

COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE 6 PLANTAS PERUANAS

Víctor Hugo Doroteo^a, Camilo Díaz^b, Cecilia Terry^c, Rosario Rojas^{a,b,*}

RESUMEN

Con miras a conocer el potencial de seis plantas peruanas para el desarrollo de fitocosméticos y/o nutraceuticos, en el presente estudio se determinó el contenido de ácido ascórbico, flavonoides y compuestos fenólicos totales; asimismo, se evaluó la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *Uncaria tomentosa* (uña de gato), *Zea mays* (maíz morado), *Smilax sonchifolius* (yacón), *Lepidium meyenii* (maca), *Krameria triandra* (ratania) y *Physalis peruviana* (aguaymanto). La actividad antioxidante *in vitro* de dichos extractos fue determinada por medio de los ensayos de inhibición de radicales DPPH, superóxido e hidroxilo; como también a través de la medición de su poder reductor y actividad antioxidante total. Los extractos con mayor actividad antioxidante fueron los de uña de gato y ratania, lo cual puede deberse a sus altos contenidos de ácido ascórbico, flavonoides y compuestos fenólicos totales.

Palabras clave: antioxidante, DPPH, flavonoides, polifenoles, TEAC

PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY *IN VITRO* OF 6 PERUVIAN PLANTS

ABSTRACT

In order to assess the potential of six Peruvian plants for the development of phytocosmetics and/or nutraceuticals, the ascorbic acid content, flavonoids and total phenolic compounds, as well as antioxidant activities of hydroalcoholic extracts of *Uncaria tomentosa* (cat's claw), *Zea mays* (purple corn), *Smilax sonchifolius* (yacon), *Lepidium meyenii* (maca), *Krameria triandra* (ratania) and *Physalis peruviana* (aguaymanto) were evaluated. The *in vitro* antioxidant activities of these extracts were determined by means of DPPH, superoxide and hydroxyl radicals inhibition assays, as well as through the measurement of their reducing power and total antioxidant activity. Hydroalcoholic extracts of cat's claw and ratania showed the highest antioxidant activities, which may be due to their high content of ascorbic acid, flavonoids and total phenolics.

Key words: antioxidant, DPPH, flavonoids, polyphenols, TEAC

INTRODUCCIÓN

El daño oxidativo causado por los radicales libres está relacionado al desarrollo de diversas enfermedades como la aterosclerosis, cáncer, artritis y otras enfermedades inflamatorias.¹

^a Unidad de Investigación en Productos Naturales, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú. rosario.rojas@upch.pe

^b Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

^c 3QPSAC.

Existen diversas sustancias sintéticas como el hidroxianisol butilado (BHA) o el hidroxitolueno butilado (BHT) que son eficientes secuestradores de radicales libres; sin embargo, dichos antioxidantes sintéticos están siendo restringidos porque pueden ser carcinogénicos.^{2,3} Por lo tanto, existe un creciente interés en la búsqueda de antioxidantes de origen natural, especialmente provenientes de plantas medicinales y/o alimenticias. En la mayoría de los casos, la actividad antioxidante de estas plantas se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos, los cuales son potentes secuestradores de especies reactivas de oxígeno y además son capaces de inhibir a enzimas productoras de radicales libres.⁴

El objetivo del presente estudio fue determinar el contenido de ácido ascórbico, flavonoides y compuestos fenólicos totales; así como evaluar la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de 6 plantas peruanas: *Uncaria tomentosa* (uña de gato), *Zea mays* (maíz morado), *Smallanthus sonchifolius* (yacón), *Lepidium meyenii* (maca), *Krameria triandra* (ratania) y *Physallis peruviana* (aguaymanto). Con miras a conocer el potencial de estos productos naturales para el desarrollo de fitocosméticos y/o nutracéuticos, se evaluó su actividad antioxidante *in vitro* por medio de los ensayos de inhibición de radicales DPPH, superóxido e hidroxilo; como también a través de la medición de su poder reductor y actividad antioxidante total.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipos. Espectrofotómetro Shimadzu UV/Vis 1240.

Reactivos. 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), reactivo Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio, cloruro de aluminio, nitrito de sodio, hidróxido de sodio, ácido gálico, quercetina, ácido ascórbico, ácido metafosfórico, 2,6-dicloroindofenol, etanol, 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), persulfato de sodio, Trolox, hexacianoferrato de potasio, ácido tricloroacético, cloruro férrico, nitroazul de tetrazolio (NBT), NADH, metasulfato de fenazina (PMS), fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, desoxirribosa, peróxido de hidrógeno, EDTA, ácido tiobarbitúrico, ácido tricloroacético, manitol.

Muestras vegetales. Las muestras vegetales fueron colectadas e identificadas por el biólogo Camilo Díaz. Se colectó corteza de *Uncaria tomentosa* (uña de gato), frutos de *Zea mays* (maíz morado), tubérculos de *Smallanthus sonchifolius* (yacón), hipocótilos de *Lepidium meyenii* (maca amarilla), raíces de *Krameria triandra* (ratania) y frutos de *Physallis peruviana* (aguaymanto).

Preparación de extractos. Las muestras vegetales secas y molidas fueron extraídas con una mezcla de etanol y agua destilada (7:3) por 4 días a temperatura ambiente. Luego de la filtración se procedió a evaporar el solvente en un rotavapor a temperatura menor de 40 °C. Los extractos hidroalcohólicos obtenidos fueron almacenados en la refrigeradora a temperatura menor de 4 °C hasta su uso.

Determinación de compuestos fenólicos. Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por García *et al.*⁵ Se preparó una curva de calibración de ácido gálico cuyo rango de concentración fue de 1-5 mg/L. Los extractos hidroalcohólicos de las 6 muestras vegetales fueron evaluados a una concentración de 0,1 mg/mL. A 100 µL de la muestra se le añadió 250 µL de la solución de Folin-Ciocalteu (diluido 1 en 2 con agua milli-Q), se sonicó por 5 min, luego se le añadió 1250 µL de carbonato de sodio al 20% y 400 µL de agua ultra pura. Se agitó vigorosamente, se cubrió de la luz y se le llevó a reposo por 90 minutos a temperatura ambiente. Las absorbancias respectivas fueron medidas a 760 nm en un espectrofotómetro.

Las muestras fueron analizadas por triplicado y el contenido de compuestos fenólicos totales fue expresado en mg de ácido gálico/g de extracto hidroalcohólico.

Determinación de flavonoides. El contenido de flavonoides en los extractos hidroalcohólicos fue determinado mediante el ensayo colorimétrico con AlCl_3 , propuesto por Ivanova et al.⁶ A 0,5 mL del extracto hidroalcohólico (a una concentración de 0,3 mg/mL) se le añadió 2 mL de agua destilada y 150 μL de nitrito de sodio. Se dejó reposar por 5 min y se le añadió 150 μL de cloruro de aluminio. Se dejó reposar por 6 min y se añadió 1 mL de hidróxido de sodio, se mezcló bien y se completó con agua destilada hasta volumen final de 5 mL. Para la cuantificación se elaboró una curva de calibración de quercetina a concentraciones entre 0,18 a 0,36 mg/mL. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 510 nm. El contenido de flavonoides totales fue expresado como mg de quercetina/g de extracto hidroalcohólico.

Contenido de ácido ascórbico. El contenido de ácido ascórbico fue determinado de acuerdo al método descrito por Lung et al.⁷ Se extrajo 20 mg del extracto hidroalcohólico con 2 mL de ácido metafosfórico al 1% por 45 minutos a temperatura ambiente; al cabo de ese tiempo se filtró. Se tomó 100 μL de la solución anterior y se le agregó 900 μL de una solución de 2,6-dicloroindofenol (cuya absorbancia estaba entre 0,30 y 0,35 para asegurar que la lectura de la muestra se encuentre dentro del rango de las de los estándares), luego de 1 minuto se midió la absorbancia a 515 nm. El contenido de ácido ascórbico se determinó a partir de la recta de regresión obtenida con el ácido ascórbico estándar en las concentraciones de 1, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Actividad antioxidante en el test de DPPH. Se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos mediante el método de Mensor et al.⁸ Se preparó diluciones en etanol acuoso de los extractos hidroalcohólicos hasta obtener concentraciones de 0,0 a 150,0 $\mu\text{g/mL}$. Se mezcló 1,0 mL de cada una de las diluciones con 0,5 mL de una solución 0,3 mM de DPPH en etanol y se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 30 minutos; al término de los cuales se procedió a medir la absorbancia de la mezcla a 517 nm. Todas las pruebas se realizaron por cuadruplicado. Se calculó el porcentaje de actividad antioxidante de cada muestra de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \left(\frac{AC - AM - AB}{AC} \right) \times 100$$

donde:

AM es la absorbancia de la muestra + DPPH

AB es la absorbancia del blanco (muestra + etanol)

AC es la absorbancia del blanco del reactivo (DPPH + etanol).

La concentración del extracto hidroalcohólico que neutraliza al 50 por ciento de los radicales de DPPH (EC_{50} , concentración efectiva media) se obtiene de la recta obtenida al graficar el porcentaje de actividad antioxidante versus la concentración de la muestra ($\hat{\mu}$ g/mL).

Actividad antioxidante total (TEAC). La capacidad antioxidante se determinó siguiendo el método descrito por Hazra et al.⁹ El radical ABTS^+ fue generado al mezclar un volumen de solución 14 mM de ABTS con un volumen de la solución 4,9 mM de persulfato de sodio y se incubó durante 12-16 h en oscuridad, para generar el radical ABTS^+ . La solución del radical ABTS se diluyó con agua hasta obtener una absorbancia de 0,70 (\pm 0,2). Se mezcló 10 μL de

los extractos hidroalcohólicos a diferentes concentraciones (0,05 a 10 mg/mL) con 1,0 mL de la solución de radical ABTS y se leyó la absorbancia luego de 6 minutos a una longitud de onda de 734 nm. Se procedió de igual manera para medir la actividad antioxidante del estándar Trolox. Todas las pruebas se realizaron por cuadruplicado.

Se calculó el porcentaje de actividad antioxidante total (% AAT) mediante la siguiente fórmula:

$$\%AAT = (A_o - A_m) \times 100 / A_o$$

donde:

% AAT = Porcentaje de actividad antioxidante total

A_o = Absorbancia del control

A_m = Absorbancia de la muestra con ABTS – Absorbancia del blanco de la muestra

El blanco consistió de la mezcla de 10 µL del extracto hidroalcohólico con 1,0 mL de agua destilada. El control consistió de la mezcla de 10 µL de etanol con 1,0 mL de la solución de radical ABTS.

Se calculó el porcentaje de inhibición de la formación de radicales ABTS y se graficó como una función de la concentración. Finalmente, se determinó el TEAC (trolox equivalent antioxidant concentration) dividiendo la pendiente de la gráfica de la muestra (extracto hidroalcohólico) sobre la pendiente de la gráfica para el estándar Trolox.

Poder reductor. El poder de los extractos de reducir el ion Fe³⁺ fue determinado mediante el método de Hazra et al.⁹ Diferentes concentraciones (0,0 hasta 0,4 mg/mL) del extracto hidroalcohólico (0,5 mL) se mezcló con 0,5 mL de solución amortiguadora de fosfato (0,2 M, pH 6,6) y 0,5 mL hexacianoferrato de potasio (0,1%), seguido de incubación a 50 °C en un baño de agua durante 20 minutos. Después de la incubación se añadió 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% para terminar la reacción. Se tomó 1 mL de la solución y se mezcló con 1 mL de agua destilada y 0,1 mL de solución de FeCl₃ (0,01%). La mezcla se dejó reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 700 nm contra agua destilada como blanco. Todas las pruebas se realizaron por cuadruplicado. Una absorbancia superior de la mezcla de reacción indica un poder reductor mayor. Se utilizó el ácido L-ascórbico como control positivo.

Inhibición del radical-anión superóxido. La actividad inhibitoria se evaluó usando el método descrito por Gupta et al.¹⁰ Se mezcló 1 mL de nitroblue tetrazolium (NBT) 156 µM (en buffer fosfato 100 mM, pH 7,4) con 1 mL de NADH 468 µM (en buffer fosfato 100 mM, pH 7,4) y 0,1 mL del extracto hidroalcohólico o quercetina (a diferentes concentraciones finales entre 20 a 200 µg/mL), se mezcló y añadió 0,1 mL de metasulfato de fenazina (PMS) 60 µM (en buffer fosfato 100 mM, pH 7,4) para iniciar la reacción. La mezcla se incubó a 25 °C por 5 minutos y se leyó su absorbancia a 560 nm. Se realizó de manera similar un control sin muestra y se utilizó a la quercetina como compuesto de referencia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El porcentaje de inhibición del anión radical superóxido fue calculado como:

$$\%Inh = (A_o - A_m) \times 100 / A_o$$

donde:

A_o = Absorbancia del control (sin muestra)

A_m = Abs. de la mezcla reaccionante con PMS – Abs. de la mezcla reaccionante sin PMS

Las EC_{50} (concentración efectiva media) se calcularon por análisis de regresión lineal, en donde la abscisa representa las concentraciones de los extractos hidroalcohólicos y la ordenada el promedio de porcentaje de actividad antioxidante obtenido a partir de tres mediciones independientes.

Actividad antioxidante para el radical hidroxilo. La actividad fue determinada de acuerdo al método descrito por Özyürek et al.¹¹ Se mezcló 100 ì L de buffer KH_2PO_4 -KOH (100 mM, pH 7,4), 100 ì L desoxiribosa (15 mM), 50 ì L de ácido ascórbico (1 mM), 50 ì L H_2O_2 (10 mM), 50 ì L de extracto hidroalcohólico (a las concentraciones finales de 5, 15, 25, 35 y 50 ì g/mL), 100 ì L $FeCl_3$ (500 ì M) y 50 ì L EDTA (1mM). La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C por 1 hora. Al final de dicho periodo de incubación se agregó 500 ì L de ácido tiobarbitúrico (TBA, 1% w/v) seguido de la adición de 500 ì L de ácido tricloroacético (TCA, 2,8% w/v). Las soluciones se pusieron en un baño de agua a 80 °C por 20 minutos para que desarrolle el color rosado del aducto malondialdehído-ácido tiobarbitúrico y luego la absorbancia se midió a 532 nm. Se realizó un control sin muestra y se utilizó al manitol como compuesto de referencia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se calculó el porcentaje de inhibición de formación de radical hidroxilo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \times (A_0 - A_m) / A_0$$

Donde:

A_0 = Absorbancia del control (sin muestra)

A_m = Abs. de la muestra con desoxiribosa – Abs. de la muestra sin desoxiribosa

Las EC_{50} (concentración efectiva media) se calcularon por análisis de regresión lineal, en donde la abscisa representa las concentraciones de los extractos hidroalcohólicos y la ordenada el promedio de porcentaje de actividad antioxidante obtenido a partir de tres mediciones independientes

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la tabla 1, en el ensayo de DPPH los extractos más activos fueron los de ratania y uña de gato ($EC_{50} = 10,45$ y $12,05 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), llegando a ser casi tan potentes como el control positivo, el flavonoide rutina ($EC_{50} = 6,43 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$).

Similarmente, la capacidad antioxidante total o TEAC (trolox equivalent antioxidant concentration) de los extractos de ratania y uña de gato fueron mayores que la de los otros extractos, llegando a ser del 71 y 47% con respecto a la del control positivo trolox (100%).

Para el test de inhibición del radical superóxido se utilizó como control positivo al flavonoide quercitina ($EC_{50} = 41,24 \pm 1,24 \mu\text{g/mL}$). Solamente los extractos de ratania y uña de gato fueron activos en este ensayo ($EC_{50} = 66,02$ y $124,28 \mu\text{g/mL}$, respectivamente).

Los extractos que mejor inhibieron al radical hidroxilo fueron los de ratania y aguaymanto ($EC_{50} = 18,50$ y $22,95 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), los cuales fueron inclusive más activos que el control positivo manitol ($EC_{50} = 39,99 \pm 1,12 \mu\text{g/mL}$) (tabla 1).

Tabla 1. Actividad antioxidante *in vitro* de 6 extractos de plantas

Extractos etanólicos	DPPH EC ₅₀ (µg extracto/mL)	TEAC	Radical superóxido EC ₅₀ (µg extracto/mL)	Radical hidroxilo EC ₅₀ (µg extracto/mL)
Ratania	10,45 ± 0,48	0,71 ± 0,04	66,02 ± 8,06	18,50 ± 0,78
Uña de gato	12,05 ± 0,47	0,47 ± 0,02	124,28 ± 7,16	> 50,00
Maíz morado	28,89 ± 0,81	0,18 ± 0,01	> 200,00	35,02 ± 2,88
Aguaymanto	> 100,00	< 0,01	> 200,00	22,95 ± 3,33
Maca	> 100,00	< 0,01	> 200,00	> 50,00
Yacón	64,52 ± 0,66	0,07 ± 0,01	> 200,00	34,07 ± 2,79

En la figura 1 se observa que existe un efecto dosis-respuesta en el poder de los 6 extractos hidroalcohólicos evaluados de reducir el ion Fe³⁺. A cualquiera de las dosis evaluadas, los extractos con mayor poder reductor fueron los de ratania, uña de gato y maíz morado. A concentraciones mayores de 0,2 mg/mL, los extractos de ratania y uña de gato fueron inclusive más activos que el ácido ascórbico (control positivo).

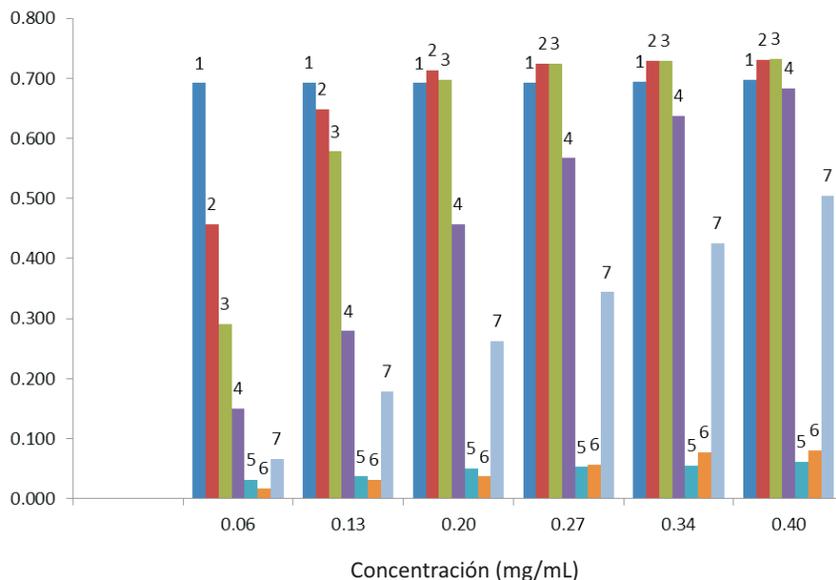


Figura 1. Poder reductor: Comparación de las absorbancias del ácido ascórbico (1) con los extractos de ratania (2), uña de gato (3), maíz morado (4), aguaymanto (5), maca (6) y yacón (7) a diferentes concentraciones (mg/mL)

La alta actividad antioxidante mostrada por los extractos hidroalcohólicos de ratania, uña de gato y maíz morado parece deberse a su gran contenido de sustancias antioxidantes. Estos tres extractos fueron precisamente los que mostraron mayor concentración de ácido ascórbico, flavonoides y compuestos fenólicos totales (tabla 2); que son sustancias con reconocida actividad antioxidante.

Tabla 2. Contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides y ácido ascórbico en 6 extractos de plantas

Extractos hidroalcohólicos	Fenólicos totales (mg ác. gálico/g extracto)	Flavonoides (mg quercetina/g extracto)	Ácido ascórbico (mg/100 g extracto)
Ratania	30,1 ± 0,20	127,87 ± 0,02	203,39 ± 6,48
Uña de gato	17,3 ± 0,01	79,39 ± 0,04	304,23 ± 3,93
Maíz morado	33,2 ± 3,40	48,40 ± 0,03	142,86 ± 7,32
Aguaymanto	9,4 ± 0,04	12,72 ± 0,00	< 45,00
Maca	9,3 ± 0,01	14,66 ± 0,00	< 45,00
Yacón	12,8 ± 0,02	27,21 ± 0,00	< 45,00

Una decocción de corteza de uña de gato mostró una alta actividad antioxidante en el test de inhibición de radicales DPPH, hidroxilo y peroxilo. Según Goncalves *et al.*, la actividad antioxidante de la uña de gato se debería principalmente a la alta concentración de proantocianidinas.¹² La capacidad antioxidante de extractos de uña de gato ha sido también demostrada por Pilarski *et al.*, quienes concluyeron que el extracto hidroalcohólico al 50% es más activo que el extracto acuoso en el test de inhibición de radicales superóxido y peroxilo, así como en su capacidad antioxidante total (TEAC).¹³

Carini *et al.* evaluaron el extracto de ratania, estandarizado en su contenido de lignanos, y mostraron que es capaz de proteger a los queratinocitos del daño causado por radiación UV-B.¹⁴ Esta propiedad, en asociación con su alta capacidad antioxidante, hace del extracto de ratania un buen candidato para el desarrollo de bloqueadores de origen natural.

CONCLUSIONES

De las seis plantas evaluadas en el presente estudio, destacan las altas actividades *in vitro* en los ensayos de inhibición de radicales DPPH, superóxido e hidroxilo; poder reductor y actividad antioxidante total de los extractos hidroalcohólicos de corteza de *Uncaria tomentosa* (uña de gato) y de raíz de *Krameria triandra* (ratania), los cuales muestran un gran potencial para el desarrollo de nutraceuticos y/o fitocosméticos.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de investigación fue llevado a cabo gracias al auspicio del FIDECOM-Innovate Perú (Proyecto 148-FINCYT-FIDECOM-PIPEI-2010: Desarrollo y validación científica de ingredientes naturales basados en plantas medicinales y/o alimenticias de la biodiversidad peruana para la industria cosmética).

REFERENCIAS

1. Halliwell, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.* **1991**; *91*, 14.
2. Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M., Ogiso, T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **1983**; *70*, 343.
3. Safer, A.M., Al-Nughamish, A.J. Hepatotoxicity induced by the antioxidant food additive butylated hydroxytoluene (BHT) in rats: An electron microscopical study. *Histol. Histopathol.* **1999**; *14*, 391.
4. Atmani, D., Ruiz-Larrea M.B., Ruiz-Sanz, J.I., Lizcano, L.J., Bakkali, F., Atmani, D. Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *J. Med. Plants Res.* **2011**; *5*, 589.
5. García Nava M.J. http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_IUAQGarciaNava.pdf (último acceso 8 de Octubre del 2012).
6. Ivanova, V., Stefova, M., Chinnici, F. Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *J. Serb. Chem. Soc.* **2010**; *75*, 45.
7. Lung, M-Y., Chang, Y-C. Antioxidant properties of the edible Basidiomycete *Armillaria mellea* in submerged cultures. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**; *12*, 6367.
8. Mensor, L., Menezes, F., Leitao, G., Reis, A., Santos, T., Coube, C., Leitao, S. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* **2001**; *15*, 127.
9. Hazra, B., Biswas, S., Mandal, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complement. Altern. Med.* **2008**; *8*, 63.
10. Gupta, M., Kanti Mazumdar, U., Gomathi, P., Sambath Kumar, R. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Ervatamia coronaria* Stapf. leaves. *Iran. J. Pharm. Res.* **2004**; *3*, 119.
11. Özyürek, M., Bektaşođlu, B., Güçlü, K., Apak, Re^oat. Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation. *Anal. Chim. Acta* **2008**; *616*, 196.
12. Gonçavez, C., Dinis, T., Batista, M.T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochem.* **2005**; *66*, 89
13. Pilarski, R., Zieliński, H., Gulewicz, K. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *J. Ethnopharmacol.* **2006**; *104*, 18.
14. Carini, M., Aldini, G., Orioli, M., Maffei Facino, R. Antioxidant and photoprotective activity of a lipophilic extract containing neolignans from *Krameria triandra* roots. *Planta Med.* **2002**; *68*, 193.