

Capacidad antioxidante de las hojas de la especie *Clusia minor* L.

Antioxidant Capacity of *Clusia minor* L. leaves

Lorena Moreno León¹ <https://orcid.org/0000-0001-5417-5306>

José Carlos Leyva García¹ <https://orcid.org/0000-0002-2046-2785>

Cindel Cuéllar Duarte² <https://orcid.org/0000-0003-3359-5015>

Kethia González García² <https://orcid.org/0000-0003-1485-9249>

Idania Rodeiro Guerra² <https://orcid.org/0000-0002-2692-6050>

Raisa Mangas Marín^{1*} <http://orcid.org/0000-0003-0883-8257>

¹Universidad de La Habana, Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). La Habana, Cuba.

²Instituto de Ciencias del Mar (ICIMAR). La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: raisam@ifal.uh.cu

RESUMEN

Introducción: El género *Clusia* es uno de los más estudiados de la familia Clusiaceae. *Clusia minor* L. es un arbusto silvestre con escasas investigaciones que se emplea en la medicina tradicional para el tratamiento de verrugas y vitiligo. La actividad antioxidante ha despertado en los últimos años un gran interés científico en el área farmacológica. A pesar de haberse realizado estudios sobre los efectos antioxidantes de esta especie, hasta el presente no se han reportado resultados concluyentes.

Objetivo: Determinar el contenido de fenoles y flavonoides presentes en las hojas de la especie *Clusia minor* L. y evaluar de manera preliminar su actividad antioxidante.

Métodos: A partir de las hojas de la especie se obtuvieron cuatro extractos (A,

B, C, E) por maceración con el empleo de disolventes en orden creciente de polaridad (hexano, acetato de etilo y metanol) y directamente con etanol, respectivamente. El contenido de fenoles y flavonoides totales fue determinado con los métodos de Folin-Ciocalteu y espectrofotométrico con cloruro de aluminio, respectivamente. La evaluación antioxidante se realizó determinando la capacidad secuestradora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) por Cromatografía en Capa Delgada (CCD) y ferro-reductora.

Resultados: Se realizó por primera vez la cuantificación de fenoles totales y flavonoides en las hojas de esta especie, y se pudo identificar su presencia en los extractos B, C y E. Todos los extractos presentaron capacidad secuestradora del radical DPPH y actividad ferro-reductora *in vitro*. Los extractos E y B mostraron la mayor capacidad secuestradora del radical DPPH y ferro-reductora, respectivamente, lo que se encuentra en correspondencia con el contenido de fenoles totales y de flavonoides en estos extractos.

Conclusiones: Los resultados revelaron el posible efecto antioxidante de la especie, relacionado, tentativamente, con la presencia de metabolitos de naturaleza fenólica. *Clusia minor* pudiera ser una alternativa natural para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

Palabras clave: *Clusia minor*; fenoles y flavonoides totales; capacidad antioxidante, DPPH; FRAP.

ABSTRACT

Introduction: *Clusia* is one of the most widely studied genera in the Clusiaceae family. *Clusia minor* L. is an insufficiently studied wild shrub used in folk medicine to treat warts and vitiligo. In recent years, antioxidant activity has arisen great scientific interest in the field of pharmacology. Though a number of studies have been conducted about the antioxidant effects of this species, no conclusive results have so far been reported.

Objective: Determine the content of phenols and flavonoids present in the leaves of the species *Clusia minor* L. and make a preliminary evaluation of its antioxidant activity.

Methods: Four extracts (A, B, C and E) were obtained from leaves of the species by maceration with the use of solvents in an increasing order of polarity

(hexane, ethyl acetate and methanol) and directly with ethanol, respectively. Total phenol and flavonoid content was determined by Folin-Ciocalteu and spectrophotometric testing with aluminum chloride, respectively. Antioxidant evaluation was performed by determining the sequestering capacity of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) by thin layer chromatography (TLC) and the ferric-reducing assay.

Results: Quantification of total phenols and flavonoids in the leaves of the species was carried out for the first time, identifying their presence in extracts B, C and E. All the extracts displayed sequestering capacity of radical DPPH and ferro-reducing activity *in vitro*. Extracts E and B showed the highest DPPH radical sequestering and ferro-reducing capacity, respectively, in keeping with the content of total phenols and flavonoids in these extracts.

Conclusions: Results revealed the possible antioxidant effect of the species, which might be related to the presence of phenolic metabolites. *Clusia minor* could be a natural alternative for the development of new therapeutic agents.

Key words: *Clusia minor*, total phenol and flavonoid content, antioxidant capacity, DPPH, FRAP.

Entregado: 01-06-20

Aprobado: 06-11-20

Introducción

El género *Clusia* (Clusiaceae) abarca aproximadamente 250 especies y ha sido motivo de estudios a lo largo de los años debido a la diversidad de metabolitos que presenta con actividades biológicas de gran interés. Las benzofenonas, biflavonoides, terpenoides y esteroides son los principales metabolitos identificados en este género de plantas. Además, dentro de los esqueletos de estos compuestos constituye un elemento químico común la presencia de restos prenilados.^(1,2,3,4) En esta especie se han encontrado acciones farmacológicas tales como: actividad antiinflamatoria, antinociceptiva, antimicrobiana, antioxidante, insecticida, antitumoral y acción inhibitoria del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).^(3,5,6)

En los últimos años la actividad antioxidante ha despertado un gran interés científico en el área farmacológica. Esto se basa principalmente, en virtud de la capacidad potencial de ciertos compuestos de interferir en la evolución y desarrollo de enfermedades donde el estrés oxidativo se encuentra involucrado tales como arteriosclerosis, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, entre otras.⁽⁷⁾ Sin embargo, hasta el presente solo existe un estudio de la capacidad antioxidante de la especie *Clusia minor* L., donde todos estos extractos mostraron capacidad secuestradora del radical DPPH, y resultó el extracto E el más prometedor.⁽⁸⁾

Se describe por primera vez la cuantificación de fenoles y flavonoides en las hojas de la especie *Clusia minor* L. y continúa la evaluación de su actividad antioxidante.

Métodos

Recolección y procesamiento del material vegetal

Las hojas de la especie *Clusia minor* L. fueron recolectadas en los meses de septiembre-octubre del 2017 en el Jardín Botánico Nacional, La Habana, Cuba. La identificación botánica de la especie fue realizada por la Dr. C. Cristina Panfet. Una muestra del ejemplar se depositó en el herbario “Alejandro de Humboldt” de esta institución (HAJB 482). En el momento de la recolección la especie se encontraba en estado de fructificación. Las hojas se secaron en una estufa MLW MK-100 (China) a 35 °C y se trituraron en un molino MANESTI (China).

Proceso de extracción

Las hojas secas y molidas (485 g) de *Clusia minor* L. se maceraron sucesivamente con n-hexano (extracto A), acetato de etilo (extracto B) y metanol (extracto C), a temperatura ambiente por triplicado durante siete días cada uno. El extracto etanólico (extracto E) se obtuvo directamente con una metodología similar. Los extractos se concentraron a sequedad con un rotoevaporador (Büchi, RE 120, Suiza) a 40 °C.

Cuantificación de fenoles totales

Los compuestos fenólicos se cuantificaron de acuerdo al método descrito en la Farmacopea Británica⁽⁹⁾ tras usar el reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico. Las muestras se prepararon a las concentraciones de 5,45 mg/mL (extracto B), 10,65 mg/mL (extracto C) y 11,35 mg/mL (extracto E). Se tomaron 20 µL de cada muestra y se mezclaron con 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu, 300 µL de Na₂CO₃ 29 % y 1580 µL de agua destilada. La mezcla se agitó y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro marca Shimadzu UV-1201 (Japón). El contenido de polifenoles se calculó por curva de calibración utilizando diferentes concentraciones de ácido gálico como estándar (0,2-1,2 mg/mL) y se expresó como mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco del extracto (mg EAG/g). El patrón de referencia se preparó en el momento de usar a una concentración de 5 mg/mL protegido de la luz. Cada determinación se realizó por triplicado.

Cuantificación de flavonoides totales

El método utilizado fue una modificación al descrito por *Woisky y Salatino*.⁽¹⁰⁾ Como patrón de referencia se empleó la quercetina y para la elaboración de la curva de calibración se utilizaron concentraciones desde 0,00625 hasta 0,100 mg/mL. De la disolución estándar se tomaron 125 µL y los extractos se mezclaron con 375 µL de etanol 95 %, 25 µL de AlCl₃ 10 %, 25 µL de CH₃CO₂K 1 mol/L y 700 µL de agua destilada. La mezcla se incubó y se protegió de la luz durante 30 minutos. Luego, la absorbancia se midió a 415 nm en un espectrofotómetro marca Shimadzu UV-1201 (Japón). Como blanco se utilizó 825 µL de agua destilada y el resto de los reactivos utilizados en la técnica. El contenido de flavonoides totales se expresó como mg equivalentes de quercetina/g de extracto seco (mg EQ/g).

Actividad antioxidante

Capacidad secuestradora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo por cromatografía en capa delgada

Se utilizó como técnica de análisis cualitativo la CCD con placas precubiertas

de sílica gel G60 de 0,2 mm de espesor, preparadas industrialmente en soporte de aluminio. Se trabajó con los sistemas de disolventes hexano: acetato de etilo (7:3) y cloroformo: metanol (9:1). La aplicación se realizó a 1 cm del borde inferior y la corrida fue, aproximadamente, de 8 cm. La distancia entre cada aplicación fue entre 0,8 y 1 cm.

El revelado cromatográfico se realizó a la luz ultravioleta en una lámpara Espectroline a 254 y 365 nm, con la exposición a los vapores de yodo y con los reveladores sulfato de cerio IV y vainillina, ambos en ácido sulfúrico. Además, se emplearon tres sustancias de referencia: ácido gálico, quercetina y nemorosona. Se trabajó con una disolución de DPPH (0,05 %) en etanol y con tiempo máximo de espera de 60 minutos. La disolución se atomizó sobre la placa inmediatamente después que la misma se secó a temperatura ambiente, bajo la corriente de aire de la campana. Las placas fueron observadas a diferentes tiempos con el objetivo de apreciar si transcurrido el tiempo máximo aparecían nuevas manchas o se intensificaba la decoloración.

Determinación de la capacidad ferro-reductora

El ensayo se realizó siguiendo el procedimiento propuesto por *Benzie y Strain*⁽¹¹⁾. Se tomaron 40 mg de cada uno de los extractos secos (A, B, C y E) y se disolvieron en 1 mL de hexano, acetato de etilo, metanol y etanol, respectivamente. Para el ensayo se prepararon las muestras de cada extracto a concentraciones de 0,25; 0,5; 1; 2 y 4 mg/mL. Como sustancia de referencia se utilizó el ácido ascórbico (99 % pureza, Aldrich) en 10 mL de agua bidestilada a las concentraciones de 100, 200, 400, 800 y 1000 $\mu\text{mol/L}$, para obtener la curva patrón. Las lecturas para el ácido ascórbico y cada uno de los extractos se realizaron por triplicado a los 4 minutos a 590 nm. Los resultados se obtuvieron a partir del cálculo al interpolar la densidad óptica (D.O) de las muestras en la curva patrón correspondiente.

Análisis estadístico

El análisis y procesamiento de los datos se realizó con el empleo del programa estadístico GraphPad Prism, versión 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Los resultados se analizaron por la prueba de Kruskal-Wallis, con Dunn-Bonferroni *a posteriori*. Estos resultados se expresaron como las medias \pm desviación estándar (DE). Los valores probabilísticos (p) inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Cuantificación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales fue determinado para los extractos B, C y E. Para el extracto A no fue posible realizar esta determinación debido a que este disolvente apolar resulta inmisible en los disolventes utilizados para realizar el ensayo.

Los resultados del contenido de fenoles totales para cada extracto se presentan en la tabla 1. Los valores variaron en un rango entre 23,88 y 200,09 mg EAG/g de extracto. La mayor concentración de compuestos fenólicos se encontró en el extracto etanólico con un valor relativamente elevado según lo planteado en la literatura.⁽¹²⁾

Tabla 1. Contenido de fenoles totales en los extractos de las hojas de *C. minor* L.

Extractos	Contenido de fenoles totales (mg EAG/g extracto) \pm DE
B	140,04 \pm 0,80
C	23,88 \pm 0,33
E	200,09 \pm 0,83

Cuantificación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales fue determinado para todos los extractos, excepto el A, por las razones descritas anteriormente. En la tabla 2 se muestran las cantidades de flavonoides presentes en cada extracto analizado. En este caso, los valores obtenidos oscilaron entre 6,12 y 100,95 mg EQ/g extracto. Basado en estos valores, se pudo observar que el extracto de mediana polaridad (B) fue el que presentó el mayor contenido de estos metabolitos. Por su parte, los extractos C y E mostraron valores muy inferiores.

Tabla 2. Contenido de flavonoides totales en los extractos de las hojas de *C. minor* L.

Extractos	Contenido de flavonoides totales (mg EQ/g extracto) \pm DE
B	100,95 \pm 0,50
C	7,02 \pm 0,24
E	6,12 \pm 0,59

Capacidad secuestradora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo por cromatografía en capa delgada

La decoloración fue inmediata y el perfil cromatográfico permaneció aparentemente igual en todas las placas transcurrido el tiempo máximo de exposición.

En relación al extracto A, solo se observó cambio en la coloración en la mancha de mayor R_f (\sim 0,7-0,9) al emplear las dos fases móviles. Los extractos B y E presentaron un gran número de manchas amarillo-naranjas con una apreciable decoloración. Muchas de estas manchas coincidieron en ambos extractos e incluso con las sustancias de referencia.

Al emplear la fase móvil hexano: acetato de etilo (7:3) se destacaron en los extractos B y E, varias manchas con valores de R_f de 0,1; 0,6; 0,7 y 0,9. Además de estas manchas, en el extracto E se presentó una mancha con un R_f de 0,8. Las manchas de menor R_f (0,1) coincidieron con las observadas para el ácido gálico y la quercetina, mientras que las de mayor R_f (0,9) lo hicieron con la nemorosona. Por su parte, el extracto C solo presentó una mancha naranja en el punto de aplicación.

El empleo de la fase móvil cloroformo: metanol (9:1) mostró en el extracto B un mayor número de manchas y con una coloración naranja. El extracto E mostró manchas mucho más claras, fundamentalmente a menores valores de R_f . Las manchas de mayor valor de R_f (0,9-1) en estos extractos coincidieron en cuanto a la coloración y la apariencia. A diferencia de la fase móvil anterior, en este caso se pudo observar en el extracto C, además de la mancha naranja en el punto de aplicación, otra mancha con un R_f de 1 que mostró cierto grado de decoloración.

Determinación de la capacidad ferro-reductora

En la tabla 3 se muestra la capacidad antioxidante mediante el ensayo de FRAP asociada a los extractos evaluados.

Tabla 3. Capacidad ferro-reductora de los extractos de las hojas de *Clusia minor* L.

Concentración del extracto (mg/mL)	Capacidad ferro-reductora ($\mu\text{mol/L EAA} \pm \text{DE}$)			
	A	B	C	E
0,25	-67,67 \pm 17,50	307,89 \pm 21,86*	25,67 \pm 18,36*	202,33 \pm 20,82*
0,5	-48,78 \pm 15,00	312,33 \pm 20,09*	252,33 \pm 16,44	221,22 \pm 18,36*
1	-44,10 \pm 13,09	326,78 \pm 18,95*	295,67 \pm 18,36	224,56 \pm 25,02*
2	-41,00 \pm 13,50	331,22 \pm 12,02*	315,67 \pm 13,88	246,78 \pm 18,95*
4	61,22 \pm 18,15	345,67 \pm 9,62	317,89 \pm 20,28	254,56 \pm 18,95

*p<0,05 representa diferencias estadísticamente significativas entre los extractos a una misma concentración, según Kruskal Wallis y Dunn-Bonferroni *a posteriori*

Como se observa, el extracto A prácticamente no mostró actividad antioxidante, solo a la mayor concentración evaluada (4 mg/mL) se evidenció capacidad reductora de 61,22 $\mu\text{mol/L EAA}$. Los extractos B, C y E evidenciaron capacidad reductora del Fe^{3+} de manera concentración-dependiente desde 0,25-4,0 mg/mL. Se pudo apreciar que el extracto B presentó la mayor capacidad reductora del complejo Fe^{3+} -TPTZ con valores superiores a 300 $\mu\text{mol/L EAA}$ a todas las concentraciones ensayadas.

Discusión

Cuantificación de fenoles totales

Las diferencias observadas en el contenido de fenoles en los extractos, tomando en consideración que se trata de una misma especie y órgano vegetal, dependen fundamentalmente de la polaridad del disolvente de extracción utilizado en cada caso. La duración de la extracción, el método y la condición del material vegetal también pueden influir.⁽¹³⁾ Por tanto, resulta evidente que la metodología seleccionada para la obtención de los extractos influyó significativamente en los resultados y debe ser una de las causas de las diferencias observadas.

Para la extracción con cada disolvente fueron empleados el mismo material vegetal, método y duración del proceso. Sin embargo, a diferencia de los extractos A-C, la extracción con etanol se realizó directamente lo que permitió que en este extracto se concentraran una mayor variedad de metabolitos, muchos de los cuales deben estar contenidos también en los extractos B y C. A partir del análisis realizado anteriormente y comparando los resultados obtenidos para los extractos B y C se puede plantear que la polaridad no favoreció la extracción de este tipo de compuestos. El extracto de mediana polaridad (B) mostró resultados muy superiores con respecto al extracto metanólico (C), más polar.

Quantificación de flavonoides totales

La polaridad de los disolventes empleados en la preparación de un extracto determina la concentración de flavonoides en el mismo y permite identificar el tipo de flavonoide presente.⁽¹⁴⁾ Se conoce que, los flavonoides menos polares (isoflavonas, flavanonas, flavonas metiladas, flavonoles) son extraídos con cloroformo, diclorometano, dietiléter y acetato de etilo, mientras que los flavonoides glicosilados y los aglicones más polares son extraídos con alcoholes o mezclas hidroalcohólicas.⁽¹⁵⁾ A partir de este análisis y tomando en consideración los resultados obtenidos, se puede sugerir que en las hojas de la especie *C. minor* L. prevalecen los flavonoides menos polares y que los más polares se encuentran a muy bajas concentraciones.

Actividad antioxidante

Capacidad secuestradora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo por Cromatografía en Capa Delgada

La selección de esta técnica se basó en la rapidez, sencillez, flexibilidad y que no requiere de equipamiento especializado para su desarrollo.^(16,17) Además, permite sugerir la posible actividad secuestradora de radicales libres de los compuestos químicos presentes en los extractos analizados. Las sustancias de referencia empleadas se revelaron con un evidente color amarillo, lo cual avala la efectividad de la técnica desarrollada.

La coincidencia observada entre las manchas de las sustancias de referencias y algunas de los extractos al utilizar la fase móvil hexano: acetato de etilo (7:3), pudiera sugerir la presencia de este tipo de metabolitos en los extractos. Por su parte, las manchas amarillo-naranjas en los extractos B y E, al presentar una apreciable decoloración, revelaron su posible capacidad secuestradora de radicales libres. La presencia de la mancha naranja en el punto de aplicación en el extracto C, debido a su intensidad, pudiera indicar una ligera capacidad secuestradora de radicales libres en el mismo.

Se pudieron observar mayores diferencias en los diferentes extractos al emplear la fase móvil cloroformo: metanol (9:1). En este caso, se destaca la mayor decoloración en las manchas del extracto E que se puede asociar a la presencia de compuestos con una mayor actividad antioxidante.

Este ensayo de carácter cualitativo con el reactivo DPPH, permitió confirmar que tanto las sustancias de referencia como los extractos son capaces de secuestrar radicales libres. Los resultados obtenidos, excepto para el extracto C, se corresponden con lo informado por *Mangas* y otros,⁽⁸⁾ al evaluar la capacidad antioxidante de estos extractos por el método de DPPH. En el estudio realizado, el extracto A no mostró prácticamente presencia de sustancias antirradicalarias capaces de reducir al DPPH. Sin embargo, el resto de los extractos presentaron entre 70-85 % de inhibición, obteniéndose los mejores resultados para el extracto E y guardó mucha relación con el extracto B.

Si bien esta técnica analítica es de gran utilidad para predecir la actividad antioxidante, resulta difícil definir el extracto con mejor actividad, pues depende de las condiciones cromatográficas bajo las cuales se desarrolle, fundamentalmente de la selección de las fases móviles que permitan una buena separación de los principales metabolitos.

Determinación de la capacidad ferro-reductora

El resultado obtenido para el extracto A, posiblemente se puede atribuir, entre otros factores, a que el método implica la determinación del poder reductor de

los extractos bajo condiciones hidrofílicas. Consecuentemente, se presentó una solubilización limitada de este extracto, lo que pudo traer consigo una inadecuada lectura de los resultados al someter la muestra al espectrofotómetro.

Además, se evidenciaron que existían diferencias estadísticamente significativas entre los extractos B y E desde 0,25 - 2,0 mg/mL, al comparar los $\mu\text{mol/L}$ EAA de cada uno a una misma concentración. A su vez, el extracto C no presentó diferencias estadísticamente significativas con B y E a ninguna de las concentraciones evaluadas, excepto a 0,25 mg/mL. Sin embargo, el extracto B presentó mejor actividad antioxidante que el resto de los extractos evaluados por este método *in vitro*.

El extracto E fue el que mayor número de polifenoles presentó y el contenido de flavonoides fue muy bajo. Por su parte, el extracto B mostró el mayor contenido de flavonoides y su contenido de fenoles totales fue relativamente elevado. Además, presentó la mejor actividad ferro-reductora y una favorable capacidad secuestradora del radical DPPH.

Todos estos resultados evidenciaron que el extracto B fue el que presentó la mejor actividad antioxidante, a pesar de no ser el de mayor contenido de fenoles. Se conoce que la relación entre la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales puede ser explicada por varias vías. A esto se suma que el contenido de este tipo de metabolitos no incorpora a todos los antioxidantes.

Es conocido que la principal actividad que se le atribuye a los flavonoides es la antioxidante, la cual está relacionada con la posibilidad de estos compuestos de secuestrar especies reactivas de oxígeno,⁽¹⁸⁾ así como, de presentar capacidad ferro-reductora.⁽⁷⁾ Al comparar los valores obtenidos que demuestran la capacidad antioxidante de los extractos con la prevalencia de flavonoides, se pudo observar que existía coincidencia entre la capacidad reductora de Fe^{3+} y los niveles de estos compuestos en las muestras. Por lo que existe la posibilidad de que, en este caso, la actividad antioxidante manifestada sea

atribuida a la presencia de estos compuestos que actúen directamente reduciendo los radicales libres.

Los resultados sugieren que tanto los compuestos fenólicos como los flavonoides, contribuyen significativamente con la capacidad antioxidante de esta especie. Sin embargo, debido a la diversidad y complejidad de mezclas naturales de estos compuestos en la especie, no resulta fácil atribuirles la actividad antioxidante a ellos solamente.

Referencias bibliográficas

1. Oliveira R, de Carvalho MG, Sarmiento TM. Ocorrência de biflavonoides em Clusiaceae: Aspectos químicos e farmacológicos. *Quim. Nova* 2012[acceso: 4 octubre 2017];35(11):2271-7 Disponible en: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012001100035&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
2. Silva EM, Araújo RM, Freire Filha LG, Silveira ER, Lopes NP, de Paula JE, Braz Filhof R, Espindola LS. Clusiaxanthone and Tocotrienol Series from *Clusia pernambucensis* and their Antileishmanial Activity, *J Braz Chem Soc* 2013[acceso: 4 octubre 2017];24(8):1314-21. Disponible en: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532013000800012&lng=en&nrm=iso
3. Anholeti M, Duprat R, Figueredo M, Kaplan M, Guerra M, Gonzalez M, Ratcliffe N, Feder D, Paiva S, Mello C. Biocontrol evaluation of extracts and a major component, clusianone, from *Clusia fluminensis* Planch & Triana against *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)* 2015[acceso: 4 octubre 2017];110(5):629-635. Disponible en: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000500629&lng=en&tlng=en
4. da Silva AC, Agra MF, Conceição DCO, Pinto FCT, Camara CA, Silva TMS. Constituintes Químicos e Atividade Antioxidante das Partes Aéreas de *Clusia*

paralicola (Clusiaceae) e *Vismia guianensis* (Hypericaceae). Revista Virtual de Química 2016[acceso: 4 octubre 2017];8(1):157-168. Disponible en: <http://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/1482/717>

5. Ribeiro PR, Ferraz CG, Guedes ML, Martins D, Cruz FG. A new biphenyl and antimicrobial activity of extracts and compounds from *Clusia burllemarxii*. Fitoterapia 2011[acceso: 10 octubre 2017];82(8):1237-40. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X11002127?via%3Dihub>

6. Nunes S, Da-Silva JP, Conserva LM y Barreto E. Leaf extract from *Clusia nemorosa* induces an antinociceptive effect in mice via a mechanism that is adrenergic systems dependent. Chinese Journal of Natural Medicines 2013[acceso: 14 octubre 2017];11(4):385-90. Disponible en: <http://www.cjnmcpu.com/fileZGTRYW/journal/article/cjnm/2013/4/PDF/20130408.pdf>

7. Coronado M, Vega S, Gutiérrez R, Vázquez M y Radilla C. Antioxidants: present perspective for the human health. Rev Chil Nutr 2015[acceso: 4 octubre 2017];42(2):206-12. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182015000200014

8. Mangas M, Montes de Oca R, Herrera ME, Bello A, Hernández I, Menéndez R, Paz MT, Rodeiro I. GC/MS Analysis and Bioactive Properties of Extracts Obtained from *Clusia minor* L. Leaves. J Mex Chem Soc 2018[acceso: 4 octubre 2017];62(4):762-75. Disponible en: <https://www.jmcs.org.mx/index.php/jmcs/article/view/544/551>

9. Office Stationery and Commission British Pharmacopoeia. British Pharmacopoeia 2010 (Stationery Office) 2009[acceso: 8 octubre 2017]. Disponible en: <https://www.pharmacopoeia.com/the-british-pharmacopoeia>

10. Woisky R, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. J Apic Res 1998[acceso: 8 octubre 2017];37(2):99-105. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/279899175_Analysis_of_Propolis_S

ome Parameters and Procedures for Chemical Quality Control

11. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996[acceso: 10 octubre 2017];239(1):70-6. Disponible en:

https://pdfs.semanticscholar.org/cbfe/ac924b3835569bbb0b1182336e2c196ab5b0.pdf?_ga=2.103631554.310092858.1614898151-1372179756.1614898151

12. Stankovic MS, Niciforovic N, Topuzovic M y Solujic S. Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from *Teucrium montanum* L. *Biotechnol. & Biotechnol* 2011[acceso: 10 octubre 2017];25(1):2222-7. Disponible en:

<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.5504/BBEQ.2011.0020?needAccess=true>

13. Shin J, Nawaz H, Phorly J, Mittal G, Kakuda Y, Jiang Y. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods-engineering and technology. *Food Rev Int* 2005[acceso: 4 octubre 2017];21(1):139-66. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/FRI-200040606>

14. Min G, Chun-Zhao L. Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World Microbiol Biotechnol* 2005[acceso: 4 octubre 2017];21(8-9):1461-3. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/225511865_Comparison_of_Techniques_for_the_Extraction_of_Flavonoids_from_Cultured_Cells_of_Saussurea_medusa_Maxim

15. Marston A, Hostettmann K. Flavonoids- Chemistry, Biochemistry and Applications. Taylor & Francis Group, London 2006[acceso: 4 octubre 2017];45(41):6786-7. Disponible en:

https://books.google.com.cu/books?hl=es&lr=&id=w3vLBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Flavonoids-+Chemistry,+Biochemistry+and+Applications.&ots=OFsPz0R2Wy&sig=uNlsM0pRNNqqCo4txsTxTzZ9U6s&redir_esc=y#v=onepage&q=Flavonoids-%20Chemistry%20Biochemistry%20and%20Applications.&f=false

16. Cimpoiu DC. Analysis of some natural antioxidants by thin-layer

chromatography and high performance thin-layer chromatography. J Liq Chromatogr RT 2006[acceso: 4 octubre 2017];7(8):1125-42. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/244594877_Analysis_of_Some_Natural_Antioxidants_by_Thin-Layer_Chromatography_and_High_Performance_Thin-Layer_Chromatography

17. Olech M, Komsta Ł, Nowak R, Cieśla Ł, Waksmundzka Hajnos M. Investigation of antiradical activity of plant material by thin-layer chromatography with image processing. Food Chem 2012[acceso: 8 octubre 2017];132(1):549-53. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814611015202?via%3Dihub>

18. Sadik CD, Sies H, Schewe T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. Biochem Pharmacol 2003[acceso: 8 octubre 2017];65(5):773-81. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006295202016210>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Lorena Moreno León: Desarrollo de la fase experimental, redacción y revisión del artículo científico.

José Carlos Leyva García: Desarrollo de la fase experimental, redacción y revisión artículo científico.

Cindel Cuéllar Duarte: Determinación de la capacidad ferro-reductora.

Kethia González García: Determinación del contenido de fenoles y flavonoides totales.

Idania Rodeiro Guerra: Interpretación de los resultados.

Raisa Mangas Marín: Desarrollo de la fase experimental, interpretación de los resultados, redacción y revisión del artículo científico.