

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

**ESTUDIO ESTRUCTURAL Y DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES
ANTIOXIDATIVAS DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *THYMUS
CITRIODORUS* Y *CYTISUS MULTIFLORUS***

Memoria que presenta **Dña. Olívia Rodrigues Pereira** para optar al Título de Grado por
la Universidad de Salamanca

Salamanca, 1 de Septiembre de 2009

Dña. M^a JOSÉ PÉREZ GARCÍA, PROFESORA ASOCIADA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y DÑA. SUSANA MARIA ALMEIDA CARDOSO, PROFESORA ADJUNTA EQUIPARADA DEL INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA (PORTUGAL)

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada “Estudio estructural y determinación de propiedades antioxidativas de extractos etanólicos de *Thymus citriodorus* y *Cytisus multiflorus*”, presentada por Dña. Olívia Rodrigues Pereira para optar al Grado de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en el Instituto Politécnico de Bragança (Portugal) y en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a día 1 de Septiembre de 2009.

Fdo. M^a José Pérez García

Fdo. Susana Maria Almeida Cardoso

**D. ENRIQUE VILLAR LEDESMA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA y
BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada “Estudio estructural y determinación de propiedades antioxidativas de extractos etanólicos de *Thymus citriodorus* y *Cytisus multiflorus*”, presentada por Dña. Olívia Rodrigues Pereira en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular para optar al Grado de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de las Dras. Dña. Susana Maria Almeida Cardoso y Dña. M^a José Pérez García.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a día 1 de Septiembre de 2009.

Fdo. Enrique Villar Ledesma

CENTRO DE REALIZACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO

El presente Trabajo de Grado se realizó en el laboratorio de Química y Bioquímica Aplicada de la Escuela Agraria del Instituto Politécnico de Bragança y en el Dpto. de Química de la Universidad de Aveiro y en el Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo de Grado no habría sido posible sin la ayuda de muchas personas, a las que en este momento me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento:

A la Profesora Susana Cardoso por su excelente trabajo, paciencia e constante interés a lo largo de todo el trabajo.

A la Dra. M^a José Pérez García por aceptar la dirección de este Trabajo de Grado y por sus acertados consejos.

A todos los que trabajan en el laboratorio de Química y Bioquímica Aplicada de la Escuela Agraria del Instituto Politécnico de Bragança, gracias por su ayuda.

A las personas del Departamento de Química de la Universidad de Aveiro por su amabilidad, en particular a la Profesora Rosário Domingues por sus enseñanzas y apoyo en la espectrometría de masas.

Al Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca por darme la oportunidad de realizar este Trabajo de Grado, en particular a la Dra. M^a Angeles Serrano García.

A toda mi familia, mis amigos y mi novio por el apoyo, ánimo y cariño demostrados no solo en esta, sino en todas las etapas de mi vida.

A todos, muchas gracias.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABTS	<i>2,2-azinobis(3-ethylbenzothizoline- 6-sulfonic acid) diammonium salt radical cation</i>
ARP	Poder antiradicalar
CAT	Catalasa
CE	Equivalentes de catequina
CID	Disociación inducida por colisión
DNP	3,4-dinitrofenil hidracina
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidracilo
ESI	Ionización por <i>Electrospray</i>
FAB	Ionización por bombardeo con átomos rápidos
FRAP	Determinación del poder reductor (<i>Ferric ion reducing antioxidant power</i>)
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GC	Cromatografía gaseosa
Glc	Glucosa
GPH-Px	Glutation peroxidasa
GPHR	Glutaciona reductasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia (<i>High performance liquid chromatography</i>)
LC	Cromatografía líquida
<i>m/z</i>	Relación masa / carga
MALDI	Ionización/desorción por laser de matriz asistida
MS	Espectrometría de Masas
ORAC	Capacidad de absorber radicales de oxígeno
PE	Equivalentes pirocatecol
Q	Analizador tipo cuadrupolo
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SOD	Superóxido dismutasa
TAE	Equivalentes de ácido tánico
TEAC	Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox
TLC	Cromatografía en capa fina

ToF	Analizador tipo tiempo de vuelo
TRAP	Capacidad antioxidante total
TSP	Ionización por <i>thermospray</i>
UV	Ultra-violeta
UV/Vis	Ultra-violeta/ Visible

Índice

1.	Introducción	1
1.1-	Retama blanca	1
1.1-1.	Propiedades y aplicaciones medicinales	1
1.2-	Tomillo limón	4
1.2-1.	Propiedades y aplicaciones medicinales	4
1.3-	Clases de compuestos fenólicos	6
1.3-1.	Ácidos fenólicos	7
1.3-2.	Flavonóides	8
1.3-3.	Flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanonas y antocianinas.....	10
1.3-4.	Chalconas y dihidrochalconas	14
1.3-5.	Taninos, proantocianidinas, catequinas	15
1.4-	Ensayos para la cuantificación de compuestos fenólicos	18
1.4-1.	Cuantificación de compuestos fenólicos totales.....	18
1.4-2.	Determinación del contenido en flavonas y flavonoles	19
1.4-3.	Quantificación de flavanonas y dihidroflavonoles	19
1.5-	Identificación de compuestos fenólicos	20
1.5-1.	Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC)	20
1.5-2.	Espectrometría de Masas – Ionización por <i>Electrospray</i> (ESI/MS)	21
1.6-	Propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos	25
1.6-1.	Efecto antioxidante- Determinación efecto bloqueador de los radicales DPPH• (2,2-Difenil-1-picril-hidracilo)	26
1.7-	Investigación y desarrollo de productos nutracéuticos	29
2.	Objetivo	32
3.	Material y Métodos	34
3.1-	Reactivos.....	34

3.2-	Equipamiento	34
3.3-	Descripción de las muestras	35
3.4-	Extracción de compuestos fenólicos	35
3.5-	Métodos espectrofotométricos	36
3.5-1.	Cuantificación de Compuestos Fenólicos totales.....	36
3.5-2.	Determinación de Flavonas y de Flavonoles	36
3.5-3.	Determinación de Flavanonas y de Dihidroflavonoles.....	37
3.5-4.	Efecto Antioxidante- Determinación del efecto bloqueador de radicales DPPH• (2,2-Difenil-1-picril-hidracilo)	37
3.6-	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	39
3.7-	Caracterización Estructural de los compuestos: Espectrometría de Masas - ESI	40
4.	Resultados y Discusión	42
4.1-	Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos.....	42
4.2-	Determinación de la Capacidad Antioxidante- efecto bloqueador de radicales DPPH• (2,2-Difenil-1-picril-hidracilo).....	48
4.3-	Caracterización de los compuestos fenólicos de los extractos etanólicos	51
4.3-1.	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	51
4.3-2.	Análisis por espectrometría de masas de las fracciones eluidas en HPLC.....	53
4.3-2.1.	<i>Cytisus multiflorus</i>	54
4.3-2.2.	<i>Thymus citriodorus</i>	62
5.	Conclusiones.....	73
6.	Referencias	75
6.1-	Bibliografía.....	75
6.2-	Web sites	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Retama Blanca	1
Figura 2- Tomillo limón.....	4
Figura 3- Biosíntesis de flavonóides (adaptado de (Cuyckens & Claeys 2004))	6
Figura 4- Estructura química de los ácidos hidroxibenzoicos y algunos ejemplos.....	7
Figura 5- Estructuras químicas de los ácidos hidroxicinámicos y algunos ejemplos	8
Figura 6- Estructura básica de un flavonóide	9
Figura 7- Estructura básica de una flavona	10
Figura 8- Estructura de vitexina, isovitexina y orientina.....	11
Figura 9- Estructura básica de una isoflavona	11
Figura 10- Estructura de daidzeína y genisteína	11
Figura 11- Estructura básica de un flavonol	12
Figura 12- Estructuras de kampferol, quercetina, mircetina y isoramnetina	12
Figura 13- Estructura básica de una flavanona	13
Figura 14- Ejemplo de una antocianina	14
Figura 15- Estructura de una chalcona	14
Figura 16- Galotanino	15
Figura 17-Elagitanino.....	15
Figura 18- Cameliatanino B	16
Figura 19- Estructura de la epicatequina y de la catequina	16
Figura 20- Representación esquemática de un sistema de ionización por ESI (Adaptado de (Griffiths et al 2001))	23
Figura 21- Mecanismo de ESI (Adaptado de (Griffiths et al 2001)).....	23
Figura 22- Formación del radical $H_2O_2\bullet$	25
Figura 23- Formación del radical $HO\bullet$	25
Figura 24- Reacción del radical DPPH. con un compuesto antioxidante, formando DPPH (adaptado (Joon-Kwan Moon 2009)).....	27
Figura 25- Uso de productos nutracéuticos (Adaptado de: (Espin et al 2007))	30
Figura 26- Perfil cromatográfico a 280 nm del extracto etanólico de la Retama blanca	52

Figura 27- Perfil cromatográfico a 280 nm del extracto etanólico del Tomillo limón ...	52
Figura 28- Estructura de luteolina-7- <i>O</i> -pentosa-8 - <i>C</i> -glucósido	56
Figura 29- Estructura de la naringina	57
Figura 30- Estructura de la orientina	58
Figura 31- Estructura de la luteolina- 7- <i>O</i> -glucósido.....	58
Figura 32- Estructura de la rutina	59
Figura 33- Estructura de la kaempferida	60
Figura 34- Estructura de la crisina	60
Figura 35- Estructura del metilgalato	61
Figura 36- Estructura de la mircetina	63
Figura 37- Estructura del eridictiol-7- <i>O</i> -glucósido	64
Figura 38- Estructura de la luteolina-7- <i>O</i> -glucósido.....	65
Figura 39- Estructura de la naringenina-7- <i>O</i> -glucósido.....	65
Figura 40- Estructura de la quercetina	66
Figura 41- Estructura de 7-OH-flavona.....	67
Figura 42- Estructura del ácido <i>p</i> -coumárico	68
Figura 43- Estructura del eridictiol-3',7-di- <i>O</i> -glucósido	69
Figura 44- Eridictiol- 7- <i>O</i> -feruil	69
Figura 45- Luteolina-7- <i>O</i> -feruil	70
Figura 46- Estructura de kampferida- <i>O</i> -glucósido	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1- Rendimiento en masa y en compuestos fenólicos totales obtenidos en los procesos de extracción.....	42
Tabla 2- Concentración de Flavonas/Flavonoles y Flavanonas/Dihidroflavonoles en extractos de Retama blanca y Tomillo limón	46
Tabla 3- Efecto antioxidante determinado por el efecto bloqueador de radicales DPPH•	48
Tabla 4- Identificación y principales fragmentos obtenidos por espectrometría de masas (modo positivo y negativo) de las fracciones eluidas por HPLC a partir de fracciones etanólicas de Retama blanca	54
Tabla 5- Identificación y principales fragmentos obtenidos por espectrometría de masas (modo negativo) de las fracciones eluidas por HPLC a partir de fracciones etanólicas de Tomillo limón.....	62

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1- RETAMA BLANCA



Figura 1- Retama Blanca

Cytisus multiflorus, conocida como Retama blanca o “White Spanish Broom” (Figura 1) es una planta autóctona y muy abundante en el sudoeste de la Península Ibérica aunque también se encuentra en la India, Australia, Francia, Italia, Estados Unidos y Argentina (Ciudad et al 2004; Frank & Ian 1994; Rodríguez-Riano et al 2004).

La especie *Cytisus multiflorus* pertenece al género *Cytisus*, familia *Fabaceae*, orden *Fabales*, subclase *Rosidae*, clase *Magnoliopsida* (Dicotiledóneas), división *Magnoliophyta* (plantas con flor), superdivisión *Spermaphyta* (plantas con semilla), subreino *Tracheobionta* (plantas vasculares) y reino *Plantae* (Ciudad et al 2004; USDA 2009).

Esta planta crece normalmente cerca de los pastos (entre la floresta y el pasto), en suelos pobres, arenosos y con características ácidas. Presenta flores blancas que florecen en el Invierno y es utilizada como planta de adorno, en la producción de miel y la fertilización de los suelos (Ciudad et al 2004; Rodríguez-Riano et al 2004).

1.1-1. PROPIEDADES Y APLICACIONES MEDICINALES

La planta *Cytisus multiflorus* posee propiedades diuréticas y anti-inflamatorias. Es utilizada en medicina popular contra el exceso de ácido úrico y para el tratamiento de cálculos renales, infecciones de las vías urinarias y tensión arterial elevada. Es también muy utilizada en el control de la diabetes. De hecho, esta aplicación se apoya en estudios científicos recientes que demostraron que el efecto hipoglicemiante máximo de un extracto etanólico de Retama blanca en ratones con diabetes tipo-2 era semejante al efecto del fármaco glicazida (Areias 2008), sugiriendo la validez del uso empírico de *Cytisus multiflorus* en el tratamiento de la diabetes tipo-2.

Además del uso arriba mencionado, otros trabajos de investigación en plantas del mismo género sugieren que la especie *Cytisus multiflorus* pueda tener otras actividades biológicas todavía no exploradas. En este contexto, un estudio *in vivo* efectuado por Nirmal et al. (Nirmal et al 2008) concluye que la administración de un extracto de *Cytisus scoparius* mejora los síntomas del stress. Estos autores sugirieron que la moderada actividad ansiolítica del extracto se relaciona con su actividad antioxidante y podrá ser útil en el futuro para el tratamiento de enfermos psicóticos. Además de esto, la misma planta ha sido estudiada *in vivo* respecto a su efecto en problemas hepáticos (inducidos por tetracloruro de carbono), verificándose que el extracto de *Cytisus scoparius* presenta un importante potencial antioxidante, al reducir la peroxidación lipídica y estimular la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y del glutatión, considerando el extracto como protector hepático (Raja et al 2007).

Además, como sería de esperar, en la literatura se encuentran descritos varios efectos protectores de extractos de plantas pertenecientes a la familia de la *Cytisus multiflorus* (*Fabaceae/Leguminosae*). Más abajo se describen algunos de esos ejemplos. El estudio experimental en modelos animales de un extracto acuoso de frutas de *Tetrapleura tetraptera* indicó que este posee efectos hipoglicemiantes y anti-inflamatorios, aunque bastante inferiores a los del diclofenac (fármaco de referencia) (Ojewole & Adewumni 2004). Además de esto, extractos de hojas de *Peltophorum africanum* revelaron poseer un efecto hepatoprotector *in vivo* después de haber se inducido toxicidad hepática por administración de etanol y tetracloruro de carbono (Ebada et al 2008). Por otro lado, compuestos fenólicos extraídos de tallos y raíces de *Derris indica* evidenciaron *in vitro* una capacidad antimicobacteriana considerable cuando se compararon con los compuestos de referencia isoniazida y sulfato de kanamicina (Koysomboon et al 2006). La planta *Sutherlandia frutescens* es un potencial agente hipoglicemiante, anti-inflamatorio, antioxidante, anticonvulsivante, analgésico y anti-infeccioso (Ojewole 2004; 2008; Wyk & Albrecht 2008), mientras los extractos de *Genista tenera* poseen potenciales aplicaciones en el tratamiento de la diabetes (Rauter et al 2009). Esta última bioactividad y la capacidad vasodilatadora han sido ya demostradas para extractos de *Eriosema kraussianumv* (Ojewole et al 2006) mientras

que extractos etanólicos de la planta *Flemingia macrophylla* poseen propiedades neuroprotectoras (Veitch 2009).

1.2- TOMILLO LIMÓN



Figura 2 - Tomillo limón

La especie *Thymus citriodorus* (Figura 2) pertenece al género *Thymus*, familia *Lamiaceae*, orden *Lamiales*, subclase *Asteridae*, clase *Magnoliopsida* (Dicotiledóneas), división *Magnoliophyta* (plantas con flor), superdivisión *Spermaphyta* (plantas que producen semillas), subreino *Tracheobionta* (plantas vasculares) y reino *Plantae*. Es nativa de la Europa y cultivada especialmente en la región mediterránea.

Es un arbusto perenne, los ramos y tallos presentan 20 a 40 cm de altura, las hojas son simples, de color verde grisáceo con bordos blancos y tiene flores muy pequeñas de color rosa (Elisabeth Stahl-Biskup 2002; USDA 2009).

1.2-1. PROPIEDADES Y APLICACIONES MEDICINALES

El *Thymus citriodorus* es una planta muy utilizada desde hace muchos años por sus propiedades aromáticas (agradable olor a limón), como planta de adorno, como desinfectante, como especia y también en la medicina tradicional, en forma de infusión, en el tratamiento de la bronquitis, asma y tratamiento de las infecciones fúngicas (Elisabeth Stahl-Biskup 2002; Horvath et al 2006; Omidbaigi et al 2005).

Aunque la especie *Thymus citriodorus* ha sido poco estudiada, un trabajo reciente reveló que un extracto de aceites esenciales de esta planta pose una gran actividad antimicrobiana y de amplio espectro con relación al extracto de referencia de *Thymus vulgaris* (Sacchetti et al 2005).

Por otro lado, varios estudios sugieren que plantas del género *Thymus* poseen importantes efectos farmacológicos como expectorante, anti-séptico, espasmolítico, antimicrobiano y antioxidante. Más concretamente, ha sido descrita por variados autores (Gião et al 2007; Kulisic et al 2006; Marja & Anu 1999) una considerable actividad antioxidante para *Thymus vulgaris* y *Thymus serpyllum*. Además, fue

verificado por Babaei et al (2008) el efecto anti-espasmódico de un extracto hidroalcohólico de *Thymus vulgaris*, sugiriendo que este puede ser útil en el tratamiento de la diarrea, consecuencia del síndrome del intestino irritable. En un contexto más amplio, puede indicarse que hay un creciente interés en la utilización de extractos de plantas de la familia *Lamiaceae* como potenciales agentes terapéuticos, por sus propiedades antifúngicas, inmunomoduladoras y antioxidantes (Reichling et al 2008). En esta línea, Reichling et al. (2008) revelaron que extractos etanólicos de *Prunella vulgaris* y de *Mentha piperita* son potenciales agentes antivíricos de uso tópico (virus *Herpes simplex*).

1.3- CLASES DE COMPUESTOS FENÓLICOS

El incremento de la disponibilidad de productos naturales derivados de plantas, utilizados desde hace largos años para fines medicinales, está asociado con la creciente investigación en torno a las sustancias bioactivas asociadas a ellos. De la gran variedad de fitoterápicos se destacan los compuestos fenólicos, dotados de propiedades antioxidantes, entre otras.

Se consideran compuestos fenólicos, los compuestos no nitrogenados que poseen un o más ciclos aromáticos y son derivados del metabolismo del ácido siquímico y/o de un poliacetato y formados a través de una serie de reacciones de condensación entre el ácido hidroxicinámico y residuos de malonato (Figura 3). De esta manera, los compuestos fenólicos derivan de dos vías anabólicas: la vía del ácido siquímico, que una vez iniciada a partir de este ácido produce los aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina) que son precursores de ácidos cinámicos, y la vía del acetato en la cual ácidos β -poliketometilénicos originan los compuestos fenólicos, a través de reacciones de ciclación.

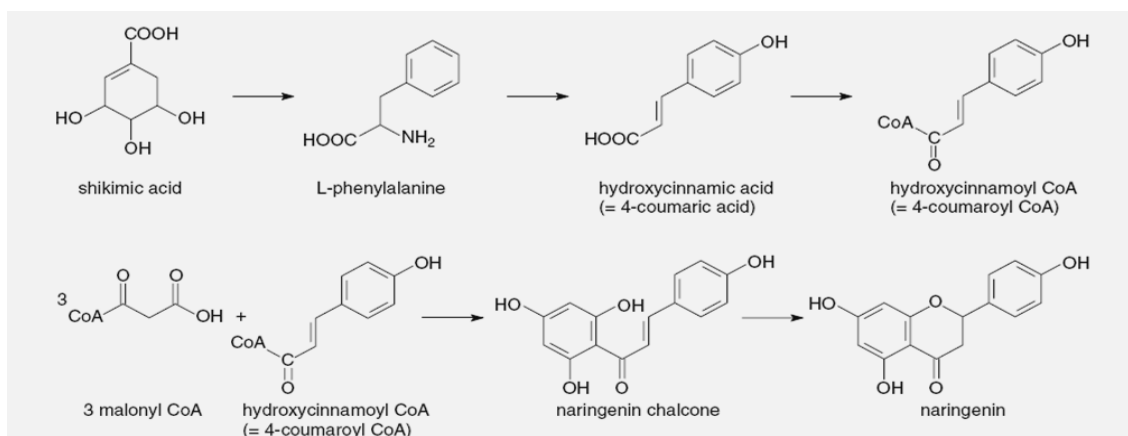
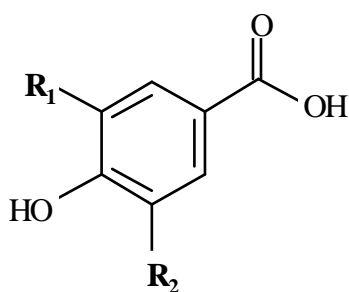


Figura 3- Biosíntesis de flavonoides (adaptado de (Cuyckens & Claeys 2004))

La gran mayoría de los compuestos fenólicos no se encuentran libres en la naturaleza, pero sí en la forma de heterósidos y también, menos comúnmente en la forma de ésteres aunque como polímeros. Como ejemplos de estos compuestos se pueden citar los ácidos fenólicos, los compuestos cumarínicos, los flavonoides y los taninos.

1.3-1. ÁCIDOS FENÓLICOS

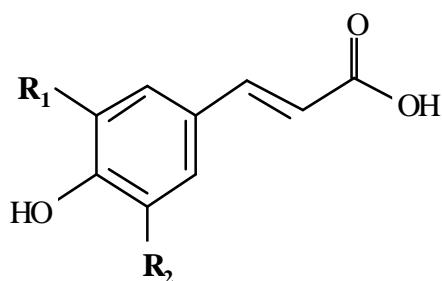
En el reino de las plantas, los ácidos fenólicos se hallan habitualmente en forma de heterósidos o ésteres derivados del ácido benzoico o del ácido cinámico y, en mucho menor cantidad, de forma libre. Los ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico (C₆-C₁), como por ejemplo el ácido gálico y el ácido vanílico, son compuestos hidroxilados muy abundantes en la naturaleza. Una vez que son hidroxilados, estos ácidos se denominan ordinariamente ácidos hidroxibenzoicos. En la Figura 4 se encuentra representada la estructura química de algunos compuestos de esta categoría.



Ácidos hidroxibenzoicos		
Compuesto	R ₁	R ₂
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	H	H
Ácido protocatéquico	OH	H
Ácido vanílico	OCH ₃	H
Ácido gálico	OH	OH
Ácido siríngico	OCH ₃	OCH ₃

Figura 4- Estructura química de los ácidos hidroxibenzoicos y algunos ejemplos

Los ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico (C_6-C_3) se encuentran normalmente en la forma de heterósidos fenilpropanoicos. Son ejemplos de ácidos cinámicos el ácido *p*-cumárico, el ácido cafeico y el ácido ferúlico (Figura 5).



Ácidos hidroxicinámicos		
Compuesto	R ₁	R ₂
Ácido <i>p</i> -cumárico	H	H
Ácido cafeico	OH	H
Ácido ferúlico	OCH ₃	H
Ácido sináptico	OCH ₃	OCH ₃

Figura 5- Estructuras químicas de los ácidos hidroxicinámicos y algunos ejemplos

1.3-2. FLAVONÓIDES

La denominación de “Flavonóides” fue propuesta en 1952 por Geissman (Dweck 2009) y se trata de un grupo de compuestos fenólicos, generalmente derivados de benzo- γ -pirona, la mayor parte de las veces unidos a azúcares que están presentes en vacuolas de flores, hojas y tallos de plantas (Havsteen 2002). El perfil de una determinada planta en flavonóides tiene un importante significado taxonómico y puede ser indicativo de si ha habido o no hibridación entre especies (Horwath et al 2008). Estos compuestos, que pueden también denominarse polifenoles, poseen bajo peso molecular y pueden presentarse en forma de aglicona o alternativamente, hidroxilados, acetilados, isoprenilados, como derivados metilados, o unidos a azúcares

sustituyentes como por ejemplo la glucosa, la galactosa y la ramnosa. Presentan un esqueleto común de 15 carbonos distribuidos como (C₆-C₃-C₆) (Dweck 2009; Ross & Kasum 2002), con dos anillos bencénicos unidos por una cadena de tres carbonos, que pueden o no formar un tercer anillo (C₆-C₃-C₆). Los anillos bencénicos son llamados de A y B y el sistema de numeración en la mayoría de sus compuestos se hace de acuerdo a lo que se indica en la Figura 6.

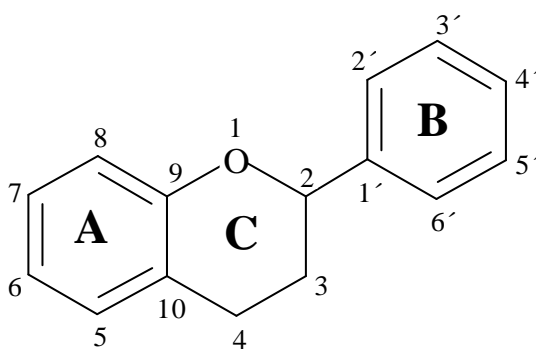


Figura 6- Estructura básica de un flavonoide

La forma estructural de los flavonoides está condicionada por las variaciones del anillo heterocíclico C y por la posición de los sustituyentes, por lo que se pueden clasificar en las categorías siguientes: flavonas, flavonoles, flavanonas, catequinas, antocianidinas e isoflavonas (Ross & Kasum 2002). Con excepción de las isoflavonas (isoflavonoides) y de las chalconas, que presentan el anillo C substituido en la posición 3, las restantes categorías mencionadas poseen la substitución del anillo en la posición 2. Hay que resaltar que los flavonoides están normalmente hidroxilados en las posiciones 3, 5, 3', 4' y 5'. También aparecen frecuentemente glicosilados en las posiciones 3 y 7. Los azúcares que se unen más corrientemente son la L-ramnosa, y los di-holósidos de glucosa y de ramnosa.

1.3-3. FLAVONAS, ISOFLAVONAS, FLAVONOLES, FLAVANONAS Y ANTOCIANINAS

Las flavonas se caracterizan por la presencia de un doble enlace entre C₂ y C₃ por presentar sustituyentes en los anillos A y B. De las cerca de 400 agliconas de flavonas conocidas (Iwashina 2000), las más frecuentemente encontradas en plantas son la apigenina (4',5,7-trihidroxi-2-flavona), la luteolina (3,4,5,7-tetrahidroxi-2-flavona) y la diosmetina (3',5,7-tri-hidroxi-4'-methoxiflavona). En plantas de las familias *Compositae*, *Labiatae* y *Umbelliferae*, estos compuestos aparecen, en general, como *O*-y/o *C*-glucósidos (unidos en las posiciones 7, 6 y 8, respectivamente, como se presenta en la Figura 7) (Cuyckens & Claeys 2004).

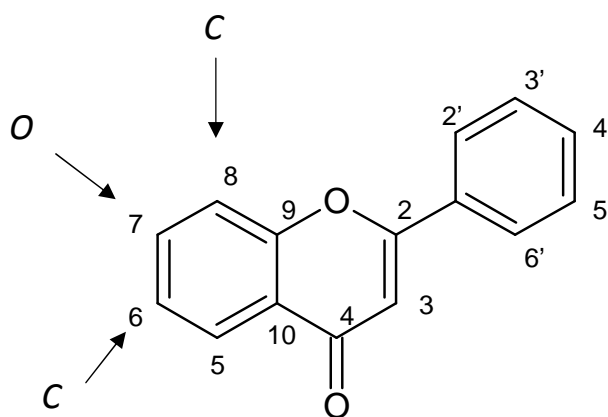
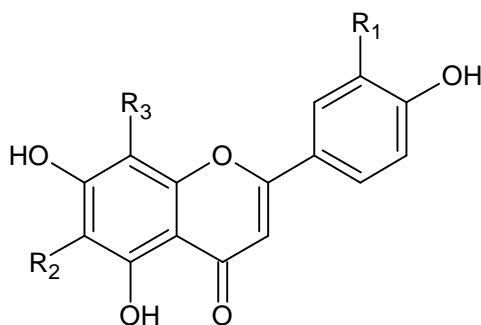


Figura 7- Estructura básica de una flavona

Como ejemplos de *O*-glucósidos se pueden mencionar la vitexina (3,4',5-tri-hidroxi-2-glucosilflavona), la isovitexina (3,4,5-tri-hidroxi-4-glucosilflavona) y la orientina como se recoge en la Figura 8 (Dweck 2009). En flores, estos compuestos muchas veces funcionan como copigmentos de las antocianinas (Dweck 2009; Iwashina 2000).



Flavonas			
Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
Vitexina	H	H	Glc
Isovitexina	H	Glc	H
Orientina	OH	H	Glc

Figura 8- Estructura de vitexina, isovitexina y orientina

Como previamente se ha mencionado, las isoflavonas se distinguen de las flavonas por la posición de su anillo B, que en estos compuestos aparece substituido en la posición 3 (Figura 9).

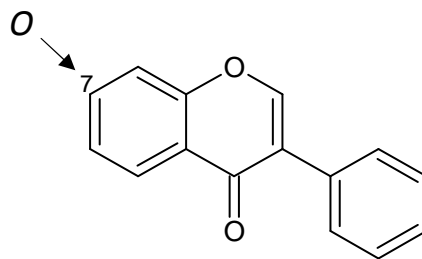
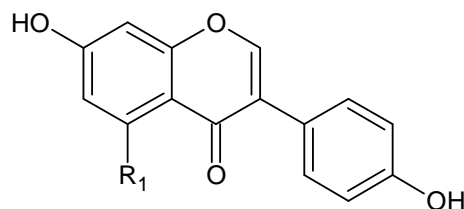


Figura 9- Estructura básica de una isoflavona

Las isoflavonas más comunes son la daidzeína (Figura 9) y genisteína (Figura 10). La sub-familia de las *Papilionoideae* (familia *Leguminosae*) es muy rica en compuestos de esta categoría (Dweck 2009).



Isolavonas	
Compuesto	R ₁
Daidzeína	H
Genisteína	OH

Figura 10 - Estructura de daidzeína y genisteína

Los flavonoles se caracterizan por la presencia de un doble enlace en C₂ y de un grupo hidroxilo en C₃ (Figura 11).

Se conocen 450 tipos de agliconas y 900 tipos de glucósidos aproximadamente (Iwashina 2000), de los cuales la gran mayoría se presentan como O-glucósidos unidos en las posiciones 3 y/o 7, como se muestra en la Figura 11.

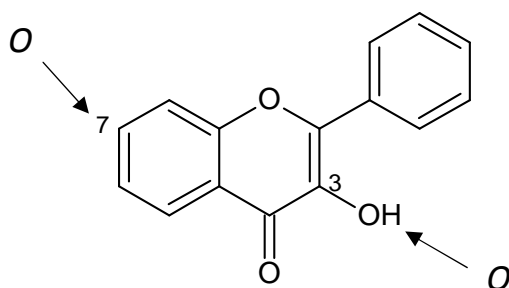
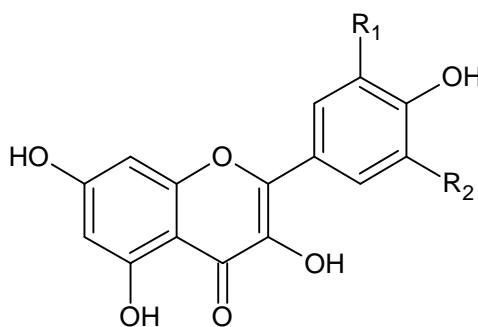


Figura 11 - Estructura básica de un flavonol

Son vulgarmente encontrados en plantas briófitas como *Takakia* (Iwashina 2000). Ejemplos bastante conocidos son la quercetina y el kampfferol (Figura 12) (Dweck 2009).



Flavonóis		
Compuesto	R ₁	R ₂
Kaempferol	H	H
Quercetina	OH	H
Mircetina	OH	OH
Isoramnetina	OCH ₃	H

Figura 12- Estructuras de kampfferol, quercetina, mircetina y isoramnetina

Las flavanonas se caracterizan por la ausencia del doble enlace entre C₂ y C₃ y por que poseen un centro quiral en la posición 2. Su estructura base se puede observar en la Figura 13.

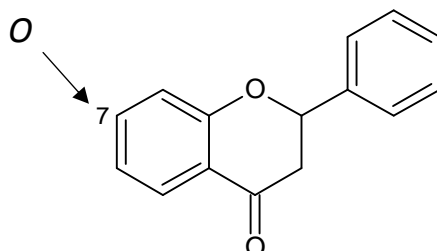


Figura 13- Estructura básica de una flavanona

Con relación a las flavonas y flavonoles, las flavanonas se encuentran menos distribuidas en la naturaleza. Las más encontradas son la naringenina y el eriodictol, relacionadas con la apigenina y la luteolina, respectivamente. Se conocen hasta ahora más de 350 agliconas de flavanonas (Iwashina 2000). Estas se encuentran típicamente en cítricos, de que son ejemplo la hesperidina, que está presente en las especies *Citrus sinensis* y *Citrus limón*, *Citrus aurantifolia* y *Citrus reticulata* y la naringenina en *Citrus arantium* y *Citrus paradisi* (Tomas-Barberén & Clifford 2000).

Las antocianinas son glucósidos hidrosolubles de las antocianidinas y se caracterizan por que poseen el catión fenil-2-benzopirílico. Lo que las distingue es la posición y el número de sustituyentes hidroxilo y metoxilo, el tipo de agentes acilantes (como por ejemplo ácidos cinámicos tales como el ácido cafeico y el ácido ferúlico) y la posición y el tipo de azúcares que se une al esqueleto primario. Los azúcares que más comúnmente se unen a estos compuestos son la arabinosa, la glucosa, la xilosa, la ramnosa, la gentiobiosa habitualmente unidos en las posiciones 3 y también 5, formando 3-*O*-glucósidos y 3,5-di-*O*-glucósidos, como representa la Figura 14 (Clifford 2000; Cuyckens & Claeys 2004; Iwashina 2000).

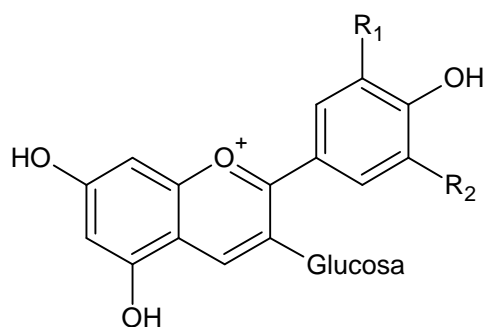


Figura 14- Ejemplo de una antocianina

Son ejemplos de este grupo de compuestos la hirsutidina (3,5,4'-triOH-7,3',5'-triOMe) que se puede encontrar por ejemplo en la *Catharanthus roseus*, la pelargonidina (3,5,7,4'-tetraOH), la cianidina (3,5,7,3', 4'-pentaOH) y la delphinidina (3,5,7,3',4',5'-hexaOH), presentes en angiospermas y gimnospermas. Alternativamente, la rosinidina (3,5,4'-triOH-7,3'-diOMe) se encuentra en las flores de *Primula roseae* (Iwashina 2000).

1.3-4. CHALCONAS Y DIHIDROCHALCONAS

Estructuralmente, las chalconas y dihidrochalconas presentan la rotura del anillo heterocíclico C, con relación a los compuestos hasta aquí descritos. El que distingue las chalconas de las dihidrochalconas es el hecho de estas ultimas no presenten doble enlace entre las posiciones α y β (Figura 15).

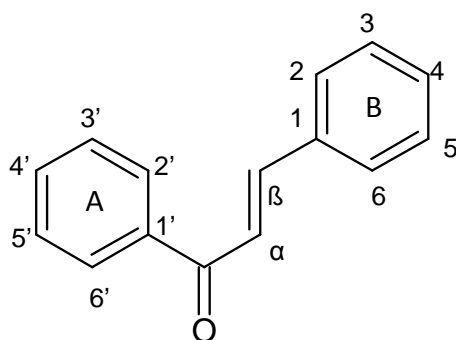


Figura 15- Estructura de una chalcona

1.3-5. TANINOS, PROANTOCIANIDINAS, CATEQUINAS

Se distinguen en las plantas varios tipos de taninos, según su estructura: taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos), taninos complejos y taninos condensados.

A. Taninos hidrolizables

Estos compuestos se caracterizan por tener en su estructura un poliol alifático central (normalmente glucosa) esterificado por moléculas de un ácido fenólico. Dependiendo del tipo de ácido fenólico, estos compuestos son designados como galotaninos (Figura 16) (se el ácido fenólico es el ácido gálico) el de elagitaninos (Figura 17), si presentan al menos dos unidades de galoíl acopladas la una a la otra y no poseen ninguna unidad de catequina glicosilada unida (Khanbabaee & van Ree 2001). En relación con los elagitaninos, el ácido fenólico es generalmente el ácido hexa-hidroxidifénico y/o ácidos desidro-hexa-hidroxidifénicos.

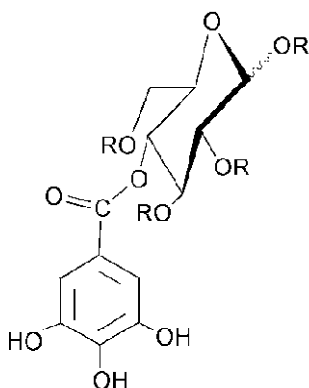


Figura 16 - Galotanino

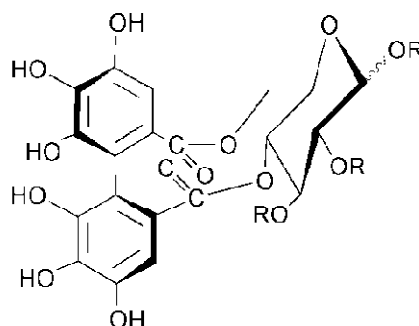


Figura 17-Elagitanino

B. Taninos complejos

Los taninos complejos se forman por la unión de galotaninos o elagitaninos (Khanbabaee & van Ree 2001) al C₆ el C₈ de una unidad 3-flavanol, como se puede ver en el ejemplo de la Figura 18 que representa el tanino camelianino B.

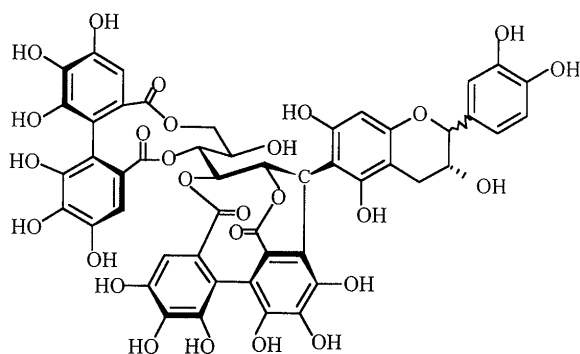
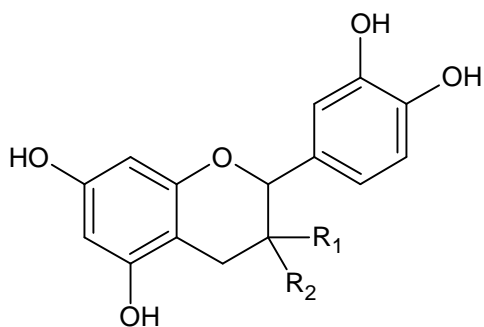


Figura 18 - Cameliatanino B

Las catequinas se distinguen de los flavonoles por que no poseen el grupo carbonilo en el anillo C. Su estructura básica se representa en la Figura 19.



Catequinas		
Compuesto	R ₁	R ₂
Epicatequina	H	OH
Catequina	OH	H

Figura 19- Estructura de la epicatequina y de la catequina

C. Taninos condensados

Estos compuestos se designan como proantocianidinas. Su estructura está constituida por unidades oligoméricas (3-flavanoles) o poliméricas de catequinas, unidas por la ligación C₄ de una catequina con el C₈ el C₆ de una otra unidad monomérica de catequina. Estructuralmente se organizan como dímeros, trímeros, tetrámeros y polímeros que pueden llegar hasta 50 unidades monoméricas, y alcanzar el valor de peso molecular de 20000 Da (Khanbabaee & van Ree 2001).

Las proantocianidinas se clasifican atendiendo al número de unidades de flavonol que integran en su estructura. Sus monómeros son, en la mayor parte de los casos, del tipo poli-hidroxi-3-flavanol y la hidroxilación de los anillos A y B es variable. Los dímeros son las estructuras más simples, pero pueden también aparecer como oligómeros y polímeros llegando a presentar hasta cincuenta unidades. Estos compuestos pueden unirse a azúcares tales como 3-, 5- y 7-*O*-glucósidos y por otra parte a ácidos fenólicos, formando muchas veces *O*-galatos, por esterificación por el ácido gálico en el grupo hidroxilo C₃ (Clifford 2000).

1.4- ENSAYOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS

FENÓLICOS

Son varios los ensayos que se utilizan para la determinación de compuestos fenólicos, y tienen como objetivo determinar la cantidad aproximada de un extracto en compuestos fenólicos totales o en grupos estructurales de compuestos como antocianinas, flavonas, flavonoles, flavanonas y dihidroflavonoles. Los métodos espectrofotométricos constituyen una importante herramienta en este sentido, ya que son de simple realización y presentan una buena repetibilidad y exactitud (Popova et al 2004).

1.4-1. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

La cuantificación de los compuestos fenólicos totales es normalmente efectuada por el método de Folin-Ciocalteu, descrito inicialmente por Singleton (1965). Este reactivo está constituido por una mezcla de ácidos fosfotungsténicos y fosfomolibdicos, que son reducidos por la oxidación de los compuestos fenólicos, formando una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno. La intensidad del color azul, medida a 700 nm, es directamente proporcional la cantidad de compuestos fenólicos. Todavía, se debe llevar en consideración que este método tiene interferencia por la presencia de otros componentes como el dióxido de azufre, el ácido ascórbico y por azúcares, cuando estos se encuentran en concentraciones elevadas. Este reactivo puede también oxidar estructuras fenólicas de los aminoácidos de las proteínas, si están presentes en la mezcla. Además, es necesario considerarse que los distintos compuestos fenólicos presentan un número variable de grupos reactivos, que pueden conducir a alteraciones en los coeficientes de extinción molar. A pesar de las interferencias, el método de Folin-Ciocalteu es generalmente considerado el más apropiado para la cuantificación de compuestos fenólicos totales.

Este ensayo es usado con distintos productos como plantas medicinales y especias (Bueyuekbalci & El 2008; Katalinic et al 2006; Li et al 2008; Moraes-De-Souza et al 2008; Zheng & Wang 2001), semillas (Dutra et al 2008), frutos (Kappel et al 2008; Panico et al 2009), polen (LeBlanc et al 2009; Moreira et al 2008; Zheng & Wang 2001), miel (Bertoncelj et al 2007), aceitunas (Pereira et al 2006), etc.

1.4-2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN FLAVONAS Y FLAVONOLES

Para la determinación del contenido en flavonas y flavonoles de los extractos se puede utilizar el método descrito por Bonvehi & Coll (Bonvehi & Coll 1994) y adaptado por Popova et al. (2004). Aunque este método hubiese sido descrito por estos autores para muestras de propóleos, ha sido usado en diferentes muestras incluyendo polen (LeBlanc et al 2009), semillas de *Pterodon enarginatus* (Dutra et al 2008). El método se basa en la reacción de los flavonoles y flavonas con el cloruro de aluminio, dando origen a un complejo Al(III) de color amarillo, que puede ser medido en un espectrofotómetro a 425nm (Dutra et al 2008; Popova et al 2004).

1.4-3. QUANTIFICACIÓN DE FLAVANONAS Y DIHIDROFLAVONOLES

Un otro método validado por los mismos autores, Popova et al, se usa para cuantificar el contenido en flavanonas y dihidroflavonoles y ha sido empleado en propóleos en 1996 por Nagy (Nagy & Grancai 1996).

El método se basa en la reacción, en medio ácido, de las flavanonas y dihidroflavonoles con el 3,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) para obtener fenilhidrazonas coloreadas, en proporción a la cantidad de flavanonas y dihidroflavonoles en la mezcla, que se miden en un espectrofotómetro a 486nm (Cvek et al 2007; Popova et al 2004).

1.5- IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

La diversidad de compuestos fenólicos existente y el creciente interés por este tipo de compuestos obliga al desarrollo de técnicas cada vez más específicas y eficientes. Su análisis y identificación puede ser llevada a cabo a través de distintos métodos analíticos, como la electroforesis capilar, cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y cromatografía gaseosa (GC) (Harnly et al 2007; Havsteen 2002; Hoffmann-Ribani et al 2009; Merken & Beecher 2000; Wang & Huang 2004).

1.5-1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

Uno de los métodos de separación, detección y cuantificación individual de los compuestos fenólicos más utilizado es el HPLC, con distintos protocolos adaptados al grupo de compuestos fenólicos que se pretenden detectar. La técnica de HPLC es utilizada en el análisis de distintos extractos alimentarios, incluyendo los de frutos frescos (Hoffmann-Ribani et al 2009; Wang & Huang 2004), frutos secos (Milbury et al 2006), plantas (Stanojevic et al 2009) y vegetales (Mauri et al 1999).

Según el proceso de extracción, la polaridad de los compuestos fenólicos en el extracto deberá ser uno de los factores a tener en consideración, a fin de se obtenerse una buena separación cromatográfica. De una forma general, la extracción de los compuestos fenólicos es efectuada con una mezcla hidroalcohólica (con metanol o etanol), acetona o dimetilsulfóxido (Harnly et al 2007) y su separación cromatográfica es efectuada con ayuda de a una columna de fase reversa recurriendo a una fase móvil normalmente constituida por dos solventes: agua y un solvente menos polar, como el metanol o el acetonitrilo. En la mayor parte de los casos, la fase móvil es ligeramente acidificada con ácido fórmico, ácido fosfórico o ácido acético para mejorar la separación en la columna y impedir la ionización de los compuestos (Harnly et al 2007; Havsteen 2002; Merken & Beecher 2000).

Como los compuestos fenólicos absorben en la región del UV, su identificación es muchas veces efectuada por acoplamiento del sistema de HPLC a un detector UV/Vis o a veces, de una forma más específica, a un detector de haz de diodos (DAD). Sus bandas de absorción características son la banda I (con un máximo entre 300 y 550 nm), que probablemente resulta del anillo B, y la banda II (entre 240 y 285 nm) que corresponde al anillo A del fenólico. La detección es efectuada con un detector UV/Vis ha veces acoplado a un espectrómetro de masas (Harnly et al 2007; Merken & Beecher 2000).

1.5-2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS – IONIZACIÓN POR *ELECTROSPRAY* (ESI/MS)

La espectrometría de masas (MS) se considera en los últimos años una herramienta muy importante en la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos. El espectrómetro de masas aparece muchas veces acoplado a un aparato de electroforesis capilar (EC/MS), de cromatografía líquida (LC/MS) o de cromatografía gaseosa (GC/MS).

El espectrómetro de masas está básicamente constituido por la fuente de ionización, por el analizador y el detector, estando estos dos últimos normalmente en alto vacío para que los iones formados viajen a través del aparato sin interferencia de las moléculas de aire.

De forma resumida el método consiste en que la muestra es introducida en la fuente de ionización del aparato (directamente a través de una sonda o de una jeringa, o alternativamente de modo indirecto a través de un sistema de cromatografía (GC o LC) o de electroforesis capilar acoplado al espectrómetro). Los iones formados en la fuente de ionización adquieren energía cinética y son dirigidos al analizador en el que son separados de acuerdo con la relación masa (m)/carga (z) (m/z). Los iones separados son detectados y esta señal es recogida en un sistema de datos donde las relaciones de m/z son almacenadas conjuntamente con su abundancia relativa y posteriormente los espectros presentados en la forma de Abundancia vs m/z . Es reseñable que la

información proporcionada por esta técnica tiene actualmente una enorme importancia en la elucidación estructural de distintos tipos de moléculas, incluyendo los compuestos fenólicos (Cohen 2009; de Souza et al 2008; Griffiths et al 2001; McNab et al 2009; Quirantes-Pine et al 2009).

El modo de ionización de la muestra es uno de los factores que distingue los distintos tipos de MS. Las técnicas de ionización suaves más recientes incluyen el *thermospray* (TSP), el bombardeo con átomos rápidos (FAB), la ionización por *electrospray* (ESI) y la Ionización/Desorción por Láser de Matriz Asistida (MALDI)(Cohen 2009; Griffiths et al 2001).

Recientemente, la espectrometría de ionización por *electrospray* (ESI) viene siendo el método de ionización de elección para la caracterización de un gran número de biomoléculas polares y no-volátiles, en particular los compuestos fenólicos. Esta técnica de ionización permite analizar compuestos desde muy bajo a muy elevado peso molecular (hasta centenas de KDa) y múltiplemente cargados y se puede acoplar a técnicas de separación como LC, una vez que las muestras deben ser introducidas en solución (Cohen 2009). Para el análisis por ionización por *electrospray*, la muestra se coloca en solución en el equipo de MS, por lo que debe ser previamente disuelta en un solvente adecuado. La introducción de la muestra en la fuente de ionización se efectúa generalmente a través de una jeringa para un capilar de diámetro interno aproximado 0,1mm que se pone a un elevado potencial. Como se representa en la Figura 20, las pequeñas gotas del solvente son vaporizadas a partir de la extremidad del capilar de acero inoxidable. La señal del potencial aplicado determina la polaridad de las gotas y de los iones formados. Se puede destacar que, entre el capilar y el contra-electrodo la presión es la presión atmosférica, y los iones son posteriormente muestrados a través de un cono, donde pasan a estar en una zona intermedia de presión más baja. En seguida los iones atraviesan un *skimmer* en dirección al analizador, que esta a un alto vacío. El *skimmer* funciona como un separador de modo que los iones muestra más pesados pasan a través de el y las moléculas más ligeras de gas y solvente son eliminadas a través del sistema de vacío.

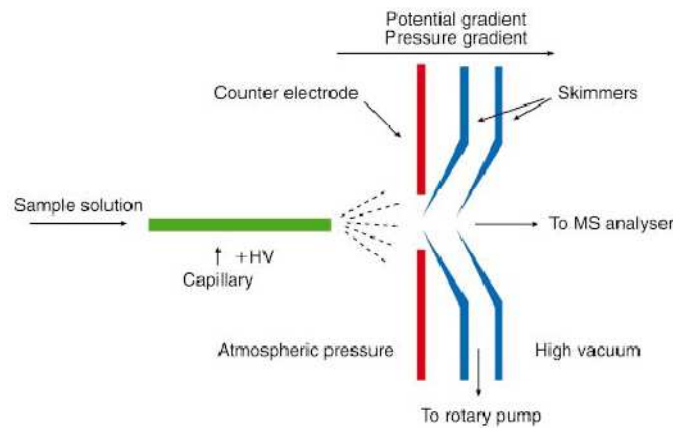


Figura 20- Representación esquemática de un sistema de ionización por ESI (Adaptado de (Griffiths et al 2001))

El mecanismo de producción de iones en *electrospray* esta asociado a la pulverización electrostática del solvente con la consecuente formación de gotas pequeñas y altamente cargadas (proceso muchas veces auxiliado por un gas nebulizador) y posteriormente, la separación de las moléculas del analito de las del solvente aunque esta ultima fase es mas difícil de comprender, es posible que a medida que el solvente se evapora con la ayuda de un gas de secado, la densidad de carga por superficie de las pequeñas gotas aumente hasta que las fuerzas repulsivas de Coulomb entre cargas superficiales excedan la tensión superficial conduciendo a la división de la gota inicial. La sucesión de este proceso de división deberá conducir a un estado en el que cada gota contendrá una única molécula que retendrá parte de la carga inicial (Cohen 2009; Griffiths et al 2001)(Figura 21).

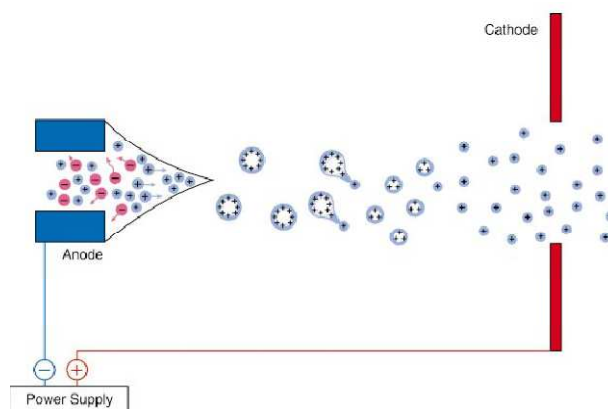


Figura 21- Mecanismo de ESI (Adaptado de (Griffiths et al 2001))

La técnica de ionización por *electrospray* es cada vez más usada en productos alimentarios, plantas medicinales y en especias, ya que proporciona importantes informaciones con vista a la caracterización estructural de los compuestos (Harnly et al 2007). De entre las fuentes de ionización disponibles, esta es la que presenta mayor sensibilidad para el análisis de compuestos fenólicos, principalmente en el modo negativo (Cuyckens & Claeys 2004). Aunque con menor aplicación, el modo positivo es también útil en la identificación de nuevos compuestos fenólicos.

Otro componente muy importante en el espectrómetro de masas es el analizador, que separa los iones según las diferentes razones m/z . Los analizadores más utilizados son los de tipo trampa de iones (Ion trap), cuadrupolo (Q) y tiempo de vuelo (ToF). El acoplamiento de estos dos últimos analizadores origina espectrómetros de masas tandem Q-ToF. Este es un ejemplo de espectrómetro de masas tandem (MS/MS) que resulta del acoplamiento secuencial de dos analizadores distintos (Cohen 2009), aunque otros como los que poseen una secuencia de analizadores de tipo cuadrupolo (triple cuadrupolo) sean también muy usados. Alternativamente, ensayos de masas en tandem son generalmente efectuados en aparatos que poseen un analizador del tipo trampa de iones.

1.6- PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son conocidos especialmente por sus propiedades antioxidantes, que son también las mejor estudiadas y descritas hasta el momento. El concepto de compuesto antioxidante surge como un agente que protege el organismo contra los radicales libres. De estos, se consideran principalmente las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS), de los cuales el principal es el NO•. Las especies reactivas son producidas en procesos fisiológicos, especialmente en la cadena respiratoria y en oxidaciones mediadas por oxigenasas. Pueden resultar de la exposición a xenobióticos o de la evolución de alguna enfermedad. Químicamente, los radicales libres poseen uno o más electrones desapareados y son muy reactivos, conduciendo a daños a nivel celular o del material nuclear (DNA), proteínas y lípidos (llevando en este último caso a peroxidación lipídica) y modulando procesos de muerte celular como la apoptosis y la necrosis (Agarwal et al 2005; Stone & Yang 2006).

Un ejemplo de ROS es el anión superóxido $O_2^{\bullet-}$. Este radical se forma en la cadena respiratoria, y puede originar otros radicales libres como el H_2O_2 (Figura 22) y el radical hidroxilo HO• (Figura 23) este último ataca especialmente moléculas de DNA.

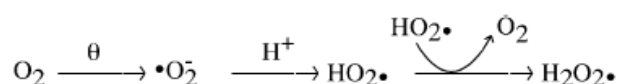


Figura 22- Formación del radical $H_2O_2\bullet$



Figura 23- Formación del radica HO•

El organismo ha desarrollado mecanismos antioxidativos enzimáticos y no enzimáticos que actúan contrarrestando este ataque a las estructuras celulares, por lo que solamente existe stress oxidativo cuando la producción de radicales libres excede la capacidad« de respuesta de las defensas antioxidativas. Componen este sistema anti-stress oxidativo intra y extracelular el complejo enzimático superóxido dismutasa

(SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPH-Px), y la glutatión reductasa (GPHR), entre otras. En lo que respecta a las defensas no enzimáticas son ejemplo compuestos como el glutatión (GSH), la vitamina E, la vitamina C, los carotenoides y los compuestos fenólicos (Havsteen 2002; Tapas et al 2008; Valko et al 2007).

Se sabe actualmente que el stress oxidativo, está relacionado con el desarrollo de distintas enfermedades como las neurodegenerativas la diabetes, la aterosclerosis y el cáncer, y también con el proceso de envejecimiento (Angelopoulou et al 2009; Fearon & Faux 2009; Frisard & Ravussin 2006; Le Gall & Ardaillou 2009; Valko et al 2006). En este sentido, distintos estudios evidencian el efecto protector de los compuestos fenólicos frente a estas enfermedades (Agarwal et al 2005; Ishige et al 2001; Kang et al 2004; Wang et al 2001).

Así, cada vez más se apuesta en la identificación de compuestos antioxidantes naturales, de que forman parte los compuestos fenólicos, que funcionan como defensas antioxidativas no enzimáticas (Joon-Kwan Moon 2009; Lule & Xia 2005). Se cree que las propiedades terapéuticas de los flavonoides se relacionan con su capacidad de captar radicales libres (Havsteen 2002) pero también con otros mecanismos, el mantenimiento de elevados niveles de glutatión, que es el principal antioxidante intracelular (Duarte et al 2005; Ishige et al 2001; Yao et al 2004).

1.6-1. EFECTO ANTIOXIDANTE- DETERMINACIÓN EFECTO BLOQUEADOR DE LOS RADICALES DPPH• (2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRACILO)

Hoy en día existe una diversidad de técnicas *in vitro* cuyo objetivo es la determinación del efecto antioxidante de sustancias/mezclas de sustancias. Se pueden clasificar esos testes en (1) testes basados en la transferencia de un hidrogeno (ex: ORAC- capacidad de absorber radicales de oxígeno; TRAP- capacidad antioxidante total y (2) testes basados en la transferencia de un electrón (TEAC- Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox; FRAP- poder reductor; efecto bloqueador de radicales libres de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)), conforme el tipo de reacción en causa (Huang et al 2005).

De los ensayos arriba mencionados, destaca el método del efecto bloqueador de radicales libres do DPPH•. Este método es utilizado muy frecuentemente para determinar la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos en distintos extractos de tés (Kulisic et al 2006; Yen & Chen 1995), en plantas medicinales (Katalinic et al 2006; Kulisic et al 2006; Serteser et al 2008; Yen & Chen 1995) como *Pterodon enarginatus* (Dutra et al 2008), *Rumex crispus* (Yildirim et al 2001) y *Melissa officinalis*, *Paronychia argentea*, *Sanguisorba minor*, *Hypericum undulatum*, *Malva silvestris* (Ferreira et al 2006), pero también en vegetales como la batata (Kanatt et al 2005), en especias como *Capsicum frutescenes* (Wang et al 2007), *Laurus nobilis* y *Mentha suaveolens* (Ferreira et al 2006) y en frutas como la *Dillenia indica* (Abdille et al 2005) y frambuesas (Liu et al 2002). La elección frecuente de este test se comprende por su rapidez y por su facilidad de ejecución, así como por el bajo gasto de reactivos, el hecho de no exigir equipamiento sofisticado y porque se trata de un test dotado de buena precisión (Huang et al 2005; Koleva et al 2002).

En este ensayo, el donador de hidrogeno es el elemento antioxidante. El radical DPPH•, un radical orgánico de nitrogeno estable comercializado acepta el hidrogeno de la substancia antioxidante, como se muestra en la Figura 24 (Huang et al 2005; MacDonald-Wicks 2006).

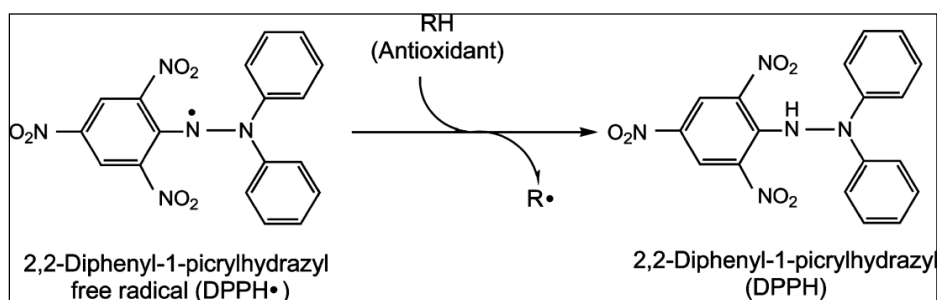


Figura 24- Reacción del radical DPPH• con un compuesto antioxidante, formando DPPH (adaptado (Joon-Kwan Moon 2009)

El efecto antioxidante es proporcional a la eliminación del radical DPPH• de la muestra y, en consecuencia, a la formación del DPPH por aceptación de un hidrogeno proveniente del compuesto antioxidante. Esta reacción se acompaña del

debilitamiento del color de la solución que pasa de morado (solución DPPH•), a amarillo (Kaur & Geetha 2006). Este hecho se traduce en una disminución de la absorbancia de la solución, medida a 517nm (Huang et al 2005; Joon-Kwan Moon 2009). El porcentaje de DPPH• que queda es proporcional a la concentración antioxidante y el resultado se expresa muchas veces en valor de EC₅₀, que representa la concentración capaz de provocar la disminución de la concentración inicial de DPPH• en 50% (Brand-Williams 1995).

1.7- INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE PRODUCTOS NUTRACÉUTICOS

Desde hace millares de años los extractos y preparaciones de plantas son la base de la medicina tradicional y el punto de partida para descubrir nuevos agentes terapéuticos. En verdad, a pesar del progreso de la química de síntesis en esta área en la última parte del siglo XX, el porcentaje de productos farmacéuticos derivados de plantas en el mercado viene aumentando en los últimos años. De esta forma, casi 50% de las pequeñas moléculas introducidas como fármacos en los últimos veinte años son de origen vegetal (Fowler 2006).

Por otra parte, evidencias recientes sugieren que el desarrollo de estrategias preventivas para resistir a la enfermedad podrá ser una forma más eficiente y eficaz como estrategia de salud a largo plazo. Así, la investigación nutricional tiene un papel crucial, especialmente por advertir de la importancia de los alimentos funcionales. Una de las principales tendencias en la producción de este tipo de alimentos es la inclusión de ingredientes naturales en los alimentos tradicionales, provenientes por ejemplo de plantas. Todavía, más recientemente, la comercialización de constituyentes bioactivos de alimentos en forma de productos farmacéuticos (nutracéuticos) ha sufrido un enorme incremento.

En este sentido, varias industrias, como las relacionadas con la producción de productos farmacéuticos, cosméticos y aditivos alimenticios viene haciendo esfuerzos para preparar productos naturales por procesos de extracción y purificación para incluir compuestos como antocianinas, proantocianidinas, flavanonas, isoflavonas en distintas formulaciones como principios activos (Espin et al 2007). Además, el interés específico en productos naturales derivados de plantas condujo a un aumento exponencial en la investigación de muchas de las plantas tradicionales medicinales, ya que estas son potenciales candidatas al descubrimiento de nuevos productos terapéuticos y/o suplementos de salud. Pero, dada la enorme heterogeneidad de las plantas y sus componentes, tendrá que obtenerse mucho más información. Por otra parte, factores como biodisponibilidad y metabolismo deben ser evaluados, y sea objeto de muchos más estudios, en el sentido de establecer una relación segura entre

el producto nutracéutico y el efecto beneficioso para la salud que se pretende obtener como se sugiere en la Figura 25.

La agencia *Food and Drug Administration* reglamenta la producción de productos nutracéuticos, pero en la Europa no existe ninguna entidad que lo practique, ni existe tampoco legislación específica.

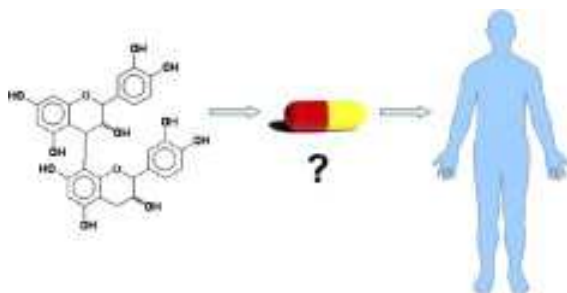


Figura 25- Uso de productos nutracéuticos (Adaptado de: (Espin et al 2007))

Los polifenoles son un grupo de fitoquímicos asociados a efectos beneficiosos. Se conocen más de 8000 estructuras químicas diferentes, siendo los flavonóides la clase principal (aproximadamente 4000 compuestos). Este grupo de compuestos posee actividad biológica y farmacológica, incluyendo la antioxidante, anti-inflamatoria, antimicrobiana, antitumoral y antiviral (Ross & Kasum 2002; Tapas et al 2008).

Los polifenoles son consumidos diariamente en la dieta por ejemplo gracias a la ingesta de frutas, vegetales, cereales y café. Se estima que su consumo en la dieta aporte al organismo entre 100 y 1000 mg al día. Un estudio realizado en adultos finlandeses concluye que estos ingerían 863 mg de polifenoles al día, de los cuales 75% eran ácidos fenólicos, 14% proantocianidinas y 10% antocianidinas y otros flavonóides (Petti & Scully 2009). La absorción, distribución y metabolización de los flavonóides es aun poco conocida. Se sabe que los flavonóides glicosilados, en la forma de ésteres o polímeros se convierten en sus respectivas agliconas por la microflora del colon, y solo posteriormente son absorbidos por difusión pasiva (Espin et al 2007; Yao et al 2004). La biodisponibilidad de los flavonóides es baja, apenas un pequeño porcentaje es absorbido, una vez que la mayor parte se queda detenida en el tracto gastrointestinal. Después de absorbidos, los flavonóides se conjugan en el hígado por glucoronidación o metilación, o son metabolizados a pequeños compuestos fenólicos (Yao et al 2004).

Objetivo

2. OBJETIVO

La creciente investigación en torno de las sustancias bioactivas está asociada con el incremento en la disponibilidad de productos naturales derivados de plantas, usados desde hace largos años con fines medicinales. Estas sustancias son en muchos casos potenciales productos terapéuticos o suplementos de salud. Sin embargo, dada la enorme heterogeneidad existente entre las plantas y en sus componentes, es preciso profundizar en este campo. No obstante, de entre la inmensa variedad de fitoterápicos se destacan los compuestos fenólicos dotados de propiedades antioxidantes, entre otras.

El objetivo general de este Trabajo de Grado es realizar la cuantificación y caracterización estructural de los compuestos fenólicos presentes en las plantas medicinales *Cytisus multiflorus* y *Thymus citriodorus*, con miras a contribuir al conocimiento fundamentado necesario para el uso racional y el desarrollo de nuevas aplicaciones de estas plantas.

Los objetivos específicos que se plantearon para este Trabajo de Grado fueron los siguientes:

- 1) Extracción, aislamiento, identificación y determinación de la estructura detallada de los compuestos fenólicos presentes en las especies *Cytisus multiflorus* y *Thymus citriodorus*;
- 2) Determinación del contenido en compuestos fenólicos totales, en flavonas/flavonoles y en flavanonas/dihidroflavonoles de los extractos;
- 3) Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de las plantas *Cytisus multiflorus* y *Thymus citriodorus* mediado por el efecto bloqueador de los radicales libres de DPPH.

Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1- REACTIVOS

El reactivo de Folin-Ciocalteu, el Na_2CO_3 , el ácido sulfúrico 96%, ácido fórmico, el ácido ascórbico, el metanol P.A. y el etanol fueron adquiridos a Panreac (Barcelona, España). El n-hexano y el hidróxido de potasio a la empresa Pronalab (Lisboa, Portugal). La naringenina y el cloruro de aluminio a Acros Organic (Bélgica). La quercetina a Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA). El 3,4-Dinitrophenil hidracina (DNP) 50% fue adquirido a Merck (Darmstadt, Alemania). El 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) fue comprado a Fluka (Sigma). El reactivo metanol y acetonitrilo de pureza HPLC se obtuvieron de Lab-Scan (Lisbon, Portugal).

3.2- EQUIPAMIENTO

Para las pesadas se utilizó una balanza analítica Kern ABS® (Alemania).

Para la purificación del agua se utilizó un sistema de purificación de Mili-Q (TGI Pure Water Systems, USA).

La incubación de los tubos se realizó en un baño de agua Julaba Shake Temp SW22 (Alemania).

Para extracción de las muestras se utilizó un agitador adquirido a Velp Scientifica®, (Italia).

Para concentrar las muestras por evaporación se uso un evaporador rotativo de marca B.U.CHI® (Suiza).

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Analytik Jena UV/VIS-Spectrometer Specord 200® (Alemania).

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en centrífuga refrigerada K2R Series, Centurion® (West Sussex, UK).

El HPLC utilizado se encontraba equipado con un módulo de separación Knauer Smartline®, con un auto inyector Knauer Smartline 3800®, con un sistema de refrigeración y con un detector UV Knauer 2500®. La obtención de datos se efectuó a través de un software ClarityChrom® (Knauer, Berlin, Germany). La columna Nucleosil C18, 250mm x 4mm, 5 µm de diámetro (Macherey-Nagel) (Germany).

El análisis de masas se llevó a cabo en un espectrómetro de masas Linear Ion Trap LXQ® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). Los datos se obtuvieron a través del sistema Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA).

3.3- DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las plantas secas de Retama blanca (*Cytisus Multiflorus*) y Tomillo limón (*Thymus Citriodoro*) han sido adquiridas a empresa ERVITAL (Mezio, Castro de Aire, Portugal). Estas plantas fueron cultivadas solamente con productos orgánicos, evitando cualquier tipo de sustancias químicas de síntesis.

3.4- EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Las plantas (5g) fueron trituradas y extraídas tres veces con 150 mL de *n*-hexano, en agitación durante 30 minutos y a temperatura ambiente, para eliminar los lípidos. El residuo delipidado fue extraído 2 o 5 veces (para a Retama blanca o para el Tomillo limón, respectivamente) con 150 mL de una solución de etanol/agua 80% (v/v) a temperatura ambiente durante 1 h o 30 min (para a Retama blanca o para el Tomillo limón, respectivamente). Las soluciones extraídas fueron filtradas a través de un filtro de placa sinterizada G3, más tarde fueron combinadas, concentradas por evaporación a presión reducida a 37°C y posteriormente congeladas a -20°C y liofilizadas. Para cada planta, el proceso de extracción se efectuó por duplicado.

3.5- MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Se utilizaron diferentes métodos espectrofotométricos en este trabajo para cuantificación de compuestos fenólicos totales, flavonas, flavonoles, flavanonas y dihidroflavonoles, tal como se describe a continuación

3.5-1. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

La concentración total de compuestos fenólicos de los extractos fue determinada por un procedimiento experimental adaptado do método de Folin-Ciocalteu (Guyot et al 1998). Para la cuantificación, se prepararon suspensiones/soluciones acuosas de los extractos no purificados (0,4 mg/mL). Las suspensiones/soluciones fueron homogeneizadas con la ayuda de un baño de ultrasonidos y a continuación se añadieron 250 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu a 0,5 mL de la suspensión/solución. Después de la homogeneización y tras un período de reacción de 3 min, se añadió 1 mL de Na_2CO_3 (200 g/L) y 3,25 mL de agua ultrapura, originando un volumen total de 5 mL. Se homogeneizaba la mezcla y se incubaba a 70°C durante 10 min, con agitación, permaneciendo después a temperatura ambiente durante 30 min. La incubación a elevada temperatura originó soluciones limpias en todas las muestras. A continuación se registró la absorbancia de las soluciones a una longitud de onda de 700 nm, en espectrofotómetro UV/Vis. La cuantificación se efectuó por correlación de las absorbancias con la recta de calibración del patrón de ácido gálico (5 - 37,5 μ g) y los resultados se expresaron en miligramos de ácido gálico por gramo de extracto seco.

3.5-2. DETERMINACIÓN DE FLAVONAS Y DE FLAVONOLES

La cantidad de flavonas y flavonoles en los extractos fue evaluada colorimétricamente de acuerdo con el método descrito por Popova et al.(Popova et al 2004), usando como compuesto patrón la quercetina. Así, a 2ml de solución 0,5mg/ml de extracto (reconstituido en metanol/ ácido acético 5% (v/v)) se le añadieron 0,2ml de cloruro de aluminio 2% (m/v) y 2,8ml de metanol. Pasados 30 min, se leyó la absorbancia a 415nm según el procedimiento descrito por (Bonvehi & Coll 1994) (Bonvehi & Coll 1994) en

espectrofotómetro de UV-Vis, usando como blanco una solución de metanol/ácido acético 5% (v/v).

La cuantificación fue efectuada por correlación de las absorbancias con la recta de calibración del patrón de quercetina (5 - 75 µg/mL) y los resultados expresados en mg de quercetina por g de extracto seco.

3.5-3. DETERMINACIÓN DE FLAVANONAS Y DE DIHIDROFLAVONOLES

La cantidad de flavanonas y dihidroflavonoles en los extractos fue estimada colorimétricamente según el método descrito por Popova et al (Popova et al 2004), con algunas adaptaciones.

Se añadieron 0,5ml de solución de extracto (1mg/ml) y 1ml de solución de 3,4-dinitrofenil hidracina (DNP)- (0,5 g de DNP en 1ml de ácido sulfúrico 96% y posterior dilución hasta 50 mL con metanol), la mezcla fue incubada en baño de agua a 50°C con agitación a 100 rpm, durante 50 min. Se dejó enfriar, y se añadieron 2,5ml de hidróxido de potasio 10% (m/v) a la mezcla. A una alícuota de 500 µl de la solución resultante se le añadieron 2,5ml de metanol, la mezcla fue centrifugada a 3937,5 x g durante 10 min y la absorbancia se leyó a 495 nm, según se especifica en el método de Nagy & Grancai (Nagy & Grancai 1996).

La cuantificación se efectuó por correlación de las absorbancias con la recta de calibración del patrón de naringenina (37,5 - 450 µg/mL) y los resultados expresados en mg de naringenina por g de extracto seco.

3.5-4. EFECTO ANTIOXIDANTE- DETERMINACIÓN DEL EFECTO BLOQUEADOR DE RADICALES DPPH• (2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRACILO)

La actividad antioxidante de los extractos fenólicos fue evaluada por el porcentaje de inhibición de la formación de radicales DPPH• (2,2-Difenil-1-picril-hidracilo), según el procedimiento descrito por Ferreira y por Kirby y Schmidt (Ferreira et al 2006; Kirby & Schmidt 1997).

Se prepararon soluciones metanólicas de los extractos de Retama blanca y de Tomillo limón con distintas concentraciones (0,05; 0,1; 0,25; 0,5 y 0,8 mg/mL de la Retama blanca y 0,05; 0,1; 0,25; 0,4 y 0,5 mg/mL para el Tomillo limón). A 0,1 mL de cada una de estas soluciones se adicionaron 1,7 ml de una solución metanólica 6×10^{-5} M de DPPH. Se agitó vigorosamente y se dejó en reposo en ambiente oscuro durante 30 min, efectuándose después la lectura de la absorbancia a 517nm. Para cada muestra de extracto se calculó el porcentaje de DPPH presente después de la reacción con los compuestos antioxidantes de los extractos, usando la fórmula que ha sido propuesta por Yen y Duh (Yen & Duh 1994):

$$\% \text{inhibición DPPH} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)}) / A_{C(0)}] * 100$$

En la cual $A_{C(0)}$ es la absorbancia del control cuando $t=0$ min y $A_{A(t)}$ corresponde a la absorbancia del antioxidante (en este caso los extractos de las muestras) cuando $t=30$ min.

Se calculó también la concentración de extracto responsable de la disminución del 50% de la absorbancia del DPPH (EC_{50}) calculado a partir de la ecuación del gráfico de porcentaje de inhibición de los extractos a diferentes concentraciones de los mismos.

A partir del valor de EC_{50} , se calculó el “Poder Antiradicalar” (ARP) en %, según la fórmula:

$$ARP = 1 / EC_{50}$$

El compuesto de referencia usado fue el ácido ascórbico a concentraciones de 0,0011, 0,0014, 0,0019, 0,0022, 0,0028, 0,0037 y 0,0044 mg/ml para la construcción de la recta patrón.

3.6- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

El perfil en compuestos fenólicos de los extractos etanólicos de la Retama blanca y del Tomillo limón fue analizado por HPLC en fase reversa.

El sistema de HPLC consistía en un módulo de separación “Knauer Smartline” equipado con un auto-inyector, un sistema de enfriamiento y un detector UV. La columna utilizada era una Nucleosil 100-5 C18 de 250 mm de largo y 4,6 mm de diámetro interno (250 mm× 4 mm id) y 5µm de tamaño de partículas (Macherey-Nagel). La adquisición de datos y el control remoto del sistema de HPLC se efectuó por un software ClarityChrom® (Knauer, Berlin, Alemania).

Para el análisis por HPLC, las muestras liofilizadas de extractos etanólicos de cada una de las plantas (100mg) se disolvieron en 10ml de metanol y se filtraron a través de filtro de Nylon de membrana de 0,2 µm (Whatman®) a un vial Teflon de 0,45 µm (Millipore, MA). Su análisis se realizó por la inyección de 10 µL en el sistema de HPLC, cuyo auto-inyector y columna se mantuvieron a 4 °C y 30°C, respectivamente. La fase móvil estaba constituida por (A) 0,1 % de ácido fórmico en agua y (B) 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo, previamente degasificados y filtrados. La separación de los compuestos fue efectuada con un flujo de 1 mL/min, utilizando el siguiente gradiente: 90% A y 10% B al inicio, 60% A y 40% B a los 30 min, 95% A y 5% B a los 40 min seguido del restablecimiento de las condiciones iniciales a los 50 min. El perfil cromatográfico fue originado mediante lecturas a 280 nm.

Según el perfil cromatográfico obtenido, las fracciones originadas en el análisis por HPLC fueron recolectadas manualmente tras su elución a la salida del detector, para posterior análisis por espectrometría de masas (sección 3.7). Este procedimiento permitió recoger 14 y 9 fracciones (relativas a los extractos de Retama blanca y de Tomillo limón, respectivamente), que fueron concentradas en un liofilizador sin alcanzar la sequedad.

3.7- CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS:

ESPECTROMETRÍA DE MASAS - ESI

La identificación de los compuestos fenólicos en los extractos de Retama blanca y de Tomillo limón fue efectuada recurriendo al análisis por Espectrometría de Masas por ESI- MS y ESI- MSn en modo negativo y positivo, con un aparato LXQ Linear Ion. Para ello a 10µl de cada fracción (recolectada a la salida del aparato de HPLC y posteriormente concentrada) se le añadieron 100 µl de solución de metanol/H₂O 50% (v/v) y la solución resultante fue inyectada directamente en la fuente de ESI por medio de una bomba de jeringa, con un flujo de 8 µL min⁻¹.

En el modo negativo se utilizaron las condiciones siguientes: N₂ 30 psi, voltaje de spray 4.7 kV, temperatura del capilar 350°C, voltaje del capilar -37.0 V y tensión del tubo capilar - 81.89 V. La energía de colisión usada en las experiencias de MSⁿ estaba entre los valores de 10 y 40 (unidades arbitrarias). Alternativamente, en el modo positivo se usaron las condiciones: N₂ 30 psi, voltaje de spray 5kV, temperatura del capilar 350°C, voltaje del capilar 24.48V y tensión del tubo capilar 114.3 V. La energía de colisión que se usó estaba entre los valores 15 y 35 (unidades arbitrarias). Los datos fueron adquiridos a través do programa Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA).

Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1- EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los rendimientos en masas y en compuestos fenólicos obtenidos en el proceso de extracción con solución de etanol/agua 80% (v/v) se presentan en la Tabla 1. Como se puede observar, el rendimiento del extracto de Retama blanca fue superior al obtenido para el Tomillo limón (22,96% y 17,14% respectivamente). La concentración en compuestos fenólicos fue semejante ($140,39 \pm 11,67$ y $138,75 \pm 13,56$ mg GAE/g de extracto para la Retama blanca y para el Tomillo limón, respectivamente). Estos últimos valores corresponden a $32,23$ y $23,78$ mg GAE/g, respectivamente, calculados respecto en la masa de planta seca.

Tabla 1 – Rendimiento en masa y en compuestos fenólicos totales obtenidos en los procesos de extracción

Fracción	Masa ^a (%)	Fenoles totales ^b (mg/g extracto)	Fenoles totales ^b (mg/g planta seca)
RETAMA BLANCA	22,96%	$140,39 \pm 11,67$	$32,23 \pm 2,68$
TOMILLO LIMÓN	17,14%	$138,75 \pm 13,56$	$23,78 \pm 2,32$

^aValores medios de dos extracciones y expresados respecto a la masa de muestra seca; ^bValores expresados como equivalentes de ácido gálico (GAE), determinados por el ensayo de Folin-Ciocalteu y resultantes de tres ensayos distintos efectuados por duplicado.

Comparando los resultados de este trabajo con los resultados de recuperación de masa obtenidos en extractos de diversas plantas frescas en maceración durante 7 días en metanol (Huda-Faujan et al 2009) *Cosmos caudatus* 1,13%, *Centella asiática* 0,71%, *Murraya koenigii* 1,65%, *Polygonum minus* 0,80%, *Oenathe javanica* 0,66% se puede decir que, a través de la técnica de extracción utilizada en este estudio, se consiguen obtener cantidades mucho más considerables que las indicadas por otros autores.

Respecto a los rendimientos en compuestos fenólicos, hay hasta ahora publicados algunos valores en la literatura, tanto para las especies *Cytisus multiflorus* y *Thymus citriodorus*, como también para otras especies del mismo género, permitiendo así una comparación más estrecha con los valores obtenidos en el presente estudio.

Más específicamente, la concentración de compuestos fenólicos totales en un extracto de Retama blanca obtenido por infusión de la planta entera triturada fue de $0,117 \pm 0,020$ g GAE/L (correspondiente a 12,9 mg GAE/g de plantas secas) (Gião et al 2007), un valor inferior al obtenido en este trabajo. Es posible que esta diferencia sea debida a las variaciones en el método de extracción, más específicamente, en este estudio se hizo una extracción en frío con una solución hidroetanólica, mientras que los autores referidos efectuaron una infusión durante 5 min. De esta forma, nuestros resultados sugieren que la extracción sucesiva con solución de etanol es más eficiente do que la extracción por infusión.

La media de la concentración de compuestos fenólicos en los extractos de *Cytisus multiflorus* (Tabla 1) fue también superior a la encontrada en extractos de una especie más estudiada, la *Cytisus scoparius*. Más específicamente, para la especie referida se encuentran descritos valores de $8,54 \pm 0,16\%$ (m/m) (Nirmal et al 2008), $58,9 \mu\text{g PE}$ (equivalentes pirocatecol)/mg (Raja et al 2006), y de 69,1, 59,5, 59,8 g TAE (equivalentes de ácido tánico)/Kg, en tres meses de cosecha distintos (Ammar et al 2004).

Por otro lado, también se encuentran descritos en la literatura los valores de la concentración de algunos extractos de plantas de la familia de la *Cytisus multiflorus* (*Fabaceae/Leguminosae*) se encuentran también descritos en la literatura. Así, Gião et al. (2007) apuntaron un valor de $0,308 \pm 0,004$ g GAE/L (que corresponde a 33,9 mg GAE/g de plantas secas) para la cantidad de compuestos fenólicos totales en un extracto obtenido por infusión de la planta *Chamaespartium tridentatum*. También, un estudio realizado en nueve extractos de plantas de la familia de las *Fabaceae* determinó los siguientes valores de compuestos fenólicos totales: *Lathyrus binatus* $180,88 \pm 5,61$ mg GAE/g, *Onobrychis scardica* $115,23 \pm 4,18$ mg GAE/g, *Anthyllis áurea*

108,96±3,14, *Trifolium pannonicum* L. 106,81±2,38, *Oxytropis campestris* L. 79,52±5,29, *Anthyllis vulneraria* L. 79,34±2,86, *Oxytropis halleri* 78,84±3,19, *Astragalus glycyphyllos* L. 44,6±2,13, *Coronilla emerus* L. 38±1,06, (Godevac et al 2008). De una forma general, se puede concluir que, el extracto obtenido de la planta *Cytisus multiflorus* es más rico en compuestos fenólicos totales que la generalidad de las plantas estudiadas dentro del mismo género y familia.

Con relación a la especie *Thymus citriodorus*, la concentración media de compuestos fenólicos extraída en el presente estudio es de la misma magnitud que los valores descritos por Gião et al. (2007) para un extracto obtenido por infusión de la planta pulverizada (0,254 mg GAE/L el 27,9 mg GAE/g planta seca). El mismo estudio encontró una concentración de compuestos fenólicos totales de 0,287±0,026 mg GAE/ml (31,6 mg GAE/g planta seca) para el Tomillo-eucalipto (*Thymus mastichina*) y de 0,511±0,064 mg GAE/ml (56,2 mg GAE/g planta seca) para el Tomillo (*Thymus vulgaris*). El valor de 0,876 mg CE/ml (0,18mg CE/g planta seca) fue descrito para un extracto obtenido por infusión de la especie *Thymi herba* (Katalinic et al 2006). También, otro estudio efectuado en un extracto de *Thymus vulgaris* reveló una concentración de 17,1± 0,2 mg GAE/g (Marja & Anu 1999) y se describió el valor de 1,51±0,01mg CE/L (0,15mg CE/g planta seca) para un extracto de la misma especie (Bueyuekbalci & El 2008).

Dados los resultados de estos estudios, se puede considerar que la extracción a frío con una solución hidroetanólica, precedida de pulverización, es bastante eficiente en el caso de la extracción de la planta Tomillo limón.

Un estudio con extractos de plantas de la familia de las *Lamiaceae* indica que *Leonurus cardiaca* posee 200±66mg GAE/g extracto, *Lamium álbum* 192±20mg GAE/g, *Galeopsis speciosa* 184±16mg GAE/g, *Lamium purpureum* 180±14mg GAE/g *Marrubium vulgare* 140±36mg GAE/g, *Stachys officinalis* 132±10mg GAE/g. Se puede verificar que la mayor parte de los extractos estudiados presentaron resultados superiores en cantidad de compuestos fenólicos totales cuando se compararon con el extracto de Tomillo limón (138,75±13,56mg GAE/g de extracto de la planta). Este hecho puede explicarse por el método de preparación de los extractos utilizado por los investigadores que consistió en infusión o decocción (Matkowski & Piotrowska 2006).

En el estudio de Gião 2007, realizado con plantas de la familia *Lamiaceae* se obtuvieron los siguientes resultados: *Rosmarinus Officinalis* $0,358 \pm 0,006$ g/L GAE (que corresponde a 39,38 mg GAE/g de planta seca), *Mentha spicata* $0,308 \pm 0,109$ (33,88 mg GAE/g de planta seca), *Satureja Montana* $0,260 \pm 0,067$ (28,60 mg GAE/g de planta seca), *Salvia sp.* $0,432 \pm 0,005$ (47,52 mg GAE/g de planta seca) y *Lavandula stoechas* $0,144 \pm 0,003$ (15,84 mg GAE/g de planta seca).

De una forma general, los resultados del presente estudio permiten concluir que aunque el extracto obtenido de la planta *Thymus citriodorus* sea menos rico en compuestos fenólicos totales que la generalidad de las plantas estudiadas de la misma familia, presenta una concentración en compuestos fenólicos totales comparable con plantas del mismo género.

En conclusión el método de extracción utilizado en el presente estudio (pulverización de las plantas seguido de agitación en solución hidroetanólica) es eficaz en lo que respecta al rendimiento en masas y rendimiento en compuestos fenólicos totales.

La concentración en flavonas/flavonoles y en flavanonas/dihidroflavonoles en los extractos etanólicos de Retama blanca y Tomillo limón, determinada colorimétricamente según el método descrito por Popova et al, (2004) se representada en la Tabla 2.

Tabla 2- Concentración de Flavonas/Flavonoles y Flavanonas/Dihidroflavonoles en extractos de Retama blanca y Tomillo limón

Fracción	^{a c} Flavonas/ Flavonoles (mg/g extracto)	^{a c} Flavonas/ Flavonoles (mg/g planta seca)	^{b c} Flavanonas/ Dihidroflavonoles (mg/g extracto)	^{b c} Flavanonas/ Dihidroflavonoles (mg/g planta seca)
RETAMA BLANCA	47,43±1,31	10,89±0,30	11,52±5,48	2,64±1,26
TOMILLO	27,30±2,15	4,68±0,37	18,05±6,33	3,09±1,08

^aValores expresados como mg de quercetina (equivalentes de quercetina según el ensayo de Popova) por g de extracto

^bValores expresados como mg de naringenina (equivalentes de naringenina según el ensayo de Popova) por g de extracto

^cValores resultantes de tres ensayos distintos efectuados por duplicado.

La concentración de flavonas y flavonoles determinada se mostró más elevada para la Retama blanca que para el Tomillo limón (47,43±1,31 mg/g y 27,30±2,15, para a Retama blanca y Tomillo limón, respectivamente). Según nuestro conocimiento, no se encuentran descritos en la literatura los valores relativos a la concentración de flavonas/flavonoles de la planta Retama blanca, o de especies dentro del mismo género. Únicamente, un estudio efectuado con macerado de semillas de *Pterodon enarginatus* (*Leguminosae*) en una mezcla de etanol/ H₂O 70% (v/v) (Dutra et al 2008) reveló un contenido de flavonas/flavonoles de 123,00 ± 1,73 mg/g, un valor bastante superior al encontrado para la Retama blanca en el presente estudio.

Con relación al Tomillo limón, tampoco se encuentran en la bibliografía valores relativos a su contenido en flavonas y flavonoles.

La concentración de flavanonas y dihidroflavonoles estimada en los extractos etanólicos de Retama blanca y de Tomillo limón fue de $11,52 \pm 5,48 \text{ mg/g}$ y de $18,05 \pm 6,33 \text{ mg/g}$, respectivamente. Por la escasez de bibliografía relativa a valores para estos parámetros en nuestras plantas, no se pueden realizar análisis comparativos.

4.2- DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE- EFECTO BLOQUEADOR DE RADICALES DPPH• (2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRACILO)

La capacidad antioxidante de los extractos de Retama blanca y Tomillo limón, evaluada por el efecto bloqueador de radicales de DPPH• se representa en la Tabla 3.

Tabla 3- Efecto antioxidante determinado por el efecto bloqueador de radicales DPPH•

Fracción	DPPH (EC ₅₀) ^{a b} (µg/ml)	ARP ^{a c} (%)
RETAMA BLANCA	29,70±2,37	33,84±2,58
TOMILLO LIMÓN	17,71±2,65	57,36±7,65

^a Valores resultantes de tres ensayos distintos efectuados por duplicado

^b EC₅₀- Concentración de extracto que promueve la disminución de la absorbancia del DPPH para 50%

^c ARP- Poder antiradicalar

El ensayo relativo al efecto antioxidante de los extractos reveló que el extracto de Tomillo limón posee mayor capacidad antioxidante que el de Retama blanca, con valores medios de EC₅₀ de 17,71±2,65 µg/ml y de 29,70±2,37 µg/ml, respectivamente (valores de ARP de 57,36±2,65%, y 33,84±2,58% respectivamente).

Que se sepa, los valores de la capacidad antioxidante (medida por el efecto bloqueador de radicales de DPPH•) en extractos de estas dos plantas no se encuentran descritos en la bibliografía mientras que existen algunos estudios relativos a plantas del mismo género y/o familia, como se menciona a continuación.

En lo que respecta a la capacidad antioxidante del extracto de Retama blanca, el estudio de Gião et al. (2007) determina un valor de EC₅₀ de 92 µg/ml por el test ABTS•+ (2,2-azinobis(3-ethylbenzothizoline- 6-sulfonic acid) diammonium salt radical cation). En relación a otras especies del mismo género de la Retama blanca, Raja et al

(2006) describieron un valor de EC_{50} de 1,5 $\mu\text{g/ml}$ para un extracto de *Cytisus scoparius*, que es considerablemente inferior al hallado en el presente trabajo para la especie *Cytisus multiflorus*.

Por otra parte, estudios efectuados en extractos obtenidos de plantas de la misma familia de la Retama blanca mostraron que su capacidad antioxidante es considerable respecto a las restantes plantas estudiadas. Más concretamente, Rauter et al (2009) describieron un valor de EC_{50} de 139 $\mu\text{g/ml}$ para un extracto de *Genista tenera*. También se encontraron valores de EC_{50} más elevados para las especies *Astragalus glycyphyllos L.*, *Coronilla emerus L.*, *Oxytropis halleri*, *Anthyllis vulneraria L.*, *Onobrychis scardica*, *Anthyllis áurea* (156,98 \pm 23,08 $\mu\text{g/ml}$, 145,31 \pm 25,61 $\mu\text{g/ml}$, 88,69 \pm 5,64 $\mu\text{g/ml}$, 69,88 \pm 3,69 $\mu\text{g/ml}$, 66,45 \pm 3,49 $\mu\text{g/ml}$, 52,31 \pm 2,13 $\mu\text{g/ml}$ y 37,68 \pm 1,16 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). Asimismo, los extractos de las especies *Lathyrus binatus*, *Trifolium pannonicum L.* y *Peltophorum africanum* manifestaron mayor poder antioxidante do que el extracto de *Cytisus multiflorus*, con valores de EC_{50} estimados en 19,62 \pm 1,65 $\mu\text{g/ml}$, 13,19 \pm 0,90 $\mu\text{g/ml}$ (Godevac et al 2008) y 6,54 \pm 0,49 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Bizimenyera et al 2007).

De una forma general, estos resultados permiten sugerir que la Retama blanca presenta mayor capacidad reductora que otras especies de la misma familia.

En relación con la capacidad antioxidante del extracto de *Thymus citriodorus* Gião et al (2007) determinaron, por el método ABTS•+, el valor de EC_{50} de 265 $\mu\text{g/ml}$, considerablemente superior al obtenido en este estudio.

En lo que respecta a especies del género *Thymus*, en lo cual se incluye la especie *Thymus citriodorus*, el mismo estudio de Gião et al (2007) concluye que la especie *Thymus vulgaris* se encuentra, en un total de 48 extractos estudiados, entre los 7 extractos con mayor capacidad antioxidante (evaluado por el método ABTS•+) y mayor contenido en compuestos fenólicos totales.

Otro estudio determina valores de EC_{50} de extractos fenólicos preparados por infusión de *Thymus vulgaris* y de *Thymus serpyllum*, evaluados por el efecto bloqueador de radicales de DPPH•, de 300 $\mu\text{g/mL}$ y 450 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Kulisic et al 2006). Alternativamente, los valores de EC_{50} de extractos metanólicos de *Thymus praecox* y

Thymus vulgaris eran considerablemente más bajos ($209,24 \pm 8,34$ $\mu\text{g/ml}$ y $56,05 \pm 5,92$ $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) (Lopez et al 2007), pero aún bastante más elevados do que el encontrado en este estudio para el *Thymus citriodorus*.

En comparación con algunas plantas de la misma familia, los estudios efectuados parecen indicar que el Tomillo limón no es de las plantas con más propiedades antioxidantes. Así, Lopez et al (2007) estimaron los valores de EC_{50} de extracto de partes aéreas de la planta *Melissa officinalis* L. en $13,74 \pm 1,43$ $\mu\text{g/ml}$ y el de *Lycopus europaeus* L. en $14,13 \pm 0,98$ $\mu\text{g/ml}$. Además, otros extractos de plantas de la familia *Lamiacea*, incluyendo las especies *Leonurus cardiaca*, *Lamium album*, *Galeopsis speciosa*, *Lamium purpureum*, *Marrubium vulgar* y *Stachys officinalis* indicaron que poseen mayor capacidad antioxidante que el Tomillo limón, presentando valores de EC_{50} de 0,70, 1, 2,85, 3, 1,15 y 1,10 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Matkowski & Piotrowska 2006).

En general, estos resultados permiten sugerir que, aunque presente menor capacidad reductora que otras especies de la misma familia, el Tomillo limón es una de las especies del género *Thymus* con mayor poder reductor.

4.3- CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

4.3-1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Los perfiles cromatográficos de los extractos de las plantas Retama blanca y Tomillo limón se encuentran representados en las Figuras 26 y 27, respectivamente. Los números indicados corresponden a las fracciones que fueron recolectadas para posterior análisis por espectrometría de masas, en la tentativa de identificar los compuestos fenólicos ahí presentes. De una forma general, la separación cromatográfica se puede considerar satisfactoria, en particular en el caso de la Retama blanca, que como era esperado mostró que los perfiles fenólicos de las muestras eran distintos, indicando la presencia de compuestos fenólicos diferentes en las dos plantas.

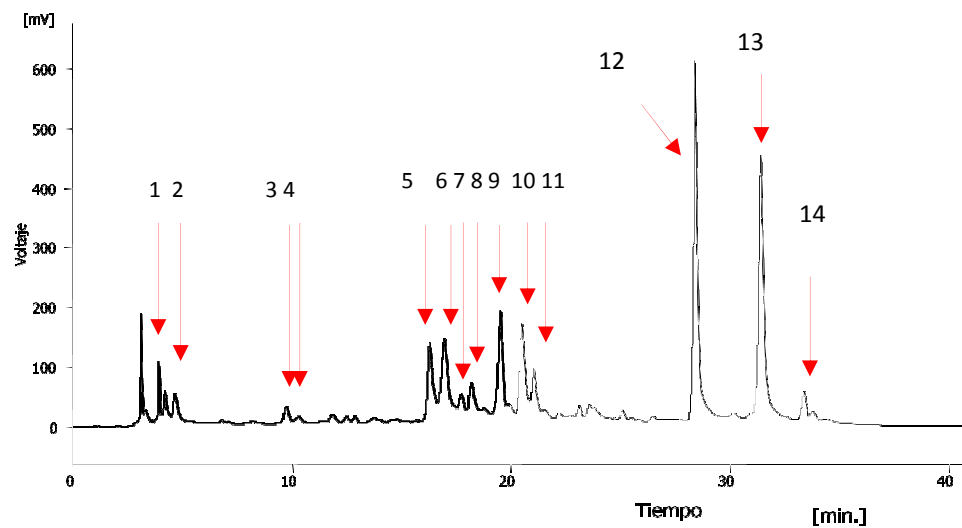


Figura 26 - Perfil cromatográfico a 280 nm del extracto etanólico de la Retama blanca

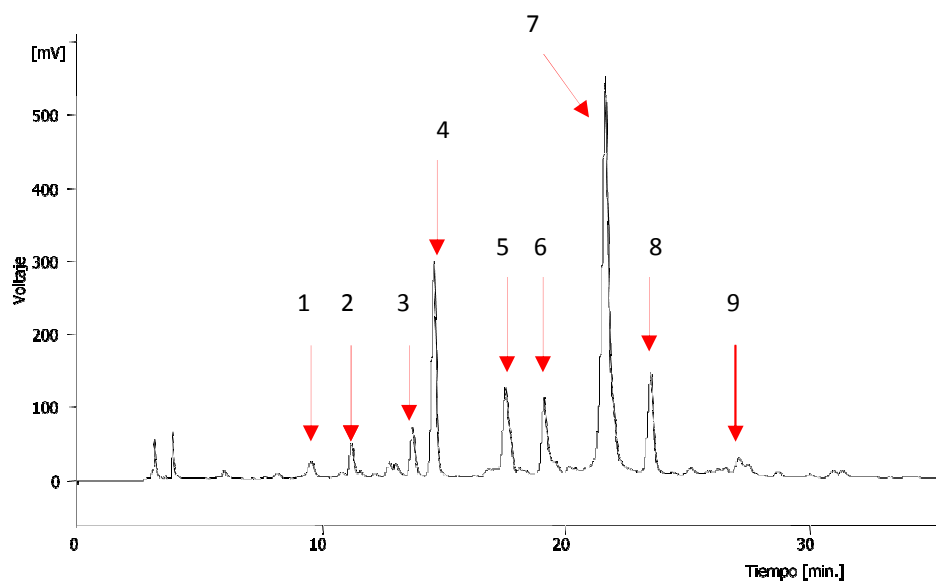


Figura 27 - Perfil cromatográfico a 280 nm del extracto etanólico del Tomillo limón

4.3-2. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS FRACCIONES ELUIDAS EN HPLC

Las fracciones recolectadas por HPLC (números indicados en las Figuras 26 y 27) fueron analizadas por espectrometría de masas por ionización por *electrospray* en modo negativo y positivo. De esta forma, la identificación de la estructura de los compuestos eluidos en las distintas fracciones se basó en la identificación del ión molecular predominante y en la interpretación de su fragmentación típica por disociación inducida por colisión (CID). Las Tablas 4 y 5 resumen los resultados obtenidos para cada una de las fracciones analizadas de los extractos de las especies *Cytisus multiflorus* y *Thymus citriodorus*, respectivamente. Las fracciones notadas con NA en las Tablas no fueron analizadas y los compuestos señalados con NI no fueron identificados. El nombre de los compuestos identificados/propuestos en este estudio se encuentra también descrito en las Tablas. Más adelante, se hace la descripción con detalle de algunos de los compuestos encontrados.

4.3-2.1. CYTISUS MULTIFLORUS

En la Tabla 4 se resumen los resultados obtenidos en el análisis de espectrometría de masas de las fracciones eluidas en HPLC de la especie *Cytisus multiflorus*. Se presenta, después una breve discusión de la estructura de algunos de los compuestos.

Tabla 4- Identificación y principales fragmentos obtenidos por espectrometría de masas (modo positivo y negativo) de las fracciones eluidas por HPLC a partir de fracciones etanólicas de Retama blanca

Nº fracción	RT (min)	Ident ^a	Ion negativo [M-H] ⁻	Fragmentos principales ESI ⁻ MS ⁿ	Ion positivo [M-H] ⁺	Fragmentos principales ESI ⁺ MS ⁿ	Compuesto	Referencias
1	3,95	NA	-	-	-	-	-	-
2	4,67	NA	-	-	-	-	-	-
3	9,77	NA	-	-	-	-	-	-
4	10,32	NA	-	-	-	-	-	-
5	16,29	A, B	579	MS ² [579]: 459(50), 429(100), 357(20), 327(40), 309(5), 285(1)	581	MS ² [581]: 449 (100), 431 (8), 329 (8), 287 (5)	Orientina+Pentosa (Luteolina- 8- C-glucósido+Pentosa)	(Cuyckens & Claeys 2004; Han et al 2008; Regos et al 2009)
6	16,96	A, B	447	MS ² [447]: 357(40), 327(100), 285(10); MS ³ [357]: 339(35), 297(100), 285(90)	449	MS ² [449]: 431(100), 413(20), 383(15), 353(5), 329(10); MS ³ [431]: 413(100), 395 (20), 383 (15), 353 (60), 311(20), 311(<1); MS ⁴ [413]: 395(20), 383(15), 367(60), 339(20), 299(20); MS ⁴ [395]: 367(100), 287(1), 299 (50), 259 (50), 243 (100), 217 (60)	Orientina (Luteoline- 8- C-glucósido)	(Colombo et al 2008; Cuyckens & Claeys 2004; Han et al 2008; Regos et al 2009)
		A, B	579	MS ² [579]: 459(75), 429(100), 357(65), 327(65); MS ³ [459]: 327(100); MS ⁴ [327]: 299(100); MS ⁵ [299]: 299(100), 271(15), 255(50)	-	-	Naringina (Naringenina-7-O-diglucósido)	(Cuyckens et al 2001)

Nº fracción	RT (min)	Ident ^a	Ion negativo [M-H] ⁻	Fragmentos principales ESI ⁻ MS ⁿ	Ion positivo [M-H] ⁺	Fragmentos principales ESI ⁺ MS ⁿ	Compuesto	Referencias
7	17,72	NA	-	-	-	-	-	-
8	18,20	NA	-	-	-	-	-	-
9	19,55	A, B	723	MS ² [723]: 621(15), 579(100), 459(15), 357 (15), 327 (15); MS ³ [579]: 459 (80), 429(90), 357 (70), 327 (100); MS ⁴ [459]: 327(100); MS ⁵ [327]: 299(100)	725	-	Kampferida +CO+pentosa+144Da	(Fabre et al 2001)
		A, B	609	MS ² [609]: 343(7), 301(100) MS ³ [301]: 273(10), 257(10), 179(100), 151(60); MS ⁴ [179]: 151(100); MS ⁵ [151]: 107(100)	633	MS ² [633]: 605(5), 487(30), 331(100); MS ³ [487]: 469(40), 29(30), 409(100), 325(100), 185(30)	Rutina (Quercitina-3-O-rutinósido)	(Cuyckens et al 2001; Han et al 2008; Ola et al 2009)
		A, B	447	MS ² [447]: 285(100); MS ³ [285]: 241(100), 217 (20), 199 (20), 175 (15), 151 (10)	-	-	Luteolina-7-O-glucósido	(Fabre et al 2001; Ola et al 2009)
10	20,51	NI	563	(-46) 517, (-46) 471, (-58) 413	-	-	-	-
11	21,05	NI	707	(-144)563,(-150)413,293,249	-	-	-	-
12	28,44	A, B	461	MS ² [461]: 415(20), 253(100); MS ³ [253]: 209(100);	-	-	Crisina + CO+H ₂ O+ Glc	(Fabre et al 2001; McNab et al 2009)
		A, B	451	MS ² [451]: 253(100); MS ³ [253]: 209(100);	-	-	Crisina + Glc+2H ₂ O	(Fabre et al 2001)
		A, B	325	MS ² [325]: 183(100)	-	-	Metilgalato+142Da	(Hvattum 2002)
13	31,42	A, B	339	MS ² [339]: 183(100)	-	-	Metilgalato+156Da	(Hvattum 2002)
		A, B	-	-	503	MS ² [503]: 417(10), 255(100); MS ³ [417]: 255(100); MS ⁴ [255]: 213(40), 153(100)	Crisina+86+Glc	(Tsimogiannis et al 2007)
14	33,36	NA	-	-	-	-	-	-

RT- tiempo de retención; Ident - Identificación; NA – fracción no analizada; NI- compuesto no identificado

^aLa identificación del compuesto fue efectuada según: A - Resultados de MS consistentes con la literatura; B - Resultados de MS con fragmentación

Fracción 5

El análisis de la fracción 5 permitió identificar un compuesto con ión molecular a m/z 579 (modo negativo) el m/z 581 (modo positivo). También, como se puede observar en la Tabla 4, los iones fragmentados en el modo negativo fueron los de las relaciones m/z de 429, 357, 327 y 285 correspondiendo este último a la luteolina. Alternativamente, en el modo positivo el espectro de MS/MS mostró señales equivalentes, con relaciones m/z de 449, 431, 329 y 287. Las pérdidas que ocurren hasta que se forma el ión molecular de m/z 285 (en el modo negativo) o de m/z 287 (en el modo positivo) sugieren la hipótesis de que la hexosa se encuentra unida a través de un enlace del tipo C. Estos datos experimentales sugieren que el compuesto presente en la fracción 5 deberá ser un derivado de la orientina (luteolina- 8- C-glucósido) (m/z 447 e m/z 449, en modo negativo e positivo, respectivamente) (Cuyckens & Claeys 2004; Han et al 2008; Regos et al 2009).

La pérdida de 132 Da a partir del ión molecular para el ión fragmento de la orientina sugiere la presencia de una pentosa en la molécula, con un enlace del tipo O-glucósido, una vez que la ocurre la pérdida directa de 132 Da (Cuyckens & Claeys 2004; Han et al 2008; Regos et al 2009; Ye et al 2005). De esta forma, se puede sugerir que en esta fracción se encuentre presente la luteolina 7-O-pentosa-8-C-glucósido Figura 28, unida en la posición 7, porque es el enlace tipo O- glucósido el que es más frecuente en las flavonas (Cuyckens & Claeys 2004).

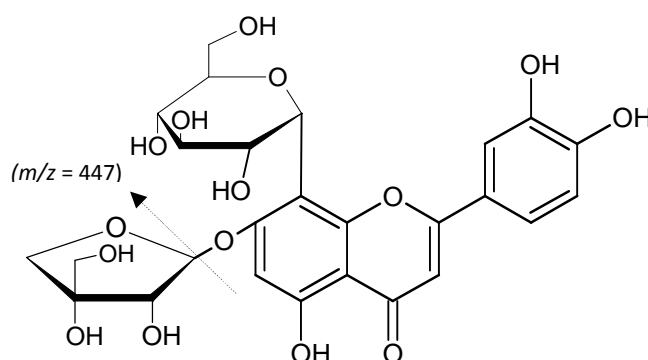


Figura 28- Estructura de luteolina-7-O-pentosa-8 -C-glucósido

Fracción 6 y 9

El espectro de ESI-MS de la fracción 6 en el modo negativo reveló los iones moleculares con m/z 579 e a m/z 447, mientras que el principal ión molecular detectado en el modo positivo fue el ión con m/z 449. Relativamente al espectro de MS/MS del ión molecular de m/z 579, este reveló la presencia de un ión fragmento de pequeña intensidad de m/z 271, que podrá corresponder a la flavanona naringenina. De esta forma, es probable que uno de los compuestos que eluyen en la fracción 6 sea la naringenina-7-*O*-diglucósido, también llamada de naringina (Figura 29), y que ha sido ya descrita por Cuyckens et al (2001) en un trabajo de caracterización estructural de patrones de flavonoides *O*- diglucósidos por ESI.

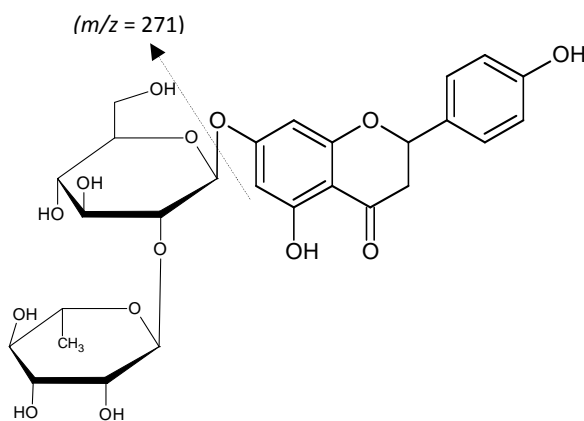


Figura 29- Estructura de la naringina

En relación al ión molecular a m/z 447, los fragmentos predominantes fueron los iones con m/z 285, m/z 327 e a m/z 357. El primero de estos fragmentos es característico de la luteolina, y en el conjunto, estos fragmentos fueron descritos para la luteolina-8-*C*-glucósido (orientina) como se observa en la Figura 30. Las pérdidas que ocurren hasta que se forma el ión molecular de m/z 285 ($447 \rightarrow 357$: -90Da; $357 \rightarrow 327$: -30Da; $327 \rightarrow 285$: -42Da) apoyan la hipótesis de que la hexosa se encuentra unida a través de un enlace del tipo *C* (Edwards et al 2006; Fabre et al 2001; Ola et al 2009).

La presencia de este derivado de luteolina fue también apoyada por la detección del ión molecular con m/z 449, en su análisis en el modo positivo. Este ión presentó el ión fragmento de m/z 287 (correspondiente a la luteolina) aunque con una señal muy débil

(<1%) y también otros iones fragmento importantes como los iones de m/z 431, m/z 413, m/z 383, m/z 329 y m/z 299, que fueron previamente identificados por Colombo et al en extractos de *Saccharum officinarum* (Colombo et al 2008) para este compuesto.

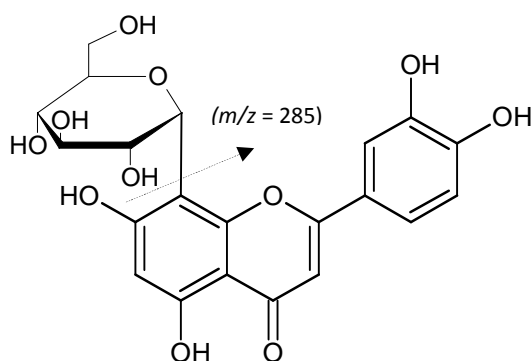


Figura 30- Estructura de la orientina

Además en la fracción 6, el ión molecular de m/z 447 también fue detectado por análisis en modo negativo de la fracción 9. Este ión presentó como principal fragmento el ión de m/z 285, formado, por pérdida de una unidad de hexosa (-162Da). Estos resultados están de acuerdo con los fragmentos descritos por otros autores (Cuyckens et al 2001; Edwards et al 2006; Regos et al 2009) para la luteolina- 7-O-glucósido (Figura 31).

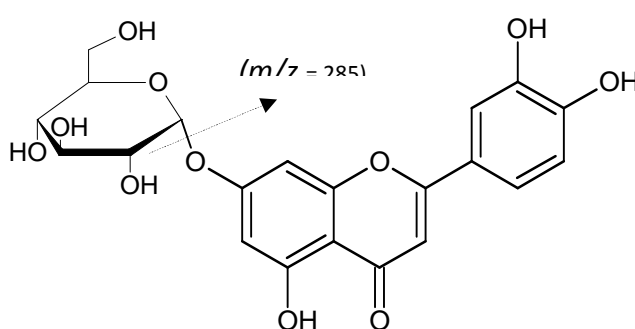


Figura 31- Estructura de la luteolina- 7-O-glucósido

Sin embargo, el ión molecular predominante en la fracción 9 fue el ión de m/z 609, cuyo espectro de MS/Ms tenía una señal bastante fuerte de m/z 301 y otros iones menos intensos de m/z 343 y m/z 463. El fragmento de m/z 301 se forma por la

pérdida de 308 Da, que puede justificarse por pérdida de rutinosa, originando una aglicona con m/z 301 que deberá corresponder al flavonol quercetina (Figura 32) (Cuyckens et al 2001; Han et al 2008; Hvattum 2002; Ola et al 2009). Estos resultados sugieren que el compuesto de ión molecular de m/z 609 es la rutina (quercetina 3-*O*-rutinosido). Esta hipótesis se apoya en los resultados obtenidos en el análisis de la misma fracción en modo positivo, en el que se detectó el ión molecular predominante con m/z 633 (correspondiente al aducto de sodio de m/z 611), cuya fragmentación también presentó la pérdida de 308 Da, formando la aglicona quercetina de m/z 325 (aducto de sodio m/z 303), tal como había sido descrito por Cuyckens et al (2001). También, fue detectada la presencia del ión fragmento de m/z 487, que corresponde al aducto de sodio de ión molecular de m/z 465 (Zhou et al 2008).

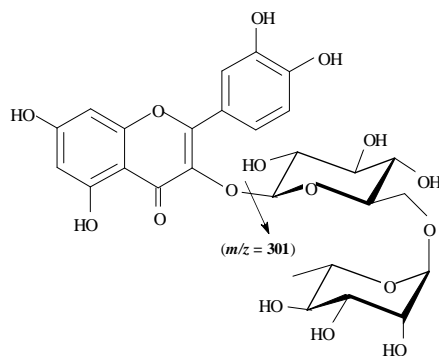


Figura 32- Estructura de la rutina

El análisis de la fracción 9 permitió todavía la detección de otro compuesto, cuyo ión molecular fue detectado a m/z 723 (modo negativo) e m/z 725 (modo positivo). Que se tenga conocimiento, este compuesto no se encuentra descrito en la literatura, pero su fragmentación sugiere que se trata de un derivado de la kampferida. De acuerdo con esto, la fragmentación de este compuesto en modo negativo originó iones fragmentos con m/z 299 atribuido al kaempferida (Fabre et al 2001) (Figura 33) que posteriormente forma, por la pérdida de un grupo metilo, el ión fragmento característico de m/z 284. También fueron detectados iones fragmento formados por pérdidas características de azúcares, como el ión de m/z 579 (-144Da), a m/z 459 (-120 Da a partir del ión a m/z 579), a m/z 327 (-132Da a partir del ión de m/z 459, equivalente a la pérdida de una pentosa) y a m/z 299 (-28 Da a partir del ión de m/z

327, equivalente a la pérdida de grupo CO). No se logró identificar los iones fragmento que corresponden a las pérdidas de 144Da y 120Da, pero se piensa que se trata de azúcares unidos en las posiciones 3 y/o 7 formando un compuesto derivado de la kaempferida con enlaces tipo *O*-glucósidos.

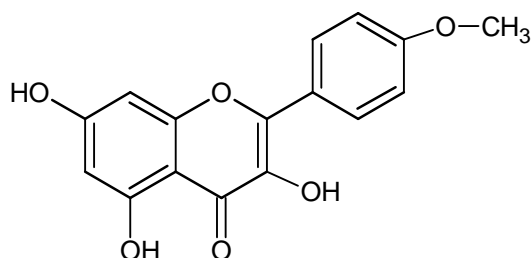


Figura 33- Estructura del kaempferida

Fracción 12

Respecto a la fracción 12, su análisis en modo negativo permitió detectar el ión molecular con m/z 461, que posee un ión fragmento de m/z 253 (correspondiente a la crisina (Figura 34), una vez que fragmenta para dar un ión de m/z 209, como ya había sido descrito (Fabre et al 2001; McNab et al 2009). A partir del ión molecular a m/z 461 se forma el ión molecular de m/z 415 (pérdida de CO e H₂O) y el ión a m/z 253 (pérdida adicional de una unidad de glucosa, 162Da), permitiendo sugerir la presencia de estos grupos en esta molécula.

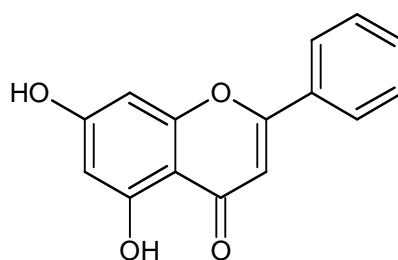


Figura 34- Estructura de la crisina

Aún el espectro de ESI-MS (modo negativo) de la misma fracción mostró el ión molecular de m/z 451, que posee un ión fragmento de m/z 253, también correspondiente a la crisina. La diferencia de masas entre el ión de m/z 451 y la crisina puede ser explicada por la pérdida de una molécula de glucosa e dos moléculas de H_2O (Tabla 4).

Fue también detectado en esta fracción, por análisis en modo negativo, el compuesto de ión molecular de m/z 325, cuyo espectro de ESI-MS/MS posee el ión fragmento de m/z 183, característico del metilgalato (Hvattum 2002). De esta forma, es posible que este compuesto sea un derivado del metilgalato (Figura 35), conteniendo una unidad de 142Da. Aparentemente, también fue eluido en la fracción 13 otro derivado de metilgalato. Este compuesto posee el ión molecular de m/z 339, llevándonos a pensar que se debe tratar también del compuesto metilgalato ligado a una unidad de 156Da.

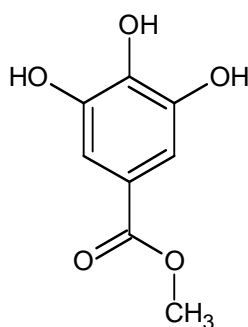


Figura 35- Estructura del metilgalato

Fracción 13

El análisis de la fracción 13 en el modo positivo mostró un ión molecular de m/z 503, con posterior pérdida de 86Da (ión molecular de m/z 417) y pérdida de una unidad de 162Da (probablemente glucosa) formando el ión fragmento de m/z 255 que corresponde a la crisina, como se muestra en la Figura 34. El espectro de MS_4 mostró el ión fragmento característico de esta flavona, el ión molecular de m/z 153 (Tsimogiannis et al 2007). Así, estos resultados sugirieron que esta fracción contendrá otro derivado de la crisina.

4.3-2.2. THYMUS CITRIODORUS

La Tabla 5 resume los resultados obtenidos en el análisis de espectrometría de masas de las fracciones eluidas en HPLC de la especie *Thymus Citriodorus*.

Estas fracciones fueron analizadas en los modos modo positivo e negativo, pero solo fueron tenidos en cuenta los datos de este última analisis, ya que los datos resultantes del modo positivo eran poco concluyentes.

Como se ha hecho para la Retama blanca, la estructura de algunos de los compuestos se describe más pormenorizadamente.

Tabla 5- Identificación y principales fragmentos obtenidos por espectrometría de masas (modo negativo) de las fracciones eluidas por HPLC a partir de fracciones etanólicas de Tomillo limón

Nº fracción	RT (min)	Ident ^a	Ion negativo [M-H] ⁻	Fragmentos principales ESI ⁻ MS ⁿ (Abundancia)	Compuesto	Referencias
1	9,60	A,B	373	MS ² [373]: 301(100) MS ³ [301]: 229(100)	Quercetina+CO+CO ₂	(Fabre et al 2001)
		A,B	333	MS ² [333]: 220(25), 262(75), 276(40), 289(15); MS ³ [289]: 274(15), 245(20), 161(35)	(Epi)catequina+ CO ₂	(de Souza et al 2008)
		A,B	325	MS ² [325]: 183(100), 163(30); MS ³ [183]: 119(100)	Metilgalato+142da	(Regos et al 2009)
		A,B	317	MS ² [317]: 245(100) MS ³ [301]: 229(5)	Mircetina	(McNab et al 2009)
		A,B	255	MS ² [255]:237; MS ² [237]: 209(50), 124(75), 97(100)	7-OH-flavona+H ₂ O	(Fabre et al 2001)
2	11,24	A,B	311	MS ² [325]: 183(100); MS ³ [183]: 119(100)	Metilgalato+128Da	(Hvattum 2002)
		A,B	325	MS ² [325]: 183(100); MS ³ [183]: 119(100)	Metilgalato+142 (isómero)	(Hvattum 2002)
		A,B	387	MS ² [387]: 369(15), 207(100), 163(10), 119(1)	Ácido p-cumárico+CO ₂ +Glc+H ₂ O	(Quirantes-Pine et al 2009; Regos et al 2009)
		A,B	611	MS ² [611]: 449(100), 287(10); MS ³ [449]: 287	Eridictiol-3',7-di-O-glucósido	(Fabre et al 2001)
3	13,65	A,B	449	MS ² [449]: 287(100); MS ³ [287]: 151(100); MS ⁴ [151]: 107(100)	Eridictiol-7-O-glucósido	(Fabre et al 2001; Hvattum 2002)
		NI	507	-	-	-
4	14,62	A,B	449	MS ² [449]: 287(100)	Eridictiol-7-O-glucósido (isómero)	(Fabre et al 2001; Hvattum 2002)
5	17,51	NI	487	-	-	-
		A,B	447	MS ² [447]: 285(100); MS ³ [285]: 243(60), 241(100), 199(100), 175(50), 151(10)	Luteolina-7-O-glucósido	(Fabre et al 2001; Ola et al 2009)

Nº fracción	RT (min)	Ident ^a	Ion negativo [M-H] ⁻	Fragmentos principales ESI ⁻ MS ⁿ (Abundancia)	Compuesto	Referencias
6	19,13	A,B	463	MS ² [463]: 301(20), 287(100); MS ³ [287]: 151(100), 135(<1), 125(<1)	Eridictiol- 7-O-feruil	(Cuyckens & Claeys 2004; Fabre et al 2001)
		A,B	433	MS ² [433]: 271(100); MS ³ [271]: 177(10), 151(100)	Naringenina-7-O-glucósido	(Fabre et al 2001)
		NI	719	-	-	-
		A,B	461	MS ² [461]: 285(100); MS ³ [285]: 241(95), 217(60), 199(60), 175(60), 151(20)	Luteolina-7-O-feruil	(Cuyckens & Claeys 2004; Fabre et al 2001)
7	21,62	A,B	461	MS ² [461]: 299(100); MS ³ [299]: 284(100); MS ⁴ [284]: 256(40), 151(5)	Kampferida-7-O-glucósido	(Fabre et al 2001)
		A,B	395	MS ² [395]: 359(100); MS ³ [359]: 223(10), 197(20), 179(20), 161(100)	Ácido rosmarinico + 2H ₂ O	(Ola et al 2009)
		A,B	373	MS ² [373]: 301(100) MS ³ [301]: 229(100)	Quercetina Co ₂ +CO+ (isómero)	(Fabre et al 2001)
8	23,51	NI	537	-	-	-
9	27,09	A,B	451	MS ² [451]: 433(100), 253(35), 225(60)	Crisina+Glc+2H ₂ O	(McNab et al 2009)
		A,B	373	MS ² [373]: 301(60)	CO ₂ +CO+quercetina (isómero)	(Fabre et al 2001)

RT- tiempo de retención; Ident - Identificación; NA – fracción no analizada; NI- compuesto no identificado

^aLa identificación del compuesto fue efectuada según: A - Resultados de MS consistentes con la literatura; B - Resultados de MS con fragmentación

Fracción 1

El espectro de ESI-MS en modo negativo de la fracción 1 reveló el ión molecular de m/z 317, y el de ESI-MS/MS un ión de m/z 245, así que se propone que se corresponde con el compuesto mircetina (Figura 36), ya que presenta fragmentos equivalentes a los descritos por McNab (McNab et al 2009).

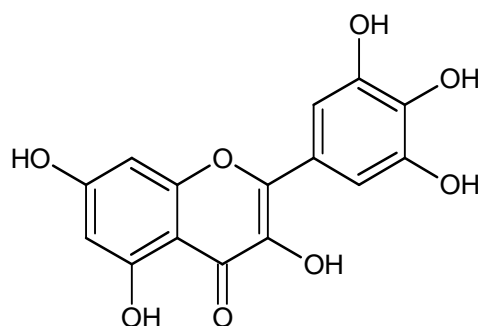


Figura 36- Estructura de la mircetina

Fracciones 3 y 4

El espectro de ESI-MS en modo negativo de la fracción 3 reveló el ión molecular de m/z 449, y las fragmentaciones siguientes demostraron la presencia del ión molecular de m/z 287, correspondiente a la aglicona de eridictiol, e iones de m/z 151 y m/z 107, característicos de la fragmentación de esta flavanona (Fabre et al 2001; Hvattum 2002). Así, es probable que el compuesto eluido en esta fracción corresponda al eridictiol unido a una glucosa en la posición 7, a través de un enlace de tipo *O*, una vez que el ión molecular de m/z 449 pierde de inmediato 162Da (Cuyckens et al 2001; Edwards et al 2006; Regos et al 2009). Según lo descrito, deberá designarse como eridictiol-7-*O*-glucósido (Figura 37).

El ión molecular de m/z 449 fue también detectado en la fracción 4 y su espectro de ESI-MS/MS demostró la presencia de la misma aglicona (ión molecular de m/z 287). De esta forma, es posible que el compuesto eluido en la fracción 4 sea un isómero del compuesto da fracción 3, ya que eluyeron con tiempos de retención distintos en su análisis por HPLC.

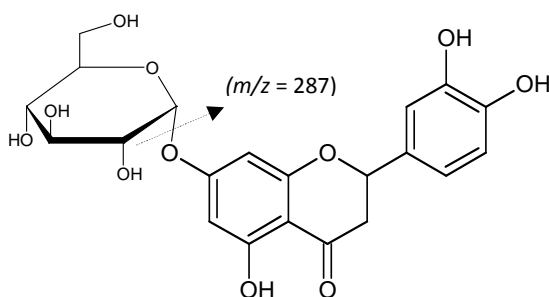


Figura 37- Estructura de eridictiol-7-*O*-glucósido

Fracción 5

En la fracción 5 parece estar presente el compuesto derivado da luteolina, luteolina-7-*O*-glucósido (Figura 38), ya que su espectro de ESI-MS en modo negativo demuestra la presencia del ión molecular de m/z 447, siguiéndose las fragmentaciones para los iones moleculares de m/z 285 (aglicona de luteolina) y de m/z 241, m/z 199, m/z 175 y m/z 151, característicos da fragmentación de la luteolina (Fabre et al 2001; Ola et al 2009).

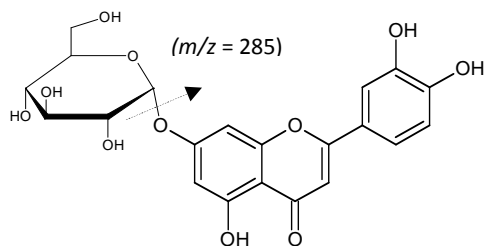


Figura 38- Estructura de la luteolina-7-O-glucósido

En el espectro de ESI-MS de la misma fracción fue detectado el ión molecular de m/z 433, que por la pérdida de una glucosa (162Da) originó el ión de m/z 271, este último correspondiente a la flavanona naringenina (Fabre et al 2001). De acuerdo con estos resultados, se sugiere que el compuesto de ión molecular de m/z 433 sea la naringenina-7-O-glucósido (Figura 39).

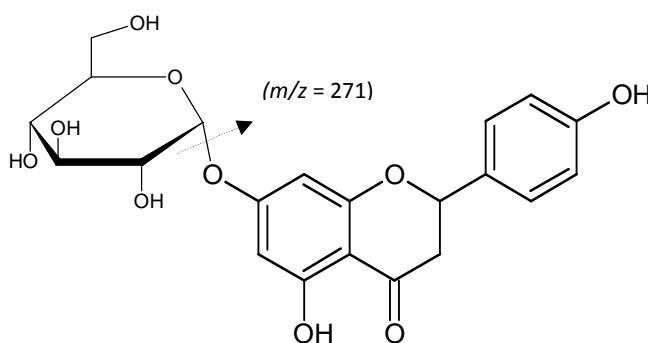


Figura 39- Estructura de la naringenina-7-O-glucósido

Discusión estructural de otros iones moleculares

Discusión estructural del ión molecular de m/z 373

Fracciones 1, 7 y 9

En el modo negativo, el espectro de ESI-MS da fracción 1 reveló el ión molecular de m/z 373, que fragmentó con una señal de m/z 301, correspondiente a la quercetina (Figura 40). El espectro de MS^3 revela la pérdida de 72Da, característica de este

flavonol (Fabre et al 2001). De esta forma, es probable que el compuesto coeluido en la fracción 1 sea un derivado de la quercetina, conteniendo grupos CO y CO₂ en su estructura.

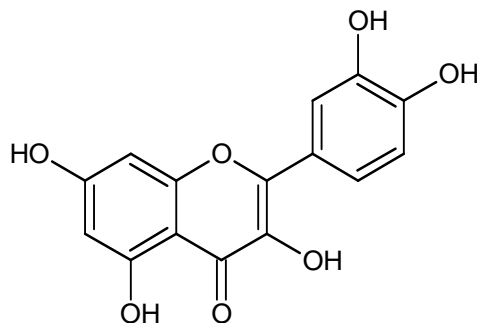


Figura 40- Estructura de la quercetina

En las fracciones 7 y 9 fueron identificados isómeros de este compuesto, teniendo en cuenta que el ión molecular que se muestra en el espectro de ESI-MS es igual, así como la principal señal en el espectro de ESI-MS/MS.

Discusión estructural del ión molecular de m/z 333

El análisis de la fracción 1 en modo negativo permitió todavía identificar el ión molecular de m/z 333, que se fragmentó con una señal de m/z 289 (correspondiendo a la aglicona de (Epi) catequina) y el ión de m/z 161, característico de su fragmentación (de Souza et al 2008). De esta forma, es posible que el compuesto coeluido en la fracción 1 del ión molecular de m/z 333 sea un derivado de la (Epi) catequina, conteniendo un grupo CO₂.

Discusión estructural del ión molecular de m/z 451

El ión molecular a m/z 451 se encontró en el espectro de ESI-MS en modo negativo de la fracción 9. Este compuesto podrá ser un derivado de la crisina, una vez que el ión a m/z 253 (correspondiente a la crisina) y el ión fragmento a m/z 225 aparecen en el espectro de ESI-MS/MS (McNab et al 2009). Se sugiere así, que en este compuesto, la

molécula de crisina (Figura 34) se encuentre ligada a una unidad de glucosa y a dos moléculas de H₂O.

Discusión estructural del ión molecular de m/z 325

Los iones fragmento que aparecen en la fracción 1 de m/z 183 y de m/z 163 sugieren que el compuesto del ión molecular de m/z 325 sea un derivado del metilgalato (Hvattum 2002) que contiene ligado una unidad de 142 Da, tal como se ha descrito anteriormente para la Retama blanca.

Discusión estructural del ión molecular de m/z 255

Además, el espectro de ESI-MS en modo negativo de la fracción 1 mostró el ión molecular de m/z 255, que por la pérdida de una molécula de agua podrá originar el fragmento a m/z 237 y, posteriormente, el ión fragmento de m/z 209, que, de acuerdo con Fabre et al (2001), es característico de la 7-OH-flavona. Así, estos resultados sugieren que este compuesto podría ser un derivado de la 7-OH-flavona (Figura 41).

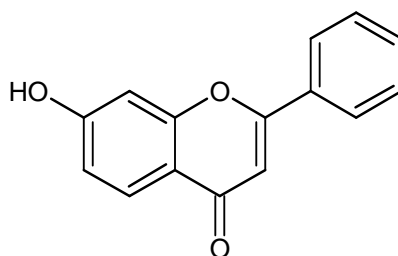


Figura 41- Estructura de 7-OH-flavona

Discusión estructural de los iones moleculares de m/z 311 e 325

En la fracción 2, el espectro de ESI-MS en modo negativo demostró que existen dos iones moleculares que pueden tratarse de derivados del metilgalato (Figura 35), ya que fragmentan para el ión de m/z 183: el ión molecular de m/z 311 (pérdida de 128Da) e el ión molecular de m/z 325 (pérdida de 142Da), este último podrá ser un isómero del compuesto encontrado en la fracción 1.

Discusión estructural del ión molecular de m/z 387

El espectro de ESI-MS en modo negativo de la fracción 2 mostró también el ión molecular de m/z 387, cuyas fragmentaciones revelaron iones fragmento de m/z 369, m/z 207, m/z 163 e y m/z 119. Conviene señalar que fue detectado por Quirantes-Pine en un extracto de partes aéreas de la planta *Lippia citriodora*, un compuesto con las mismas características (Quirantes-Pine et al 2009), aunque su estructura no haya sido esclarecida. Una vez que los dos últimos fragmentos son característicos del ácido *p*-cumárico (Figura 42), es posible que este compuesto sea un derivado de este ácido, conteniendo una molécula de H₂O, una de glucosa y un grupo CO₂ (ácido *p*-coumarico+CO₂+Glc+H₂O).

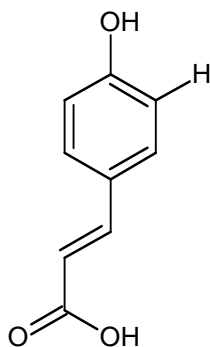


Figura 42- Estructura del ácido *p*-cumárico

Discusión estructural del ión molecular de m/z 611

El ión molecular de m/z 611 que se encontró en el espectro de ESI-MS de la fracción 2 y que se fragmentó en los iones de m/z 449 (pérdida de 162Da) (Figura 43) y de m/z 287 (pérdida de 162Da) indica la presencia de eridictiol unido a dos moléculas de glucosa a través de enlaces del tipo *O*-glucósido. Se sugiere que se trate del compuesto eridictiol-3',7-di-*O*-glucósido (Abad-Garcia et al 2009).

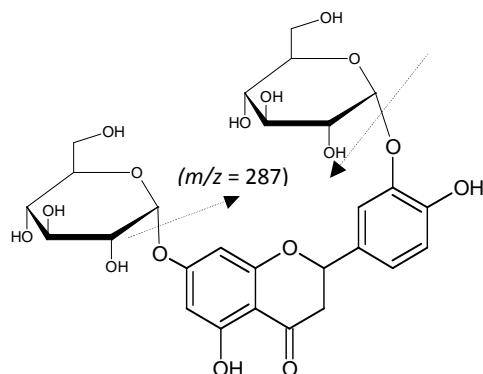


Figura 43- Estructura de eridictiol-3',7-di-O-glucósido

Discusión estructural del ión molecular de m/z 463

El ión molecular de m/z 463 detectado en el análisis por ESI-MS en modo negativo de la fracción 5 se fragmentó para dar una señal a m/z 287 (eridictiol). En el espectro de ESI-MS/MS/MS del ión de m/z 287 fueron detectados los iones de m/z 151 (el más abundante) y a m/z 125(<1%) y m/z 135(<1%). La pérdida de 176 Da a partir del ión molecular, origina la señal de m/z 287 lo que sugiere la presencia de una unidad feruil unida al eridictiol y el compuesto eridictiol- 7-O-feruil (Figura 44) (Cuyckens & Claeys 2004; Fabre et al 2001).

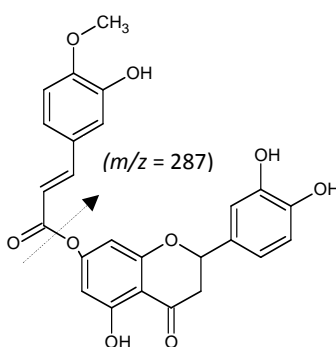


Figura 44- Eridictiol- 7-O-feruil

Discusión estructural del ión molecular de m/z 461

El espectro de ESI-MS de la fracción 6 exhibió un ión molecular de m/z 461, que fragmentó para dar el ión de m/z 285 (característico de la luteolina). El espectro de ESI-MS/MS/MS de este último ión originó los iones fragmento de m/z 241, m/z 217, m/z 199, m/z 175 e 151, típicos de la luteolina (Fabre et al 2001). La pérdida de 176 Da a

partir del ión molecular, originando la señal de m/z 285 sugiere que se trate del compuesto luteolina ligado a una unidad feruil - luteolina-7-*O*-feruil (Figura 45) (Cuyckens & Claeys 2004).

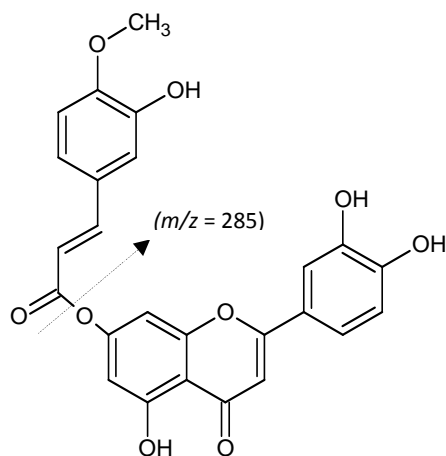


Figura 45- Luteolina-7-*O*-feruil

Discusión estructural del ión molecular a m/z 461

La fracción 7 mostró en su espectro de ESI-MS (modo negativo) el ión molecular de m/z 461, que fragmentó para dar el ión de m/z 299 (-162 Da, pérdida de hexosa), m/z 284, m/z 256 y m/z 151. Estos resultados sugieren la presencia del compuesto kampferida (Fabre et al 2001) ligado a una unidad de glucosa, formando la kampferida-7-*O*-glucósido (Figura 46).

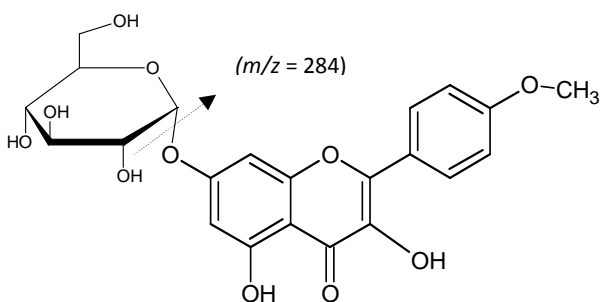


Figura 46- Estructura kampferida-7-*O*-glucósido

Discusión estructural del ión molecular de m/z 395

En el espectro de MS de la fracción 7 puede observarse todavía la presencia del ión molecular de m/z 395, que se fragmentó para dar los iones de m/z 359, m/z 197 y m/z 161, estos últimos característicos del ácido rosmarínico (Ola et al 2009). De acuerdo con esto, es posible que este compuesto sea un derivado del ácido rosmarínico, conteniendo dos moléculas de H₂O en su estructura.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

Los resultados del presente Trabajo de Grado han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. Se ha puesto a punto un método espectofotométrico para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales en las especies *Cytisus multiflorus* y *Thymus citriodorus*
2. Se ha puesto a punto un método espectofotométrico novedoso para la cuantificación de flavonas/flavonoles en plantas.
3. Se ha puesto a punto un nuevo método espectofotométrico de determinación del contenido en flavanonas/ dihidroflavonoles en plantas.
4. Las especies *Cytisus multiflorus* y *Thymus citriodorus* son abundantes en compuestos fenólicos, poseen cantidades considerables de flavonas/flavonoles y pequeñas concentraciones de flavanonas/dihidroflavonoles.
5. Se ha dilucidado el perfil fenólico de los extractos etanólicos de las especies *Cytisus multiflorus* y *Thymus citriodorus*, identificando la estructura de gran parte de sus compuestos, a través de un método de espectrometría de masas del tipo MS-*Electrospray*.
6. Se ha determinado la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de *Cytisus multiflorus* y *Thymus citriodorus* por el método DPPH concluyéndose que las dos plantas poseen una considerable capacidad reductora.
7. La planta *Cytisus multiflorus* presenta mayor capacidad reductora que otras especies de la misma familia.
8. El *Thymus citriodorus* es una de las especies del género *Thymus* con mayor poder reductor.

Referencias

6. REFERENCIAS

6.1- BIBLIOGRAFIA

- Abad-Garcia B, Berrueta LA, Garmon-Lobato S, Gallo B, Vicente F. (2009). A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216:5398-415
- Abdille MH, Singh RP, Jayaprakasha GK, Jena BS. (2005). Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. *Food Chem.* 90:891-6
- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3:20
- Ammar H, Lopez S, Gonzalez JS, Ranilla MJ. (2004). Comparison between analytical methods and biological assays for the assessment of tannin-related antinutritive effects in some Spanish browse species. *J. Sci. Food Agric.* 84:1349-56
- Angelopoulou R, Lavranos G, Manolakou P. (2009). ROS in the aging male: Model diseases with ROS-related pathophysiology. *37th Annual Conference of the European-Teratology-Society*, pp. 167-71. Arles, FRANCE: Pergamon-Elsevier Science Ltd
- Areias LR, Vieira, Inês P., Tinoco, M. T., Antunes, Célia M., Morais, Júlio. (2008). Effect of *Cytisus multiflorus* in the control of Type-2 Diabetes. In *XIV Congresso Nacional de Bioquímica, Ponta Delgada, Açores, Portugal*. Ponta Delgada, Açores, Portugal
- Bertoncelj J, Dobersek U, Jamnik M, Golob T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem.* 105:822-8
- Bizimenyera ES, Aderogba MA, Eloff JN, Swan GE. (2007). Potential of neuroprotective antioxidant-based therapeutics from *Peltophorum africanum* Sond (Fabaceae). *Afr. J. Tradit. Complement. Alt. M.* 4:99-106

- Bonvehi JS, Coll FV. (1994). Phenolic composition of propolis from China and from South-america. *Z.Naturforsch.(C)* 49:712-8
- Brand-Williams WC, M. E.; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. -Wiss. Technol.* 28:25-30
- Bueyuekbalci A, El SN. (2008). Determination of In vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas. *Plant Food Hum. Nutr.* 63:27-33
- Ciudad AG, Santos BF, de Aldana BRV, Zabalgogezcoa I, Gutierrez MY, Criado BG. (2004). Use of near infrared reflectance spectroscopy to assess forage-quality of a Mediterranean shrub. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 35:665-78
- Clifford MN. (2000). Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *J.Sci. Food Agric.* 80:1063-72
- Cohen A. (2009). Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI and Commonly Used Mass Analyzers (vol 44, pg 210, 2009). *Appl. Spectrosc. Rev.* 44:362-
- Colombo R, Yariwake JH, McCullagh M. (2008). Study of C- and O-glycosylflavones in sugarcane extracts using liquid chromatography - Exact mass measurement mass spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* 19:483-90
- Cuyckens F, Rozenberg R, de Hoffmann E, Claeys M. (2001). Structure characterization of flavonoid O-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 36:1203-10
- Cuyckens H, Claeys M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* 39:1-15
- Cvek J, Medic-Saric M, Jasprica I, Zubcic S, Vitali D, et al. (2007). Optimisation of an extraction procedure and chemical characterisation of croatian Propolis tinctures. *Phytoch. Anal.* 18:451-9
- de Souza LM, Cipriani TR, Iacomini M, Gorin PAJ, Sasaki GL. (2008). HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47:59-67
- Duarte AI, Santos MS, Oliveira CR, Rego AC. (2005). Insulin neuroprotection against oxidative stress in cortical neurons - Involvement of uric acid and glutathione antioxidant defenses. *Free Radic. Biol. Med.* 39:876-89

- Dutra RC, Leite MN, Barbosa NR. (2008). Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* Vogel seeds. *Int. J. Mol. Sci.* 9:606-14
- Dweck AC. (2009). The internal and external use of medicinal plants. *Clin. Dermatol.* 27:148-58
- Ebada SS, Ayoub NA, Singab ANB, Al-Azizi MM. (2008). Phytophenolics from *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) with promising hepatoprotective activity. *Pharmacogn. Mag.* 4:286-92
- Edwards EL, Rodrigues JA, Ferreira J, Goodall DM, Rauter AP, et al. (2006). Capillary electrophoresis-mass spectrometry characterisation of secondary metabolites from the antihyperglycaemic plant *Genista tenera*. *Electrophoresis* 27:2164-70
- Elisabeth Stahl-Biskup FS. (2002). *Essential oil chemistry of the genus Thymus—a global view*. In: *Thyme, the genus Thymus*. London: Taylor and Francis. 317 pp.
- Espin JC, Garcia-Conesa MT, Tomas-Barberan FA. (2007). Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry* 68:2986-3008
- Fabre N, Rustan I, de Hoffmann E, Quetin-Leclercq J. (2001). Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12:707-15
- Fearon IM, Faux SP. (2009). Oxidative stress and cardiovascular disease: Novel tools give (free) radical insight. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47:372-81
- Ferreira A, Proenca C, Serralheiro MLM, Araujo MEM. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J. Ethnopharmacol.* 108:31-7
- Fowler MW. (2006). Plants, medicines and man. *J. Sci. Food Agric.* 86:1797-804
- Frisard M, Ravussin E. (2006). Energy metabolism and oxidative stress - Impact on the metabolic syndrome and the aging process. *Endocrine* 29:27-32
- Gião MS, Gonzalez-Sanjose ML, Rivero-Perez MD, Pereira CI, Pintado ME, Malcata FX. (2007). Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *J. Sci. Food Agric.* 87:2638-47
- Godevac D, Zdunic G, Savikin K, Vajs V, Menkovic N. (2008). Antioxidant activity of nine Fabaceae species growing in Serbia and Montenegro. *Fitoterapia* 79:185-7

- Griffiths WJ, Jonsson AP, Liu SY, Rai DK, Wang YQ. (2001). Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem. J.* 355:545-61
- Guyot S, Marnet N, Laraba D, Sanoner P, Drilleau JF. (1998). Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* var. Kermerrien). *J. Agric. Food Chem.* 46:1698-705
- Han J, Ye M, Qiao X, Xu M, Wang B-r, Guo D-A. (2008). Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47:516-25
- Harnly JM, Bhagwat S, Lin LZ. (2007). Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Anal. Bioanal. Chem.* 389:47-61
- Havsteen BH. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 96:67-202
- Hoffmann-Ribani R, Huber LS, Rodriguez-Amaya DB. (2009). Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. *J. Food Compos. Anal.* 22:263-8
- Horvath G, Szabo LG, Hethelyi E, Lemberkovics E. (2006). Essential oil composition of three cultivated *Thymus* phenotypes from Hungary. *J. Essent. Oil Res.* 18:315-7
- Horvath AB, Grayer RJ, Keith-Lucas DM, Simmonds MSJ. (2008). Chemical characterisation of wild populations of *Thymus* from different climatic regions in southeast Spain. *Biochem. Syst. Ecol.* 36:117-33
- Huang DJ, Ou BX, Prior RL. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53:1841-56
- Huda-Faujan N, Noriham A, Norrakiah AS, Babji AS. (2009). Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. *Afr. J. Biotechnol.* 8:484-9
- Hvattum E. (2002). Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16:655-62

- Ishige K, Schubert D, Sagara Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 30:433-46
- Iwashina T. 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant R.* 113:287-99
- Joon-Kwan Moon aTS. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem* 57 (5):1655-66
- Kanatt SR, Chander R, Radhakrishna P, Sharma A. (2005). Potato peel extract - a natural antioxidant for retarding lipid peroxidation in radiation processed lamb meat. *J. Agric. Food Chem.* 53:1499-504
- Kang SS, Lee JY, Choi YK, Kim GS, Han BH. (2004). Neuroprotective effects of flavones on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Bioorg. & Med. Chem. Let.* 14:2261-4
- Kappel VD, Costa GM, Scola G, Silva FA, Landell MF, et al. (2008). Phenolic content and antioxidant and antimicrobial properties of fruits of *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* at different maturity stages. *J. Med. Food* 11:267-74
- Katalinic V, Kulisic T, Jukic M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* 94:550-7
- Kaur IP, Geetha T. (2006). Screening methods for antioxidants - A review. *Mini-Rev. Med. Chem.* 6:305-12
- Khanbabae K, van Ree T. (2001). Tannins: Classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* 18:641-9
- Kirby AJ, Schmidt RJ. (1997). The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs -- I. *J. Ethnopharmacol.* 56:103-8
- Koleva, II, van Beek TA, Linssen JPH, de Groot A, Evstatieva LN. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytoch. Anal.* 13:8-17
- Koysomboon S, van Altena I, Kato S, Chantrapromma K. (2006). Antimycobacterial flavonoids from *Derris indica*. *Phytochemistry* 67:1034-40
- Kulisic T, Dragovic-Uzelac V, Milos M. (2006). Antioxidant Activity of Aqueous Tea Infusions Prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. *Food Technol. Biotechnol.* (4): 485-92
- Le Gall JY, Ardaillou R. 2009. The biology of aging. *Bull. Acad. Natl. Med.* 193:365-402

- LeBlanc BW, Davis OK, Boue S, DeLucca A, Deeby T. (2009). Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chem.* 115:1299-305
- Li HB, Wong CC, Cheng KW, Chen F. (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Sci. Technol.* 41:385-90
- Liu M, Li XQ, Weber C, Lee CY, Brown J, Liu RH. (2002). Antioxidant and anti proliferative activities of raspberries. *J. Agric. Food Chem.* 50:2926-30
- Lopez V, Akerreta S, Casanova E, Garcia-Mina JM, Cavero RY, Calvo MI. (2007). In vitro antioxidant and anti-rhizopus activities of lamiaceae herbal extracts. *Plant Food Hum. Nutr.* 62:151-5
- Lule SU, Xia WS. (2005). Food phenolics, pros and cons: A review. *Food Rev. Int.* 21:367-88
- MacDonald-Wicks LKW, L. G.; Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J. Sci. Food Agric.* 86:2046-56
- Marja PK, Anu IH. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47:3954–62
- Matkowski A, Piotrowska M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia* 77:346-53
- Mauri PL, Iemoli L, Gardana C, Riso P, Simonetti P, et al. (1999). Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometric characterization of flavonol glycosides in tomato extracts and human plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13:924-31
- McNab H, Ferreira ESB, Hulme AN, Quye A. (2009). Negative ion ESI-MS analysis of natural yellow dye flavonoids-An isotopic labelling study. *Int. J. Mass Spectrom.* 284:57-65
- Merken HM, Beecher GR. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J. Agric. Food Chem.* 48:577-99
- Milbury PE, Chen CY, Dolnikowski GG, Blumberg JB. (2006). Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. *J. Agric. Food Chem.* 54:5027-33

- Moraes-De-Souza RA, Oldoni TLC, Regitano-d'Arce MAB, Alencar SM. (2008). Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 6:41-7
- Moreira L, Dias LG, Pereira JA, Estevinho L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food Chem. Toxicol.* 46:3482-5
- Nagy M, Grancai D. (1996). Colorimetric determination of flavanones in propolis. *Pharmazie* 51:100-1
- Nirmal J, Babu CS, Harisudhan T, Ramanathan M. (2008). Evaluation of behavioural and antioxidant activity of *Cytisus scoparius* Link in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *BMC Complement. Altern. Med.* 8:8
- Ojewole JAO. (2004). Analgesic, antiinflammatory and hypoglycemic effects of *Sutherlandia frutescens* R. BR. (variety *Incana* E. Mey.) [Fabaceae] shoot aqueous extract. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 26:409-16
- Ojewole JAO. (2008). Anticonvulsant property of *Sutherlandia frutescens* R. BR. (variety *incana* E. MEY) [Fabaceae] shoot aqueous extract. *Brain Res. Bull.* 75:126-32
- Ojewole JAO, Adewumni CO. (2004). Anti-inflammatory and hypoglycaemic effects of *Tetrapleura tetraptera* (Taub) [fabaceae] fruit aqueous extract in rats. *J. Ethnopharmacol.* 95:177-82
- Ojewole JAO, Drewes SE, Khan F. (2006). Vasodilatory and hypoglycaemic effects of two pyrano-isoflavone extractives from *Eriosema kraussianum* N. E. Br. [Fabaceae] rootstock in experimental rat models. *Phytochemistry* 67:610-7
- Ola SS, Catia G, Marzia I, Francesco VF, Afolabi AA, Nadia M. (2009). HPLC/DAD/MS characterisation and analysis of flavonoids and cinnamoyl derivatives in four Nigerian green-leafy vegetables. *Food Chem.* 115:1568-74
- Omidbaigi R, Sefidkon F, Hejazi M. (2005). Essential oil composition of *Thymus* citriodorus* L. cultivated in Iran. *Flavour Frag. J.* 20:237-8
- Panico AM, Garufi E, Nitto S, Di Mauro R, Longhitano RC, et al. (2009). Antioxidant activity and phenolic content of strawberry genotypes from *Fragaria x ananassa*. *Pharm. Biol.* 47:203-8

- Pereira JA, Pereira APG, Ferreira I, Valentao P, Andrade PB, et al. (2006). Table olives from Portugal: Phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 54:8425-31
- Petti S, Scully C. (2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *J. Dent.* 37:413-23
- Popova M, Bankova V, Butovska D, Petkov V, Nikolova-Damyanova B, et al. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytoch. Anal.* 15:235-40
- Quirantes-Pine R, Funes L, Micol V, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. (2009). High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. *J. Chromatogr. A* 1216:5391-7
- Raja S, Ahamed K, Kumar V, Mukherjee K, Bandyopadhyay A, Mukherjee PK. (2007). Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *J. Ethnopharmacol.* 109:41-7
- Raja S, Nazeer AH, Kumar V, Mukherjee K, Bishnu Pada Saha AB, Mukherjee PK. (2006). *Cytisus scoparius* link - A natural antioxidant. *BMC Complement. Altern. Med.* 6:8
- Rauter AP, Martins A, Lopes R, Ferreira J, Serralheiro LM, et al. (2009). Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*. *J. Ethnopharmacol.* 122:384-93
- Regos I, Urbanella A, Treutter D. (2009). Identification and Quantification of Phenolic Compounds from the Forage Legume Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *J. Agric. Food Chem.* 57:5843-52
- Reichling J, Nolkemper S, Stintzing FC, Schnitzler P. (2008). Impact of Ethanolic Lamiaceae Extracts on Herpesvirus Infectivity in Cell Culture. *Forsch. Komplement.med.* 15:313-20
- Rodriguez-Riano T, Ortega-Olivencia A, Devesa JA. (2004). Reproductive biology in *Cytisus multiflorus* (Fabaceae). *Ann. Bot. Fenn.* 41:179-88
- Ross JA, Kasum CM. (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Ann. Rev. of Nutr.* 22:19-34

- Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, et al. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 91:621-32
- Serteser A, Kargioglu M, Gok V, Baci Y, Ozcan MM, Arslan D. (2008). Determination of antioxidant effects of some plant species wild growing in Turkey. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 59:643-51
- Stanojevic LP, Stankovic MZ, Cakic MD, Nikolic LB, Nikolic VD, Ristic DP. (2009). The effect of the operation conditions and the extraction techniques on the yield, kinetics and composition of methanol extracts of Hieracium pilosella L. *Hem. Ind.* 63:79-86
- Stone JR, Yang SP. (2006). Hydrogen peroxide: A signaling messenger. *Antioxid. Redox Signal.* 8:243-70
- Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop. J. Pharm. Res.* 7:1089-99
- Tsimogiannis D, Samiotaki M, Panayotou G, Oreopoulou V. (2007). Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules* 12:593-606
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39:44-84
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem.-Biol. Interact.* 160:1-40
- Veitch NC. (2009). Isoflavonoids of the Leguminosae. *Nat. Prod. Rep.* 26:776-802
- Wang CN, Chi CW, Lin YL, Chen CF, Shiao YJ. (2001). The neuroprotective effects of phytoestrogens on amyloid beta protein-induced toxicity are mediated by abrogating the activation of caspase cascade in rat cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 276:5287-95
- Wang J, Zhao M, Zhao Q, Jiang Y. (2007). Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chem.* 101:1658-63
- Wang SP, Huang KJ. (2004). Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1032:273-9

- Wyk BE, Albrecht C. (2008). A review of the taxonomy, ethnobotany, chemistry and pharmacology of *Sutherlandia frutescens* (Fabaceae). *J. Ethnopharmacol.* 119:620-9
- Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomas-Barberan FA, Datta N, et al. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Food Hum. Nutr.* 59:113-22
- Ye M, Yan YN, Guo DA. (2005). Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug Tu-Si-Zi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19:1469-84
- Yen GC, Chen HY. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 43:27-32
- Yen GC, Duh PD. (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *J. Agric. Food Chem.* 42:629-32
- Yildirim A, Mavi A, Kara AA. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J. Agric. Food Chem.* 49:4083-9
- Zheng W, Wang SY. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* 49:5165-70
- Zhou JL, Qian ZM, Luo YD, Tang D, Chen H, et al. (2008). Screening and mechanism study of components targeting DNA from the Chinese herb *Lonicera japonica* by liquid chromatography/mass spectrometry and fluorescence spectroscopy. *Biomed. Chromatogr.* 22:1164-72

6.2- WEB SITES

- USDA. (2009). "<http://plants.usda.gov/>." Natural Resource Conservation Service
Retrieved 6-08-2009, 2009