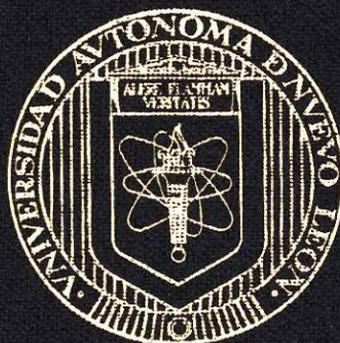


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EVALUACION DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
EN PLANTAS DEL NORESTE DE MEXICO

Por

MARIA ESTHELA POZOS SAENZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
LICENCIATURA DE QUÍMICO CLINICO BIOLÓGICO

SEPTIEMBRE, 2005

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
LIBRARY

PHYSICS DEPARTMENT
5720 S. UNIVERSITY AVE.
CHICAGO, ILL. 60637

TL
RM666
A555
P69
2395
C.1

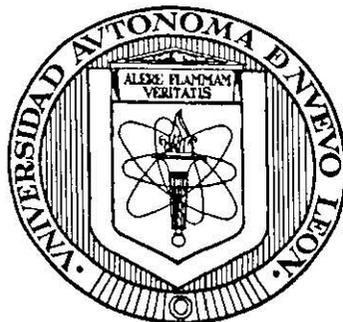
PHYSICS DEPARTMENT
5720 S. UNIVERSITY AVE.
CHICAGO, ILL. 60637



1080170730

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PLANTAS
DEL NORESTE DE MÉXICO

Por
María Esthela Pozos Sáenz

Como requisito parcial para obtener el Grado de Licenciatura de
QUÍMICO CLÍNICO BIÓLOGO

Septiembre 2005

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PLANTAS DEL NORESTE DE MÉXICO

Aprobación de Tesis:



DR. RICARDO SALAZAR ARANDA
Director de Tesis



DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES
Comité de Tesis



DRA. PAULA CORDERO PEREZ
Comité de Tesis

Evaluación de la actividad antioxidante en plantas del Noreste de México.

Presentado por:

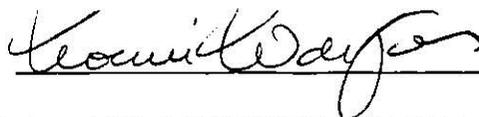
María Esthela Pozos Sáenz

Este trabajo se realizó en los laboratorios de extracción y bioensayos del Departamento de Química Analítica, en la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Ricardo Salazar Aranda.

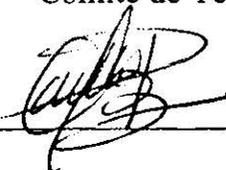
Firmas



DR. RICARDO SALAZAR ARANDA
Director de Tesis



DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES
Comité de Tesis



DRA. PAULA CORDERO PEREZ
Comité de Tesis

Dedicación

Esta Tesis esta dedicada a:

Mi madre Sra. Josefina Sáenz

y

Mis sobrinos, J. Felix. Gisela, Diana, Juanito y Mayito.

Agradecimientos

Primeramente a mi familia más cercana por el apoyo incondicional que me han mostrado siempre, gracias Mami, Juan, Mario, Sara y Almita, por su comprensión y por tener confianza en mí.

A todos mis compañeros, que siempre estuvieron presentes en la realización de esta tesis dándome ánimos. Gracias Eloy, Emigdio, Daniela, Yael, Marthita y Paco. Voy a extrañar mucho la convivencia diaria!

A mi Asesor de tesis Dr. Ricardo Salazar, por haber sido paciente conmigo, a lo largo de estos últimos seis meses, y por toda la enseñanza que obtuve al trabajar con él.

A la Dra. Noemí Waksman, por la oportunidad, y el apoyo brindado en todo lo que envolvió la realización de esta tesis.

A la Dra. Paula por participar en la realización de esta Tesis, con la recopilación bibliográfica, y recolección de las plantas.

A Ivonne porque siempre me tendió la mano, y por el apoyo moral que me dio desde el primer día que llegue al laboratorio.

A Alex porque siempre estuvo pendiente en la parte experimental de esta investigación, ayudando y aconsejando en todo lo que se pudiera.

A Idalia, por ayudarme con los extractos, y por su compañía y comprensión en la parte final de este proyecto.

A Lucy, por su ayuda y apoyo moral en la parte de desarrollo de la Tesis.

A todos los que se interesaron por mí, preguntando “como iba lo de la tesis” a mis amigos, compañeros de generación, primos, tíos, y demás familiares.

Un agradecimiento especial a todos los que fueron mis maestros a lo largo de la carrera, a cada uno de ustedes los recuerdo con cariño, pero sobre todo con admiración porque de cada uno aprendí cosas muy importantes.

Finalmente a todo el personal de este departamento por las facilidades prestadas. Gracias, Maribel, Vero, Gloria, Martha, Agustín y demás integrantes.

Resumen

Alumna:

María Esthela Pozos Sáenz

Examen de Grado: Septiembre 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título de Estudio:

**Evaluación de la actividad
antioxidante en plantas del
Noreste de México**

Número de paginas: 38

Área de estudio: Química Biomédica

Candidato al grado de Licenciado
Químico Clínico Biólogo.

Propósito y método del estudio

Los organismos aerobios poseemos un sistema de defensa en contra de los radicales libres, producidos principalmente durante la respiración celular; sin embargo factores externos pueden ocasionar un desequilibrio entre las especies reactivas del oxígeno y nuestro sistema de antioxidantes produciendo un deterioro celular que resulta en muerte o mutagénesis. Esta patología se ha relacionado con enfermedades como el Cáncer, Alz-Heimer, Enf. de Parkinson, Artritis reumatoide, Enf. Cardiovascular, etc.

La fitoterapia como medicina alternativa, actualmente es un campo muy importante de investigación para expertos en la salud, quienes se han encaminado a la búsqueda de tratamientos efectivos en contra de enfermedades, en donde la medicina alópata es limitada.

Las plantas han sido a través de los años, recursos primordiales para solventar distintos padecimientos que acaecen al ser humano. La cultura popular mexicana de la fitoterapia tiene una tradición de mas de 3,000 años, reportándose unas 3,000 especies curativas de las 30,000 especies existentes en nuestro País; muchas de este 10% no han sido estudiadas científicamente

El propósito de esta investigación fue realizar un rastreo de plantas de la región, con actividad antioxidante, frente a sistemas *in vitro* de radicales libres.

Se realizó una selección de plantas usadas tradicionalmente en nuestra región, para combatir síntomas relacionados con el deterioro celular (procesos inflamatorios, necróticos, reumáticos, etc). Para este propósito se realizaron extractos hidroalcohólicos y metanólicos primarios, los cuales se probaron por tres métodos.

Los ensayos realizados fueron: captura de radicales libres con el radical libre DPPH; contenido total de compuestos fenólicos y la inhibición de la Xantina Oxidasa, obtenidos de publicaciones científicas recientes.

Conclusiones y contribuciones:

De las plantas seleccionadas, cinco de ellas mostraron en los tres ensayos, una actividad antioxidante considerable. A partir del rastreo de plantas llevado a cabo, se seguirán analizando los extractos en otros sistemas con el fin de comprobar su efecto beneficioso en enfermedades degenerativas.

Índice

Capítulo	Página
1. Introducción	1
1.1 Factores Ambientales.....	3
1.2 Factores Endógenos.....	3
1.3 Interacción de radicales libres y Biomoléculas.....	5
1.3.1 Peroxidación lipídica.....	5
1.3.2 Oxidación de Proteínas.....	6
1.3.3 Oxidación de Ácidos Nucleicos y Nucleótidos.....	6
1.4 Antioxidantes.....	7
1.5 Flavonoides como antioxidantes.....	8
1.6 Evaluación de la actividad Antioxidante.....	9
1.7 La Herbolaria como Medicina Alternativa.....	10
1.8 Medicina Tradicional Mexicana.....	12
1.9 Justificación.....	12
1.10 Objetivo General.....	13
1.11 Objetivos específico.....	13
2. Material y Métodos	
2.1 Reactivos.....	14
2.2 Material.....	14
2.3 Equipo.....	14
2.4 Selección y Recolección de Plantas.....	15
2.5 Extracción.....	15

2.6 Captura de radicales libres con DPPH (1,1-difenil-2picrilhidrazilo)	16
2.6.1 Revelado de Cromatografía en Capa Fina	17
2.6.2 Medición Espectrofotométrica (UV-Vis)	18
2.7 Determinación de Fenoles Totales	18
2.8 Inhibición de xantina oxidasa	19
3. Resultados	20
3.1 Selección de plantas	20
3.1.1 <i>Turnera diffusa</i> (Damiana)	21
3.1.2 <i>Cucurbita spp.</i> (Calabacilla)	21
3.1.3 <i>Fluorensia Cernua</i> (Hojasen)	21
3.1.4 <i>Selaginella pilifera</i> (Flor de peña)	21
3.1.5 <i>Juglans mollis</i> (Nogalillo)	22
3.1.6 <i>Centaurea americana</i> (Centaurea)	22
3.2 Extractos de las Plantas	22
3.3 Reducción de DPPH. Cromatografía en Capa Fina	22
3.4 Reducción de DPPH. Determinación UV-Vis	22
3.5 Determinación de Fenoles Totales	24
3.6 Inhibición de xantina oxidasa	25
4. Discusión	27
5. Conclusiones	32
6. Perspectivas	33
7. Bibliografía	34

Lista de Figuras

Figura	Descripción	Página
1	La imagen muestra la estructura básica de un compuesto flavonoide.	9
2	La imagen muestra el revelado de la placa cromatografica con DPPH; los extractos activos se observan con una coloración amarilla.	23

Lista de Tablas

Tabla	Contenido	Página
1	Técnicas utilizadas para extracción.....	16
2	Lista de plantas recolectadas.....	20
3	Porcentajes de recuperación de extractos.....	23
4	Porcentajes de Reducción de DPPH.....	24
5	Contenido de Fenoles Totales.....	25
6	Porcentajes de Inhibición de xantina oxidasa a concentraciones de 10, 20 y 30 µg/ml.....	26
7	Porcentajes de Inhibición de xantina oxidasa a concentraciones de 50, 100 y 150 µg/ml.....	26

Abreviaturas y símbolos

ROS	Reactive Oxygen Species.
ADN	Ácido desoxirribonucleico
XO	Xantina Oxidasa
DPPH	1,1-difenil,2-picrilhidrazilo
ABTS	[Acido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)]
CCF	Cromatografía en capa fina
UV-Vis	Ultravioleta Visible
g	gramos
mg	miligramos
µg	microgramos
ml	mililitro
min	minutos
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
OMS	Organización Mundial de la Salud
N.L	Nuevo León
Coah.	Coahuila
%	porcentaje
e	Absortividad Molar
°C	Grados Celsius

CAPITULO I

INTRODUCCION

Todos los organismos aerobios poseemos un sistema de defensa contra los productos reactivos del oxígeno (ROS, por sus siglas en ingles *Reactive Oxigen Species*). Sin embargo puede presentarse en el organismo un desequilibrio a favor de estas especies reactivas, produciendo un daño sobre las macromoléculas, tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN), lípidos, proteínas y carbohidratos, volviendo vulnerable a la célula y originando su muerte o mutagenesis ⁽¹⁾. La muerte celular ocurre por el daño sobre la membrana celular, la cual esta constituida principalmente por lípidos y proteínas; al dañarse la membrana pierde su fluidez normal y se produce lisis (se alteran procesos como traducción de señales, secreción y endocitosis) ⁽²⁾. El daño al material genético puede ser tan severo que la célula ya no este capacitada para seguir ordenado las reacciones bioquímicas que se necesitan para vivir y simplemente muere; por otro lado puede ocurrir una mutación en el ADN, que al no ser corregido, puede traducirse en una neoplasia.

El cáncer es una de las enfermedades de mayor importancia en nuestros días, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se diagnostican más de 11.000.000 de casos y ocurren 7.000.000 de decesos cada año, lo que equivale a 12.5% de muertes por enfermedad a nivel mundial. Esta enfermedad se define como la proliferación descontrolada de una o varias líneas celulares por efecto del daño al material genético que sufrió la célula; esta producción celular descontrolada trae como consecuencia, invasividad a tejidos locales y dispersión o metástasis a otras partes del

cuerpo. El daño al ADN en varios tipos de cánceres, se relaciona directamente con la exposición a los agentes reactivos del oxígeno (ROS).

Se sabe además, que otras enfermedades con las que se asocian dichos agentes son: Alz-Heimer, Enfermedades cardiovasculares, Diabetes, Artritis reumatoide enfermedad de Parkinson, etc. ⁽³⁻⁵⁾.

Los radicales del oxígeno, y otros agentes oxidantes que fácilmente pueden llegar a convertirse en radicales (peróxido de hidrógeno, ac. hipocloroso, ozono) se definen como especies reactivas que contienen uno o más electrones desapareados, lo que las convierte en moléculas reactivas e inestables; como consecuencia logran desestabilizar a moléculas vecinas, tomando electrones de los orbitales atómicos y ocasionando una reacción en cadena generada por una lucha en lograr estabilización, esto resulta en la descomposición de dichas moléculas y su oxidación.

Los radicales libres, pueden ser de procedencia endógena o estar presentes en el ambiente. Se generan *in vivo* por la acción metabólica natural de ciertas enzimas, [xantina oxidasa (XO), NADPH oxidasa], o por filtración de electrones de la cadena de transporte mitocondrial. Los presentes en el ambiente se atribuyen al uso de ciertos químicos (humo de cigarrillos), por la acción catalítica de los metales de transición (Fe^{2+} , Cu^+) y por radiación del ambiente, especialmente de la forma de ozono atmosférico (O_3) ⁽¹⁾.

Las principales especies reactivas del oxígeno y sustancias prooxidantes son:

Óxido nítrico (NO)

Radical hidroxilo (HO^\cdot)

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Anión superóxido (O_2^-)

Oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$)

Peróxido (ROO^\cdot)

Ozono (O_3)

1.1. Factores Ambientales

El estilo de vida en la actualidad, difiere mucho al que se tenía hace un par de décadas, situaciones como la expansión de la industria y tecnología, y el aumento en la concentración de masas en las grandes ciudades, ha traído como consecuencia un cambio en los hábitos alimenticios y ocupacionales de muchas personas.

Se han descrito algunos factores ambientales que influyen en la formación de radicales libres en el organismo. Estos son, radiaciones ionizantes, contaminantes del aire (ozono, óxido nítrico, Radón), humo de cigarrillos, exposición a químicos en áreas de trabajo, ingesta de algunos fármacos, dietas bajas en alimentos antioxidantes y estilos de vida sedentarios, entre otros ⁽⁶⁻⁸⁾.

Entre las formas más peligrosas de contaminación se deben considerar las radiaciones. Este tipo de contaminación ambiental afecta al suelo y a las aguas, y manifiesta sus efectos a corto plazo, así como a largo plazo después de muchas generaciones. Los efectos inmediatos están caracterizados por las alteraciones de las membranas celulares, la formación de radicales libres, la oxidación de las proteínas de membrana y de enzimas. Los efectos tardíos son aquellos que influyen en el ADN ⁽⁶⁾.

1.2. Factores Endógenos

Los procesos fisiológicos normales del organismo, no son de menor consideración en el proceso oxidativo. Estos procesos incluyen la cadena respiratoria, producción de enzimas en el metabolismo de productos de desecho, y las generadas en respuesta a un proceso inflamatorio.

La mitocondria constituye la fuente principal de radicales libres. Este fenómeno se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, que es la última etapa de producción de protones de alta energía, y cuyo pasaje a través de la membrana interna

mitocondrial genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar el ATP o adenosina trifosfato ⁽⁵⁾.

En este proceso de fosforilación oxidativa, el oxígeno actúa como aceptor final de electrones, adquiriendo en más del 95 % de estas reacciones un total de 4 electrones de moléculas con producción de 2 moléculas de agua. Una consecuencia directa de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas puede entregar 1 ó 2 electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los radicales libres ⁽⁵⁾.

Los leucocitos polimorfonucleares constituyen una fuente importante de producción de radicales, cuando se activan por diversas proteínas que actúan en conjunto con ellos (complemento, interleucinas, etc). Los leucocitos poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa generadora de oxígeno que en presencia de hierro se transforma en el altamente tóxico radical hidroxilo (OH[•]). Esta situación se da particularmente en los procesos inflamatorios ⁽⁵⁾.

La enzima mieloperoxidasa, producida por los neutrofilos, reacciona con el H₂O₂ proveniente de las células fagocitarias activadas por contacto con partículas extrañas, formando un complejo enzima-sustrato con una fuerte capacidad oxidativa. El producto final de esta reacción es el ácido hipocloroso (HOCl). Finalmente el HOCl puede reaccionar con otra molécula de H₂O₂ y dar lugar al oxígeno singulete.

La xantina oxidasa, enzima que predomina en los endotelios, normalmente depura las xantinas, y es una fuente importante de Aniones superóxido (O₂⁻) ⁽⁸⁾.

El ejercicio de alta intensidad induce estrés oxidativo; los mecanismos de este estrés no se comprenden todavía con claridad, a pesar de que estudios recientes sugieren que las proteínas hemo podrían jugar un papel importante como iniciadoras y transductoras del daño por radicales libres.

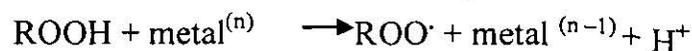
Los radicales libres producidos en la fisiología humana normal, se controlan con los mecanismos antioxidantes. Sin embargo, como ya se ha mencionado, puede ocurrir un desbalance, por un estado patológico, en donde esta producción de radicales se incrementa sustancialmente, ingresándose al estado de estrés oxidativo ⁽⁸⁾.

1.3. Interacción de Radicales Libres y Biomoléculas

1.3.1. Peroxidación lipídica

La peroxidación de los lípidos expuestos al oxígeno es la causa no solo del deterioro de los alimentos, sino también del daño a los tejidos *in vivo*, donde pueden llegar a ser causa de cáncer. Los efectos deletéreos son iniciados por los radicales libres (ROO·, RO·, OH·) producidos durante la formación de peróxidos a partir de ácidos grasos que contienen grupos metilenos unidos por dobles ligaduras interrumpidas, es decir, de los ácidos grasos polinsaturados que se encuentran en la naturaleza. La peroxidación lipídica se lleva a cabo por un mecanismo de reacción en cadena, generado a partir de un radical libre, donde participa como iniciador el radical hidroperóxilo (ROOH·) provocando un suministro continuo de radicales; finalmente una vez oxidados los lípidos, ocasionan efectos devastadores desestabilizando la permeabilidad celular y ocasionando su muerte ⁽⁹⁾. El mecanismo de la peroxidación lipídica se muestra a continuación:

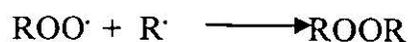
1.- Iniciación: producción de radicales a partir de un precursor.



2.- propagación:



3.- Terminación:



1.3.2. Oxidación de proteínas

Todas las cadenas laterales de los aminoácidos que forman parte de las proteínas son susceptibles de ser atacadas por el radical hidroxilo (OH^\cdot), aunque algunas son más vulnerables que otras como es el caso de las cadenas laterales de la tirosina, fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína. En consecuencia la exposición de proteínas a sistemas generadores de radicales libres conduce a modificaciones de la estructura terciaria, que puede acompañarse de una ruptura química, un incremento en la susceptibilidad al ataque proteolítico y a la pérdida de la función biológica.

Uno de los radicales más reactivos a la estructura de proteínas es el óxido nítrico (NO). Además, se ha sugerido que las proteínas pueden actuar como “atrapadoras” de la energía química liberada por los radicales libres y transferirla a otra molécula ⁽⁷⁾.

1.3.3. Oxidación de ácidos nucleicos y nucleótidos

La importancia biológica de los ácidos nucleicos nos obliga a considerar como un efecto de gran repercusión el que se presenten modificaciones o deleciones de las bases de la molécula de ADN causadas por la presencia de radicales libres. A semejanza de las proteínas, parece existir una baja posibilidad del establecimiento de reacciones en cadena; sin embargo, el daño puede ser más significativo, aunque sea muy limitado en extensión y localización. La interacción de radicales libres con el ADN causa cambios conformacionales, alteración de bases y ruptura de una o de la doble cadena y pérdida de nucleótidos, eludiendo el sistema de reparación al presentar una mutación antes de la replicación. Las modificaciones de las bases se deben, en gran parte, a los metales de transición, fundamentalmente al ión ferroso, que se encuentra unido al ADN y que en presencia de peróxido de hidrógeno, genera el hidroxilo que modifica las bases. El hidroxilo puede atacar tanto purinas como pirimidinas, además de generar rupturas en las cadenas de ADN ⁽⁷⁾.

1.4. Antioxidantes

Un antioxidante se define como aquella sustancia que presente en bajas concentraciones, y expuesta a un sustrato potencialmente oxidable, disminuye significativamente o previene la oxidación de ese sustrato; una gran cantidad de estos se presenta en el reino vegetal en forma de compuestos polifenólicos⁽¹⁾.

La importancia que han logrado cobrar los antioxidantes como “preventores del envejecimiento” nació a partir de la observación de una relación directa entre personas que llevaban una dieta rica en frutas y vegetales y la disminución de padecimientos tales como enfermedades cardiovasculares y distintos tipos de cánceres, encontrando sustancias que tienen la capacidad de reducir los agentes oxidantes que producen el envejecimiento.

Hace varias décadas se reconoció que los antioxidantes de origen exógeno (consumidos en la dieta) se encuentran abundantemente en el reino vegetal, en forma de compuestos fenólicos; desde entonces muchos estudios se han enfocado en productos vegetales de consumo común ^(3,10-14).

Este tema en la actualidad ha cobrado mayor importancia entre especialistas de la salud quienes han recurrido a las plantas con el fin de conseguir antioxidantes más potentes que los ya conocidos.

El sistema de defensa antioxidante humano consiste en un sistema enzimático y otro no enzimático. El primero incluye enzimas tales como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSHPx), glutatión reductasa, catalasa entre otras. El segundo se divide en dos grupos: los de origen endógeno y los proporcionados en la dieta. El glutatión reducido (GSH), ácido úrico y albúmina son algunos de los antioxidantes endógenos, mientras que las vitaminas C, E, Beta Caroteno y los compuestos polifenólicos como los flavonoides representan los antioxidantes principales de la dieta ⁽¹⁾.

También se pueden clasificar a los antioxidantes con respecto a su mecanismo de acción en dos clases; los primarios o preventores, y los secundarios que capturan los radicales.

Los primarios, previenen la formación de nuevos radicales, convirtiéndolos en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar, o evitando la formación de radicales a partir de otras moléculas. Por ejemplo la enzima glutatión peroxidasa, que convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres. Las catalasas, la glutatión reductasa, y las proteínas que se unen a los metales como la ferritina y transferrina, limitan la disponibilidad de hierro necesario para formar el radical hidroxilo.

Los secundarios tienen la función de capturar los radicales libres evitando la reacción en cadena, por ejemplo, la vitamina E, C, carotenos, ácido úrico, albúmina, melatonina, compuestos fenolicos etc ⁽⁷⁾.

1.5. Flavonoides como antioxidantes.

Muchos estudios han mostrado que la actividad antioxidante de las plantas se debe a la presencia de flavonoides ⁽¹⁰⁾. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, sobre todo en las partes aéreas de las plantas. Los flavonoides se encuentran en las vacuolas de las células vegetales y salen al citoplasma celular para realizar su función.

Químicamente, los flavonoides son difenilpropanos (C₆-C₃-C₆) y consisten en un anillo de benceno (A) condensado con un anillo de seis miembros (C), el cual es substituido con un grupo fenilo (B) (fig. 1) ⁽¹⁾. La rutina y la quercitina son ejemplos de flavonoides.

En las plantas actúan como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, repelentes, atractores visuales etc. Muchos estudios sugieren que los flavonoides manifiestan diversas actividades biológicas, como antialérgicos, antiinflamatorios y antivirales, pero la actividad más interesante es su poder antioxidante, la cual se debe a la capacidad de reducir la formación de los radicales libres o bien, de capturarlos. La actividad antioxidante *in vitro* de los flavonoides ha sido estudiada ampliamente, surgiendo una relación importante entre la estructura de los flavonoides y su capacidad antioxidante. Dicha capacidad *in vivo* de los flavonoides, está menos documentada debido a que no se conoce bien como actúa en los humanos. Los flavonoides ingeridos son degradados a varios ácidos fenólicos, algunos de los cuales todavía poseen la habilidad de capturar radicales libres. Los flavonoides absorbidos y sus metabolitos, pueden jugar un papel importante *in vivo*. Esto se ha demostrado experimentalmente a través de la cuantificación de antioxidantes en plasma después de la ingesta.⁽¹⁵⁾

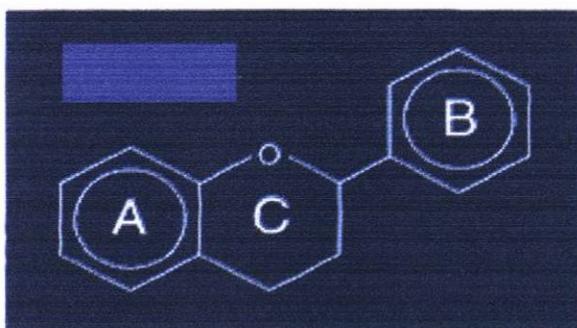


Fig. 1. Estructura básica de un flavonoide

Los compuestos polifenólicos pueden actuar como antioxidantes por diferentes mecanismos:

- 1) Capturando radicales libres, 2) disminuyendo el oxígeno singulete,
- 3) Quelando metales de transición, 4) inhibiendo enzimas ⁽¹⁾

1.6. Evaluación de la actividad antioxidante

Una gran cantidad de publicaciones reporta la actividad antioxidante de plantas de uso común distribuidas en todo el mundo o de regiones endémicas. En base a los mecanismos de acción se han desarrollado una gran diversidad de métodos para su

estudio. los procedimientos más utilizados son: la captura de radicales libres con DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo),^(14,16-21) la inhibición de enzimas (xantina oxidasa, Lipooxigenasa, Ciclooxygenasa),^(13-15,22,23) la cuantificación de fenoles totales con el reactivo Folin-Ciocalteu,⁽¹⁰⁾ la medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS),⁽⁹⁾ la oxidación de lípidos mediante la utilización de liposomas,⁽¹⁷⁾ la capacidad en equivalentes Trolox utilizando ABTS [Acido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)],^(1,24) la disminución del oxígeno singulete,^(1,8) quimioluminiscencia utilizando el sistema HRP-luminol-H₂O₂,⁽²⁵⁾ entre otras.

Cabe mencionar que si bien, se han llegado a establecer varios mecanismos de acción de antioxidantes, es aún difícil establecer un método que evalúe confiablemente la capacidad antioxidante, debido a que el área de los antioxidantes es todavía un tema complejo, y los resultados de los estudios publicados varían considerablemente⁽²⁶⁾.

Sin embargo, en todo el mundo se realizan estudios de un gran número de plantas y alimentos de tipo vegetal para conocer sus propiedades antioxidantes y como consecuencia se han elucidado más de 8.000 estructuras que poseen este tipo de efecto antioxidante. De hecho se han sintetizado otros compuestos que logran potenciar la actividad presentada por el compuesto original. Sin embargo falta mucho por mostrar y en un futuro se pretende contar con compuestos que sirvan como terapia o prevención de distintos sistemas celulares que se ven afectados por destrucción tisular, que conlleven este tipo de mecanismos.

1.7. La Herbolaria como Medicina Alternativa.

Desde hace algunos años la investigación de plantas medicinales ya no es vista como un folklore, sino, como una relevante actividad científica, ya que las plantas medicinales son una alternativa viable en el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas, en la obtención de nuevas moléculas bioactivas que se manifiesten en diferentes mecanismos de acción⁽²⁷⁾.

El desarrollar nuevos medicamentos a partir de plantas medicinales, se justifica debido a que la probabilidad de encontrar nuevas moléculas en las especies vegetales utilizadas por la medicina tradicional es notablemente alta, así como su posibilidad de expresar diferentes mecanismos de acción, ofreciendo una nueva estrategia terapéutica. (27)

En el resurgimiento de la importancia de las plantas medicinales como fuente de potenciales terapéuticos, son los países del primer mundo quienes invierten grandes cantidades de dinero en la investigación farmacológica de plantas medicinales, obteniendo la materia prima vegetal de los países tropicales generalmente en desarrollo (27).

La investigación de plantas medicinales abarca diferentes disciplinas: la Etnomedicina, la Farmacología, la Fitoquímica, la Toxicología, la investigación clínica, la Biotecnología y el diseño de medicamentos (27).

Hoy se cuenta ya con grandes obras, catálogos, colecciones, bancos de datos sobre medicina tradicional, sus recursos humanos, sus recursos naturales, plantas medicinales, y organización social de médicos tradicionales (27).

La OMS reconoció la importancia de este recurso terapéutico y generó un programa de reconocimiento y promoción de la medicina herbolaria y en 1990 promovió una serie de recomendaciones para la regularización de los medicamentos herbolarios.

La Secretaría de Salud en el País, reconoce que muchas de las plantas medicinales ampliamente conocidas por la población, están siendo utilizadas como fitofármacos y que esta práctica cada día tiene mayor relevancia, por lo que ha construido el marco para la regulación de estos productos (medicamentos herbolarios) para lo cual ha formado diversos instrumentos como la propuesta del nuevo Reglamento de la Ley General de Salud en materia de control sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios en el cual se precisa la manera en que estos productos son

tratados. El nuevo reglamento reconoce tres tipos de medicamentos: El químico farmacéutico, el homeopático y el herbolario ⁽²⁷⁾.

El medicamento herbolario como nuevo concepto “Es el producto elaborado con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de alguna planta o extractos o trituras así como: jugos, resinas, aceites grasos y esenciales presentados en forma farmacéutica. Su uso terapéutico está basado en el conocimiento tradicional o popular y su efectividad y seguridad están establecidas en la literatura nacional como internacional” ⁽²⁷⁾.

1.8. Medicina Tradicional Mexicana

En México la cultura popular de la fitoterapia tiene una tradición de más de 3,000 años, reportándose unas 3,000 especies curativas de las 30,000 especies existentes en nuestro País. Sin embargo, una gran mayoría no han sido estudiadas científicamente, ⁽²⁸⁾ además la mayor parte de las publicaciones sobre herbolaria mexicana, provienen del centro del País.

Por otra parte, la región del Norte del País cuenta con una gran variedad de flora que se ha adaptado y crecido bajo las condiciones climáticas tan singulares de nuestra región y muchas de estas especies no han sido estudiadas todavía.

1.9. Justificación

Las enfermedades degenerativas han mostrado un aumento creciente en los últimos años, la etiología de dichas enfermedades está relacionada íntimamente con la presencia de radicales libres. La disposición de terapias alternas y novedosas contribuiría a mejorar la calidad de vida de los pacientes. Por esto se consideró importante iniciar el rastreo de la actividad antioxidante de plantas del Noreste de México.

1.10. Objetivo General

Evaluar la actividad antioxidante de seis plantas del Noreste de México.

1.11. Objetivos Específicos

- 1.-Seleccionar plantas del Noreste de México reportadas por sus propiedades antioxidantes.
- 2.-Obtener extractos primarios de las especies seleccionadas.
- 3.-Evaluar la actividad antioxidante de los extractos, a través de los ensayos:
 - a) Revelado de CCF con DPPH.
 - b) Reducción de DPPH por UV-Vis.
 - c) Determinación de fenoles totales.
 - d) Inhibición de la Xantina Oxidasa.

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

2.1. Reactivos

Los siguientes reactivos fueron adquiridos comercialmente en la compañía CTR y son de grado analítico: metanol, etanol, ácido acético glacial, acetato de etilo, ácido fórmico, acetona. De la compañía Sigma Aldrich se adquirieron los productos: pirocatecol, xantina, xantina oxidasa, quercitina, rutina, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio, carbonato de sodio. El DPPH (1,1-difenil,2-picrilhidrazilo) y el reactivo de Folin Ciocalteu fueron adquiridos de Fluka.

2.2. Material

Pipetas automáticas Transferpette de 50, 100, 1000 μ l.

Cubeta de cuarzo de 1 ml y 1 cm de trayecto óptico.

Cromatofolios de sílica 60 F₂₅₄

Cuba de vidrio 20 X 21 cm.

2.3. Equipo

Balanza digital (Scout Pro) OHAUS

Potenciómetro (061) Beckman

Vortex (MS1) Minishaker IKA

Ultrasonido (3510) BRANSON

Licadora Man

Espectrofotómetro (DU 7500) Beckman

Rotavapor (011) Buchi

Balanza analítica (GR-120) A&D, Co.

Agitador mecánico (unimax 1010) Heidolph

2.4. Selección y Recolección de Plantas

Bajo la valiosa ayuda del Biólogo Humberto Sánchez, se seleccionaron plantas de la región con propiedades antioxidantes.

Un espécimen de cada planta se envió al Herbario Institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, para confirmar su identificación.

Las plantas se cortaron de manera cuidadosa a fin de no alterar sus metabolitos, se dejaron secar por varias semanas a temperatura ambiente, en un lugar libre de humedad, posteriormente se separaron en hojas, tallos, raíces y flores, se molieron y conservaron en bolsas de plástico para su posterior extracción.

2.5. Extracción

Se realizaron extracciones metanólicas (damiana, calabacilla, hojaseñ) y etanólicas 90% (flor de peña, nogalillo, centáurea) como se muestra en la Tabla I

En todos los casos el extracto se recuperó en un matraz bola y se evaporó a sequedad en rotavapor cuidando que la temperatura del baño no fuera mayor a 37 °C. El extracto se recuperó con un poco de solvente y se colocó en una caja petri hasta sequedad a temperatura ambiente. Finalmente se almacenó en un frasco oscuro, se selló con nitrógeno gaseoso y se mantuvo en refrigeración (2-4°C).

Tabla I. Procedimientos para extracción.

Planta	Parte utilizada	Material en polvo (g)	Solvente	Volumen total	Tiempo de agitación	# de extracc.	Referencia
Damiana	Hojas	100	Metanol	1.4 L	20 min, y luego en reposo 24h	3	(30)
	Tallos	100					
	Raíz	86.7					
Calabacilla	Hojas	100	Metanol	1.4L	20 min, y luego en reposo 24h	3	(30)
	Tallos	100					
	Raíz	100					
Hojasen	Hojas	100	Metanol	1.4L	20 min, y luego en reposo 24h	3	(30)
	Tallos	100					
	Raíz	100					
	Flor	20.4	Metanol	260ml			
Flor de peña	Hojas	63.0	Etanol:H ₂ O 9:1	630 ml	20 min	1	(29)
Nogalillo	Hojas	100	Etanol:H ₂ O 9:1	1L	90min, a 116 rpm	1	(29)
	Fruto	58.0		580ml			
	Corteza	98.0		980ml			
Centaurea	Flor	100	Etanol:H ₂ O 9:1	1L	90 min a 116 rpm	1	(29)

2.6. Captura de Radicales Libres con DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

Los ensayos realizados para evaluar la capacidad antioxidantes de los extractos basados en la captura de radicales libres con DPPH, fueron descritos anteriormente por E.H. Naik y cols. (2001) ⁽²⁰⁾ y Juma B. y cols ⁽³¹⁾

2.6.1. Revelado de Cromatografía en Capa Fina

1 mg de extracto se disolvió en 1ml de etanol, posteriormente se sembraron 10µl de la solución en una cromatoplaque de sílica 60 F₂₅₄. Se utilizó quercitina (1mg/ml) como control positivo. La cromatografía se desarrolló utilizando como fase móvil acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:27). Los solventes se mezclaron uno a uno en el orden mencionado, agitando constantemente para su óptima disolución. La placa se retiró y se dejó secar por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se reveló con DPPH (2 mg/ml en etanol), utilizando un aspersor manual para el rociado de la placa. Después de 30 minutos se observaron las manchas claras en contraste con el fondo morado de la placa.

Los 15 extractos, se sembraron junto con el control positivo en la placa cromatográfica en el siguiente orden:

1. *Turnera diffusa*, hoja.
2. *Turnera diffusa*, tallo.
3. *Turnera diffusa*, raíz.
4. *Cucurbita spp.*, hoja.
5. *Cucurbita spp.*, raíz.
6. *Cucurbita spp.*, tallo.
7. *Fluorensia cernua*, hoja.
8. *Fluorensia cernua*, tallo.
9. *Fluorensia cernua*, raíz.
10. *Fluorensia cernua*, flor.
11. *Selaginella pilifera*, hoja.
12. *Juglans mollis*, hoja.
13. *Juglans mollis*, fruto.
14. *Juglans mollis*, corteza.
15. *Centaurea americana*, flor.
- 16.-Quercitina (control)

2.6.2. Medición Espectrofotométrica (Uv-Vis)

Se prepararon soluciones de cada uno de los extractos a una concentración de 1 mg/ml en etanol y una solución de DPPH de 0.2mg/ml en etanol. En un tubo de ensaye se colocaron 0.5 ml de solución del extracto y se adicionaron 0.5 ml de solución DPPH. Se agitaron y dejaron reaccionar en la oscuridad durante 30 min. La medición espectrofotométrica se realizó a una longitud de onda de 517 nm, en una celda de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico y capacidad de 1 ml. Se utilizaron como control positivo quercitina y rutina. La reducción del DPPH se calculó a partir del cambio de absorbancia del reactivo con etanol (control) mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ reducción} = \frac{(\text{Abs de ctrl.}) - (\text{Abs de mta.}) \times 100}{\text{Abs de ctrl}}$$

2.7. Determinación de Fenoles Totales.

La cantidad de Fenoles Totales se determinó de acuerdo al método descrito por Charanjit Kaur y cols.(2001).⁽¹⁰⁾ Brevemente, 100 µl de solución del extracto (1 mg/ml en etanol), se disolvieron en 3 ml de agua destilada, se agregaron 0.5 ml del reactivo Folin-ciocalteau, y se dejó reposar 3 min, y posteriormente se adicionaron 2 ml de solución de carbonato de sodio (20 %). Los tubos se mezclaron por inmersión y se dejaron reposar durante una hora. Finalmente se leyó la absorbancia a 650 nm. Como control positivo se utilizó pirocatecol. El contenido total de fenoles se expresó como gramos (g) de pirocatecol, por cada 100g de muestra, según la siguiente ecuación:

$$\frac{(\text{Abs de la mta}) \times 100}{\text{Absorbancia}}$$

2.8. Inhibición de Xantina Oxidasa

Para este ensayo enzimático se colocó xantina oxidasa (24 mU), amortiguador de fosfatos pH de 7.4 (50 mM), extractos a concentraciones entre 10 y 150 $\mu\text{g/ml}$ (disueltos en etanol) y xantina (25 μM), en un volumen final de 1 ml. Se siguió la aparición de ácido úrico a una longitud de onda de 292 nm (Uv-Vis), de acuerdo al procedimiento descrito por A. Russo y cols. (2002) ⁽¹⁴⁾.

En la celdilla de reacción se puso la solución buffer, la enzima y posteriormente el extracto, esta solución se leyó como blanco. Se comenzó a leer inmediatamente después de agregar el sustrato (xantina). El tiempo de lectura fue de tres minutos, con intervalos de lectura de 30 seg. La celdilla se mantuvo a una temperatura de 24°C.

Cálculos:

La actividad enzimática se define como la transformación de 1 μmol de sustrato o la formación de 1 μmol de producto por minuto durante la reacción enzimática y se expresa en unidades internacionales por ml (UI/ml). Para obtener la actividad enzimática se multiplica el cambio de Abs/min por un factor (F), que resulta de la siguiente ecuación:

$$F = 1/\epsilon (\text{vol. en la cubeta})(\text{dil. de la enzima})$$

Donde:

$$\epsilon = \text{absortividad molar} = 9.2 \times 10^3$$

Dil = dilución de la enzima en la cubeta.

El porcentaje de actividad se calcula relacionando la actividad enzimática sin el extracto, y la que se obtuvo con la presencia del extracto; una vez conociendo el porcentaje de actividad se calcula por diferencia el porcentaje de inhibición.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1. Selección de Plantas

Para la selección de las plantas se realizó una búsqueda bibliográfica y se consultó al experto Botánico Biol. Humberto Sánchez. Se seleccionaron seis plantas y se recolectaron de diferentes puntos de la Región (Tabla II). Especímenes secos y bien cuidados, se enviaron al Herbario Institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, para la identificación y/o comprobación de la especie de cada planta.

Tabla II. Selección y Recolección de Plantas

Nombre científico	Nombre común	Lugar de Recolección	Folio
<i>Turnera diffusa</i>	Damiana	Cadereyta, N. L.	2872
<i>Cucurbita spp.</i>	Calabacilla	García, N. L.	(*)
<i>Flourensia cernua</i>	Hojasen	Ramos Arizpe, Coah.	(*)
<i>Selaginella pilifera</i>	Flor de peña	Villaldama, N. L.	18458
<i>Juglans mollis</i>	Nogalillo	Villaldama, N. L.	17854
<i>Centaurea americana</i>	Centáurea	Villa de Santiago, N. L.	17624

(*) A ún no han sido clasificadas.

3.1.1. *Turnera diffusa* (Damiana)

Planta herbácea de la familia de las turneráceas que mide entre 30 y 70 cm de altura. Su tallo es ramoso con hojas alternas ovaladas y aromáticas. Las flores son pequeñas de color blanco o amarillo.

Uso tradicional: anti-anémica, conceptiva, actúa en contra de la frigidez e impotencia, diurética, contra malestar menstrual, problemas de próstata, tónico general y cerebral ⁽²⁸⁾.

3.1.2. *Cucurbita spp.* (Calabacilla)

Planta anual de la familia de las cucurbitáceas, su tallo es rastrero o trepador; las hojas rugosas el fruto globoso de pulpa fibrosa y firme.

Uso tradicional: fortificante y tónico cerebral, deshace los cálculos renales y disminuye el ardor de vejiga causado por “arenillas”, previene el cáncer estomacal, actúa contra problemas de próstata quemaduras, irritaciones de piel y sarna ⁽²⁸⁾.

3.1.3. *Fluorensia cernua* (Hojasen)

Arbusto de la familia de las compuestas que mide un metro de altura. Sus hojas son elípticas, agudas y aromáticas, de dos a tres centímetros de largo y de sabor muy amargo.

Uso tradicional: contra problemas estomacales, ayuda a poner en orden los procesos digestivos ⁽²⁸⁾.

3.1.4. *Selaginella pilifera* (Flor de peña)

Planta herbácea de 15 a 20 cm de alto con las hojas obtusas, con un pelo largo en el ápice.

Uso tradicional: Bebidas y licores: se adiciona al tesguino. La infusión de esta planta se toma contra cólicos y enfermedades gastrointestinales ⁽³²⁾.

3.1.5. *Juglans mollis* (Nogalillo)

Árbol de la familia de las juglandaceas, que alcanza 15 metros de altura. Su madera es dura rojiza y parda, con hojuelas ovales y puntiagudas.

Uso tradicional : Las hojas se utilizan en cataplasmas contra el reumatismo. El cocimiento de las hojas favorece la cicatrización de las llagas rebeldes, alivia las aftas, leucorrea y además se emplea como antiescrofuloso. Para curar intoxicaciones, se usa la infusión de las hojas. El mesocarpio del fruto se usa para las ronchas, aplicando una cataplasma en la parte afectada ⁽³²⁾.

3.1.6. *Centaurea americana* (Centaurea)

No se ha descrito en la literatura las propiedades de esta especie, sin embargo se han encontrado propiedades antimicrobianas y fitotóxicas de ese género ⁽³³⁾.

3.2. Extractos de las plantas

Los porcentajes de recuperación para los extractos metanólicos estuvieron entre 5.1 y 20.1 % mientras que los hidroalcohólicos fueron de 0.47 a 10.1 %. (Tabla III.)

3.3. Reducción de DPPH. Cromatografía en Capa Fina.

De los quince extractos analizados, seis mostraron actividad en este bioensayo: tallo y raíz de Damiana, hoja, fruto y corteza de Nogalillo y flor de Centaurea (Figura 2) (véase lista de extractos página 17)

3.4. Reducción de DPPH. Determinación UV-Vis.

Se determinó la decoloración de DPPH a 517 nm y se calculó el porcentaje de reducción de cada uno de los extractos, frente al radical libre (Tabla IV). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se muestra el promedio junto a su desviación

estándar. Once extractos primarios mostraron actividad antioxidante importante. Los extractos que sobrepasan el 50% de reducción son: 1-3 y 8-15.

Tabla III. Porcentajes de recuperación.

	Planta	Parte utilizada	% Recuperación
1	Damiana	Hoja	15.80 %
2	Damiana	Tallo	8.40 %
3	Damiana	Raíz	5.40 %
4	Calabacilla	Hoja	5.60%
5	Calabacilla	Raíz	6.30 %
6	Calabacilla	Tallo	5.10 %
7	Hojasen	Hoja	20.10 %
8	Hojasen	Tallo	10.30 %
9	Hojasen	Raíz	15.60 %
10	Hojasen	Flor	6.80 %
11	Flor de Peña	Hoja	0.47 %
12	Nogalillo	Hoja	8.70 %
13	Nogalillo	Fruto	1.72 %
14	Nogalillo	Corteza	7.40 %
15	Centaurea	Flor	10.10 %

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 Q

Figura 2. Cromatografía en Capa Fina, revelada con DPPH (2 mg/ml)

3.5. Determinación de Fenoles Totales

Los resultados de la determinación de Fenoles Totales en los extractos demostraron que al menos 8 extractos contienen una cantidad superior a 4g de catecol/100g de muestra (Tabla V). Cada uno de los extractos se realizaron varias veces, y se muestra el promedio de tres de ellos con su desviación estándar.

Tabla IV. Porcentaje de Reducción de DPPH.

	Planta	Parte utilizada	% Reducción
1	Damiana	Hoja	75.3 ± 5.8
2		Tallo	86.8 ± 5.3
3		Raíz	85.8 ± 3.0
4	Calabacilla	Hoja	9.6 ± 7.8
5		Raíz	12.7 ± 13.0
6		Tallo	23.1 ± 10.1
7	Hojasen	Hoja	27.9 ± 8.4
8		Tallo	88.1 ± 4.3
9		Raíz	85.1 ± 5.4
10		Flor	51.3 ± 9.7
11	Flor de Peña	Hoja	76.8 ± 2.6
12	Nogalillo	Hoja	80.9 ± 7.9
13		Fruto	80.9 ± 7.4
14		Corteza	91.1 ± 1.0
15	Centaurea	Flor	77.2 ± 6.5
	Quercetina	Control	78.6
	Rutina	Control	96.2

Tabla V. Fenoles Totales

	Planta	Parte utilizada	g pirocatecol/ 100 g de extracto
1	Damiana	Hoja	3.0 ± 1.5
2		Tallo	4.1 ± 1.9
3		Raíz	1.5 ± 0.8
4	Calabacilla	Hoja	1.4 ± 1.4
5		Raíz	0.8 ± 1.1
6		Tallo	1.9 ± 1.3
7	Hojasen	Hoja	1.5 ± 1.1
8		Tallo	5.1 ± 1.0
9		Raíz	2.9 ± 1.7
10		Flor	4.6 ± 2.8
11	Flor de Peña	Hoja	4.6 ± 1.4
12	Nogalillo	Hoja	13.3 ± 3.0
13		Fruto	6.8 ± 3.6
14		Corteza	23.0 ± 0.9
15	Centaurea	Flor	10.5 ± 4.6

3.6. Inhibición de Xantina Oxidasa

Se determinó la actividad de la enzima xantina oxidasa en presencia y ausencia de extracto y se calculó el porcentaje de inhibición de la actividad (Tabla VI y VII). En estos experimentos se utilizaron diferentes concentraciones de los extractos y se realizaron por triplicado. Los resultados se reportan como promedio de tres experimentos y su desviación estándar. Siete extractos primarios fueron muy activos a bajas concentraciones y cuatro más mostraron una actividad moderada a concentraciones de 50 a 150 µg/mL.

Tabla VI. Porcentaje de Inhibición de Xantina oxidasa a 10, 20 y 30µg/ml de extracto

	Extracto	10µg/ml	20µg/ml.	30µg/ml.
2	Damiana, tallo	40.7 ± 11.0	20.8 ± 0.7	21.4 ± 6.3
3	Damiana, raíz	30.9 ± 6.0	24.8 ± 1.0	7.4 ± 5.5
4	Calabacilla, hoja	20.5 ± 11.9	21.8 ± 12.7	55.2 ± 26.4
5	Calabacilla, raíz	24.6 ± 4.6	17.4 ± 17.8	32.5 ± 9.6
6	Calabacilla, tallo	47.7 ± 10.3	23.7 ± 2.1	21.2 ± 1.6
14	Nogalillo, corteza	10.6 ± 0	18.9 ± 8.1	22.4 ± 15.0
15	Centáurea, flor	19.9 ± 20.9	28.9 ± 8.0	38.3 ± 2.4
	Quercetina	64.6	85.4	86.6

Tabla VII. Porcentajes de inhibición de Xantina Oxidasa a 50, 100 y 150µg/ml de extracto.

	Extracto	50µg/ml	100µg/ml	150µg/ml
1	Damiana, Hoja	31.9 ± 12.2	48.8 ± 11.6	49.1 ± 21
7	Hojasen, hoja	22.6 ± 13.2	12.6 ± 4.5	11.1 ± 7.4
8	Hojasen, tallo	36.0 ± 10.6	48.6 ± 18.5	56.9 ± 13.7
9	Hojasen, raíz	NI	NI	NI
10	Hojasen, flor	16.3 ± 1.14	NI	NI
11	Flor de Peña, hojas	10.8 ± 5.8	25.8 ± 10.1	31.7 ± 5.5
12	Nogalillo, hoja	47.1 ± 13.0	8.0 ± 7.6	NI
13	Nogalillo, fruto	15.2 ± 11.0	24.3 ± 14.4	20.0 ± 12.9
	Quercitina	87.7	100	100

NI = No activo a estas concentraciones

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se eligieron plantas del Noreste del país, ya que la mayor parte de los estudios que se reportan en la literatura están enfocados a plantas del centro y sur; ⁽²⁸⁾ siendo especies distintas a las de nuestra región. La selección se realizó bajo criterios etnofarmacológicos y quimiotaxonómicos.

El criterio etnofarmacológico se llevó a cabo con la ayuda del Biólogo Humberto Sánchez Vega, quien orientó sobre las posibles plantas localizadas en la región con actividad antioxidante, a partir de una lista de plantas que se obtuvo de una búsqueda bibliográfica.

La identificación de especies relacionadas taxonómicamente con otras plantas de las cuales ya se ha reportado su actividad antioxidante constituye el criterio quimiotaxonómico. Además proporcionó instrucciones sobre la recolección, señalando la manera cuidadosa con que se deben desprender las plantas del suelo, con el fin de no alterar los metabolitos, así como la manera de conservación; para este propósito se recomendó extenderlas y mantenerlas en un lugar libre de humedad y dejar secarlas completamente, para posteriormente ser extraídas.

La identificación final de las especies recolectadas, fue realizada por el Herbario Institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U. A. N. L. (Tabla II). Hasta el momento no se ha logrado identificar con certeza las plantas calabacilla y hojasen, ya

que es necesario obtener fotografías de las plantas que estén con flor y obtener todo el espécimen completo.

Las plantas Damiana, Calabacilla y Hojasen se extrajeron con metanol. Esto en base a lo reportado por Molina G. y cols. ⁽³⁰⁾ quienes indican que se usa metanol como sistema extractante de plantas en general, ya que con este se asegura arrastrar compuestos polares y medianamente polares. Además muchos de los estudios preliminares para comprobar actividad antioxidante en plantas se realizan con extractos metanólicos ^(12, 17, 19, 31). El porcentaje de recuperación más alto que se obtuvo utilizando este solvente, fue de 20.1 % correspondiente a las hojas de *Florenzia cernua* (hojasen), mientras que el más bajo fue de 5.1 % que pertenece al tallo de *Cucurbita spp.* (calabacilla) (Tabla III).

Por otra parte, las plantas *Juglans mollis* (nogalillo), *Selaginella pilifera* (flor de peña) y *Centaurea americana* (centaurea) se extrajeron con una mezcla etanol:agua (9:1), en base a lo reportado por Orozco Hayek y cols. ⁽²⁹⁾ quien menciona haber obtenido un mayor porcentaje de recuperación con este sistema, además se logra obtener un rango más amplio de polaridades de los compuestos, al utilizar esta mezcla de solventes. Otra razón por la cual se eligió este sistema de extracción es que varios artículos reportan extracciones etanólicas de plantas, con el fin de probar su actividad antioxidante ^(10, 14, 16). Como se indica en la Tabla III, los porcentajes de recuperación variaron desde 0.47 % (hojas de *Selaginella pilifera*) hasta 10.10 % (flor de *Centaurea americana*).

Queda claro que no se pueden comparar los porcentajes de recuperación obtenidos de diferentes plantas y con diferentes solventes, sin embargo en este trabajo se obtuvieron mejores porcentajes de recuperación con la extracción metanólica.

Se ha puntualizado la problemática para evaluar la actividad antioxidante, debido a que es un tema complejo; ⁽²²⁾ realizar la evaluación con distintos métodos confiere un punto para obtener resultados con mayor validez. En esta Tesis se utilizaron

tres ensayos para determinar la actividad antioxidante de extractos: secuestro de radicales libres con DPPH, determinación de Fenoles Totales e inhibición de Xantina Oxidasa; estos ensayos se eligieron a partir de una gran variedad de ensayos descritos en la literatura por su sencillez y bajo costo.

Inicialmente se empleó la técnica de Cromatografía en Capa Fina, con el objetivo de analizar la presencia de antioxidantes utilizando el revelador 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), un radical libre estable, que reacciona con agentes reductores (antioxidantes). El reactivo DPPH tiene un color morado; al aparearse los electrones cambia a amarillo. ⁽³¹⁾ Los resultados demostraron la actividad de seis de los quince analizados (Figura 2); en este procedimiento se utilizó quercitina como control positivo.

Por otro lado, se utilizó este mismo radical libre estable para realizar la determinación cuantitativa del porcentaje de reducción del DPPH, por medio de espectrofotometría UV-Vis. El DPPH provee información de la reactividad con compuestos antioxidantes, por medio del mecanismo de captura electrónica. El DPPH tiene un color morado cuando su electrón no está apareado, cuando el radical libre llega a estar apareado, al estar en contacto con el antioxidante, resulta una coloración amarilla, la cual se mide a 517 nm. ⁽¹⁾ Como se muestra en la Tabla IV, once de los 15 extractos analizados, mostraron un porcentaje de reducción mayor a 50%, incluyendo las seis que demostraron la actividad antioxidante por Cromatografía en Capa Fina.

El segundo ensayo realizado en el presente trabajo fue la determinación de fenoles totales utilizando el reactivo de Folin Ciocalteau. Este reactivo se reduce en presencia de compuestos fenólicos, a pH básico, formando compuestos cromógenos que pueden ser medidos espectrofotométricamente a 650nm. El contenido de fenoles totales, como ya se ha mencionado, está estrechamente relacionado con la presencia de antioxidantes en forma de flavonoides⁽²⁶⁾. Generalmente, los resultados son expresados en mg de pirocatecol por 100 gr de muestra; por ejemplo Charanjit K. y cols. ⁽¹⁰⁾ reportaron hasta 399.8 mg de pirocatecol presentes en 100g de material fresco de *Menta spicata*. Los resultados obtenidos en esta investigación estuvieron entre 0.8 g de

pirocatecol presentes en 100 g de extracto de la raíz de calabacilla hasta 23 g de pirocatecol por cada 100 g de extracto en la corteza de Nogalillo (Tabla V).

Finalmente se realizó el bioensayo de la inhibición de X.O como indicador de la actividad antioxidante. Esta es una enzima compleja que contiene molibdeno, flavin adenin dinucleotido (FAD), y otros metales que actúan en conjunto para metabolizar compuestos del catabolismo de las proteínas. La xantina oxidasa actúa sobre la xantina, convirtiéndola en ácido úrico, el cual es producto de desecho de las purinas. Durante esta reacción la XO produce una gran cantidad de compuestos reactivos de oxígeno (O_2^-), y se ha comprobado que algunos compuestos como los flavonoides inhiben la actividad de dicha enzima. Los flavonoides que son estructuralmente semejantes al sustrato, xantina, son degradados por la XO, y los metabolitos resultantes de la reacción, se unen fuertemente al sitio de acción de la enzima y la inhiben; a estos metabolitos se les a llamado “ productos suicidas”.⁽²²⁾

Russo y cols.⁽¹⁴⁾ han reportado un porcentaje de inhibición de hasta 95.5 % cuando trabajaron con un extracto de propolis a una concentración de 50 μ g/ml. En la Tabla VI se describen los porcentajes de inhibición a concentraciones que van de 10 μ g/ml hasta 150 μ g/ml. Los extractos más activos fueron siete (Tabla VI) los cuales se analizaron a concentraciones bajas entre 10 y 30 μ g/ml, éstos tuvieron porcentajes de inhibición entre 7.4 y 55.2%; mientras que los extractos evaluados a concentraciones de 50-150 μ g/ml, tuvieron una actividad moderada, inhibiendo desde un 8% hasta un 56.9%; sin embargo, los extractos obtenidos de raíz y flor de Hojasen y de hojas de Nogalillo, no inhibieron aún a estas concentraciones.

Por otro lado los artículos publicados presentan una tendencia dosis-efecto, sin embargo como lo muestran nuestros resultados, algunos de los extractos (2, 3, 6, 7, 10 y 12) por el contrario presentaron mejor inhibición a concentraciones menores; este hecho puede deberse a interferencias causadas por el gran número de compuestos presentes en los extractos primarios, ocurriendo así, un impedimento en el sitio alostérico de la enzima.

Este método resulta ser muy específico ya que las moléculas deben ser estructuralmente semejantes al sustrato, a diferencia del DPPH que es muy general y que evalúa la presencia de agentes reductores en general.

Debido a las particularidades de cada procedimiento o ensayo empleado es recomendable analizar los compuestos activos frente a diferentes procedimientos *in vitro* e *in vivo* y correlacionar dicha actividad con una dosis efectiva, que por el contrario no afecte a los tejidos, con reacciones opuestas prooxidantes. Tal como describen Kurisawa y cols. ⁽²³⁾ y Cos y cols. ⁽¹⁾, los compuestos no pueden ser clasificados como antioxidantes por el hecho de presentar dicha actividad en determinado sistema porque puede actuar como prooxidante en otro.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

Todos los extractos analizados de Nogalillo, Damiana, Centaurea, Flor de peña y los extractos de tallo y raíz de Hojasen, produjeron buena actividad en el ensayo con DPPH.

Todas las plantas analizadas contienen una gran cantidad de fenoles totales, particularmente las partes aéreas.

Siete extractos resultaron ser muy activos en el bioensayo con xantina oxidasa.

La raíz y flor de Hojasen y las hojas de Nogalillo no inhiben la actividad de xantina oxidasa.

CAPITULO VI

PERSPECTIVAS

Obtener fracciones de los extractos más activos por medio de técnicas cromatográficas.

Determinar la actividad antioxidante de los extractos y las nuevas fracciones, en otros sistemas *in vitro*.

Evaluar la actividad antioxidante en ensayos con distintas líneas celulares humanas,

Determinar la toxicidad de los extractos.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Cos, P., Calomme, M., Pieters, L., Vlietinck, A., Vanden, D. **Structure- activity relationship of flavonoids as antioxidant and pro-oxidant compounds.** En: Studies in Natural Products Chemistry,(Ed. Atta-ur-Rahman). 2000; 22:307.339.
- 2.-De la Morena, G. S.; Martinez, J. **Efecto hepatoprotector inducido por el flavoniodo astilbina frente a un modelo animal tratado con el tetracloruro de carbono.** Rev Cubana Plant Med. 1999; 4:36-39.
- 3.- Wang, H., Nair, M., Strasburg, G. M., Chang, Y.Ch., Booren, A. M. Gray, J. I., DeWitt, D. L. **Antioxidant ad antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin from tart cherries.** J. Natural Products. 1999; 62:294-296.
- 4.- Srinivasan, P., Vadhanam, M. V., Arif, J. M., Gupta, R. C. **A rapid screening assay for antioxidant potential of natural and synthetic agents.** International Journal of Oncology. 2002; 20:983-986.
- 5.- www.naturozone.com
- 6.- Zollo, A., Furno, M., Grandola, G., Totàro, M., y Aloj, E. **Factores ambientales generadores de radicales libres y factores clínico-sanitarios y ocupacionales de**

riesgo de irradiaciones: prevención y protección. Rev. Higiene y Sanidad Ambiental, 2004; 65-71.

7.- Velásquez, M., Gomez, B., Contreras, R; **El envejecimiento y los radicales libres.** Ciencias, 2004; 75:36-43.

8.- Venereo, J. R. **Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes.** Rev Cubana Med Milit 2002; 31(2):126-133.

9.- Robert K. Murray. **Bioquímica de Harper 11° ed.** Editorial el manual moderno, 1988. pag 137.

10.- Charanjit, K., Kapoor, C. **Antioxidant activity and phenolic content of some Asian vegetables.** Internacional Journal of Food Science and Tecnology, 2002; 37:153-161.

11.-Chen, Jay-ho; O Ho, H., Yen, K., Yang, L. **hepatoprotection by “Dangqui Long-Hwei-Wan” in male mice.** American Journal of Chinese Medicine. 2000. disponible en www.findarticles.com

12.- Simie M; Kundacovie T; Kovacevie N. **Preleminary assay on the antioxidative activity of *laurus nobilis* extracts.** 2003;74:613-616).

13.- Bergman, M., Perelman, A., Dubinsky, Z., Grossman, S. **Scavenging of reactive oxygen species by novel glucurinated flavonoid antioxidant isolated and purified from spinach.** Phytochemistry, 2002; 62:753-762.

14.- Russo. A., Longo, R., Vanella, A. **Antioxidant activity of propolis: role of caffeinic acid phenethyl ester and galangin.** Fitoterapia, 2002; 73:21-29)

15.- Pietta, P. G. **Flavonois as antioxidants.** J. Nat. Prod. 1999; Num. 63:1035-1042.

- 16.- Shon, D; Y-c, kim; S-h oh; Park E-J. **Hepatoprotective and free radical scavenging effects of *Nelumbo nucifera***. *Phytomedicine* 2003;37:165-169.
- 17.- Picerno, P., Mencherini, T., Lauro, M., Barbato, F., Aquino R. **Phenolic constituents and antioxidant properties of *Xanthosoma violaceum* leaves**. *J. Agric. Food Chem.* 2003. (Num. 51) (pags. 6423-6428).
- 18.- Alfaro, C., Urios, A., González, C., Moya, P., Blanco, M. **Screening from *penicillium novae-zeelandiae* displaying radical-scavenging activity and oxidative mutagenicity: isolation of gentisyl alcohol**. 2003. *Mutation Reserch*, 539:187-194
- 19.-Cuendet M., Hostettmann, K., Potteriat, O. **Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fragraea blumei***. *Helvetica Chimica Acta* 1997. 80
- 20.- Naik G.H., Priyadarsini, K., Satav, J., Banavalikar, M., Shohoni D., Biyani, M., Mohan, H. **Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine**. *Phytochem* 2002, 63: 97-104.
- 21.- Aniya, Y., Miyagi, C., Nakandakari, A., Kamiya, S., Imaizumi, N., Ichiba, T. **Free radical scavenging activity of the medicinal herb *Limonium wrightii* from the Okinawa islands**. *Phytomedicine*,2002, 48: 238-244
- 22.- Lin, J., Chen, P., Tang, Ho., Shiau, S. **Inhibition of xantine oxidase and supresión of intracellular reactive oxygen species in hl-60 cells by theaflavin-3,3-digillate, epigallocatechin-3- gallate, and propyl gallate**. *J Agric Chem*, 2002.48: 2736-2743
- 23.- Kurisawa, M., Chung, J., Kim, Y., Uyama, H., Kobayashi, S. **Amplification of antioxidant activity and xantine oxidase inhibition of catechin by enzymatic polymerization**. *American Chemical Society*, 2003, 3 (4).

- 24.- Buege, J., A., and Aust, S., D. **Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymol.** 1978; 52:302-310.
- 25.- Georgetti, Sandra., Csagrande, R., Di Mambro V., Fonseca, J. **Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence metod.** 2003 AAPS PharmSci. 2003,5: 1-5.
- 26.-Huang, D., Ou, B., Prior R. **The Chemistry behind antioxidants capacity assays.** J. Agric. Food Chem,2005, 53:1841-1856
- 27.- www.imss.gob.mx/NR/rdonlyres
- 28.- Jorge, Adame; Homero, Adame. **Plantas curativas del Noreste Mexicano.** ed. Castillo, primera edición, 2000.
- 29.-Orozco Hayek M. **Elección de las condiciones más adecuadas para la obtención de extractos de plantas superiores con actividad sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente.** Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, UANL, 2004.
- 30.- Molina, G. **Aislamiento y caracterización de compuestos con actividad bactericida y bacteriostatica de plantas del Noreste de México sobre cepas de *Micobacterium tuberculosis* sensibles y multiresistentes.** Tesis de doctorado en Quimica biomédica, Facultad de Medicina UANL. 2004.
- 31.- Juma, B; Runner R; Majinda T;. **Erythrinaline alkaloids from the flowers and pods of *Eritrina lysistemon* and their DPPH radical scavenging properties.** Phytochemistry 2004, 65:1397-1404
- 32.- <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm>

33.- Veluri, R. **Phytotoxic and Antimicrobial Activities of Catechin Derivatives.** J. Agric. Food Chem.2004, 52: 1077-1082.

