z, Tang M y Wu J. (1999). The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, (64)4:555-559.
- Johnson R, Segal M, Sautin Y, Nakagawa T, Feig D, Kang DH,...Sanches-Lozada, L (2007). Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 86:899-906.
- Kamalanathan D, Srinivasan R, Pratheeba T, Yuvarajan R y Natarajan D. (2015). Antioxidant activities of leaf extracts of *Euphorbia fusiformis* Buch.-Ham. Ex D. Don (Euphorbiaceae). *Free Radicals and Antioxidants*, 5(2):83-89.
- Karmakar I, Haldar S, Chakraborty M, Dewanjee S y Haldar PK. (2015) Antioxidant and cytotoxic activity of different extracts of *Zanthoxylum alatum*. *Free Radicals and Antioxidants*, 5(1):21-28.
- Katalinic V, Milos M, Kulisic T y Jukic M. (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94: 550-557.
- Keher JP, Smith CV. Free radicals in Biology: Sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases. En: Frei B editor. *Natural antioxidants in human health and disease* (1994). New York: Academic Press, 25-62.

- Khan A, Anand V, Badrinarayanan V, Thirunethiran K y Natarajan P. (2017). In vitro Antioxidant and Cytotoxicity Analysis of Leaves of *Ficus racemosa*. *Free Radicals and Antioxidants*, 7(1): 8-12.
- Kim HS, Quon MJ y Kim J. (2014). New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate. *Redox Biology*, 2:187-195.
- Kim IS, Yang M, Lee OH y Kang SN. (2011). The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *Food Science Technology*, 44(5):1328-1332.
- Lee J, Koo N y Min DB. (2004). Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3:21-33.
- Liu M, Yang S, Jin L, Hu D, Xue W y Yang S. (2012). In vitro antitumor and antioxidant activities of *Belamcanda chinensis* (L.) DC. *Journal of Medicinal Plant Research*, 6(43):5566-5569.
- Lobo V, Patil A, Phatak A & Chandra N. (2010). Free radicals antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Review*, 4(8):118-126.
- Mc Cord JM y Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22):6049-6055.
- Michaelis L. (1946). Fundamentals of oxidation and respiration. *American Scientist*, 34(4):573-596.
- Mitchell T y Darley-Usmar V. (2012). Metabolic syndrome and mitochondrial dysfunction: insights from preclinical studies with a mitochondrially targeted antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(5):838-840.
- Moran-Palacio EF, Zamora-Álvarez LA, Stephens-Camacho NA, Yañez-Farías GA, Virgen-Ortiz A, Martínez-Cruz O, Rosas-Rodríguez JA. (2014). Antioxidant capacity radical scavenging kinetics and phenolic profile of methanol extracts of wild plants of Southern Sonora, Mexico. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(9):1487-1493.
- Musa KH, Abdullah A, Subramaniam V. (2015). Flavonoid profile and antioxidant activity of pink guava. *Science Asia*, 41:149-154
- Mushtaq A, Masoodi MH, Wali AF, Ganai BA. (2017). Total phenolic content, total flavonoid content, in vitro antioxidant activity and antimicrobial activity against human pathogenic bacteria of *Eremurus himalaicus*-an edible herb of north western Himalayas. *Free Radicals and Antioxidants*, 7(1):90-94.

- Neeraj, Pramod, J., Singh, S., y Singh, J. (2013). Role of free radicals and antioxidants in human health and disease. *International Journal of Current Research and Review*, 05(19):14-22.
- Neto JRL, Uchoa ADA, Andrade de Moura P, Bezerra Filho CM, Tenorio JCG, Gomes da Silva A, Ximenes RM, Vanusa da Silva M, Correia MTS. (2016). Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10(27):409-416.
- Organización Mundial de la Salud. 57a Asamblea Mundial de la Salud: resolución WHA57.17.2002.
- Oussou, J.B., Asiedu-Gyekye, I.J., Yapo, A.F., N'guessan, B.B., Amoateng, P., Kouakou, L.K., Asante, I.K. y Ehile, E.E. (2016). In vitro scavenging activity and acute toxicity study of methanol leaves extract and fractions of *Lophira lanceolata* Tiegh. Ex Keay (Ochnaceae) in rats. *International Journal of Phytomedicine*, 8:411-421.
- Oyaizu M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and dietetics*. 07:307-315.
- Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., y Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.
- Park E, Lee SM, Lee J y Kim JH. (2013). Anti-inflammatory activity of mulberry leaf extract through inhibition of NF- κ B. *Journal of Functional Foods*, 5(1):178-186.
- Patti M y Corvera S, (2010). The role of mitochondria in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*; 31(3):364-395.
- Pérez S, Pereda J, Sabater L y Sastre J. (2015). Redox signaling in acute pancreatitis. *Redox Biology*, 5:1-14.
- Preciado LM, Lobo-Echeverri, Pereañez JA, Zapata K y Rojano BA. (2016) Antioxidants from three *Swietenia* species (Meliaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 10(2):8-17.
- Procházková D, Bousová I y Wilhelmová N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 82(4):513-523.
- Pryor W. (1994) Oxidants and antioxidants. En: Frei B, editor. *Natural antioxidants in human health and disease*. New York: Academic Press, p 1-24.
- Pulido R., Bravo L y Saura-Calixto F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agriculture and food Chemistry*. 48:3396-3402.

- Quijano C, Trujillo M, Castro L y Trostchansky A. (2016). Interplay between oxidant species and energy metabolism. *Redox Biology*, 8:28-42.
- Rajib Ahsan Md, Monirul Islam Km, Jahan Bulbul I, Ashik Musaddik Md y Haque E. (2009). Hepatoprotective Activity of Methanol Extract of Some Medicinal Plants Against Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats. *European Journal of Scientific Research*. 37(2): 302-310.
- Rains JL y Jain SK. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(5):567-575.
- Rains TM, Agarwall S y Maki KC. (2011). Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(1):1-7.
- Rice-Evans CA, Miller NJ y Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7):933-956.
- Samaniego-Sanchez C, Inurreta-Salinas Y, Quesada-Granados JJ, Blanca-Herrera R, Villalón-Mir M López-García de la Serrana H y López-Martínez MC. (2011). The influence of domestic culinary processes on the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of green tea infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24(1):79-86.
- Savatovic S, Cetkovic G, Canadanovic-Brunet J y Djilas S. (2012). Kinetic behaviour of the DPPH radical-scavenging activity of tomato waste extracts. *Journal of Serbian Chemical Society*. 77(10):1381-1389.
- Schattenberg JM y Czaja MJ. (2014) Regulation of the effects of CYP2E1-induced oxidative stress by JNK signaling. *Redox Biology*, 3:7-15.
- Schreck, R., Rieber, P., y Baeuerle, P.A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *The EMBO Journal*, 10(8):2247-2258.
- Sen C, Ertan F y Isbilir S. (2016). Investigation of antioxidant capacity, antimicrobial activity, total phenolic and monomeric anthocyanin contents in different extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. *International Journal of Biological and Pharmaceutical Research*, 7(1):35-41.
- Sendra J, Sentandreu E y Navarro J. (2006). Reduction kinetics of the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH•) for determination of the antiradical activity of citrus juices. *European Food Research and Technology*. 223:615-624.
- Sharma RK, Chatterji S, Rai DK, Mehta S, Rai PK, Singh RK, Watal G y Sharma B. (2009). Antioxidant activities and phenolic contents of the aqueous extracts of some indian medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(11):944-948.

- Sies H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4:180-183.
- Sikarwar MS, Hui BJ, Subramaniam K, Valeisamy BD, Yean LK y Balaji K. (2014). Antioxidant activity of *Artocarpus altilis*(Parkinson) fosberg leaves. *Free Radicals and Antioxidants*, 4(2):33-39.
- Simao AA, Lage FF, Chagas PMB, Fraguas RM, Freire JM, Marques TR y Correa AD. (2013). Antioxidants from medicinal plants used in the treatment of obesity. *European Journal of Medicinal Plants*, 3(3):429-443.
- Singh B, Sharma P, Kumar A, Chadha P, Kaur R, y Kaur A. (2016) Antioxidant and in vivo genoprotective effects of phenolic compounds identified from an endophytic *Cladosporium velox* and their relationship with its host plant *Tinospora cordifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*. 194:450-456.
- Singleton VL y Rossi JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16:144-158.
- Sivaraman A, Johnson M, Pramilazhagan T y Idudayaraj V. (2013). Evaluation of antioxidant potential of ethanolic extracts of selected species of *Selaginella*. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 4(3):238-244.
- Stadie WC y Haugaard N. (1945). Oxygen poisoning. V. The effect of high oxygen pressure upon enzymes: Succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 161:153-173.
- Stadie WC, Riggs BC y Haugaard N. (1945). Oxygen poisoning. VI. The effect of high oxygen pressure upon enzymes: Pepsin, catalase, cholinesterase and carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 161:175-180.
- Storey KB y Wu CW. (2013). Stress response and adaptation: A new molecular toolkit for the 21st century. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 165(4):417-428.
- Suja KP, Jayalekshmy A, Arumughan C. (2004). Free radical scavenging behavior of antioxidants compounds of sesame (*Sesamum indicum*) in DPPH system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(4):912-915.
- Susuki, Y.J., Forman, H., y Sevanian, A. (1997). Oxidant as stimulators of signal transducción. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(1-2):269-285.
- Szollosi R y Varga I. (2002). Total antioxidant power in some species of *Labiatae* (Adaptation of FRAP method). *Acta Biologica Szegediensis*, 46(3-4):125-127.
- Turrens, J.F., y Boveris A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochemical Journal*, 191(2):421-427.

- Ursini F, Maiorino M y Forman HJ. (2016). Redox homeostasis: The golden mean of healthy living. *Redox Biology*, 8:205-215.
- Venkat Raji Reddy G, Vijay Kumar R, Rama V, Krishna Reddy M y Narsimha Reddy Y (2015). Preliminary hepatoprotective activity of medicinal plant extracts against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in albino rats. *International Journal of Recent Scientific Research*. 6(7): 4946-4951.
- Verma PK, Raina R, Sultana M, Prawez S y Jamwal N. (2013). Hepatoprotective mechanisms of *Ageratum conyzoides* L. on oxidative damage induced by acetaminophen in Wistar rats. *Free Radicals and Antioxidants*, 3(2):73-76.
- Virgili F y Marino M. (2008). Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(1):1205-1216.
- Xiao J, Ho CT, Liong EC, Nanji AA, Leung TM, Lau TYH, Fung ML y Tipoe GL. (2014). Epigallocatechin gallate attenuates fibrosis, oxidative stress, and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease rat model through TGF/SMAD, PI3 K/Akt/FoxO1, and NF-kappa B pathways. *European Journal of Nutrition*. 53(1):187-199.
- Yen, G. C.; Wu, J. Y. (1999). Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, 65(1): 375– 379
- Yu BP. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. 74(1):139-162.
- Zachariah SM, Aleykutty NA, Viswana V, Jacob S y Prabhakar V. (2011). In vitro antioxidant potential of methanolic extracts of *Mirabilis jalapa* Linn. *Free Radicals and Antioxidants*, 1(4):82-86.
- Zhang L, Ravipati AS, Koyyalamudi SR, Jeong SC, Reddy N, Smith PT, Barlett J, Shanmugam K y Wu MJ. (2011). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoids compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23):12361-12367.
- Zhang N, Li Z, Xu K, Wang Y y Wang Z. (2016). Resveratrol protects against high-fat diet induced renal pathological damage and cell senescence by activating SIRT1. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39:1448-1454.
- Zhu D., Sánchez-Ferrer A y Nystrom L. (2016). Antioxidant activity of individual steryl ferulates from various cereal grain sources. *Journal of Natural Products*. 79:308-316.