

PERFIL COMPARATIVO DE POLIFENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UNCARIA TOMENTOSA POTENCIADA CON ÁCIDO CÍTRICO

COMPARATIVE PROFILE OF TOTAL POLYPHENOLS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CITRIC ACID-ENHANCED UNCARIA TOMENTOSA

Camila K. Aranda Medina¹; Cesar A. Roque Borda¹; Genesis S. Esquivel Tohalino¹; Jesús M. Zambrano Salas¹; Keny Davi Alvarado Quiroz¹.

(1) Universidad Católica de Santa María, Equipo de Investigación ABBC: Área de Tecnología de Alimentos, Arequipa-Perú

RESUMEN: La uña de gato (*Uncaria tomentosa*) es una enorme liana que crece en las selvas de Sudamérica y Mesoamérica. Se destaca por contener elevadas concentraciones de alcaloides oxindólicos y de compuestos fenólicos, en especial de pro-antocianidinas. El objetivo fue, potenciar la capacidad antioxidante de extractos de *U. tomentosa* con ácido cítrico, un aditivo de la industria alimentaria muy común. Para ello, se estableció una gradiente de concentraciones de ácido cítrico y se evaluó el perfil antioxidante de los extractos a partir de las hojas y de la corteza. Siendo los métodos ensayados: barrido de radicales libres DPPH y ABTS, y capacidad reductora del hierro (FRAP). Como resultados se obtuvieron incrementos del 16,17–27,72% y 3,86–244,97% para polifenoles totales; 2,37–7,86% y 24,47–235,44% para DPPH. Desde para ABTS; y en la reducción del hierro desde 64,18–15,11% y 64,36–50,60%. Esto se debe a la presencia de ácido cítrico, el cual aportaría en gran medida en la formulación de productos alimenticios antioxidantes.

Palabras clave: *Uncaria tomentosa*, ácido cítrico, potenciación, actividad antioxidante, Folin-Ciocalteu, DPPH, FRAP, ABTS.

ABSTRACT: Cat's claw (*Uncaria tomentosa*) is a huge liana that grows in the jungles of South America and Mesoamerica. It stands out for containing high concentrations of oxindolic alkaloids and phenolic compounds, especially pro-anthocyanidins. This explains its use in traditional medicine as an anti-inflammatory and antioxidant agent. The present study focused on the latter characteristic. The objective is to enhance it with citric acid, a very common food additive. For this purpose, a gradient of citric acid concentrations was established and the antioxidant profile of aqueous leaf and bark extracts was evaluated with the following assays: Folin-Ciocalteu, DPPH, FRAP and ABTS. Which revealed that the concentration of citric acid and antioxidant capacity are directly proportional variables. The statistical method also confirmed that the difference is significant. On the other hand, citric acid produced better results in peel extracts, although leaf extracts yielded higher values of antioxidant activity.

Keywords: *Uncaria tomentosa*, citric acid, potentiation, antioxidant activity, Folin-Ciocalteu, DPPH, FRAP, ABTS.

INTRODUCCIÓN

La uña de gato (*Uncaria tomentosa*) es una liana trepadora originaria de la Amazonia (Grazón & Calvo, 2021). Sus principios activos de mayor se dividen en dos grandes grupos: alcaloides oxindólicos y ácidos fenólicos. Otros metabolitos secundarios esenciales encontrados son glicósidos de ácido quinóico, triterpenos polihidroxilados, flavonoides, cumarinas, terpenos y saponinas; aunque su presencia dentro de la planta sea menor (Bors et al., 2011; Muhammad et al., 2001).

Todos estos compuestos son los responsables de los muchos efectos farmacológicos que presenta la especie, sin embargo, para cada propiedad actúa un grupo diferente de moléculas. Por ejemplo, se ha encontrado que los efectos biocidas de la uña de gato, se deben a la acción de los alcaloides.

Mientras que la actividad antioxidante es independiente a la concentración de estos (Dominguez et al., 2010; Heitzman et al., 2005).

Es así, que capacidad de inhibir radicales libres recae en los polifenoles, es decir: flavonoides, ácidos fenólicos y taninos. Siendo la concentración de estos últimos, muy determinante. Se ha observado que, en extractos libres de taninos, su capacidad inhibitoria es de sólo el 7%. Frente a un 70% de los extractos con presencia de taninos condensados. Cabe resaltar que la mayor parte de los compuestos fenólicos presentes en *U. tomentosa*, siguen el modelo químico de las proanto cianidinas (Golcalves et al., 2005; Heitzman et al., 2005).

A diferencia de otras especies del género *Uncaria*, los extractos acuosos de *U. tomentosa* son agentes antioxidantes activos únicamente a altas concentraciones. Siendo la corteza, la que presenta mayor cantidad de compuestos antioxidantes, taninos condensados y pro-antocianidinas, de toda la planta. Diversos estudios han demostrado que los polifenoles también son responsables de su capacidad de barrido de radicales libres. Dentro de los que se han confirmado a los radicales hidroxilos como los blancos predilectos de los extractos de *U. tomentosa* (Golcalves et al., 2005; Guijarro et al., 2001; Zeballos et al., 2003). Por otro lado, la capacidad antioxidante de *U. tomentosa* se extiende también, a la protección del daño oxidativo al ADN (Chavéz, 2019).

Correspondencia:

E-mail: equipu.abbc@ucsm.edu.pe

Presentando unos notables efectos de inhibición de los radicales peroxilo (H_2O_2) y cierto grado de quelación de los iones hierro asociados al ácido ascórbico (Golcalves et al., 2005).

El ácido cítrico, o ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico, es un compuesto orgánico sintetizado tanto naturalmente como por vía laboratorio. Constituye un intermediario fundamental del metabolismo, razón por la que se encuentra en casi todos los tejidos animales y vegetales. Este compuesto está considerado como uno de los más versátiles químicamente hablando. Scheels Karls en 1874, lo extrae por primera vez en Inglaterra, a partir del jugo de limón, y desde entonces se utiliza en la industria alimentaria debido a su agradable sabor ácido aunado a su alta solubilidad en agua. También presenta un interesante perfil antioxidante, pues es utilizado para eliminar los óxidos metálicos de la superficie de los metales ferrosos y no ferrosos. Además de quelar el litio y tender a actuar en sinergia con otros antioxidantes para secuestrar los radicales libres (Muñoz Bernal et al., 2017).

En este estudio, se evaluó el efecto de una serie de concentraciones ácido cítrico sobre extractos acuosos de *U. tomentosa* con el objetivo de comprobar si había un incremento en la capacidad antioxidante.

2. METODOLOGÍA

2.1. Material vegetal:

Del material vegetal se utilizaron las hojas (H) y la corteza (C) obtenidas del departamento de Ucayali, Perú. Para la extracción, las muestras fueron sometidas a un Vórtex (Scientific Industries, Inc., EEUU), centrifugados (BOECO, Alemania) a 3000 rpm por 30 min y almacenados en un agitador orbital (BOECO, Alemania) con agitación constante de 100 rpm a temperatura ambiente durante 24 h, todos los procedimientos se realizaron en oscuridad. Este método es una modificación del método empleado por Navarro para la extracción de proteínas (Navarro et al., 2017). Y fue empleado para evitar la degradación por calor de los componentes fenólicos volátiles. Para potenciar la capacidad antioxidante, se incubó la muestra por 24 h en diferentes concentraciones de ácido cítrico (0; 5; 10; 15; 20; 30; 50 mg/ml).

2.2. Reactivos Químicos:

Ácido cítrico; ácido fosfo-molibdo-túngstico (reactivo Folin-Ciocalteu); carbonato de sodio (Na_2CO_3); ácido gálico; 2,2-difenilpicrilhidrazilo (DPPH); 2,4,6-tri(2-piridil)triazina (TPTZ); cloruro férrico ($FeCl_3$); ácido clorhídrico (HCl); acetato de sodio; 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS); persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) provenientes de la empresa Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). Etanol al 96% proveniente de Diproquim, Productos Químicos (Arequipa, Perú).

2.3. Polifenoles totales:

Ampliamente utilizado y desarrollado por Singleton y col. 1999, el método colorimétrico Folin-Ciocalteu permite cuantificar la concentración de compuestos fenólicos en una muestra a través de una reducción de carácter REDOX (Moreno, 2017). En la cual, los ácidos fosfo-molibdico y fosfo-túngstico, que componen al reactivo Folin-Ciocalteu, se reducen, mientras que los polifenoles se oxidan en quinonas. Este proceso genera, además, un cambio en la coloración: de amarillo a un tono azulado cuya intensidad depende de la cantidad de fenoles presentes. Es por ello que, al medir la absorbancia del producto resultante, se puede determinar la

concentración en base a una curva de calibración de ácido gálico.

Se agregaron 2 ml de una disolución al 2% p/v de Na_2CO_3 , 200 μ l del extracto y 200 μ l de reactivo Folin-Ciocalteu a tubos de ensayo en oscuridad durante 30min, la absorbancia fue leída a 750 nm en un espectrofotómetro (BOECO, Alemania). Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por gramo de muestra (mg GAE/g UT).

2.4. Capacidad Antioxidante:

a) Capacidad de barrido de radicales DPPH:

El 2,2-difenilpicrilhidrazilo (DPPH) es un radical libre sintético que es utilizado para medir la capacidad que tiene una sustancia, o una mezcla, para inhibir su efecto oxidante (Molyneux, 2004). Esto quiere decir que dichos compuestos deben presentarse como mejores competidores de electrones que las moléculas biológicas, evitando así, que estas sufran daño oxidativo. La razón por la que este radical se encuentra tan estandarizado es porque atrapa a otros radicales libres, lo que permite que el ensayo sea bastante más exacto. Además de que no tiende a sufrir reacciones de polimerización por radicales. La reacción en que se basa esta prueba puede ser monitoreada visualmente, puesto que el compuesto inicial es de color morado intenso, que se decolora a un amarillo suave al completarse el proceso.

La reacción se basa, por su parte, en que el radical libre difenilpicrilhidrazilo presenta un electrón desapareado en su grupo amina secundaria, justo en el centro de la molécula. El cual se reduce al robar electrones y un ion hidrogenión del hidroxilo de un fenol, convirtiéndose a este, en una quinona. El DPPH diluido en un solvente orgánico muestra un pico de absorbancia a 517 nm, el cual decae a medida que la reacción se produce (Sharma, 2009).

Se tomaron 3,9mL de una solución etanólica de DPPH (25 mg/L), con 100 μ l de muestra por 2h en oscuridad, y leídas a 517 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición de radicales libres siguiendo la siguiente ecuación:

$$I\% = \left[\frac{Abs_{DPPH} - Abs_{muestra}}{Abs_{DPPH}} \right] \quad (Ec. 1)$$

Donde " Abs_{DPPH} " es la absorbancia de la solución madre de DPPH, y " $Abs_{muestra}$ " es el valor de absorbancia obtenido de las muestras en el tiempo final, es decir, en el momento de decaimiento de la reacción. Por tanto, los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición de radicales.

b) Capacidad reductora del hierro:

La mayor parte de pruebas para analizar la actividad antioxidante de una muestra se basan en las reacciones de reducción-oxidación, como es el caso del ensayo FRAP, o *Ferric Reducing Ability of Plasma* por sus siglas en inglés. Este método espectrofotométrico se basa en la premisa de que todos los antioxidantes no enzimáticos son capaces de reducir los iones de Fe^{+3} en iones de Fe^{+2} , lo que conlleva a un cambio en el color de la solución. Para esta prueba se necesitan condiciones ácidas, logradas por la presencia de un buffer acetato. La desventaja de este método, sin embargo, es su falta de especificidad, pues cuantifica cualquier sustancia con potencial reductor (Rosales et al., 2018).

Cuando, en condiciones ácidas, se mezclan 2,4,6-tri(2-piridil)triazina y cloruro férrico, tres moléculas de TPTZ forman un complejo alrededor de un ion de hierro +3 proveniente del cloruro. Dicho complejo protege al ion hierro de forma que sólo reaccione con sustancias capaces de reducirlo a su forma ferrosa (Fe^{+2}).

Lo que genera un cambio de color a azul, presentando un máximo de absorbancia a 595 nm. Cabe resaltar que el preparado inicial no necesariamente será de color rojo.

Antes de realizar el ensayo, se requiere preparar en un baño termostático a 37°C, una solución madre de FRAP. La cual está constituida por 25 ml de buffer acetato 300 mM (pH 3.6), 2.5 ml de una solución de FeCl₃ 20 mM y 2.5 ml de solución TPTZ 10 mM. El buffer se preparó en base a 0.0061 g de acetato de sodio disueltos en 200 ml de agua destilada. El pH de esta mezcla fue ajustado utilizando HCl 40 mM, para luego enrasar a 250 ml con agua destilada. La siguiente disolución, la de FeCl₃, fue preparada diluyendo 0.0312 g de cloruro férrico en 25 ml de agua destilada. Para la solución de 2,4,6-tri(2-piridil)triazina, se pesaron 0.0312 g de TPTZ, a los cuales se les adicionó HCl 40 mM hasta alcanzar un volumen de 10 ml exactos.

Para el ensayo, se requieren igualmente las ya mencionadas diluciones de ácido cítrico. Primero, se distribuyeron 540 µl de agua destilada en cada tubo de ensayo utilizado. En segundo lugar, se añadieron 180 µl de cada muestra y se llevó a agitación por vórtex durante 10 s. Luego de esto, se vertieron 540 µl de solución madre de FRAP a cada tubo y se agitó vigorosamente. El reactivo blanco se compone de los solventes de los extractos, en este caso, agua. Finalmente, la absorbancia fue medida 5 y 30 minutos después de iniciada la reacción, a una longitud de onda de 595 nm. Los resultados fueron expresados en micro-equivalentes de iones de Fe²⁺.

c) Capacidad de barrido de radicales libres catiónicos de ABTS:

Un método más rápido y versátil para medir la actividad antioxidante de un extracto es el ensayo del radical catiónico ABTS. Debido a que presenta altas tasas de reproducibilidad y a que es eficaz para cuantificar tanto compuestos polares como los no polares (Kuskoski et al., 2005).

En principio, el método consistía en la generación del radical ABTS^{•+} utilizando metioglobina y al mismo tiempo en que se añadían los compuestos antioxidantes a analizar. Por lo cual, era difícil afirmar que la molécula ABTS había sido oxidada en su totalidad (Restrepo et al., 2009). Un estudio posterior sugirió primero producir un radical ABTS^{•+} estable y luego, recién hacerlo reaccionar con los antioxidantes. Evaluando en este caso, la decoloración de la mezcla y su consiguiente cambio en la absorbancia. De modo que los resultaron fuesen más confiables. Es por ello que se utilizó este último protocolo. Para generar el radical, se mezcló una solución de ABTS a 7 mM con una de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) a 2.45 mM.

Y se dejó incubar esta solución madre a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 h. Pasado ese lapso, se añadió un volumen igual de buffer fosfato pH 7.4, para luego colocar el preparado en un baño termostático a 30 °C. Se recolectaron 2.97 µl de esta solución, y fueron vertidos en tubos de ensayo. Después, se añadieron 30 µl de los extractos de *U. tomentosa*. Dichas muestras fueron también diluidas en etanol hasta medir una absorbancia de 0.700 ± 0.002 a 734 nm. El reactivo blanco consistió en la solución del radical ABTS^{•+} estable disuelto en etanol.

2.5. Análisis estadístico:

El correspondiente tratamiento estadístico de los valores obtenidos se realizó por el método de t de medias en el programa Statgraphics Centurion XVI. II.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados por tres de los métodos coinciden entre sí (Folin-Ciocalteu, DPPH y ABTS), y además, confirman la hipótesis planteada. En efecto, el ácido cítrico es capaz de potenciar el perfil antioxidante de la *U. tomentosa* en gran medida. Siendo la interacción, mayor con los componentes de la corteza y sin importar la dosis aplicada. Por su parte, el ensayo FRAP difiere y presenta resultados ambiguos y contradictorios.

3.1 Cuantificación de los polifenoles totales:

La presencia de polifenoles totales en los extractos acuosos de hojas y corteza de *U. tomentosa* variaron notablemente. Como se puede observar en la tabla 1, el extracto puro de hojas de arrojó un valor de 176.38 mili-equivalentes (ml-eq) de ácido gálico. Mientras que, para la corteza, fueron 153.04 ml-eq.

En cuanto a los demás valores de la tabla, estos fueron medidos siguiendo la escala de concentraciones de ácido cítrico. Mostrando una correlación positiva entre la cantidad de "polifenoles medidos", y la de ácido cítrico disuelto en el extracto.

Esta sobreestimación es producto de la interacción de dicho ácido con el reactivo Folin-Ciocalteu, pues la reacción REDOX es similar con el ácido cítrico que con los polifenoles. Punto y aparte, se ha demostrado que una gran variedad de biomoléculas presentes en los extractos es capaz de reaccionar con esta mezcla de wolframio y molibdeno. Incluyendo desde azúcares hasta ácidos carboxílicos, pasando claro está, por las proteínas (Molyneux, 2004).

Estos defectos en su sensibilidad pueden ser corregidos por medio de tres maneras distintas. La primera y más complicada, restar las concentraciones dadas por el extracto en su conjunto, menos las obtenidas por cada uno de los componentes que no sean de naturaleza fenólica. En segunda instancia, se pueden emplear métodos de purificación de polifenoles más selectivos. O, simplemente, tratar el extracto vegetal con un agente oxidante como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Sánchez et al., 2013).

Por otro lado, según los resultados obtenidos, el ácido cítrico interactúa más y mejor con los polifenoles presentes en los extractos de corteza. Incluso agregando una cantidad pequeña (5 mg/ml de ácido cítrico), ya es posible apreciar un aumento en la cantidad de mili-equivalentes de ácido gálico. Mientras que, para las hojas, dicha cantidad de potenciador no genera ningún efecto.

Este patrón se acentúa conforme las concentraciones del ácido aumentan, obteniendo un aumento neto de casi 345% en los extractos de corteza. Comparado a un incremento de sólo el 127.7% en el caso de las hojas. Esto puede sugerir que el tipo de interacción entre los compuestos fenólicos de la corteza y el ácido cítrico sea de carácter sinérgico. Mientras que, en las hojas, es de naturaleza aditiva.

Tabla 1. Perfil antioxidante de los extractos de hojas y corteza de *U. tomentosa*.

Código	Polifenoles totales		DPPH		ABTS		FRAP	
	Hojas	Corteza	Hojas	Corteza	Hojas	Corteza	Hojas	Corteza
	mg GAE / g EUT		% de Inhibición		mmol Trolox / l		$\mu\text{Mol Fe}^{2+}$ / ml	
UTAC0	176.38 ± 11.42	153.04 ± 8.29	60.39 ± 0.005	9.70 ± 0.05	1.34 ± 0.02	1.14 ± 0.02	431.96 ± 2.51	223.64 ± 1.67
UTAC1	176.38 ± 0.46	158.94 ± 2.25	61.82 ± 0.02	12.07 ± 0.005	1.40 ± 0.02	1.16 ± 0.04	366.68 ± 8.38	213.37 ± 2.51
UTAC2	204.90 ± 2.29	183.92 ± 7.75	61.87 ± 0.01	15.55 ± 0.02	1.61 ± 0.01	1.39 ± 0.02	319.42 ± 8.43	199.30 ± 2.78
UTAC3	213.34 ± 11.75	206.90 ± 5.64	63.09 ± 0.02	24.18 ± 0.003	1.69 ± 0.09	1.61 ± 0.02	264.42 ± 8.35	181.76 ± 0.27
UTAC4	218.61 ± 4.40	414.14 ± 1.49	63.38 ± 0.01	28.76 ± 0.04	1.73 ± 0.01	2.77 ± 0.01	228.07 ± 2.07	174.96 ± 4.95
UTAC5	225.24 ± 0.62	527.94 ± 3.80	65.14 ± 0.01	32.53 ± 0.01	1.76 ± 0.01	2.98 ± 0.03	154.73 ± 5.56	153.94 ± 4.94

3.2. Medición de la capacidad antioxidante:

a) Capacidad de barrido de radicales libres:

Los resultados obtenidos por los ensayos DPPH y ABTS siguen la misma tendencia y concuerdan con lo sugerido por el método Folin-Ciocalteu. En primer lugar, la capacidad de los extractos de *U. tomentosa* para inhibir radicales DPPH es mayor en las hojas que en la corteza. Según DPPH, los extractos puros, los compuestos presentes en las hojas son capaces de inhibir por sí solos, hasta un 60.39% de los radicales libres. Mientras que los componentes de la corteza sólo barren un 9.7% del total de radicales (tabla 1). En el caso de ABTS, las hojas tuvieron 1.34 equivalentes Trolox (mmol de Trolox / l), y la corteza, 1.14 equivalentes. Revelando que los polifenoles presentes en la corteza de *U. tomentosa* son menos eficaces a la hora de evitar daños oxidativos que sus análogos en las hojas de la uña de gato. Lo cual puede deberse a que la forma particular en que los polifenoles hallados en la corteza interactúan sea, probablemente, de carácter inhibitorio entre sí. Bloqueando uno, los efectos del otro.

La literatura afirma que los extractos acuosos de *U. tomentosa* poseen una elevada capacidad de barrer los radicales DPPH. Ello, sin importar la parte de la planta utilizada (Sandoval et al., 2002). Sin embargo, otros tantos estudios han encontrado diferencias entre los perfiles antioxidantes de las hojas, la corteza y las raíces (3) (28). Resultados que coinciden con lo hallado en este estudio.

Un estudio realizado por M. Sandoval y col. 2002 (Sandoval et al., 2002), evaluó extractos liofilizados de la corteza *U. tomentosa* a diferentes concentraciones. Sus resultados variaron de un 3.5% para 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, el mínimo utilizado, hasta un 85.5% cuando el extracto era de 100 μg de corteza liofilizada por cada ml de agua. El valor más cercano al obtenido por este estudio, se sitúa en los 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, concentración en la cual, el extracto inhibe un 7.8% de radicales libres. Los extractos preparados en este estudio tenían una proporción de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e inhibieron 9.7% de los radicales. De donde se deduce que la liofilización y la extracción por agitación son técnicas de similar rendimiento y otorgan a los extractos, un perfil antioxidante muy parecido.

En cuanto al aspecto central del presente trabajo, el efecto del ácido cítrico en la actividad antioxidante de la uña de gato, se observa que dicho ácido sí es capaz de potenciar a los extractos. En principio, los extractos de corteza revelan un aumento de casi el 3% cuando se añaden 5 miligramos de ácido cítrico por mililitro. Dicho efecto se repite en las hojas, aunque en menor grado, pues esa misma concentración de ácido consigue incrementar la capacidad antioxidante de las hojas en sólo un 1%. Reforzando lo obtenido con anterioridad con el ensayo Folin-Ciocalteu, la interacción es sinérgica entre el ácido cítrico y los compuestos de la corteza de *U. tomentosa*. En cuanto a la concentración final del ácido, 50 mg/ml, los resultados son todavía más sorprendentes: un 32.53%

para la corteza, lo que triplica el 9.7% de extracto puro; y 65.14% para las hojas, siendo el aumento neto de sólo un 5%.

El ensayo ABTS, por su parte, confirmó estos resultados, pese a ello, existen unas cuantas diferencias. Por un lado, la diferencia entre la actividad antioxidante entre extractos de hojas y corteza no es tan marcada como en los ensayos antes mencionados. Siendo de apenas 0.2 equivalentes Trolox. Además de ello, si bien el ácido cítrico aumentó en mayor medida la capacidad inhibitoria de la corteza, el incremento en las hojas tampoco fue despreciable. Y, como se observa en la tabla 1, la primera dosis de ácido cítrico posee una mayor influencia en los extractos de hojas que en los de corteza. Situación que se revierte con el aumento de la cantidad de dicho ácido.

b) Capacidad reductora del hierro:

Los resultados encontrados por el ensayo FRAP son contradictorios al resto del estudio. Puesto que, los valores de la tabla 3 van disminuyendo a medida que las dosis de ácido cítrico aumentan. Es decir, ambas variables son inversamente proporcionales. Lo que podría sugerir que este compuesto influye de manera negativa en la capacidad reductora de los extractos de *U. tomentosa*. No obstante, la literatura afirma que el ácido cítrico es, de hecho, una sustancia ampliamente utilizada para eliminar óxidos de hierro. En los cuales, el hierro presenta su mayor valencia (Muñoz et al., 2014).

Sin embargo, se sabe que los extractos de corteza de *U. tomentosa* presentan propiedades quelantes, en especial, de los iones de hierro que inician la peroxidación lipídica (Goncalves et al., 2005). Aunque el estudio de Gonçalves y col. 2005 utilizó un sistema de Fe^{+3} /ascorbato, también menciona que *U. tomentosa* es capaz, en cierta medida, de unirse a los iones de hierro. Lo cual podría haberse reflejado en los datos arrojados por el ensayo. De modo que, en principio, los componentes de la planta habrían actuado más como antioxidantes que como quelantes. Pues los valores de capacidad reductora de los extractos puros son los más altos. Sin embargo, es posible que el ácido cítrico haya estimulado la quelación en detrimento de la reducción, siguiendo un mecanismo desconocido. Por tanto, al aumentar la dosis de ácido, los extractos cada vez redujeron menos a los iones de hierro, causando que la cantidad de iones Fe^{+2} fuera menor. Hasta llegar, en el caso de las hojas a casi una cuarta parte de la capacidad reductora inicial; y en de la corteza, se redujo a poco más de la mitad.

Cabe resaltar que, de existir dicho efecto estimulante en la quelación, el ácido cítrico favorecería a los polifenoles de las hojas. Lo cual resulta una situación inversa a lo encontrado con la potenciación de la capacidad reductora. Punto y aparte, debido a la poca información obtenida, no se pueden descartar a los alcaloides como los causantes de este peculiar comportamiento (Goncalves et al., 2005; Muñoz et al., 2014).

3.3. Análisis estadístico:

El tratamiento estadístico de los datos reveló una diferencia significativa entre los extractos puros y los potenciados (tabla 2).

Tabla 2. Tratamiento estadístico de los datos por el método de t de medias.

Código	Hojas	Corteza
UTAC0	23.53	1.71
UTAC1	23.53	0.07
UTAC2	27.8	0.34
UTAC3	29.07	1.76
UTAC4	29.86	0.66
UTAC5	30.86	0.09

4. CONCLUSIONES

A través de los resultados de los ensayos Folin–Ciocalteu, DPPH y ABTS, se confirmó la hipótesis inicial de que el ácido cítrico es una sustancia capaz de mejorar notablemente, el perfil antioxidante de los extractos de hojas y corteza de *U. tomentosa*. Además de encontrar que la capacidad reductora y de inhibición de radicales libres son directamente proporcionales a la concentración aplicada de ácido cítrico. Lo que revela una correlación positiva.

Para estudios ulteriores, se recomienda evaluar si la influencia del ácido cítrico sobre los extractos acuosos de *U. tomentosa* es aditiva o de carácter sinérgico. De ser así, determinar cuáles de los componentes aislados de la planta, alcaloides o polifenoles, trabajan mejor con el potenciador.

Sin embargo, los resultados arrojados por el ensayo FRAP resultan contradictorios y de difícil interpretación con la literatura encontrada. Por lo que es recomendable estudiar más a fondo las leves propiedades quelantes de *U. tomentosa* y su interacción con el ácido cítrico.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Bors M, Bukowska B, Pilarski R, Gulewicz K, Oszmiński J, Michalowicz J, Koter–Michalak M. Protective activity of the *Uncaria tomentosa* extracts on human erythrocytes in oxidative stress induced by 2, 4–dichlorophenol (2, 4–DCP) and catechol, *Food and chemical toxicology*. 2011; 49(9): 2202–2211.
- [2] Chávez Sumarriva, N. L. (2019). Capacidad antioxidante, polifenoles y efecto citotóxico en líneas celulares del extracto hidroalcohólico de *Handroanthus obscurus* (Bureau & K. Schum.) Mattos “tahuari negro.” Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- [3] Domínguez Torrejón G, García Martín J D J, Guzmán Loayza D, Alanoca R. Contenido de alcaloides en corteza de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC procedente de diferentes hábitats de la región Ucayali–Perú, *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2010; 76(3): 271–278.
- [4] Garzón LPG, Calvo CEF. Manejo y propagación de la ña-de-gato, *Uncaria guianensis* y *U. tomentosa*, en comunidades Tikuna del sur de la Amazonia colombiana. *Rev Verde Agroecol Desenvolv Sustent [Internet]*. 2021 [cited 2021 Dec 30];16(3):272–9. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8187986>
- [5] Guijarro J M. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. y Oncología, *Natura Medicatrix: Revista médica para el estudio y difusión de las medicinas alternativas*. 2001; 19(5): 228–233.
- [6] Gonçalves C, Dinis T, Batista M T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti–inflammatory activity, *Phytochemistry*. 2005; 66(1): 89–98.
- [7] Heitzman M E, Neto C C, Winiarz E, Vaisberg A J, Hammond G B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae), *Phytochemistry*. 2005; 66(1): 5–29.
- [8] Kuskoski E M, Asuero A G, Troncoso A M, Mancini–Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)*. 2005; 25(4): 726–732.
- [9] Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 2004; 26(2): 211–219.
- [10] Moreno Roque CS. Compuestos fenólicos obtenidos del subproducto de *Persea americana* Mill. para la reducción de materia orgánica del efluente de una industria de curtido de *Tayassu pecari* ubicada en el parque industrial de Arequipa. *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa*; 2017.
- [11] Muhammad I, Dunbar D C, Khan R A, Ganzera M, Khan I A. Investigation of *Uña De Gato* I. 7–Deoxyloganic acid and NMR spectroscopic studies on pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*, *Phytochemistry*. 2001; 57: 781–785.
- [12] Muñoz–Bernal Ó A, Torres–Aguirre G A, Núñez–Gastélum J A, de la Rosa L A, Rodrigo–García J, Ayala–Zavala J F, Álvarez–Parrilla E. Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin–Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales, *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico–Biológicas*. 2017; 20(2): 23–28.
- [13] Muñoz–Villa A, Sáenz–Galindo A, Lluvia L L, Cantú–Sifuentes L, Barajas–Bermúdez L. Ácido cítrico: compuesto interesante, *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 2014; 6: 12–25.
- [14] Navarro, Y. M. C., Salazar, L. M. B., Giraldo, J. D. R., González, J. P. P., & Osorio, J. I. T. (2017). Optimización del protocolo para la extracción y la cuantificación de proteínas totales en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 13(1), 65–68.
- [15] Reemplaza 1 : Rosales Zárata, V. I. (2018). Estabilidad gastrointestinal y bioactividad in vitro de antocianinas aisladas de zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino en función de la presencia de iones divalentes de hierro, zinc, magnesio y calcio. <http://148.224.97.92/xmlui/handle/ii/4772>
- [16] Restrepo–Sánchez, D.-C., Narváez–Cuenca, C.-E., & Restrepo–Sánchez, L.-P. (2009). Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez–Santander, Colombia. *Química Nova*, 32(6), 1517–1522. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000600030>
- [17] Rosales Zárata VI. Estabilidad gastrointestinal y bioactividad in vitro de antocianinas aisladas de zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino en función de la presencia de iones divalentes de hierro, zinc, magnesio y calcio. 2018 [cited 2021 Dec 30]; Available from: <http://148.224.97.92/xmlui/handle/ii/4772>
- [18] Sánchez–Rangel J C, Benavides J, Heredia J B, Cisneros–Zevallos L, Jacobo–Velázquez D A. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination, *Analytical Methods*. 2013; 5(21): 5990–5999.
- [19] Sandoval M, Okuhama N N, Zhang X–J, Condezo L A, Lao J, Angeles F M, Musah R A, Bobrowski P, Miller M J S. Anti–inflammatory and antioxidant activities of cat’s claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content, *Phytomedicine*. 2002; 9: 325–337.
- [20] Sharma O P, Bhat T K. DPPH antioxidant assay revisited, *Food chemistry*. 2009; 113(4): 1202–1205.
- [21] Zevallos Pollito P A, Flores Bendezú Y. Caracterización morfológica de plántulas de “uña de gato” *uncaria tomentosa* (willd. ex roemer & schultes) dc y *U. Guianensis* (aublet) gmelin del Bosque Nacional Alexander Von Humboldt, *Ecología Aplicada*. 2003; 2(1): 41–46

Recibido el 04 de octubre del 2021 y aceptado para su publicación el 30 de noviembre del 2021