

ACTIVIDAD ANTIOXIDATIVA DE ALGUNOS EXTRACTOS VEGETALES

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SOME VEGETABLE EXTRACTS

Beatriz H. MONTOYA¹, Víktor LEMESHKO², Juan B. LÓPEZ³,
Andrés PAREJA³, Rodrigo URREGO³ y Ricardo TORRES^{1*}.

RESUMEN

La información acerca de extractos vegetales con actividad antioxidativa tiene gran interés para la medicina, las industrias farmacéutica y de alimentos. En este trabajo es evaluada la capacidad antioxidativa de varios extractos vegetales utilizando dos métodos: la decoloración del radical libre estable 1,1-difenil-2-picril hidracilo (DPPH) y la inhibición de la lipoperoxidación de las biomembranas de cerebro de rata. Se encuentra que los extractos activos en la decoloración del DPPH inhiben también la lipoperoxidación de biomembranas inducida por Fe²⁺-ascorbato, pero no se observa una correlación alta entre la decoloración del DPPH en el medio metanólico y la inhibición de la lipoperoxidación de biomembranas en el medio acuoso. Además, se muestra que los extractos difieren no solamente por la cantidad del material antioxidativo, sino también por las características cinéticas de la reacción de los antioxidantes presentes con radicales libres. Para dos extractos de mayor actividad antioxidativa, se evalúa la cito- y genotoxicidad, mostrando que no poseen efectos tóxicos considerables.

Palabras clave: *antioxidantes, plantas medicinales, extractos, lipoperoxidación de biomembranas, genotoxicidad.*

ABSTRACT

The information concerning the antioxidant activity of vegetable extracts has great interest for medicine and for pharmaceutical and food industries. In this work the antioxidant capacity of several vegetable extracts is evaluated using two methods: the discoloration of the stable free radical 1,1-diphenyl-2-picryl hidrazil (DPPH) and the inhibition of the lipid peroxidation of rat brain biomembranes. It is found that the extracts, which are actives in the discoloration of DPPH also inhibit the biomembranes lipid peroxidation induce by Fe²⁺-ascorbate, but there is not observed a high correlation between the discoloration of DPPH in the methanolic medium and the inhibition of the biomembranes lipid peroxidation in the aqueous media. In addition, it is shown that the extracts differ not only in the quantity of the antioxidant material, but also in the kinetic characteristics of the reaction between the present antioxidants and free radicals. The cyto- and genotoxicity of two extracts with higher antioxidant activity is evaluated and it is shown that they do not cause considerable toxic effects.

Key words: *antioxidants, medicinal herbs, extracts, biomembranes lipid peroxidation, genotoxicity.*

1 Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Sede Medellín), Apartado aéreo 3840, Medellín, Colombia.

2 Escuela de Física, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Sede Medellín), Apartado aéreo 3840, Medellín, Colombia.

3 Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Sede Medellín), Apartado aéreo 3840, Medellín, Colombia.

* Autor quien se debe dirigir la correspondencia: rtorres@perseus.unalmed.edu.co

INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes naturales han cobrado gran interés en las últimas dos décadas puesto que el estrés oxidativo (un desbalance entre las sustancias antioxidantes y prooxidantes) está implicado en un gran número de afecciones de la salud (1, 2). El consumo de productos alimenticios que contengan los principales antioxidantes naturales como vitamina E, vitamina C y carotenos es importante para un buen funcionamiento del organismo y ayuda a disminuir el riesgo de la formación de algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas, etc. (3-6). Existe la hipótesis de que el daño oxidativo permanente está implicado también en el mecanismo molecular del envejecimiento (7, 8). Por lo tanto, el suministro de antioxidantes exógenos podría tener efectos benéficos y ser una alternativa en la prevención y tratamiento de varias enfermedades (9). Los antioxidantes también se utilizan en la industria de alimentos, cosmética, pinturas, aceites, polímeros y, en general, para proteger cualquier sustancia susceptible a la oxidación mediada por radicales libres (1).

La cito- y genotoxicidad de las sustancias, inclusive de origen natural, es una característica importante para pretender aplicarlas en seres humanos. Varios investigadores han evaluado el riesgo cito- y genotóxico de los extractos vegetales (10-13), mostrando que dicha evaluación es indispensable para poder realizar una aplicación segura de los extractos en medicina, la industria farmacéutica y de alimentos.

El objetivo del presente trabajo fue la selección de las plantas medicinales de mayor capacidad antioxidativa, utilizando como primera evaluación la habilidad de los extractos vegetales para desactivar al radical libre estable DPPH. Los extractos más activos fueron evaluados también en su capacidad de inhibir la lipoperoxidación de biomembranas. Adicionalmente, fueron determinadas las características cinéticas de decoloración del DPPH por los extractos, y para dos extractos de mayor actividad antioxidativa fue evaluada su actividad cito- y genotóxica.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

Preparación de extractos: Las muestras vegetales secas y finamente molidas fueron extraí-

das durante una semana, a temperatura ambiente, 24-26 °C, con etanol 96% en atmósfera de Nitrógeno, utilizando una relación material:solvente de 1:10. Los sobrenadantes obtenidos se conservaron en atmósfera de Nitrógeno a 0 °C hasta el momento de la investigación.

Evaluación de la capacidad antioxidativa de los extractos vegetales: La capacidad antioxidativa de los extractos fue evaluada por la decoloración del DPPH. La metodología empleada es una modificación del procedimiento reportado por Joyeux et al (14). Los extractos vegetales fueron diluidos en metanol 333, 666, 1111 o 3333 veces y finalmente mezclados en proporción 1:2 en volumen con la solución de DPPH 51 µM en metanol, las concentraciones finales de extracto en la celda fueron de 1.0, 0.5, 0.3 o 0.1 µL/mL y de 34 µM DPPH. Esta solución fue incubada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego la absorbancia a 517 nm ($A_{517,muestra}$) fue leída en el espectrofotómetro SP-850 Turner (USA). También se leyó A_{517} para el control ($A_{517,control}$) y para el blanco ($A_{517,blanco}$). El control se preparó agregando la solución de DPPH y metanol sin extracto y para el blanco se utilizó metanol sin DPPH y el extracto diluido. El porcentaje de decoloración del DPPH fue calculado de acuerdo con la siguiente ecuación: $(A_{517,control} - A_{517,muestra} + A_{517,blanco}) * 100\% / A_{517,control}$

Análisis de la cinética de decoloración del DPPH por los extractos y evaluación del grado de decoloración: En el espectrofotómetro SP-850 Turner (USA) equipado con un agitador magnético y conectado con el registrador Linseis (USA) fue registrado el cambio de A_{517} del DPPH (véase arriba) a temperatura ambiente durante 2-4 minutos en presencia de los extractos vegetales en las concentraciones especificadas en la leyenda de la figura 2. Adicionalmente, para las mismas concentraciones de los extractos fue leída también A_{517} después de una incubación por tiempos prolongados (3.5-7.0 horas), hasta llegar a una absorbancia final aproximadamente estable.

Inhibición de la lipoperoxidación de biomembranas por los extractos antioxidantes: Para la evaluación de la capacidad antioxidativa de los extractos vegetales fue investigada la inhibición de la lipoperoxidación de las

membranas biológicas. Uno de los productos básicos de la lipoperoxidación, el malondialdehído, fue determinado por la reacción con el ácido tiobarbitúrico empleando una modificación del método descrito por López (15). Como fuente de las membranas biológicas se utilizó el homogenizado de cerebro de rata al 20% w/w preparado en el medio tris-HCl 125mM, pH 7.0, a temperatura 4 °C. A 2 mL de este medio a temperatura ambiente fue adicionado ascorbato-tris 0.5 μM, pH 7.0, 20 μL de homogenizado de cerebro de rata, 5 mL del extracto vegetal equivalente a la decoloración de 14 μM de DPPH. Para arrancar la lipoperoxidación, se agregó 10 μM FeCl₃ (el tiempo cero). Inmediatamente, se tomó una alícuota (B1) de 500μL que fue adicionada en un tubo de ensayo con 5 μL de 45 mM BHT en etanol (para parar la reacción de lipoperoxidación), junto con 1 mL del reactivo de coloración frío que consta de ácido tricloroacético, 15% w/v, ácido tiobarbitúrico, 0.375% w/v, y HCl 0.25N. A los 8 minutos fue tomada otra muestra de 500 μL (B2) y se repitió el mismo procedimiento. Posteriormente, los tubos tapados se calentaron en el baño maría a 90 °C durante 15 minutos para desarrollar el color. Después de enfriar las muestras y centrifugarlas a 2500 rpm por 15 minutos, se leyó A₅₃₂ del sobrenadante en el espectrofotómetro SP-850 Turner (USA). En el control, se adicionó etanol, sin extracto. El porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación fue calculado así: $(A_{532} \text{ control (8 min)} - A_{532} \text{ control (0 min)} - A_{532} \text{ muestra B2 (8 min)} + A_{532} \text{ muestra B1 (0 min)}) * 100\% / (A_{532} \text{ control (8 min)} - A_{532} \text{ control (0 min)})$.

Evaluación de la cito- y genotoxicidad de los extractos: La cito- y genotoxicidad fue evaluada utilizando el procedimiento descrito por Marshall (16) y por Evans (17) con algunas modificaciones. Se incubó por 18 h a 37°C la siguiente mezcla: 7.8mL de medio RPMI/HEPES, pH 7.3; 30mL de fitohemaglutinina y 1 mL de sangre. Posteriormente, en cada muestra se agregó a una 100 μL de extracto (concentración final 1.24, 12.4 o 124 mg/mL de material extraído), en otra 100 μL etanol (control negativo), y en la tercera 100 μL de mitomicina C (concentración final 0.19 mM, control positivo). Las muestras se incubaron por

48 h más. Luego, se adicionó 150μL de colchicina 10μg/mL e incubaron otros 30 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 200g por 7 minutos, y los residuos se suspendieron en 9 ml de la solución hipotónica 75 mM KCl y en seguida se incubaron a 37°C durante 7 minutos. Nuevamente, se centrifugaron a 200g por 7 minutos, los residuos se suspendieron en 9 mL de la solución fijadora (3 partes de metanol a 1 parte de ácido acético) recién preparada, se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos, se centrifugaron y se repitió la adición de fijador dos veces más. Finalmente, los residuos se resuspendieron en 0.2 mL de fijador fresco, y esta mezcla se goteó en un portaobjetos previamente sumergido en agua con hielo, las placas se dejaron secar y posteriormente se tiñeron con Giemsa (4% v/v) por 7 minutos. Antes de realizar el montaje de las placas con el cubreobjetos, estas se sumergieron en xilol y dejaron secar. Para la evaluación de la citotoxicidad fue contado el número de células en mitosis presentes en mil células por placa, con un microscopio usando el objetivo 40X (dicha fracción en porcentaje es el índice mitótico).

Para la evaluación de la genotoxicidad fue contado el número de aberraciones cromosómicas presente en 25 células mitóticas por placa, con el microscopio usando el objetivo 100X. Se realizaron seis repeticiones con individuos diferentes, luego para cada tratamiento se analizaron 150 mitosis. Para el análisis de varianza (ANOVA) de las aberraciones cromosómicas, los datos se transformaron sumándole 0.5 al número de quiebres contados en un cultivo y sacando la raíz cuadrada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar la capacidad antioxidativa de varias plantas medicinales, inicialmente fue determinado el grado de decoloración del DPPH en medio metanólico en presencia de 1 mL/mL del extracto vegetal etanólico (Véase tabla 1). Según los datos obtenidos, diez extractos (sombreados) mostraron la mayor actividad antioxidativa, más de 80% de decoloración. El grado de decoloración del DPPH ocasionado por esos extractos fue evaluado también a menores concentraciones (Véase figura 1).

Tabla 1. Capacidad antioxidativa de los extractos evaluada por el grado de decoloración del DPPH a los 30 minutos (1µL del extracto inicial en 1 mL del medio metanólico con 34 µM DPPH).

Nombre científico	Nombre común	Parte vegetal	% de decoloración del DPPH
<i>Juglans neotropica</i> Diels	Nogal	Hojas	92.86
<i>Psidium guajava</i> L.	Guayabo	Corteza	95.22
<i>Tibouchina longifolia</i> (Vahl) Baill.	Hierba de San Juan	Hojas	95.29
<i>Mangifera indica</i> L.	Mango	Hojas	93.96
<i>Cupressus lusitanica</i> Mill.	Pino	Flores	93.31
<i>Persea americana</i> Mill.	Aguacate	Hojas	93.31
<i>Myrica pubescens</i> H.&.B. ex Willd	Olivo	Hojas	92.70
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Eucalipto	Hojas	96.04
<i>Verbena littoralis</i> Kunth	Verbena blanca	Hojas y semillas	86.05
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Romero	Hojas	82.01
<i>Plantago major</i> L.	Llantén	Hojas	76.66
<i>Jacaranda mimosifolia</i> D. Don	Gualanday	Hojas	75.73
<i>Sambucus nigra</i> L.	Saúco	Hojas	75.24
<i>Origanum majorana</i> L.	Mejorana	Flores	65.05
<i>Melissa officinalis</i> L.	Toronjil	Hojas	60.68
<i>Salvia officinalis</i> L.	Salvia	Hojas	52.03
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Nees	Canela	Corteza	49.89
<i>Cynara scolymus</i> L.	Alcachofa	Hojas	32.42
<i>Achillea millefolium</i> L.	Milenrama	Flores	27.96
<i>Pimpinella anisum</i> L.	Anís	Semillas	17.06
<i>Calendula officinalis</i> L.	Caléndula	Flores	16.67
<i>Bixa orellana</i> L.	Achiote	Semillas	14.91
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Manzanilla	Flores	13.69
<i>Mentha piperita</i> L.	Hierbabuena	Parte aérea	13.42
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Albahaca	Hojas	11.46
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Jengibre	Rizoma	10.90
<i>Valeriana officinalis</i> L.	Valeriana	Rizoma	8.55
<i>Aloysia tripillia</i> (L'Hérit.) Britt.	Cidrón	Hojas	9.07
<i>Cymbopogon citratos</i> (DC.) Stapf	Limoncillo	Hojas	8.55
<i>Artemisia absinthium</i> L.	Ajenjo	Hojas	8.33
<i>Borago officinalis</i> L.	Borraja	Hojas	4.48
<i>Avena sativa</i> L.	Avena	Hojuelas	3.04
<i>Malva sylvestris</i> L.	Malva	Flores	2.12
<i>Daucus carota</i> L.	Zanahoria	Raíz	0.67
<i>Allium sativum</i> L.	Ajo	Bulbo	-2.34

Con base en esos datos fue determinada, por interpolación, la concentración de extracto que decoloraría el 50% del DPPH (IC_{50}) a 30 minutos de incubación (Véase tabla 2). Según los resultados obtenidos fueron elegidos los siete extractos (sombreados) con menor IC_{50} , para evaluar la cantidad total de antioxidantes equivalente al DPPH que el extracto puede decolorar en un tiempo hipotéticamente infinito ($n = \mu\text{mol DPPH/mg}$

del material vegetal seco) (Véase tabla 2). Cinco extractos de los siete presentaron el valor de n más alto.

Para todos los siete extractos se ha investigado también su característica cinética de reacción con el DPPH, la cual es importante para la eficiencia de un antioxidante (18). Según la cinética de decoloración del DPPH (Véase figura 2), fue determinado el parámetro K , la velocidad inicial de

decoloración del DPPH normalizado a la cantidad del DPPH decolorado en un tiempo prolongado (Véase tabla 2).

También fue determinada la capacidad de estos siete extractos para inhibir la lipoperoxidación de biomembranas (Véase tabla 2), mostrando que un valor de **K** mayor no siempre corresponde a una mayor inhibición de la lipoperoxidación, aunque

los siete extractos presentaron una alta protección de las biomembranas contra el estrés oxidativo inducido por Fe^{2+} -ascorbato. Entre las posibles causas de la ausencia de una correlación estricta entre la velocidad de decoloración del DPPH y la inhibición de la lipoperoxidación de biomembranas, el mayor peso lo puede tener la diferencia de la lipofiliidad de los antioxidantes (19, 20).

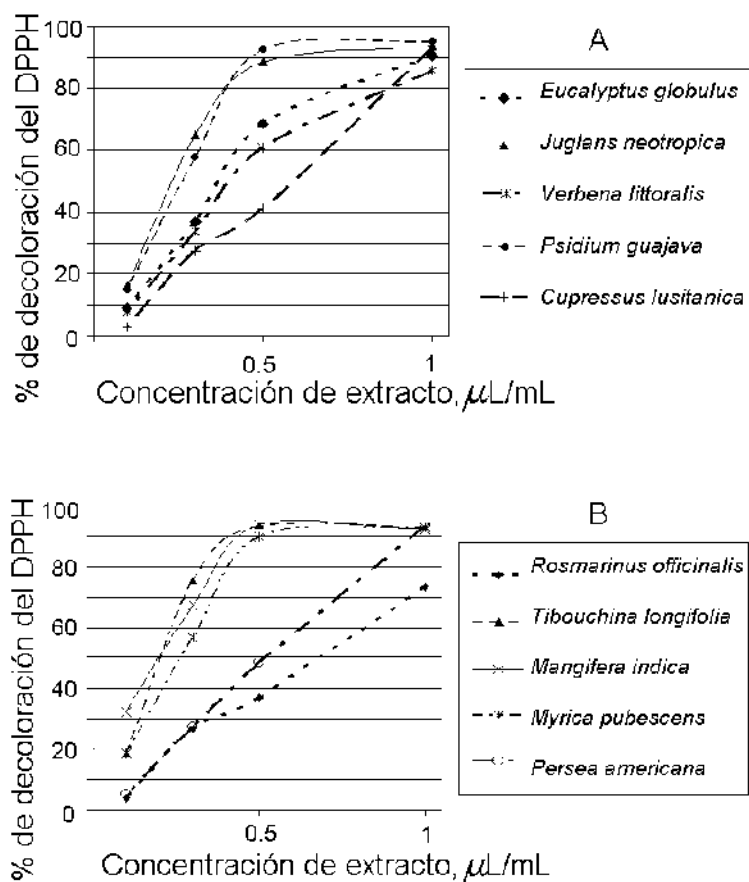


Figura 1. Porcentaje de decoloración del DPPH por distintas concentraciones del extracto.

Para dos extractos de mayor actividad antioxidativa (por la decoloración del DPPH), *Mangifera indica* (hojas) y *Tibouchina longifolia* (parte aérea), fue evaluada la citotoxicidad y/o el efecto sobre el ciclo celular en linfocitos de sangre periférica humana (Véase tabla 3). Los datos mostraron con un 95% de confianza, que ninguno de estos extractos a las dosis ensayadas reducía significativamente el índice mitótico (prueba de Kruskal-Wallis). El tratamiento de datos pareados en ocasiones permite una disminución en la

varianza, por lo tanto se aplicó la prueba estadística de rango de signos a las diferencias entre el índice mitótico del tratamiento y su control respectivo, encontrando que el cultivo junto con el extracto de *Mangifera indica* a 124, 12.4 y 1.24 mg/mL redujo significativamente el índice mitótico con un 95% de confianza, pero no se detectó un efecto dosis respuesta. Luego, en presencia del extracto de *Mangifera indica* se retrasa el ciclo celular, debido probablemente a la reparación del ADN en G_2 , y/o se aumenta la mortalidad de los linfocitos.

Tabla 2. Resultados de la evaluación de la actividad antioxidativa de diferentes extractos vegetales.

Especie vegetal	Familia	(mg material extraído/g material vegetal seco)	IC ₅₀ (μL/mL)	n, (μmol DPPH/mg material vegetal seco)	K*10 ³ (nmol DPPH /s por nmol DPPH reducido por el extracto)	% de inhibición de la lipoperoxidación
<i>Mangifera indica</i> L.	Anacardiaceae	162	0.20	1.57	81	75.79
<i>Tibouchina longifolia</i> (Vahl) Baill.	Melastomataceae	184	0.21	1.50	70	53.06
<i>Juglans neotropica</i> Diles	Juglandaceae	176	0.24	1.21	32	75.49
<i>Myrica pubescens</i> H.&B. ex Willd.	Myricaceae	177	0.26	1.39	37	80.33
<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	124	0.26	1.40	56	71.65
<i>Verbena littoralis</i> Kunth	Verbenaceae	162	0.42	0.76	34	74.51
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Myrtaceae	207	0.38	0.69	47	82.98
<i>Persea americana</i> Mill.	Lauraceae	115	0.51	–	–	–
<i>Cupressus lusitanica</i> Mill.	Cupressaceae	245	0.56	–	–	–
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	175	0.68	–	–	–

Para estos dos extractos fue evaluada también la genotoxicidad determinada por las aberraciones cromosómicas (Véase tabla 4). Encontrándose que ninguna de ellas aumenta significativamente la frecuencia de quiebres cromosómicos con un

95% de confianza (ANOVA). Sin embargo, se detectó que cierto número de las aberraciones son de tipo cromosómico, lo que sugiere que en los extractos puede existir una sustancia que afecta al ADN en la fase G₁ del ciclo celular.

Tabla 3. Índice mitótico en cultivos de linfocitos humanos expuestos a los extractos de *Mangifera indica* y *Tibouchina longifolia*

Concentración de extracto	Índice mitótico	
	Control	Mitomicina C (0.19mM)
	2.27 ± 1.35	1.70 ± 0.55
	<i>Mangifera indica</i>	<i>Tibouchina longifolia</i>
1.24 μg/mL	1.22 ± 0.27	1.92 ± 0.35
12.4 μg/mL	1.48 ± 0.44	1.62 ± 0.34
124 μg/mL	1.00 ± 0.18	1.82 ± 0.32

Tabla 4. Aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos humanos expuestos a los extractos etanólicos de *Mangifera indica* y *Tibouchina longifolia*

		Aberraciones cromosómicas*						% de quiebres en 25 células.
		QK	QC	G	D	F	CA	
Control (Etanol)	1%v/v	0	5	2	0	0	0	4.7 ± 0.18
Mitomicina C	190 μM	4	4	4	1	8	0	16.7 ± 1.78
<i>Mangifera indica</i>	1.24 μg/mL	0	2	2	1	2	2	7.3 ± 0.39
	12.4 μg/mL	2	1	1	1	0	4	8.0 ± 0.21
	124 μg/mL	4	0	0	0	0	0	8.7 ± 0.55
<i>Tibouchina longifolia</i>	1.24 μg/mL	0	5	5	1	0	2	6.7 ± 0.78
	12.4 μg/mL	0	5	5	3	0	2	14.7 ± 0.51
	124 μg/mL	0	2	2	0	0	4	9.3 ± 0.81

QK quiebre cromosómico, QC quiebre cromatídico, G gap, D deleciones (cromatídicas y cromosómicas), F Figuras (trirradial, tetradial, cromosoma en anillo, cromosoma dicéntrico), CA cromosoma acéntrico. *En 150 células en mitosis.

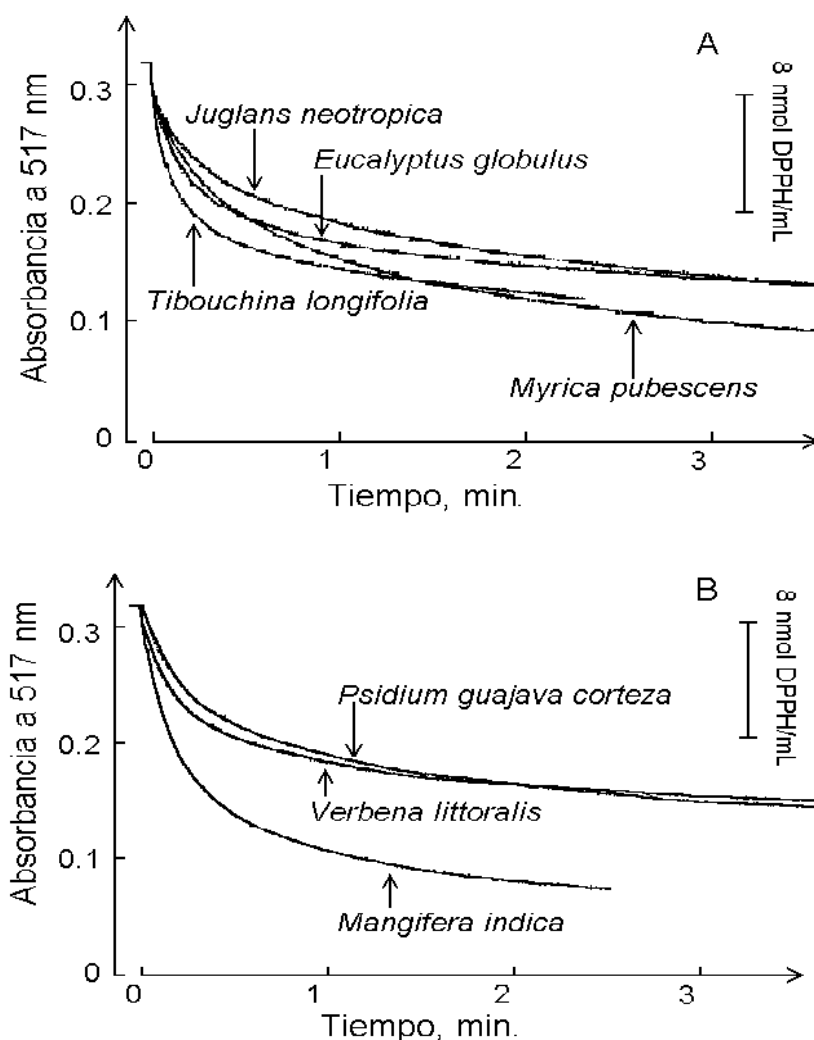


Figura 2. Cinética de decoloración del DPPH para los extractos *Juglans neotropica* 0.19 mL/mL, *Eucalyptus globulus* 0.33 mL/mL, *Tibouchina longifolia* 0.14 mL/mL, *Myrica pubescens* 0.14 mL/mL, *Psidium guajava* 0.14 mL/mL, *Mangifera indica* 0.14 mL/mL y *Verbena littoralis* 0.38 mL/mL.

La comparación de la actividad antioxidativa evaluada por la decoloración del DPPH y la inhibición de la lipoperoxidación de biomembranas muestra que la mayor capacidad antioxidativa la poseen: *Psidium guajava* (corteza), *Eucalyptus globulus* (hojas), *Myrica pubescens* (hojas), *Mangifera indica* (hojas), *Juglans neotropica* (hojas), *Verbena littoralis* (hojas) y *Tibouchina longifolia* (parte aérea) las cuales pertenecen a las familias *Myrtaceae*, *Myricaceae*, *Anacardiaceae*, *Juglandaceae*, *Verbenaceae* y *Melastomataceae*. Una alta actividad antioxidativa de los extractos vegetales fue reportada también por otros autores para: *Rhus verniciflua* (madera) (21, 22) y *Mangifera indica* (corteza) (23) de la familia *Anacardiaceae*; *Syzigium aromaticum* (clavos

(24, 25), *Eucalyptus polyanthemus* (hojas) (25), *Psidium guajava* (frutos) (26) y *Pimenta dioica* (frutos) (27) de la familia *Myrtaceae*; *Myrica gale* (exhudados del fruto) (28) de la familia *Myricaceae*; *Juglans regia* (semilla) de la familia *Juglandaceae* (29) y varias especies de la familia *Verbenaceae* (30, 31).

Los siete extractos vegetales elegidos en este trabajo por su alta capacidad antioxidativa pueden seguir siendo investigados con el fin de determinar sus posibles aplicaciones en medicina, en la industria farmacéutica y de alimentos, ya que los dos extractos con mayor cantidad del material antioxidativo y la mayor reactividad con el radical libre DPPH no muestran evidencia que estén induciendo un gran efecto cito- o genotóxico.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Dario Sánchez y al estudiante Carlos Marrugo del Herbario MEDEL de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín por la clasificación de las especies vegetales.

La presente investigación fue financiada por la dirección de investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín (DIME)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Halliwell B. and Gutteridge J. M. C. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine Tercera edición. Nueva York. Oxford University Press. págs. 617-783.
- Yu B. P. (1994.) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* Vol. 74 (1), 139-162.
- Nguyen M. and Schawartz S. J. (1999) Lycopene: Chemical and biological properties. *Food Technol.* Vol. 53 (2), 38-45.
- Benedich A. and Olson J. A. (1989) Biological actions of carotenoids. *FASEB J.* Vol. 3, 1927-1932.
- Van Acker S. A. B. E., Koymans L. M. H. and Bast A. (1993) Molecular pharmacology of Vitamin E: Structural aspects of antioxidant activity. *Free Radical Biol. Med.* Vol. 15, 311-328.
- Block, G. and Langseth, L. (1994) Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technol.* 48 (7), 80-84.
- Sohal R. S. and Brunk U. T. (1992) Mitochondria production of pro-oxidants and cellular senescence. *Mutat. Res.* Vol. 275, 295-304.
- Shigenaga M. K., Hagen T. M. and Ames B. N. (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 91, 10771-10778.
- Popov I. and Lewin G. (1999) Antioxidative homeostasis: Characterization by means of chemiluminescent technique. *Meth. Enzymol.* Vol. 300, 437-456.
- Gadano A., Gurni A., López P., Ferraro G. And Carballo M. (2002) In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *J. Ethnopharmacol.* Vol. 81, 11-16.
- Varanda E. A., Pozzetti G. L., Lourenco M. V., Vilegas W. and Raddi M. S. G. (2002) Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the *Salmonella*/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. *J. Ethnopharmacol.* Vol. 81, 257-264.
- Ribeiro L. R., Silva A. R., Bautista A. R. P. L. et al. (1993) Clastogenic effect of extracts obtained from *Crotalaria retusa* L. and *Crotalaria mucronata* Desv. on mouse bone marrow cells. *Mutat. Res.* Vol. 300, 253-258.
- Sánchez-Lamar A., Fuentes J. L., Fonseca G. et al. (2002) Assessment of the potential genotoxic risk of *Phyllanthus orbicularis* HBK aqueous extract using in vitro and in vivo assays. *Toxicol. Lett.* Vol. 136, 87-96.
- Joyeux M., Lobstein A., Anton R. y Mortier F. (1995) *Planta Med.* Vol. 61 (2), 126-129.
- López, A. M. (2000) *Bioquímica y biología molecular.* México. McGraw-Hill Interamericana. págs. 95-97.
- Marshall R. (1995) Measurement of chromosome aberrations in vitro using human peripheral blood lymphocytes. Chapter 32 *En: O'Hare S. and Atterwill C. K. (Eds.). Methods in molecular biology: In vitro toxicity testing protocols.* Totowa, Humana Press Inc. 43: 287-296.
- Evans H. F. (1984) Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. Chapter 18. *En: Kilbey B. J, Legator M., Nichols W. and Ramel C. (Eds). Handbook of mutagenicity test procedures.* Segunda edición. Amsterdam. Elsevier Science Publishers B. V. 405-427.
- Shi H., Noguchi N. and Nikim E. (2001) Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Meth. Enzymol.* 355: 157-166.
- Massaelli, H., Sobrath, S. and Pierce, G. N. (1999) The importance of lipid solubility in antioxidants and free radical generating systems for determining lipoprotein peroxidation. *Free Radical Biol. Med.* 26 : (11-12), 1521-1530
- Frankel E. N., Huang S.-W., Kanner J. and German J. B. (1994) Interfacial phenomena in evaluation of antioxidants: Bulk oils vs emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 42 (5):1054-1059.
- Lim K-T, Hu Ch and Kitts D. D. (2001) Antioxidant activity of *Rhus verniciflua* stokes ethanol extract. *Food and Chem. Toxicol.* 39:229-237.
- Kim Y.-S. and Shin D.-H. (2001) Effects of *Rhus verniciflua* stokes on the oxidative stability of fried potato chips during storage. *Food Sci. Biotechnol.* 10 (4) : 418-422.
- Sánchez G. M. Re L., Giuliani A., Núñez-Sellés A. J., Davison G. P. and León-Fernández O. S. (2000) Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacological Res.* 42 (6) : 565-573.
- Shobana, S. and Naidu A. (2000) Antioxidant activity of selected Indian spices. *Prostaglandins Leuk. Essen. Fatty Acids.* 62 (2) : 107-110.
- Lee K. G. and Shibamoto T. (2001) Inhibition of malonaldehyde formation from blood plasma oxidation by aroma extracts and aroma components isolated from clove and eucalyptus. *Food Chem. Toxicol.* 39 (12) : 1199-1204.
- Jimenez-Escrig A., Rincon M., Pulido R. and Saura-Calixto F. (2001) Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.* 49 (11) : 5489-5493.
- Nakatani N. (2000) Phenolic antioxidants from herbs and spices. *Biofactors.* 13 : 141-146.
- Mathiesen L., Malterud K. E. and Sund R. B. (1995) Antioxidant activity of fruit exudate and C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale*. *Planta Med.* 61 (6): 515-518.
- Halvorsen B. L., Holte K., Myhrstad M. C. et al. (2002) A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J. Nutr.* 132 (3) :461-471.
- Ramos A., Piloto J., Visozo A., Garcia A., Lastra H. and de Leon H. P. (2001) Mutagenicity and antioxidant assessment of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl. *Phyther. Res.* 15 (4) : 360-363.
- Mensor L. L., Menezes F. S., Leitao G. G. et al. (2001) Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phyther. Res.* 15 (2) : 127-130.

Fecha de Recibo: Mayo 15 de 2003

Fecha de Aceptación: Agosto 5 de 2003