

VALIDACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE CITRUS AURANTIUM EN TABASCO, MÉXICO

VALIDATION OF THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF CITRUS AURANTIUM IN TABASCO, MEXICO

E.C. Villarreal_Ibarra¹ ; M.T Cadenas-González^{1,2} ; F Méndez-Morales^{1,2} ; G.I Bolio-López¹ ; M.M Hernández-Villegas¹ ; N.E Rivera-Torres¹ ; D. Almenares-López^{1*} ; C Rivas Morales³ .

1. Universidad Popular de la Chontalpa, México.
2. Centro de Tecnología Avanzada (CIATEQ, A.C.), Tabasco, México.
3. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

*Autor de correspondencia: D. Almenares-López, email: damianys.almenares@upch.mx

Información del artículo:

Artículo original

DOI: <https://doi.org/10.33975/riug.vol35n1.1157>

Recibido: 6 marzo 2023; Aceptado: 19 abril 2023

RESUMEN

Citrus aurantium L. (Rutaceae), comúnmente conocida como naranja amarga, posee múltiples potenciales terapéuticos. Se realizó un estudio cualitativo experimental con el objetivo de conocer las características del consumo de *C. aurantium* (CA) en población tabasqueña. Para validar su uso, se preparó un extracto etanólico (85 %) de las hojas secas de CA y se realizó el tamizaje fitoquímico, con posterior cuantificación del contenido de fenoles y flavonoides totales. Posteriormente se determinó actividad antioxidante por el ensayo DPPH y toxicidad aguda con *Artemia Salina*. Las partes más empleadas de la planta son las hojas para aliviar dolores musculares, síntomas de resfriados. En el estudio fitoquímico se encontraron que el extracto contiene alcaloides, flavonoides, cumarinas, quinonas y taninos. En la cromatografía de capa fina del extracto hidroalcohólico se demostró la presencia de la naringina. Se obtuvo un contenido de fenoles totales de 69.42 ± 3.47 EAG/g MS y de flavonoides totales de 14.78 ± 0.28 EQ/g MS. Contiene actividad antioxidante de $9240 \pm$ nmol TEAC/gMS y el ensayo de toxicidad aguda demostró una toxicidad moderada. Los resultados evidencian que el extracto etanólico al 85 % contiene compuestos fenólicos y flavonoides, permitiendo sostener las propiedades medicinales y farmacológicas conferidas a la planta en el estado de Tabasco.

Palabras clave: *Citrus aurantium*; antioxidante; fenoles; flavonoides; toxicidad aguda.

Cómo citar: Villarreal_Ibarra, E.C., Cadenas-González, M., Méndez- Morales, F., Bolio-López, G.I., Hernández-Villegas, M.M., Rivera-Torres, N.E., Almenares-López, D., & Rivas Morales, C. (2023). Validación del potencial antioxidante de *Citrus aurantium* en Tabasco, México. *Revista de Investigaciones Universidad del Quindío*, 35(1), 248-259. <https://doi.org/10.33975/riug.vol35n1.1157>

ISSN: 1794-631X e-ISSN: 2500-5782

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional.



ABSTRACT

Citrus aurantium L. (Rutaceae), commonly known as bitter orange, has multiple therapeutic potentials. An experimental qualitative study was carried out with the objective of knowing the characteristics of the consumption of *C. aurantium* (CA) in the Tabasco population. To validate its use, an ethanolic extract (85 %) was prepared from the dry CA leaves and phytochemical screening was performed, with subsequent quantification of the content of total phenols and flavonoids. Subsequently, antioxidant activity was determined by the DPPH assay and acute toxicity with *Artemia salina*. The most used parts of the plant are the leaves to relieve muscle pain, cold symptoms. In the phytochemical study it was found that the extract contains alkaloids, flavonoids, coumarins, quinones and tannins. In the thin layer chromatography of the hydroalcoholic extract, the presence of naringin was demonstrated. A total phenol content of 69.42 ± 3.47 EAG/g DM and total flavonoids of 14.78 ± 0.28 EQ/g DM were obtained. It contains antioxidant activity of $9240 \pm$ nmol TEAC/gMS and the acute toxicity test showed moderate toxicity. The results show that the 85% ethanolic extract contains phenolic compounds and flavonoids, allowing to sustain the medicinal and pharmacological properties conferred to the plant in the state of Tabasco. Conclusions: this study showed the existence of phenols and flavonoids, the antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *C. aurantium* leaves and their moderate toxicity against *Artemia salina*.

Keywords: *Citrus aurantium*; antioxidant; phenol; flavonoids; acute toxicity.

INTRODUCCIÓN

La comercialización y el uso de plantas medicinales, así como el desarrollo de investigaciones alrededor de las mismas, es un tema vigente en México, lo cual demuestra la permanencia de esta práctica cultural y pone de manifiesto la revalorización del conocimiento tradicional para tratar diversos problemas de salud (Monroy et al., 2007). En particular, Tabasco es una zona rica en recursos naturales y de abundante producción de plantas, lo que permite crear gran variedad de productos a partir de las mismas, y de esta manera, aprovechar los recursos naturales e impulsar la agroindustria. Una muestra de ello es que, desde hace varios años, se ha estado trabajando en varios municipios del estado, en la recuperación del conocimiento de las plantas medicinales (Magaña et al., 2010).

Las plantas medicinales que se emplean para el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas han cobrado especial importancia, debido a su accesibilidad y bajo costo.

El organismo humano dispone de mecanismos de defensa antioxidante frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Halliwell et al., 1990); pero en ciertas situaciones, estas defensas no son suficientes y el desequilibrio entre ellos pueden conducir a modificaciones químicas de macromoléculas, que producen daño oxidativo biológicamente relevante. Lo anterior, proporciona un mecanismo lógico para el inicio y desarrollo de varios estados patológicos (Diplock et al., 1998). Entre ellas, varias enfermedades crónicas degenerativas han sido relacionadas con daño oxidativo, como la enfermedad cardiovascular (Berliner y Heinecke, 1996), el cáncer (Bagchi et al., 2000; Diplock et al., 1998), y la alteración de la visión (Dean et al., 1997; Taylor et al., 1993), etc. Se ha reportado que, la ingesta de alimentos ricos en sustancias antioxidantes como vitaminas C y E, carotenoides o compuestos fenólicos, previene o disminuye el desarrollo de estas enfermedades (Dai and Mumper, 2010).

La naranja amarga (*Citrus aurantium*), del género *Citrus*, perteneciente a la familia Rutáceas, es un árbol pequeño, verde y espinoso que crece en zonas tropicales y subtropicales, con una alta presencia en el estado de Tabasco. Sus hojas tienen un limbo ovalado con bordes enteros muy olorosos de color verde; sus flores son blancas y muy fragantes; su fruto es esférico y de piel gruesa, lo que permite proteger la parte comestible y jugosa (Jyotsna y Saonere, 2011).

Los cítricos deben su actividad biológica, en gran medida, a la presencia de fenoles. Dentro de las propiedades biológicas atribuidas a estos compuestos, se encuentran: la inhibición de la agregación plaquetaria, acción vasorrelajante, antiinflamatorios y anticancerígenos, hepatoprotectores y antimicrobianos (Fernández et al., 2006). Entre los fenoles, los flavonoides constituyen potentes antioxidantes (Ojito et al., 2012). La presencia de metabolitos antioxidantes en la naranja agria pudieran justificar su empleo en el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas no transmisibles en la región.

El estudio de las plantas medicinales debe tener en cuenta tanto aspectos botánicos como culturales, gracias a los cuales, se han acumulado estos conocimientos. En México, algunas universidades y el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) realizan labores de investigación sobre plantas medicinales, aunque se requiere un mayor esfuerzo para complementar con terapéuticas consensadas por la propia población, de manera que el paciente y el médico tengan más de una alternativa para procurar la salud (OMS, 2002). Es por este motivo que, en el presente estudio, por una parte, evaluamos el uso de *C. aurantium* por la población tabasqueña y por otro, se realizó la identificación de metabolitos secundarios mediante pruebas químicas y caracterización por Cromatografía en capa fina (CCF) con compuestos de referencia, además de la cuantificación de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de naranja agria cultivada en el sureste mexicano, y determinar la actividad antioxidante *in vitro* y la toxicidad frente a *Artemia salina* de extractos de hojas. Los resultados permitirán obtener evidencias para ejecutar investigaciones posteriores para el uso racional de las plantas medicinales en la población mexicana. Lo anterior facilitará la asociación entre la experiencia de la tradición y el conocimiento científico, con el propósito de desarrollar un producto farmacológico con actividad biológica demostrada, de poca toxicidad y bajo costo de producción.

MATERIALES Y METODOS

Área de estudio. La colecta se realizó en la comunidad Paso de la Mina, Barrial Tercera Sección, en el municipio de Huimanguillo de la región de la Chontalpa en el estado de Tabasco, México. Se ubica en las coordenadas 17° 57' 48.1" de latitud norte 93° 39' 57" de longitud oeste, con una altitud de 6 m sobre el nivel del mar. La comunidad se caracteriza por tener un clima cálido húmedo con lluvias todo el año, característico de la selva alta perennifolia, donde la temperatura varía entre 25.4°C y 26.9°C.

Muestras

La colecta del material vegetal (hojas) se realizó en noviembre del 2018, considerando el período de mayor floración y fructificación de *C. aurantium* (naranja agria) (Ochoa-Gaona et al., 2002). La identificación taxonómica de la planta fue confirmada por la Dra. Eustolia García López del Colegio de Posgraduados, H. Cárdenas, Tabasco y, se ha depositado un ejemplar comprobante en el herbario

departamental. El secado se realizó a la sombra durante 21 días a temperatura ambiente en un cuarto oscuro y bien ventilado a una temperatura y humedad promedio de 30°C y 60% respectivamente.

Para el desarrollo de datos sobre hábitos de consumo de la naranja amarga, se realizó un cuestionario semiestructurado de 12 preguntas a 100 personas de edades entre los 45-70 años, seleccionadas aleatoriamente en los Municipios de Huimanguillo y Cárdenas.

Preparación del extracto

Para la obtención del extracto se utilizaron 5 g de Hojas secas de CA. Se realizó maceración sucesiva del fármaco con etanol (Marca Merk) al 85% a razón de un gramo por cada diez volúmenes de solvente en matraz Erlenmeyer, previamente tapado con papel de aluminio y colocado en agitador marca IKA; modelo KS 260 Basic durante 7 días a temperatura ambiente para su posterior filtración. Posteriormente, se concentraron mediante un Rotavapor Modelo R52 a 40 °C.

Tamizaje fitoquímico.

El extracto crudo de las hojas de *C. aurantium*, se sometió a diversas pruebas químicas para identificar la presencia de familias de metabolitos secundarios. Se inició con la caracterización mediante reacciones coloridas por duplicado. Para lograr la identificación de metabolitos secundarios del grupo de alcaloides (Dragendorff y Mayer), flavonoides (Prueba de Shinoda), saponinas, taninos, quinonas y esteroides se realizaron las pruebas en el laboratorio de Química Analítica en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Plazas, 2015).

Caracterización de flavonoides por Cromatografía en capa fina (CCF).

Se empleó como fase estacionaria una placa de sílica gel GF 254. Se utilizó Naringina comercial como estándar de referencia. Se utilizaron diferentes fases móviles para la identificación de los flavonoides. Para rutina se utilizaron las siguientes fases móviles: Acetato de etilo, metanol, ácido acético (7:3:1), para Quercetina: Diclorometano, Acetato de etilo, ácido Fórmico (7:3:1), y para la Naringina: metanol, acetona (95:5). Como revelador se utilizó cloruro férrico al 1% en 1-butanol.

Contenido fenólico total

El contenido de fenoles totales en el extracto etanólico de *C. aurantium* se determinó mediante la prueba de Folin-Ciocalteu con ligeras modificaciones (Hernandez, et al., 2021). La absorbancia se midió con un espectrofotómetro UV-Vis a 760 nm. La curva de calibración se preparó utilizando ácido gálico acuoso (> 99 %; número de registro CAS 5995-86-8) con 0,02-0,1 mg/mL, obteniendo un R² de 0,999. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE)/g MS. Cada muestra se hizo por triplicado. La curva de calibración de ácido gálico muestra que el método es lineal en concentraciones que van de 0-800 mg/mL con una curva $y = 0.0026x + 0.0648$.

Contenido total de flavonoides

El contenido total de flavonoides se midió utilizando el método colorimétrico de cloruro de aluminio (Hernández et al., 2021) y estándar de dihidrato de quercetina (>98 %; número de registro CAS 6151-25-3). La absorbancia se determinó a 510 nm. Los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de quercetina (QE)/g MS. Todas las muestras se realizaron por triplicado. $y = 0.0193x + 0.0922$ $R^2 = 0.9924$.

Actividad antioxidante

Ensayo de decoloración del catión radical (DPPH):

Se determina mediante la medición del grado de decoloración que provoca el extracto en una solución metanólica de DPPH (a-a-difenil-β-picrilhidrazilo) mediante el método de Brand-Williams (1995) con algunas modificaciones. Se preparó una solución madre de DPPH aproximadamente 20 mg/L del radical en metanol, 990 μL de esta solución se mezclaron con 10 mL de solución de extracto. Se preparó un blanco de muestra que contenía 990 μL MeOH con 10 mL de muestra y un blanco de referencia con 990 μL DPPH y 10 mL de solvente. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad y se midió la absorbancia a 517 nm. Los resultados se expresaron como valores TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) mediante la construcción de una curva patrón usando como antioxidante TROLOX®.

Ensayo de letalidad sobre *Artemia salina*.

Se preparó agua de mar artificial (Instant Ocean-Sea Salt) utilizando 20 g de sal de mar y disueltos en 500 mL de agua destilada a pH 7.8. Previo a la realización del ensayo, el agua de mar artificial fue acondicionada suministrando aire mediante una bomba para acuario por 24 h. Para la eclosión de los nauplios de *A. salina*, se adecuó un recipiente de vidrio rectangular, el cual consta de un área oscura en donde se incuban los quistes y dos áreas iluminadas que permiten mediante fototropismo obtener solo nauplios eclosionados. Transcurrido un periodo de incubación de 48 h bajo condiciones de temperatura ambiente (23-25 °C) aireación y luz constante, se procedió a llevar a cabo el ensayo utilizando microplacas estériles de 96 pozos (Costar, Corning, NY, USA), en los cuales se depositaron en un volumen final de 100 μL por pozo 10 nauplios y 10 μL en concentraciones de 10, 100 y 1000 μg/ml del extracto de *C. aurantium*. Se utilizó dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) al 5 % como control positivo y agua de mar como control negativo (McLaughlin, 1991). La microplaca fue incubada por 24 h bajo las condiciones antes mencionadas. Posteriormente, utilizando un estereoscopio, se realizó el conteo de nauplios muertos en cada pozo de la microplaca (Déciga et al., 2007). El ensayo fue realizado por triplicado y se determina la CL₅₀ mediante el método estadístico Probits. El grado de toxicidad de un extracto se precisa en función del valor de su CL₅₀ tomando en cuenta el siguiente criterio: 0 – 100 μg/mL alta, 100 - 500 μg/mL moderada, 500 - 1000 μg/mL ligera y un valor superior a 1000 μg/mL no tóxico (Syahmi et al., 2010).

Análisis estadístico. Los datos obtenidos fueron tabulados y almacenados en bases de datos confeccionadas en Origin Pro 2018. Se determinó la Media ± Desviación estándar de cada variable estudiada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1-Formas de consumo de *C.aurantium* en población tabasqueña

Con el objetivo de conocer las formas de consumo de *C. aurantium*, se realizó una encuesta a 100 personas con edades entre 45-70 años, seleccionadas aleatoriamente en los Municipios de Huimanguillo y Cárdenas. Se reporta que la parte más empleada de la planta fue la hoja con el 70 %, seguido del jugo con el 17% (Figura 1).

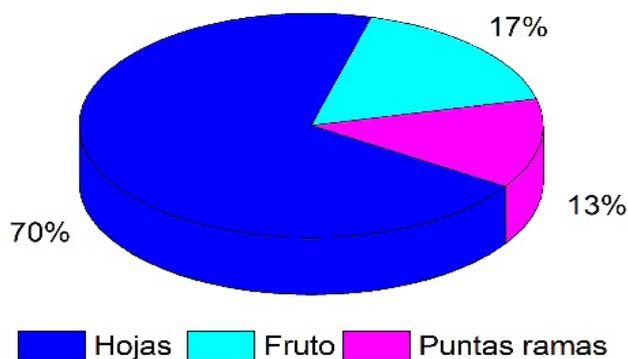


Figura 1. Partes de la planta empleada en la población encuestada

Con respecto a la forma de consumo, con fines terapéutico, se encontró que, el 58% utilizan las hojas como té o infusiones, el 24% realizan baños de tina; que le brinda efectos de relajamiento aliviando dolores musculares y síntomas de resfriados (Figura 2).

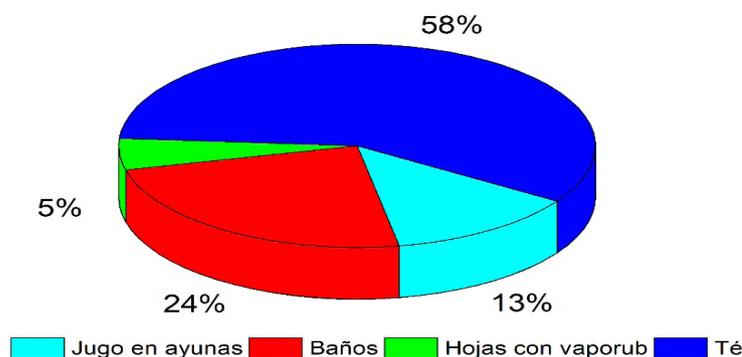


Figura 2. Formas de consumo de *C. aurantium* en población encuestada

Mientras que, el 32 % reportan que lo han empleado para disminuir los niveles de colesterol en sangre y el 20% lo ha empleado para bajar la fiebre y otro 20 % para eliminar inflamación y, solo el 1% lo emplea para disminuir el estrés (Figura 3).

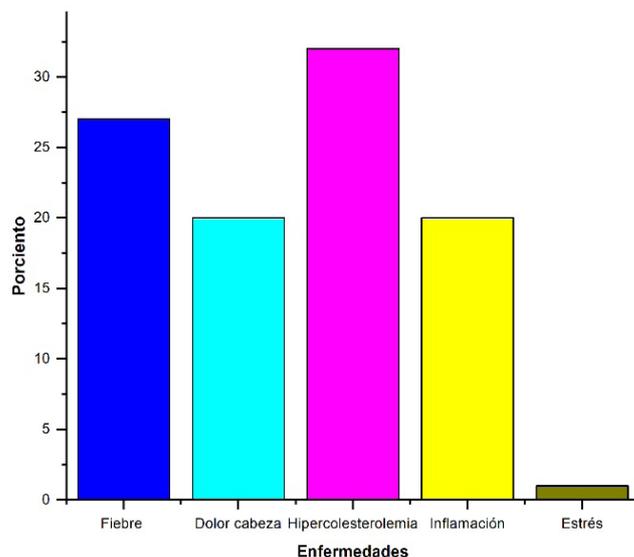


Figura 3. Enfermedades causales de uso de *C.aurantium* en la población encuestada

Citrus aurantium L. (Rutaceae), posee múltiples potenciales terapéuticos. Dentro de sus propiedades, se incluyen actividades anticancerígenas, ansiolíticas, antiobesidad, antibacterianas, antioxidantes, plaguicidas y antidiabéticas. Dentro de los metabolitos secundarios de esta planta se encuentran, los flavonoides, como la naringina y alcaloides como la p-sinefrina. Recientemente, se han realizado varios estudios científicos que investigan los efectos potenciales de varias partes de la planta, incluyendo flores, frutas y aceites esenciales (Suntar et al., 2018). Es necesario señalar que, en la medicina tradicional china desde hace cientos de años, la cáscara y/o la fruta de *C. aurantium* (naranja amarga) se ha utilizado para el tratamiento de; indigestión, diarrea y disentería, estreñimiento y como expectorante. Mientras que, en la medicina popular sudamericana se ha empleado para tratar el insomnio, la ansiedad y la epilepsia (Pimenta et al., 2016). En México, se ha empleado principalmente como condimento y para el tratamiento de algunas enfermedades.

Un estudio previo realizado en Nacajuca, Tabasco, reportó que las hojas y las ramas son las partes de las plantas medicinales más usadas (Magaña, 2010). Contrario a lo que reportan Hurtado et al. (2006) en Michoacán; quienes encontraron que las ramas son la parte más usada de las plantas medicinales. Desde 1983, se ha planteado que, en las hojas se encuentra una alta concentración de metabolitos secundarios, porque en ellas es donde se llevan a cabo la mayoría de las funciones de las plantas que después serán distribuidas al resto de la misma (Ojito et al., 2012).

2-Tamizaje fitoquímico preliminar

El tamizaje fitoquímico de las hojas de *C. aurantium*, destacó la presencia de esteroides, taninos, antrona, carboxilo, alcaloides y flavonoides (Tabla 1).

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico extracto etanólico de hojas de *Citrus aurantium*.

Prueba	Resultados	Prueba	Resultados
Insaturaciones	+	Shinoda	+
Grupo Carbonilo	-	Saponinas	-
Esteroles o miniesteroles	+	Taninos	+
Cumarinas	-	Antrona	+
Quinona	-	Carboxilo	+
Alcaloides	+	Flavonoides	+

+ significa que se obtuvo una respuesta positiva para ese metabolito; - indica respuesta negativa

La cromatografía de capa fina en el extracto hidroalcohólico demostró la presencia de naringina que coincide con el estándar de Naringina comercial con un $R_f=0.80$. Al aplicar Sulfato férrico al 1% la mancha permaneció y tomo un color marrón oscuro, esto indica la presencia de la flavonona. No se observa la presencia de rutina y Quercetina.

El tamizaje fitoquímico de las hojas de *C. aurantium*, indica la presencia de esteroides, Shinoda, Taninos, antrona, carboxilo, alcaloides, consistente con lo encontrado por Ojitos y colaboradores (2012), quienes reportan presencia de quinonas, aminoácidos, taninos, fenoles, flavonoides dihidroflavonoles y aminas, en extractos preparados con etanol al 70%. Además, Suntar y col. (2018), realizaron una revisión sobre las funciones de esta planta y reportan que, la composición química incluye vitaminas, minerales, compuestos fenólicos y terpenoides. Otros autores también han encontrado diferentes flavonas, flavonas polimetoxiladas, flavonoles y flavanonas en las hojas de varias especies de cítricos con actividad antioxidante, por lo que se considera que dicha actividad pudiera estar mediada por esos compuestos (Djoukeng et al., 208; Kawaii et al., 2000). Escobar y colaboradores en el 2010 indicaron por la técnica de HPLC la presencia de naringina como componente mayoritario en la cáscara de *C. aurantium*.

Cuantificación de fenoles y flavonoides.

En la Tabla 2 se muestran los datos de la concentración de fenoles totales equivalente a ácido gálico en los extractos de *C. aurantium*, y la concentración de flavonoides totales en equivalentes de quercetina. Se obtuvo para la muestra de estudio una concentración de fenol equivalentes a ácido gálico por gramo de masa seca (EAG/g MS) de 69.42 ± 3.47 EAG/g MS y de flavonoides de 14.78 ± 0.28 EQ/g MS.

Tabla 2. Contenido de fenoles totales, flavonoides totales, actividad antioxidante y toxicidad aguda del extracto etanólico de las hojas de citrus aurantium

C.AURANTIUM	FENOLES TOTALES EAG/G MS	FLAVONOIDES TOTALES EQ/G MS	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DDPH NMOL TEAC/GMS	TOXICIDAD AGUDA CL50 UG/ML
Extracto etanólico 85%	69.42 ± 3.47	14.78 ± 0.28	9240 ± 1038	965

Resultados expresados como Promedio \pm desviación estándar TEAC-Capacidad antioxidante equivalente a Trolox, EAG/g MS- Equivalentes ácido gálico, EQ/g MS.-Equivalentes a quercetina, CL50 concentración letal 50%.

Las hojas de la naranja agria son consideradas una fuente con alto contenido fenólico. Varios estudios han determinado el contenido de fenoles en los extractos y en todos los casos los resultados han sido diferentes. Dicha diferencia cuantitativa se ha mostrado entre diferentes órganos y en diferentes poblaciones de una misma planta, explicado por la regulación de la expresión génica y la interacción con factores ambientales como el clima, la altitud, nutrición y diferentes prácticas agrícolas (Winkel-Shirley, 2002). Ojitos et al., (2012), en Cuba, demostró como resultado 31 ± 2.8 mg/mL concentraciones de fenoles equivalentes a ácido gálico mg/mL en hojas de CA. Otros estudios realizados por Escobar et al., (2010) reportaron 1.68 ± 0.06 g (GAE/100g base húmeda) y 7.84 ± 0.27 g (GAE/100g base seca) en concentraciones de fenoles en extractos etanólicos de las cáscaras de *C. aurantium*.

Los flavonoides específicos de *C. aurantium*, al ser evaluados de manera independiente, han demostrado un efecto reductor de la concentración de glucosa y colesterol en sangre (Figueroa-Valverde et al., 2009). Ojitos y colaboradores (2012) reportan una concentración de flavonoides de 4.89 ± 2.88 mg/mL en el extracto etanólico y 4.29 ± 0.21 mg/mL en extractos metanólicos. Los flavonoides como la naringina y la hesperidina están ampliamente distribuidos en las especies de Citrus y se sabe que exhiben efectos antioxidantes, antiinflamatorios, hepatoprotectores, antineoplásicos, termogénicos y lipolíticos (Stohs et al., 2011). Actividad antioxidante.

3-Actividad antioxidante

En la tabla 2 se observa que, el extracto de las hojas de *C. aurantium* presentó actividad de decoloración del radical DPPH, de $9240 \pm 1038,35$ nmol TEAC/gMS. Los radicales libres se asocian principalmente con el estrés oxidativo y constituyen una amenaza potencial por el daño que pueden causar cuando se combinan con el ADN, las proteínas, y la membrana celular. Por lo que, es muy importante la eliminación de dichos radicales (Archana y Gupta, 2020). Los antioxidantes son sustancias químicas neutralizantes que minimizan el daño oxidativo a los procesos biológicos (Shantabi et al., 2014). Se han propuesto varias técnicas para el análisis antioxidante como; los ensayos de ABTS \cdot^+ , FRAP, DPPH y más recientemente el ensayo Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC). Sin embargo, aún no existe un método universal que pueda determinar esta capacidad total cuantitativamente (Guimarães et al., 2010). En este estudio, empleamos el ensayo DDPH debido a su facilidad de uso y accesibilidad. Dicha prueba, se basa en la eliminación de DPPH, un radical libre estabilizado (Dhar et al., 2013).

En este sentido, los compuestos fenólicos son importantes antioxidantes en la dieta, porque su estructura les permite la eliminación de radicales libres, y han demostrado ser más eficaces antioxidantes in vitro que las vitaminas E y C. Nuestros hallazgos sugirieron que las hojas *C. aurantium*, rica en antioxidantes como fenoles y flavonoides que son los principales contribuyentes a la recolección los radicales libres en las vías de oxidación, puede justificar su uso por la población tabasqueña.

Se ha observado que la capacidad de captura de radicales DPPH depende de la concentración de flavonoides presentes en el extracto. Esta afirmación fue demostrada con las cáscaras de *C. aurantium* (Díaz et al., 2016). La Presencia de flavonoides en *C. aurantium* podría contribuir a la eliminación de radicales libres (Chang et al., 2007).

La capacidad de atrapar radicales libres de extractos obtenidos a partir de frutos de diferentes especies

de cítricos ha sido demostrada por varios autores (Patil, 2009), no así en extractos obtenidos a partir de hojas. Varios estudios han demostrado una relación lineal entre el contenido de fenoles totales y la alta actividad antioxidante (Escobar, 2010). Sin embargo, Ghafar y col. (2010) encontraron correlaciones negativas entre estas variables.

En este estudio, se demuestra la capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *C. aurantium*. Estos resultados demuestran el potencial de dicho extracto para su empleo como antioxidante. Sin embargo, es necesario realizar estudios de estabilidad, formulación química, así como la evaluación de la toxicidad y seguridad del extracto tanto in vivo como in vitro en modelos biológicos para proponer su uso como producto farmacológico.

4-Toxicidad *Artemia salina*

El ensayo de letalidad con *A. salina* demostró que la toxicidad del extracto fue dependiente de la concentración, no siendo tóxico a concentraciones menores que 10 µg/mL, sin embargo, mostró toxicidad moderada a concentraciones entre 100 y 1 000 µg/mL. En la tabla 2 se muestra una CL50 del extracto etanólico 85% de 925 µg/ml.

Para validar el uso de las plantas en la medicina tradicional, y garantizar un tratamiento seguro, es necesaria la evaluación de su toxicidad (Nguta, 2012). El ensayo de letalidad sobre *A. salina* es utilizado para determinar toxicidad aguda, de manera; confiable, de bajo costo, sencilla y rápida. Para el extracto en estudio se obtuvo una CL50 925 µg/mL, considerado como moderadamente tóxico. Estos resultados, aunque superiores, muestran similitud con los de Ojitos y col. (2012), quienes reportan una CL50 de 464,24 µg/mL. Los estudios de evaluación de la toxicidad aguda en extractos provenientes de cítricos, son escasos. Un estudio previo, se evaluó la toxicidad aguda del extracto de la cáscara de *C. aurantium*. En dicho estudio se compararon los resultados con resultados de toxicidad en ratones y mostraron una buena correlación con el ensayo de letalidad en *Artemia salina*, demostrando la fiabilidad de este método (Lagarto, et al., 2001).

CONCLUSIONES

Las partes más empleadas de *C. aurantium* en los municipios de Cárdenas y Huimanguillo son las hojas, utilizadas en té e infusiones para relajamiento, dolores musculares y síntomas de resfriados. Con la caracterización fitoquímica del extracto hidroalcohólico mediante pruebas básicas, se encontraron metabolitos secundarios presentes en las hojas como son: cumarinas, quinonas, taninos, alcaloides y flavonoides. La presencia de flavonoides en el extracto hidroalcohólico se demostró por cromatografía de capa fina reportando la presencia de la naringina. El contenido de fenoles totales y flavonoides totales demostró una concentración de fenol de 69.42 ± 3.47 EAG/g MS y el contenido de flavonoides de 14.78 ± 0.28 EQ/gMS. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *C. aurantium* confirmó la actividad antioxidante sobre el radical DPPH y toxicidad moderada en el ensayo de *A. salina*. Estas actividades respaldan, para esta planta, futuros estudios en el desarrollo y descubrimiento de nuevas sustancias antioxidantes naturales.

Conflicto de interés: Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

Contribución por autor: DAL: diseño, escritura y revisión del documento, MTCG, MMHV, GIBL, NERL, FMM, ECVI, CRM: asesoría, escritura y revisión del documento.

Financiación o fondos: El presente estudio no conto con ningún apoyo financiero, todo fue con recurso propio de los investigadores.

REFERENCIAS

- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 2000; 148: 187-197.
- Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 1996; 20: 707-727.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol* 28: 559 – 562
- Chang HY, Ho YL, Sheu MJ, Lin YH, Tseng MC, Wu SH, et al. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Phellinus merrillii* extracts. *Botanical Studies*. 2007;48(4):407-17
- Dai J, Mumper R (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15: 7313-7352
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 1997; 324: 1-18.
- Dhar, P., Bajpai, P. K., Tayade, A. B., Chaurasia, O. P., Srivastava, R. B., & Singh, S. B. (2013). Chemical composition and antioxidant capacities of phytococktail extracts from trans-Himalayan cold desert. *BMC complementary and alternative medicine*, 13, 259. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-259>
- Déciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, Angeles-López GE, Navarrete A, Mata R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 110:334–342
- Diaz-Uribe, Carlos E., Vallejo, William, Oliveros, Grace, & Muñoz, Amner. (2016). Study of scavenging capacity of naringin extracted from Citrus uranium peel against free radicals. *Prospectiva*, 14(2), 31-35. <https://doi.org/10.15665/rp.v14i2.677>
- Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Viña-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br. J. Nutr. C*; 1998, 80 (1): S77-S112.
- Djoukeng JD, Arbona V, Argamasilla R, Gómez-Cadenas A. Flavonoid profiling in leaves of citrus genotypes under different environmental situations. *J Agric Food Chem.* 2008;56(23):11087-97.
- Escobar blanco, M. Barragán Huerta Unzon, H.Y. 2010. Extracción de compuestos fenólicos de las cascaras de cítricos producidos en México. (Tesis de maestría). México, D.F.
- Fernández-Pachón, M^a Soledad, Villaño, Débora, Troncoso, Ana M^a, & García-Parrilla, M^a Carmen. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo.. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56(2), 110-122.
- Figueroa Valverde, L., Diaz Cedillo, F., Camacho, L. A., López, R.M. 2009. Efectos inducidos por la ruta graveolens L. *Cnidocolos chayamansa* McVaugh y *Citrus aurantium* L. Sobre los niveles de glucosa, colesterol y triacilglicéridos en un modelo de rata diabética. *Revista brasileña de farmacognosia*. 19 (4). 898-907.
- Ghafar MFA, Prasad KN, Weng KK, Ismail A. Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from citrus species. *Afr J Biotechnol.* 2010;9(3):326-30.
- Guimarães R, Barros L, Barreira JCM, M. Sousa AJ, Carvalho AM, Ferreira IC. 2010. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem Toxicol.* 48(1). 99-106.
- Gupta S., Gupta V.K. Green Synthesis Of MgO Nanoparticles Prepared By *Ficus religiosa* And Monitoring of Their Antimicrobial Activity Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Solid State Technol.* 2020;63:3259–3266].

- Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* 1990; 280: 1-8.
- Hernández Galvez, G. ., Castillo Téllez, M., Chan González, J. de J. ., Méndez Morales, F., Almenares López, D. ., Hernández Villegas, M. M. ., & Villareal Ibarra, E. C. (2021). Comparative study of different drying methods regard to the phenols and flavonoids content of dried *Citrus aurantium* L. leaves. *Agro Productividad*. <https://doi.org/10.32854/agrop.v14i10.2031>
- Hurtado Rico, N.E., Rodríguez Jiménez, C. y Aguilar Contreras A., 2006. “Estudio Cualitativo y Cuantitativo de la Flora Medicinal del Municipio de Copándaro de Galeana, Michoacán, México”. *Polibotánica*, 22: 21-50.
- Jyotsna A, Saonere S. An overview of *C. aurantium* used in treatment of various diseases. *Afr J Plant Sci* 2011; 5(7):390-395
- Lagarto A., Silva R.; I. Guerra Sardiñas; L. Iglesias Buela. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. , 8(5), 395–400. doi:10.1078/0944-7113-00044
- Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M, Koizumi M, et al. Quantitative study of flavonoids in leaves of Citrus plants. *J Agric Food Chem.* 2000;48(9):3865-71.
- Magaña, A., Gama, M.A., Mariaca, L.M. & Méndez, R. (2010). El uso de las plantas medicinales en las comunidades mayachontales de Nacajuca, Tabasco, México. *Polibotánica*, 29, 213-262.
- McLaughlin J.M. 1991. Crown gall tumors on potato discs and brine shrimp lethality: two simple biosassays for higer plant screening and fractionation. Academic Press, San Diego, p 2-32.
- Monroy, C. & Castillo P. (2007). *Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos*. Segunda. edición. Universidad Autónoma de Morelos.405 pp.
- Nguta JM. Evaluation of Acute Toxicity of Crude Plant Extracts from Kenyan Biodiversity using Brine Shrimp, *Artemia salina* L. (Artemiidae). *Open Conf Proc J.* 2012; 3(1):30-34.
- Ojito Ramos, Katia, Herrera Sánchez, Yamila, Vega Pérez, Nadine, & Portal Villafañá, Orelvis. (2012). Actividad antioxidante in vitro y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de Citrus spp. (Rutaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(4), 368-379.
- Patil Jaiprakash r. 2009. Studies on isolation and characterization of bioactive compounds in lime citrus *aurantifolia*(christm) swingle], their antioxidant and anticancer properties. department of crop physiology college of agriculture, dharwad university of agricultural sciences Dharwad.
- Pimenta F. C. F., Alves M. F., Pimenta M. B. F., et al. Anxiolytic effect of *Citrus aurantium* L. on patients with chronic myeloid leukemia. 2016;30(4):613–617. doi: 10.1002/ptr.5566.
- Plazas González, Erika Andrea. (2015). Tamizaje fitoquímico preliminar, evaluación de la actividad antioxidante in vitro y toxicidad de seis especies de Ericaceas colombianas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(2), 182-199.
- Shantabi L., Jagetia G.C., Ali M.A., Singh T.T., Devi S.V. Antioxidant potential of *Croton caudatus* leaf extract in vitro. *Transl. Med. Biotechnol.* 2014; 2:1–15.
- Suntar, I., Khan, H., Patel, S., Celano, R., & Rastrelli, L. (2018). An Overview on *Citrus aurantium* L.: Its Functions as Food Ingredient and Therapeutic Agent. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 7864269. <https://doi.org/10.1155/2018/7864269>
- Syahmi ARM, Vijayarathna S, Sasidharan S, Latha LY, Kwan YP, Lau YL, Shin LN, Chen Y. Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of *Elaeis guineensis* Jacq., (Oil Palm Leaf) Methanol Extract. *Molecules* 2010, 15:8111-8121
- Taylor A. Cataract: relationship between nutrition and oxidation. *J. Am. Coll. Nutr.* 1993; 12: 138-146.
- Winkel-Shirley B 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol.* 5. 218-223.