

34

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

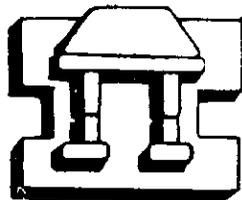
BIOLOGIA

EVALUACION DE UN FILTRO SOLAR DE
YUCCA FILIFERA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A
P. B'OL. ANA MARIA GARCIA BORES

DIRECTOR DE TESIS: M.EN C JOSE GUILLERMO AVILA ACEVEDO
JEFE DEL LABORATORIO DE FITOQUIMICA
UNIDAD DE BIOTECNOLOGIA Y PROTOTIPOS



IZTACALA

MEXICO, D. F.

1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

264726



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitoquímica de la
Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos de la Escuela Nacional de
Estudios Profesionales – Iztacala, bajo la asesoría del M. en C. José
Guillermo Avila Acevedo.**

Dedicatorias

Señor, siempre haz guiado mi vida y haz estado a mi lado en los momentos más difíciles.

Juan Antonio, eres el ser que más amo en el mundo, el motor que me impulsa a seguir adelante día con día.

Edmundo, mi gran amor.

Mis padres, Carmen y Juan, los dos ejemplos más importantes en mi vida.

Rodrigo, tu mejor legado fue el enseñarme que hay que luchar hasta el final.

Agradecimientos

Gracias **Señor** por ser siempre mi guía y por todas las bendiciones que me haz proporcionado.

A **Juan Antonio y Edmundo**, por su infinito amor y su apoyo incondicional.

A mis padres, **Carmen y Juan** por su paciencia, comprensión y amor.

A mis hermanas, **Mari Carmen, Rocío, Ana bel y Mireya** por todo su cariño y comprensión.

A mis maestros del laboratorio de Fitoquímica, **Memo, Andrés, Gabriel, Margarita, Naní y José Luís**, por ser mis amigos.

A todos mis maestros en especial a **M. en C. Ignacio Peñalosa, M. en C. Martha Salcedo, Bióloga Irma Dueñas y M. en C. Angel Durán**, por la interminable fuente de conocimiento y experiencias que siempre me brindaron.

A mis compañeros de la carrera, **Moní, Kena, Sandra, Alfredo, Israel, Iván, Luís, Jeanette, Alejandra, Carlos y Malinali**, por los buenos y malos momentos que pasamos juntos.

Indice

| | |
|---|-----|
| Indice de figuras | III |
| Indice de tablas | V |
| Indice de fotos | VI |
| Indice de espectros | VII |
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Introducción | 2 |
| 2.1 La estructura y función de la piel | 2 |
| 2.1.1 Radiación solar | 3 |
| 2.1.2 Los efectos de la radiación UV-B en la piel | 4 |
| 2.2 Fotoprotección | 6 |
| 2.3 Radicales libres | 6 |
| 2.3.1 Formación de los radicales libres | 6 |
| 2.3.2 Tipos de reacción de los radicales y reacción en cadena | 8 |
| 2.3.3 Efectos de los radicales en los sistemas biológicos | 9 |
| 2.4 Mecanismos antioxidantes | 10 |
| 2.4.1 Vitamina E como antioxidante | 11 |
| 2.5 Flavonoides | 13 |
| 2.5.1 Estructura | 13 |
| 2.5.2 Actividad biológica | 13 |
| 2.6 <i>Yucca filifera</i> | 14 |
| 2.6.2 Taxonomía | 14 |
| 2.6.2 Descripción | 15 |
| 2.6.3 Distribución | 15 |
| 2.6.4 Utilización actual y potencial | 16 |
| 3. Antecedentes | 17 |
| 4. Justificación | 18 |
| 5. Objetivos | 19 |
| 6. Metodología | 21 |
| 6.1 Colecta y secado | 21 |
| 6.2 Preparación del extracto | 22 |
| 6.3 Determinación de la absorbancia | 22 |
| 6.4 Aislamiento y elucidación de la estructura del filtro solar | 22 |

| | |
|--|----|
| 6.5 Evaluación de la capacidad fotoprotectora en la región del UV-B del compuesto activo | 23 |
| 6.4.1 Protección usando bacterias | 23 |
| 6.4.2 Protección usando conejos | 23 |
| 6.6 Actividad anti-radicales del compuesto activo | 24 |
| 6.7 Biodegradabilidad | 24 |
| 7. Resultados | 25 |
| 7.1 Espectro de absorción del extracto de <i>Yucca filifera</i> | 25 |
| 7.2 Aislamiento y elucidación del filtro solar | 26 |
| 7.2.1 Determinación del peso molecular | 26 |
| 7.2.2 Estudio espectroscópico del filtro solar | 28 |
| 7.3 Evaluación de la capacidad fotoprotectora en la región del UV-B del compuesto activo | 31 |
| 7.3.1 Protección usando bacterias..... | 31 |
| 7.3.2 Protección usando conejos | 32 |
| 7.4 Actividad anti-radicales del compuesto activo | 34 |
| 7.5 Biodegradabilidad | 35 |
| 8. Discusión | 36 |
| 9. Conclusiones | 38 |
| 10. Bibliografía | 39 |

Índice de figuras.

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura de la piel. En la sección A se observa la epidermis (E), la dermis papilar (PD), dermis reticular (RD), la capa basal (bc) y el estrato córneo (c). En la sección B se muestra un prolongamiento de la dermis reticular (RD) y la hipodermis (HD) (Leeson, T., 1989) | 2 |
| Figura 2. Esquema del espectro electromagnético (Eckert, R., 1992)..... | 3 |
| Figura 3. La energía solar como fuente, en último término de toda la energía biológica. Las células fotosintéticas emplean la energía de la luz solar para elaborar glucosa y otros productos orgánicos de la célula, que son empleados por las células heterótrofas como fuentes de energía y carbono (Lenhinger, A., 1981)..... | 4 |
| Figura 4. Mecanismos antioxidantes (Niki, E., 1993)..... | 10 |
| Figura 5. Reacción de compuestos fenólicos con radicales, con la consecuente fase de terminación Radical peroxil (ROO·) y radical fenoxil (PhO·) (Ritov, V., 1995)..... | 11 |
| Figura 6. Acción del α -tocoferol, bloqueando la reacción en cadena de la lipidoperoxidación (Haslam, E., 1996)..... | 12 |
| Figura 7. Estructura básica de los flavonoides (López, A., 1996)..... | 13 |
| Figura 8. Mapa de la distribución de <i>Yucca filifera</i> (Matuda, E., 1980)..... | 16 |
| Figura 9. Diagrama de la estrategia metodológica..... | 20 |
| Figura 10. Zona de colecta..... | 21 |
| Figura 11. Patrón de absorción del extracto metanólico de <i>Y. filifera</i> (26 μ g/ml)..... | 25 |
| Figura 12. Determinación del PM utilizando HPLC..... | 27 |
| Figura 13. Determinación del PM mediante cromatografía de filtración en gel..... | 27 |
| Figura 14. Asignación teórica de los protones en el monómero del filtro solar..... | 29 |

| | |
|--|----|
| Figura 15. Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C , asignaciones de los desplazamientos químicos..... | 30 |
| Figura 16. Estructura propuesta para el filtro solar de <i>Y. filifera</i> | 30 |
| Figura 17. Evaluación de la capacidad fotoprotectora de filtro solar de <i>Y. filifera</i> en bacterias | 31 |
| Figura 18. Porcentaje de decoloración de una solución metanólica de difenilpicril-hidracil (DPPH, 20mg/l) por la adición del compuesto activo de <i>Y. filifera</i> y por el ácido tánico (25, 50, 100 y 200 ppm)..... | 34 |
| Figura 19. Crecimiento de hongos y bacterias, empleando como sustrato el filtro solar de <i>Y. filifera</i> | 35 |

Indice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación de la piel de acuerdo con su sensibilidad a la luz solar (Modificado de Madhukar, A., 1992)..... | 5 |
| Tabla 2. Efectos de la radiación ultravioleta en humanos (Madhukar, A., 1992)..... | 5 |
| Tabla 3. Fuentes de radicales libres dentro de las células.(Cross, E)..... | 7 |
| Tabla 4. Generación de las especies reactivas de oxígeno (Pryor, W., 1994). 7 | |
| Tabla 5. Reacciones de los radicales libres (Pryor, W., 1994)..... | 8 |
| Tabla 6. Fases de las reacciones en cadena típicas de los radicales libres. Molécula lipídica (LH), radical lipidoperoxilo (LOO) y radical lipidohidroperoxido (LOOH). (Pryor, W., 1994)..... | 8 |
| Tabla 7. Algunas enfermedades relacionadas con los radicales libres. (Cross, E.)..... | 9 |
| Tabla 8. Clases de flavonoides y sus propiedades biológicas. (Avendaño, A., 1996)..... | 14 |
| Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas del filtro solar de <i>Y. filifera</i> , donde se puede observar, el rendimiento del compuesto puro a partir de la corteza, el punto de fusión (p.F.), el pico máximo de absorción en la región del ultravioleta (U.V.) y la reacción al cloruro férrico..... | 26 |
| Tabla 10. Bandas de absorción en el infrarrojo (IR) del filtro solar..... | 28 |
| Tabla 11. Desplazamientos de la resonancia magnética de protones..... | 28 |

Indice de fotos

- Foto 1. Corte histológico de piel irradiada, sin protección (zonas epidérmica y dérmica), a) Estrato córneo, b) Epitelio estratificado, c) Folículos pilosos, d) Tejido conectivo normal, e) Tejido conectivo dañado..... 32
- Foto 2. Corte histológico de piel irradiada y protegida con escalol, a) Glándula sebácea, b) Folículos pilosos, c) Tejido conectivo normal..... 33
- Foto 3. Corte histológico de piel irradiada y protegida con el filtro solar de *Y.filifera*, a) Folículos pilosos, b) Tejido conectivo normal..... 33

Indice de espectros

| | |
|---|----|
| Espectro 1. Espectro de infrarrojo (IR) del filtro de <i>Yucca filifera</i> | 42 |
| Espectro 2. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN ¹ H) del filtro de <i>Yucca filifera</i> | 43 |
| Espectro 3. Espectro de resonancia de ¹³ C (RMN ¹³ C) del filtro de <i>Yucca filifera</i> | 44 |

1. Resumen.

La piel es el órgano más grande del cuerpo y su principal función es delimitar el medio interno de los seres vivos y protegerlo de los factores ambientales, uno de los cuales es la luz solar, la cual, se divide en ultravioleta, visible e infrarrojo. La luz ultravioleta se divide en UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) y UV-C (<280 nm).

La intensa radiación UV-B en la piel humana se ha relacionado con diversas enfermedades que van desde eritema hasta cáncer de piel, también facilita la formación de radicales libres, los cuales dañan reversible o irreversiblemente diversas biomoléculas alterando las funciones celulares. Para evitar o reducir dichos efectos se han desarrollado diversos filtros solares que absorben a esa longitud de onda.

Los seres vivos tienen mecanismos antioxidantes los cuales actúan como preventivos, atrapadores o reparadores del daño. Las plantas que viven en zonas con alta radiación UV presentan diversos compuestos con esta propiedad, entre los cuales se encuentra la vitamina E y otros derivados fenólicos como los flavonoides.

Una de las plantas suculentas más representativas de la flora mexicana es *Yucca filifera*, popularmente conocida como "palma china", es de gran importancia en el altiplano potosino ya que es empleada para diversos fines.

En el presente trabajo se realizó un estudio fitoquímico del compuesto presente en *Yucca filifera* que absorbe en la región ultravioleta y se evaluó su capacidad fotoprotectora y atrapadora de radicales libres, para lo cual se colectó la corteza en el pozo de Santa Clara en el municipio de Matehuala a 160 Km al norte de San Luis Potosí.

Se determinó el espectro de UV en el extracto etanólico de corteza seca, encontrando un pico máximo de absorción a 308 nm, el extracto se purificó mediante cromatografía en columna en sílica gel y filtración en gel. El compuesto puro se sometió a análisis espectroscópico de infrarrojo (IR), de resonancia magnética nuclear de protones (RMN¹H) y de ¹³C (RMN¹³C), encontrando que es una 3-desoxiproantocianidina polimérica con un peso molecular aproximado de 2.6×10^6 .

El compuesto activo tiene capacidad fotoprotectora en bacterias ya que las protege del efecto letal de la radiación, además de que en cortes histológicos de piel de conejo se observa la protección en el tejido conjuntivo y en la prevención de la formación de eritema. Por otro lado los resultados obtenidos de la prueba del difenil-picril-hidracil (DPPH) muestran que presenta el 75.54 % de decoloración, por lo que se puede considerar como un buen atrapador de radicales libres. Por último el compuesto sirve como única fuente de carbono para el crecimiento de hongos y bacterias obtenidos del suelo.

2. Introducción.

2.1 La estructura y función de la piel.

La piel es el órgano más grande del cuerpo, está compuesta de una gran variedad de tipos celulares, su principal función es delimitar el medio interno de los seres vivos y protegerlo del ambiente externo (Russell, O., 1992), debido a lo cual sirve como barrera de protección contra el ataque de microorganismos y factores ambientales físicos y químicos (Jürgen, F., 1992). Presenta una estructura compleja formada por diferentes capas, las cuales son la epidermis, dermis (dermis reticular) e hipodermis. La epidermis es una capa de epitelio estratificado que está conectada al tejido conjuntivo (dermis); estas se encuentran encima de una base de tejido adiposo que forma la hipodermis (Leeson, T., 1989; Russell, O., 1992).

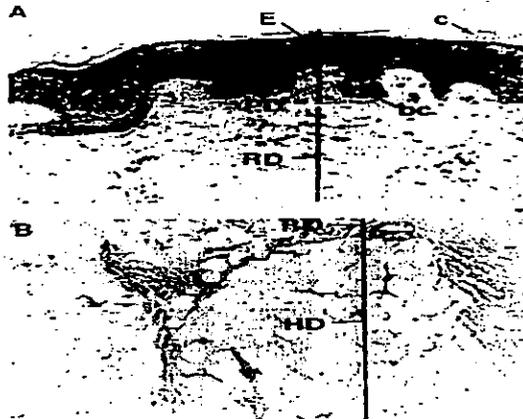


Figura 1. Estructura de la piel. En la sección A se observa la epidermis (E), la dermis papilar (PD), dermis reticular (RD), la capa basal (bc) y el estrato córneo (c). En la sección B se muestra un prolongamiento de la dermis reticular (RD) y la hipodermis (HD) (Leeson, T., 1989)

El color de la piel en sí es amarillo, debido a la presencia de caroteno, pigmento vegetal que se deposita en el estrato córneo y en las células de grasa de la dermis y la hipodermis. La sangre que se observa a través de la dermis la da un tono rojizo. Por último la presencia de cantidades variables de melanina explica los tonos de color pardo. La melanina es producida por células especializadas de la epidermis, los melanocitos, su formación tiene lugar en los melanosomas. Los factores ambientales como los rayos ultravioleta aumentan la producción de melanina y por lo tanto el bronceado (Leeson, T., 1989).

2.1.1 Radiación solar.

Uno de los principales factores ambientales a los que está expuesta la piel es la luz solar, la cual se divide en ultravioleta, luz visible e infrarrojo y ondas cortas (figura 2) (Madhukar, A., 1992).

La luz ultravioleta (UV) se divide en: UV-A (320-400 nm), UV-B (280 a 320 nm) y UV-C (<280 nm). (Larson, R., 1988; *op cit*). La región UV-A (320-400 nm), causa la pigmentación excesiva de la piel o melanogénesis, la UV-B provoca eritema, quemaduras de piel, también estimula la pigmentación y el edema, La radiación UV-C es absorbida por las capas atmosféricas por lo que no incide en la superficie terrestre, sin embargo, hay lámparas comerciales que tienen esta longitud de onda, las cuales se emplean como germicidas. (Freeman, S., 1989).

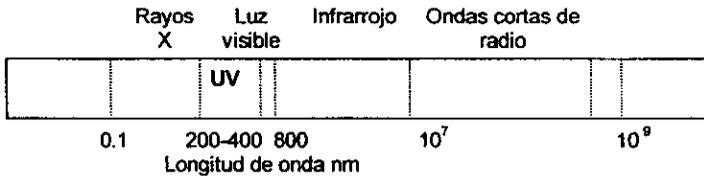


Figura 2. Esquema del espectro electromagnético (Eckert, R., 1992).

La radiación solar ha sido reconocida como benéfica, ya que los organismos fotosintéticos captan energía solar para transformarla en biomasa, estos y los organismos heterótrofos viven en un estado estacionario de equilibrio en la biosfera. La energía solar es la que provee de la fuerza necesaria para efectuar el ciclo continuo del dióxido de carbono atmosférico (CO₂) y del oxígeno (O₂) (Lehninger, A., 1981).

Además de la gran importancia que tiene la energía solar en la fotosíntesis, en los humanos es muy importante ya que promueve la síntesis de vitamina D, la deficiencia de ésta conduce a un metabolismo anormal del calcio y fósforo y a una formación defectuosa de los huesos como en el raquitismo, además estimula la producción de melanina, la cual ayuda a controlar los efectos de la radiación (*op cit*, Madhukar, A., 1992).

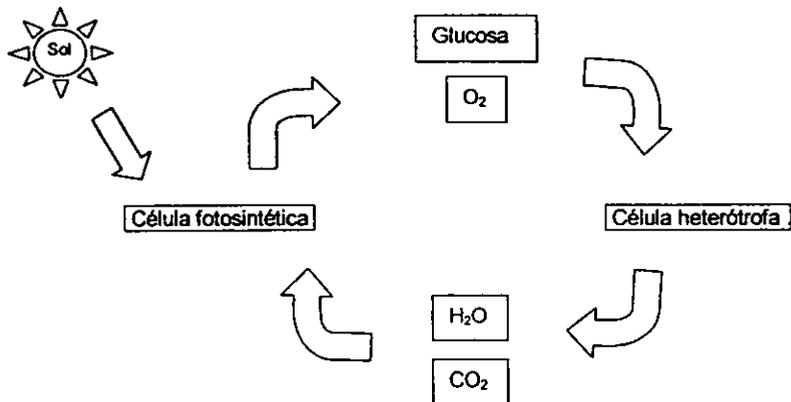


Figura 3. La energía solar como fuente, en último término de toda la energía biológica. Las células fotosintéticas emplean la energía de la luz solar para elaborar glucosa y otros productos orgánicos de la célula, que son empleados por las células heterótrofas como fuentes de energía y carbono (Lenhinger, A., 1981).

2.1.2 Efectos de la radiación ultravioleta en la piel.

No podemos pasar por alto que en dosis excesivas la radiación solar, sobre todo en la región del ultravioleta, tiene efectos nocivos. La intensidad de la radiación depende de la latitud y altitud geográfica, el transcurso del día, la altitud y la capa de ozono (Larson, R., 1988) así que al disminuir esta última aumenta la radiación que llega a la superficie terrestre. Se ha determinado que si disminuye en 1% la capa de ozono, aumenta hasta en un 2% la radiación UV-B, por lo que se incrementa la incidencia de enfermedades. (Freeman, S., 1989; Fernández, G., 1994).

La sensibilidad de la piel esta determinada genéticamente por el color y la facultad de respuesta a la radiación por diversos mecanismos de defensa por lo que se ha realizado una clasificación de la piel en base al color y sensibilidad a la radiación solar (tabla1) (Leeson, T., 1989; Freeman, S., 1989).

La piel humana tiene diversos mecanismos que le permiten impedir los daños causados por la radiación UV, los cuales son:

a) Queratinización. Es el estrato córneo de la piel, el cual contiene proteínas que absorben la luz UV.

b) Pigmentación. Se secreta melanina por los melanocitos, en la epidermis adquiriendo el bronceado.

c) Acumulación de carotenoides. En la epidermis y la hipodermis se acumulan los carotenos, los cuales actúan como estabilizadores de membranas y como antioxidantes.

d) Superóxido dismutasa y peróxido-reductasa. Disminuyen el efecto de la radiación UV eliminando radicales libres.

e) Mecanismos de reparación del ADN. Eliminan el daño causado al ADN por la radiación, disminuyendo el riesgo de cáncer. (Madhukar, A., 1992).

| Tipo de piel | Color de la piel sin exponerse al sol | Sensibilidad a la luz UV | Bronceado |
|--------------|---------------------------------------|---------------------------|--|
| I | Blanco | Muy sensible +++++ | Siempre enrojece pero nunca broncea |
| II | Blanco | Muy sensible ++++ | Siempre enrojece, rara vez broncea |
| III | Blanco | Sensible +++ | Enrojece moderadamente, bronceado uniforme |
| IV | Café claro | Moderadamente sensible ++ | Enrojece poco, bronceado marrón |
| V | Café | Minimamente sensible + | Enrojece rara vez, bronceado chocolate |
| VI | Negro | Insensible | Nunca enrojece, negros o hindúes |

Tabla 1. Clasificación de la piel de acuerdo con su sensibilidad a la luz solar (Modificado de Madhukar, A., 1992).

A pesar de los mecanismos mencionados la piel humana está sujeta a la intensa radiación UV, la cual se ha relacionado con diversas enfermedades que van desde la formación de eritema, melanogénesis, envejecimiento prematuro y cáncer de piel (tabla 2). (Freeman. S., 1989).

| Efectos agudos | Efectos crónicos |
|---|--|
| Quemaduras Neomelanogénesis Reacciones fotoalérgicas y fototóxicas Enfermedades fotosensitivas (Lupus, porfiria) | Arrugas en la piel Cáncer (melanomas y carcinomas) Alteraciones de la respuesta inmune |

Tabla 2. Efectos de la radiación ultravioleta en humanos (Madhukar, A., 1992).

2.2 Fotoprotección.

Para evitar o reducir los efectos nocivos de la radiación UV es necesario tomar medidas fotoprotectoras como evitar la exposición prolongada en las horas de mayor irradiación (10 a.m. a 3 p.m.), emplear ropa protectora como sombreros, paraguas y lentes para el sol, favorecer el bronceado natural con exposiciones cortas o suberitemogénicas (formadoras de eritema o enrojecimiento), administrar productos químicos que aumenten las defensas naturales de la piel y el empleo de filtros solares, los cuales pueden ser tópicos u orales.

Los filtros solares tópicos se dividen en químicos y físicos.

Filtros químicos: son preparaciones incoloras las cuáles se colocan sobre la piel, normalmente contienen compuestos químicos que absorben de 290 a 400 nm, modifican las propiedades ópticas de la piel y previenen las reacciones fotoquímicas y bioquímicas responsables de la inducción de quemaduras solares además protegen del envejecimiento prematuro.

Filtros físicos: también se les llama bloqueadores, no absorben la luz, reflejan la radiación UV y la visible. Normalmente son sustancias coloridas, opacas, que se adhieren a la piel y no se caen después de nadar. No son aceptados cosméticamente, pero son apropiados para pacientes que son muy sensibles a la radiación UV y a la visible o para personas que por su trabajo se exponen mucho tiempo al sol.

Filtros orales.

La mayoría de la gente no aplica filtros solares tópicos en su vida diaria, por lo que se ha tratado de desarrollar protectores solares sistémicos, los cuales reducen inevitablemente los efectos de la radiación. Compuestos como el ácido acetilsalicílico y las vitaminas A, C y E se emplean ampliamente, sin embargo su supuesta fotoprotección no ha sido determinada, sólo el β -caroteno se ha recomendado en pacientes con porfiria. (Madhukar, A., 1992).

2.3 Radicales libres.

2.3.1 Formación de los radicales libres.

La radiación UV incide en el agua, principal componente de los seres vivos, esta absorbe la energía ionizante, la cual rompe enlaces químicos induciendo la formación de radicales y especies reactivas de oxígeno (Roger, H., 1993; Pryor, W., 1994) las cuales intervienen en procesos oxidativos en los tejidos, además existen factores endógenos en las células que generan radicales (tabla 3) relacionados con diversas enfermedades (Pryor, A., 1994).

| Fuentes exógenas | Fuentes endógenas |
|--|--|
| Substancias que contribuyen al ciclo redox (reducción-oxidación de un tejido). Oxidaciones de medicamentos (paracetamol, CCl ₄ , Humo de cigarrillo Radiación ionizante Luz solar Substancias que oxidan el glutatión | Cadenas transportadoras de electrones Oxidasa de xantina Dioxigenasa de la indolamina Dioxigenasa del triptófano Oxidasa de la galactosa Ciclooxygenasa Lipoxigenasa Neutrófilos Monocitos y macrófagos Eosinófilos Células endoteliales |

Tabla 3. Fuentes de radicales libres que inciden de las células.(Cross, E).

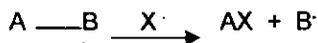
Un radical libre es cualquier átomo o grupo que posee uno o más electrones desapareados, pueden ser especies iónicas o eléctricamente neutras pero con una elevada reactividad química (Robertfroid, H., 1993; Pryor, W., 1994)

Los radicales libres se forman por dos mecanismos generales:

a) Mediante la ruptura homolítica de enlaces:



b) Por la reacción de moléculas con otros radicales (Pine, S., 1988) :



Dentro de la gran variedad de radicales libres encontramos a las especies reactivas de oxígeno, los cuales son muy activos en los sistemas biológicos, estos los podemos clasificar en (tabla 4):

a) Radicales inorgánicos: Seperóxido (O₂⁻) e hidróxilo (OH).

b) Radicales orgánicos: Peroxil (ROO[·]), alcoxi (RO[·]), radicales de ácidos grasos insaturados y alilos (CH=CH-CH₃) (Gilbert, P., 1981; Bisby, R., 1993; Pryor, W., 1994).

| Nombre | Reacción |
|--------------------|---|
| Superóxido | $O_2 + e \rightarrow O_2^{\cdot -}$ |
| Hidroperoxil | $O_2^{\cdot -} + H^+ \rightarrow HO_2^{\cdot}$ |
| Hidroxil | $2HO_2^{\cdot} \rightarrow H_2O_2 + HO_2$ $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^-$ |
| Radical de carbono | $OH^{\cdot} + OH^- + RH \rightarrow R^{\cdot}$ |
| Peroxil | $R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$ |
| Alcoxil | $ROO^{\cdot} + RH \rightarrow ROOH$ $ROOH + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + RO^{\cdot}$ |

Tabla 4. Generación de las especies reactivas de oxígeno (Pryor, W., 1994).

2.3.2 Tipos de reacción de radicales y reacción en cadena.

Se reconocen tres clases de reacciones mediante las cuales actúan los radicales, la abstracción de un átomo, transferencia de electrones y la adición del radical (tabla 5).

| Tipo de reacción | Mecanismo de reacción |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Abstracción de un átomo | $A\cdot + RH \rightarrow AH + R\cdot$ |
| 2. Transferencia de electrones | $X\cdot + Y \rightarrow X + Y\cdot$ |
| 3. Adición del radical | $T\cdot + T\cdot \rightarrow T_2$ |

Tabla 5. Reacciones de los radicales libres (Pryor, W., 1994).

Una característica importante de los radicales es la capacidad de llevar a cabo reacciones en cadena, las cuales tienen tres fases típicas: iniciación, propagación y terminación.

Iniciación.

Resulta en la creación de especies con electrones no apareados, un ejemplo es la ruptura homolítica en peróxidos.

Propagación.

El carácter de radical es transferido a otra molécula como un lípido, formando otros radicales.

Terminación.

Es el resultado de la conversión de radicales en productos con electrones apareados (tabla 6). (Pine, S. 1988; Pryor, W., 1994).

| |
|--|
| Iniciación $A - B \rightarrow A\cdot + B\cdot$ |
| Propagación $A\cdot + LH \rightarrow AH + L\cdot$ $L\cdot + \cdot OO \rightarrow LOO\cdot$ $LOO\cdot + LH \rightarrow LOOH + L\cdot$ |
| Terminación $L\cdot + L\cdot \rightarrow L-L$ $L\cdot + LOO\cdot \rightarrow LOOL$ |

Tabla 6. Fases de las reacciones en cadena típicas de los radicales libres. Molécula lipídica (LH), radical lipidoperoxilo (LOO) y radical lipidohidroperoxido (LOOH). (Pryor, W., 1994).

2.3.3 Efectos de los radicales en los sistemas biológicos.

Los radicales de oxígeno tienen la capacidad de dañar reversible o irreversiblemente compuestos pertenecientes a todas las clases bioquímicas, incluyendo ácidos nucleicos (ADN y ARN), proteínas y aminoácidos libres, lípidos, lipoproteínas, carbohidratos y macromoléculas del tejido conjuntivo, éstas alteraciones pueden tener impacto sobre el funcionamiento celular, tales como el metabolismo y la expresión genética (Gerschman, R., 1954; Cross, E).

La estructura de algunos aminoácidos puede ser modificada por lo que pierden su actividad biológica, en las proteínas se rompen los enlaces disulfuro, son más susceptibles a la proteólisis y pierden su función. En lo referente a la interacción con el ácido desoxirribonucleico (DNA) cambia su estructura, formando dímeros de pirimidina, la metilación de bases y los factores de transcripción afectando la regulación en la expresión de ciertos genes. Con los lípidos se lleva a cabo la lipoperoxidación lo cual afecta a las membranas celulares produciendo lisis (Larson, R., 1988; Pryor, W., 1994).

En la última década se ha obtenido amplia evidencia que indica que los radicales de oxígeno tienen cierta ingerencia en el desarrollo de muchas enfermedades (tabla 7), sin embargo su participación en muchos procesos patológicos todavía es controvertido. En la piel intervienen en las lesiones por radiación solar, porfiria, dermatitis por contacto, coloraciones fotosensibles y en el síndrome de Bloom (Cross, E.; Athar, M., 1992; Benedic, A., 1994).

| Organo involucrado | Enfermedades donde intervienen los radicales libres |
|----------------------------------|--|
| Corazón y sistema cardiovascular | Cardiomiopatía por alcoholismo, enfermedad de Keshan, Arteriosclerosis. |
| Pulmones | Enfisema, hiperoxia, displasia broncopulmonar, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, neumocosis por polvo mineral. |
| Riñones | Enfermedad nefrótica antglomerular de la membrana basal, nefrotoxicidad por aminoglucósidos y por metales pesados. |
| Tracto gastrointestinal | Lesión hepática por endotoxinas y por tetracloruro de carbono, pancreatitis inducida por ácidos grasos libres. |
| Ojos | Cataratogénesis, hemorragia ocular, daño degenerativo de la retina, retinopatía en bebés prematuros, retinopatía fótica |
| Piel | Lesiones por radiación solar, porfiria, dermatitis por contacto, síndrome de Bloom |

Tabla 7. Algunas enfermedades relacionadas con los radicales libres. (Cross, E.).

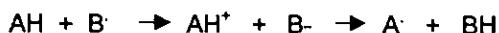
2.4 Mecanismos antioxidantes.

Muchos mecanismos de defensa dentro de los organismos han evolucionado para limitar los niveles de especies de oxígeno reactivo y el daño que inducen (Gilbert, P., 1981; Cross, E.; Jürgen, F., 1992), dichos mecanismos se basan en la transferencia de un átomo de hidrógeno (a), formando un radical menos activo debido a entra en resonancia, o por la formación de iones (b) (Roger, H., 1993).

a)



b)



Los mecanismos antioxidantes actúan como preventivos, atrapadores o reparando el daño (figura 4).

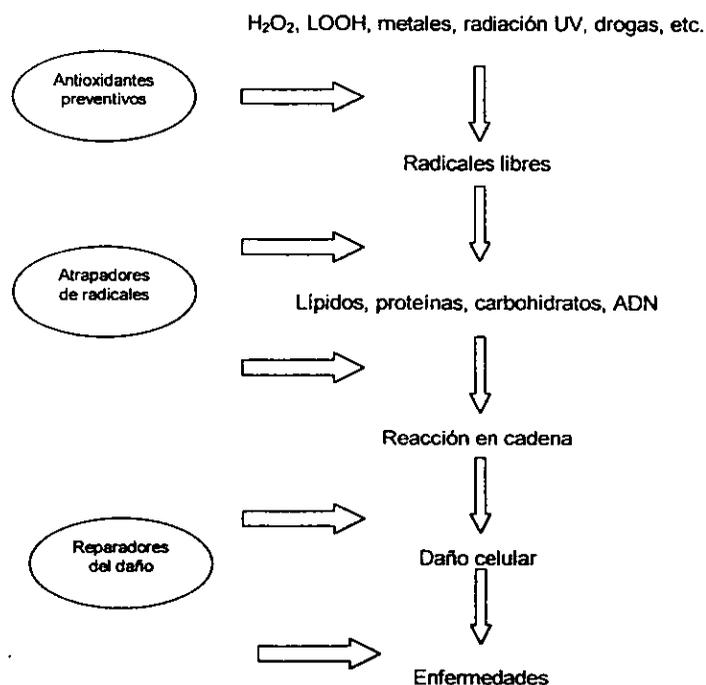


Figura 4. Mecanismos antioxidantes (Niki, E., 1993).

Preventivos.

Suprimen o impiden la formación de radicales libres, como la catalasa que reduce el peróxido de hidrógeno formando agua:



Atrapadores de radicales libres.

Suprimen o rompen la reacción en cadena de los radicales, impidiendo su propagación, pueden ser hidrofílicos como la vitamina C o hidrofóbicos como la vitamina E. Los primeros actúan en medios acuosos pero no protegen las membranas celulares.

Reparadores del daño:

Las principales enzimas son: lipasas, reparan el daño en los fosfolípidos, proteasas eliminan las proteínas dañadas, las glicosilasas y las nucleasas reparan el daño en el DNA (Niki, E., 1993).

La luz solar afecta procesos metabólicos en las plantas como la fotosíntesis, respiración y fosforilación, lo que provoca alteraciones fisiológicas, sin embargo, se ha reportado que la mayoría de las plantas que viven en las zonas con alta radiación UV tienen mecanismos antioxidantes que se pueden clasificar en: enzimas (catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa), compuestos fenólicos como la vitamina E y flavonoides (Bahorun, T., 1993; Ritov, V., 1995), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, carotenoides) y otros compuestos como la vitamina C (Larson, R., 1988).

2.4.1 Vitamina E como antioxidante.

La vitamina E y otros antioxidantes fenólicos interactúan con los radicales superóxido transfiriéndoles un átomo de hidrógeno, formando el radical fenoxil, el cual es menos reactivo en sistemas biológicos (figura 5) (Pryor, W., 1994; Ritov, V., 1995).



Figura 5. Reacción de compuestos fenólicos con radicales, con la consecuente fase de terminación Radical peroxil (ROO[·]) y radical fenoxil (PhO[·]) (Ritov, V., 1995).

La vitamina E está compuesta de α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol, α -totrienol, β -tocotrienol, δ -tocotrienol y γ -tocotrienol. El α -tocoferol es el más abundante en los tejidos y es al que se le asigna la mayor capacidad antioxidante, ya que reacciona con los radicales peroxilo, los cuales se generan por la reacción de un radical libre con un fosfolípido de la membrana celular dando lugar a una molécula que reacciona con el O_2 . La vitamina E termina la cadena de reacciones de la peroxidación de lípidos, gracias a la característica de ser liposoluble (figura.6).(Packer, L., 1994).

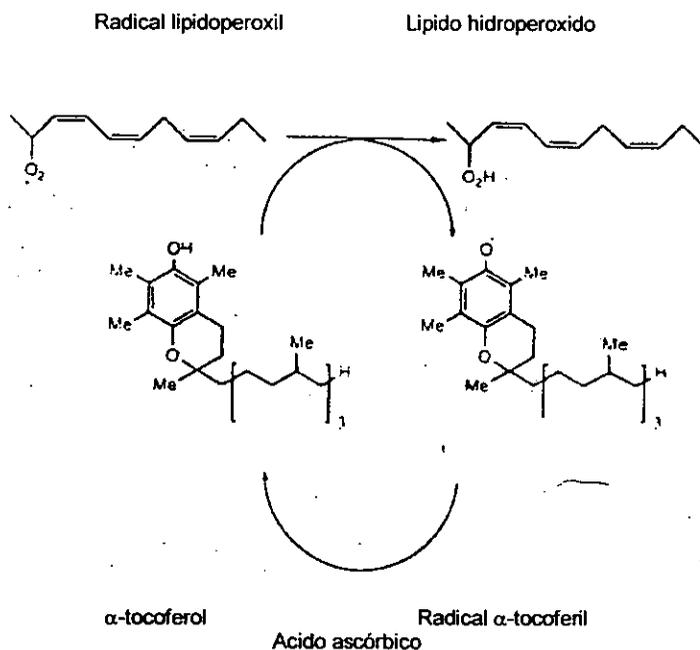


Figura 6. Acción del α -tocoferol, bloqueando la reacción en cadena de la lipíperoxidación (Haslam, E., 1996).

2.5 Flavonoides.

2.5.1 Estructura.

Los flavonoides están distribuidos ampliamente en las plantas, en la raíz, tallo, polen, semillas, hojas, flores, frutos, la madera y corteza (Harbone, J., 1984; Wolf, B., 1990). Ausentes prácticamente en las algas, aparecen en las briofitas. Se encuentran en helechos y gimnospermas y ampliamente representados en angiospermas, donde la diversidad estructural es mayor (López, A., 1996).

Los flavonoides son compuestos fenólicos, los cuales tienen 15 átomos de carbono en su núcleo básico (2-fenil cromano (I) o 3-fenil cromano (II), los cuales son ordenados en una configuración C₆-C₃-C₆; es decir dos anillos aromáticos que por convención son llamados A y B unidos por tres átomos de carbono, que darán origen al anillo C, relacionados con un núcleo básico. Los átomos de carbono individuales son referidos por un sistema de numeración, en el cual se utilizan números ordinarios para el anillo A,C y números prima para el anillo B (figura 7). (Anchenson, R., 1983; Harbone, J., 1984; López, A., 1996).

La mayoría de los flavonoides tienen hidroxiladas las posiciones 5, 7 y 4' variando únicamente en el nivel de oxidación en el anillo A y B. También se encuentran como O-glucósidos. (Avendaño, A., 1996).

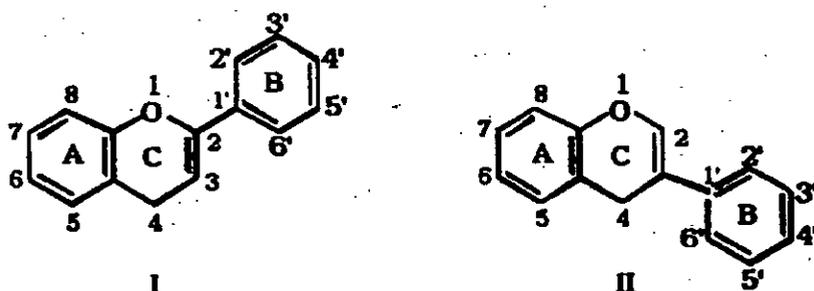


Figura 7. Estructura básica de los flavonoides (López, A., 1996).

2.5.2 Actividad biológica.

Existen tres clases de flavonoides más abundantes, las antocianidinas, flavonas y flavonoles. Cada una de las clases varía en sus propiedades (tabla 8), por ejemplo las antocianidinas son pigmentos en las plantas, mientras que las flavonas son incoloras. (Avendaño, A., 1996).

| Flavonoide | Número de estructuras conocidas | Propiedades biológicas |
|--|---------------------------------|--|
| Antocianidinas | 250 | Pigmentos rojos, rosas, anaranjados, violetas y azules |
| Chalconas | 60 | Pigmentos amarillos |
| Auronas | 20 | Pigmentos amarillos |
| Flavonas | 350 | Pigmentos color crema en las flores |
| Flavonoles | 350 | Algunos tienen la actividad de repelentes |
| Flavanonas | 150 | Poseen sabor amargo |
| Dihidrochalconas | 10 | No se conoce actividad |
| Proantocianidinas | 50 | Sustancias astringentes |
| Catequinas | 20 | Tienen la actividad de curtir |
| Leucoantocianidinas o 3-4, Flavadioles | 20 | Tienen la habilidad de curtir |
| Biflavonoides | 65 | No se conoce ninguna actividad |
| Isoflavonoides | 150 | Actividad estrogénica y fungitóxica |

Tabla 8. Clases de flavonoides y sus propiedades biológicas. (Avenidaño, A., 1996).

Los flavonoides dado su diversidad estructural constituyen uno de los grupos más extensos de metabolitos secundarios en las plantas, están presentes en ellas no sólo como parte constitutiva, además también funcionan como defensa en las infecciones por hongos, dan la pigmentación a las flores y frutos, así como el sabor astringente en muchos casos (Harbone, J., 1984; Haslam, E., 1996; López, A., 1996).

Los estudios farmacológicos que se basan en la herbolaria tradicional han determinado que las principales actividades farmacológicas de los flavonoides son la actividad antimicrobiana, citotóxica en diferentes líneas celulares (KB, P-388). Antiinflamatoria, reguladores de enzimas, así como actividad antioxidante (Salvayre, R., 1988; Pryor, W., 1994; Galvez, J., 1995; López, A., 1996; Halsam, E., 1996; Zhu, M., 1997).

2.6 *Yucca filifera*.

2.6.1. Taxonomía (Clasificación de Hutchinson).

Reino: Vegetal

Subreino: Embryophyta

División: Anthophyta

Clase: Monocotyledonae

Orden: Agavales

Familia: Agavaceae

Género: *Yucca*

Especie: *Yucca filifera* Chabaud.

2.6.2 Descripción.

Yucca filifera es una de las plantas suculentas más representativas de la flora mexicana popularmente conocido como "palma china". (Matuda, E., 1980).

Planta arborescente que llega a crecer hasta 20 m de altura. Las plantas adultas son en general muy ramificadas (hasta 40 ramas).

Hojas hasta de 55 cm de largo por 3.6 cm de ancho; linear oblanceoladas, constreñidas cerca de la base, rígidas, generalmente ásperas en ambas superficies; con numerosos filamentos espiralados de color blanco, fácilmente quebradizos, por lo que son más notables en las hojas jóvenes. El escapo sobresale del follaje; panícula más o menos cilíndrica, pendular; hasta 1.50 m de largo, multiflora.

Flores extendidas, pediceladas; pedicelos hasta de 2.7 cm de largo; segmentos inferiores algo más cortos y más anchos; filamento de 1.0 – 1.5 cm de largo; pistilo de 2.3 – 2.5 cm de largo; ovario oblongo de 5.0 – 8.8 cm de largo por 2.7 – 3.3 cm de diámetro; termina en un pico de 0.2 – 0.7 cm de largo. Semillas de 8 x 2 mm, algo rugosas. Florece de fines de abril a fines de mayo. (*op cit*; Romo de Vivar, A., 1985).

2.6.3. Distribución.

Se distribuye en los estados de Hidalgo, Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí, Coahuila y Nuevo León con gran densidad poblacional, por lo que llega a ser una de las especies predominantes de los hábitats áridos y semiáridos de dichos estados.

Su hábitat es en planicies con suelos someros, con cuencas endorreicas, con altitudes entre 500 y 2400 msnm. Forma parte del estrato arbóreo, principalmente en el Matorral Desértico. (Matuda, E., 1980).

En San Luis Potosí abunda en los suelos aluviales y en algunos valles con afloramientos de yeso como el de Matehuala y Valles.



Figura 8. Mapa de la distribución de *Yucca filifera* (Matuda, E., 1980).

2.6.4 Utilización actual y potencial.

Yucca filifera ha sido utilizada localmente para construir chozas y corrales empleando sus troncos y hojas (Castañeda, C., 1975; Romo de Vivar, A., 1974; Maldonado, L., 1985 a; Maldonado, L., 1985 b), las partes tiernas de tallos y hojas jóvenes como forraje, sus fibras son empleadas para hacer cuerdas, sacos y cepillos, además de las raíces y las hojas se obtiene jabón (amole), las flores y frutos son comestibles (Romo de Vivar, A., 1974; Maldonado, L., 1985 a; Maldonado, L., 1985 b;). También se considera que la cantidad y calidad de celulosa podría emplearse en la industria papelera.

De las semillas se obtiene 8% de sapogenina, 12% de aceite para consumo humano y de 20 a 30% de proteína (Romo de Vivar, A., 1974). En estudios bromatológicos de los frutos se ha determinado que contienen 2.9% de proteína, 1.10% de calcio y 0.90% de fósforo (Franco de la Cruz, N., 1979).

Yucca filifera es de gran importancia en el altiplano potosino por la diversidad de aplicaciones, sin embargo, podría explotarse de forma industrial explotando la celulosa o las fibras, para repercutir en el beneficio económico de las comunidades de la zona, para lo cual es necesario hacer estudios científicos sobre la ecología de la planta, propagación *in vitro*, etc. (Maldonado, L., 1985b).

3. Antecedentes.

Se han realizado varios estudios en los que se demuestra que la intensa radiación ultravioleta altera procesos metabólicos en plantas y animales por la formación de radicales libres y que los organismos han desarrollado mecanismos que inhiben los efectos de dichos radicales (Gilbert, P., 1981; Larson, R., 1988; Jürgen, F., 1992).

Se han desarrollado filtros solares para que absorban la radiación UV-B con el fin de minimizar los efectos nocivos, la mayoría de estos tienen en su formulación compuestos sintéticos. Recientemente han salido al mercado filtros con productos naturales, sin embargo la gran mayoría de estos no cuentan con los estudios apropiados para validar su actividad.

Los mecanismos anti-radicales pueden ser preventivos (impiden la formación de radicales), atrapadores de radicales y reparadores del daño causado (Niki, E., 1993). Dentro del segundo grupo de compuestos, como ejemplo podemos mencionar a la vitamina E y los flavonoides (Larson, R., 1988; Bahorun, T., 1993; Ritov, V., 1995).

Los flavonoides son compuestos con una gran diversidad estructural lo que conlleva a un sin fin de actividades biológicas (Harbone, J., 1984; Haslam, E., 1996; López, A., 1996).

Se han reconocido muchas clases de flavonoides como antioxidantes (Larson, R., 1988; Wolf, B., 1990; Haslam, E., 1996) y se ha comparado su capacidad para inhibir la lipoperoxidación con la vitamina E, encontrando una actividad similar (Salvayre, R., 1988). También se han propuesto como componentes de medicinas o como base de la dieta regular para el tratamiento y prevención de diversas enfermedades, por su actividad como atrapadores de radicales hidroxil, superóxido y peroxil (Wolf, B., 1990; Haslam, E., 1996).

Los flavonoides para que funcionen como antioxidantes deben formar radicales intermediarios, por los que se ha estudiado el mecanismo de la formación y decaimiento de éstos (Wolf, B., 1993). También se han descrito como inhibidores de enzimas, sin embargo, no influyen en la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión transferasa, las cuales forman parte de uno de los principales mecanismos antioxidantes de la célula (Galvez, J., 1995).

Las plantas que crecen en zonas con intensa radiación solar (zonas áridas y semiáridas) contienen elevadas concentraciones de flavonoides, los cuales les sirven como antioxidantes (Larson, R., 1988).

4. Justificación

En los últimos años ha disminuido la capa de ozono, incrementando la radiación UV que incide en la superficie terrestre, lo que repercute en el incremento en las enfermedades causadas por la luz solar y por las reacciones de radicales libres. Se han fabricado un sin fin de filtros solares con base en compuestos sintéticos, pero existen muy pocos de productos naturales.

En los climas áridos-semiáridos la incidencia de la luz UV es intensa por lo que se puede suponer que las especies dominantes en estos hábitats presentan compuestos muy eficientes tanto en la filtración de las radiaciones así como en los mecanismos antioxidantes.

Los flavonoides son uno de los principales mecanismos antioxidantes de las plantas, los cuales se encuentran en altas concentraciones en la corteza y siendo *Y. filifera*, una de las especies predominantes en estos climas, es un buen candidato para obtener a partir de su corteza un filtro solar con propiedades antioxidantes.

México es uno de los países con más diversidad de flora y fauna, sin embargo ésta, no se ha aprovechado, en gran medida por la falta de estudios básicos, además de que las zonas áridas – semiáridas constituyen una parte importante del territorio nacional, el cual tiene muchas especies potencialmente aprovechables, sin embargo, la gran mayoría de estas presentan problemas de comercialización.

Es necesario ampliar los estudios tanto ecológicos como fitoquímicos para encontrar nuevos productos susceptibles de explotación, así como evaluar la posibilidad de explotación para uso industrial.

En el presente trabajo se realizó un estudio fitoquímico del compuesto que absorbe en la región ultravioleta presente en la corteza de *Y. filifera*, y evaluarlo como filtro solar, sus propiedades antioxidantes, así como determinar su biodegradabilidad.

5.Objetivos.

❖ Objetivo general.

Evaluar biológicamente el filtro solar obtenido de la corteza de *Yucca filifera*.

❖ Objetivos particulares.

Aislar e identificar la o las moléculas que absorben en el UV-B, presentes en la corteza de *Y. filifera*.

Evaluar *in vitro* e *in vivo* las propiedades como filtro solar de la molécula que absorbe en la región ultravioleta.

Evaluar la actividad antioxidante del o los compuestos responsables de la absorción en el UV-B.

Determinar la biodegradabilidad del filtro solar de *Y. filifera*.

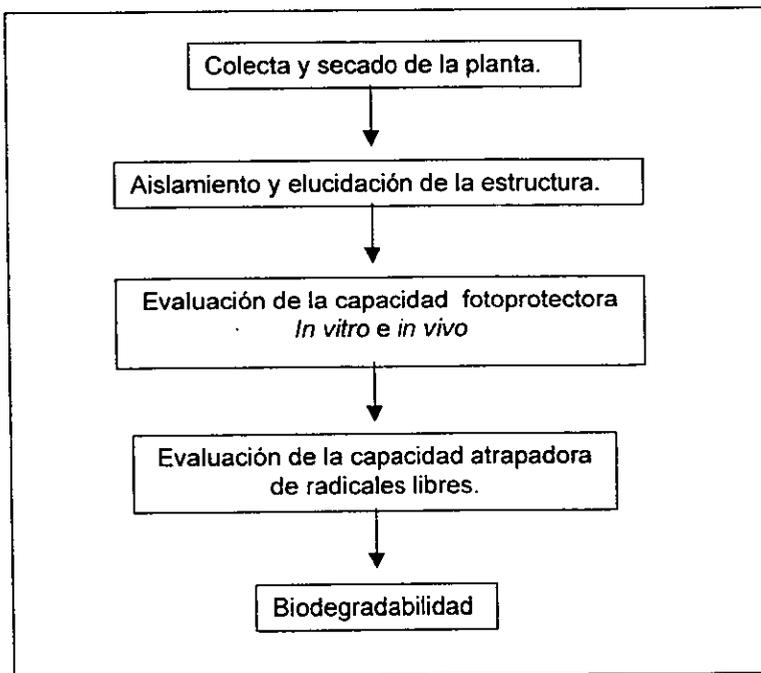


Figura 9. Diagrama de la estrategia metodológica.

6.2 Preparación del extracto

500 g de corteza seca se sometieron a extracción mediante reflujo, durante 6 horas en 2.5 l de etanol al 80%. La solución etanólica se concentró a presión reducida hasta sequedad. Los sólidos se extrajeron con cloroformo para proteger el extracto de la oxidación.

6.3 Determinación de la absorbancia.

Se determinó el espectro de U.V. de un extracto etanólico de *Yucca filifera* (26 μg de sólidos/ml) en un espectrofotómetro de UV-Vis Perkin-Elmer Lambda II.

6.4 Aislamiento y elucidación de la estructura del filtro solar.

El filtro solar se purificó mediante cromatografía de filtración en gel usando como fase estacionaria Sephadex LH-20 (Farmacia Fine Chemicals) y como fase móvil, etanol grado cromatográfico (Aldrich). Por último, el compuesto se pasó en una columna de exclusión molecular utilizando Sephadex G-200 (Farmacia Fine Chemicals) y como fase móvil etanol grado cromatográfico (En todas las fases de separación se obtuvo el patrón de absorción de la sustancia).

El peso molecular del compuesto (PM) se determinó por comparación y extrapolando con sustancias de peso molecular conocido, usando cromatografía de exclusión molecular (bajo las mismas condiciones que en el caso anterior) y mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (en un equipo de HPLC LDC Analytical, Columna TSK Gel G5000 PWXL TOSO HAAS: Fase móvil: MeOH/H₂O 20:80; Velocidad 1 ml/min; detección a 280 nm). Se utilizaron como estándares internos las siguientes sustancias: Cianocobalamina (PM 1,350), Mioglobina equina (PM 17,000), Ovoalbúmina de pollo (PM 44,000), Globulina bovina (PM 158,000), Tiroglobulina bovina (PM 670,000), Dextrán (PM 65,600), Ficol (PM 400,000), y Dextrán (PM 2'000,000).

El compuesto puro se sometió a análisis espectroscópico de infrarrojo (Perkin-Elmer Spectrum 2000), de resonancia magnética nuclear de protones (RMN¹H) y de ¹³C (RMN¹³C) (en un equipo Varian XR-300 A), empleando como solventes cloroformo (RMN¹³C) y metanol (RMN¹H) y como estándar interno Tetrametilsilano (RMN¹H).

6.5 Evaluación de la capacidad fotoprotectora en la región del UV-B del compuesto activo.

Se evaluaron de acuerdo a dos técnicas:

6.5.1 Protección usando bacterias.

Un cultivo con 18 horas de incubación de la bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922) con una concentración de 1×10^8 bacterias/ml, se diluyó 1:10 en medio rico (infusión de cerebro y corazón, Bioxon-112), cuando el crecimiento poblacional alcanzó una densidad óptica (a 550 nm) de 0.3 se centrifugó (6000 rpm, 10'). Posteriormente, las bacterias se resuspendieron en 10 ml de Ringer PBS (pH= 7.0) y se colocaron en cubetas de cuarzo estériles Pye Unicam (B538751 A de 1 mm de espesor). Los filtros solares se disolvieron en metanol al 90%, se depositaron en cubetas de cuarzo y posteriormente se colocaron junto a los tubos que contenían la bacteria. Finalmente se irradió (1 Joule m^{-2}/seg) con una lámpara de luz UV-B (312 nm Spectroline EB-280 C) a una distancia de 15 cm (intensidad de campo de 130 Watt/ m^2) y a diferentes tiempos. El control positivo fue etil-hexil-metoxicinamato (escalol, ISP VAN DIK) y el control negativo etanol al 90%. Se realizó el conteo del número de sobrevivientes de acuerdo al método de Eisenstadt (1994).

6.5.2 Protección usando animales.

Los experimentos se realizaron irradiando conejos machos albinos adultos de raza Nueva Zelanda, de 2.5 Kg. de peso promedio. Veinticuatro horas antes del experimento se les rasuró la parte dorsal y se les asignaron cuadrantes para exposición a la irradiación a razón de 2 cm^2 por sustancia a evaluar, de acuerdo al método estadístico de doble asignación de números aleatorios. La sustancia problema y el control positivo (escalol) se colocaron en cada cuadrante hasta alcanzar una concentración de 2 mg/cm^2 . El control negativo será etanol al 90%. Los conejos se colocaron en sujetadores cubriéndoles los ojos y se les irradió (1 Joule m^{-2}/seg) con una lámpara de luz UV-B (312 nm, Spectroline EB-280 C), a una distancia de 15 cm (intensidad de campo de 130 Watt/ m^2) durante 15 minutos.

Después de la irradiación, se tomaron biopsias de aproximadamente 2 mm^2 y se preservaron en formol al 10%, se procesaron de acuerdo a la técnica histológica estándar de Eosina y Hematoxilina realizando posteriormente la interpretación morfohistológica del tejido (Fiore, M.H., 1986; Gilchreot, B.A. et al., 1983).

6.6 Actividad anti-radicales del compuesto activo.

La actividad de limpieza de radicales libres se evaluó midiendo el grado de decoloración de una solución metanólica de difenil-picril-hidracil (DPPH, Sigma D-9132) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (25, 50, 100 y 200 ppm). El control positivo fue el ácido tánico (Sigma T0125) a las mismas concentraciones del compuesto activo, se empleó como blanco H₂O desionizada. La mezcla de reacción fue de 1.5 ml de solución metanólica de DPPH (20 mg/l) y 750 µl del problema. Posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm. El % de decoloración del DPPH se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación (Joyeux, M. et al., 1995; Mathiesen, L. et al., 1995):

$$\% \text{ de decoloración} = 1 - (\text{absorbancia del problema})/(\text{absorbancia del blanco}).$$

6.7 Biodegradabilidad.

Se empleó el medio Czapek dox modificado, cuya única fuente de carbono fue el compuesto activo de *Y. filifera* a una concentración de 3 g/L. Este medio se inoculó con una mezcla de bacterias y hongos aislados de suelo de la zona de colecta a una concentración de 10⁵ bac/ml de acuerdo al patrón de Mc. Farland, con los hongos que estaban presentes en el suelo, que no se cuantificaron. Los microorganismos se incubaron a 37°C evaluando su crecimiento espectrofotométricamente (660 nm) cada hora durante 4 días (Swisher, R.D., 1987; Jyunkai, S., 1996).

7. Resultados.

7.1 Espectro de absorción del extracto de *Y. filifera*.

Se midió el espectro de absorción del extracto metanólico de *Y. filifera* de 200 a 400 nm, en la figura 11 en eje de las ordenadas encontramos longitud de onda y en el eje de las abscisas la absorbancia en nm, se observó el pico máximo de absorción a 308 nm a la concentración de 26 $\mu\text{g/ml}$. Cabe hacer notar que se evaluaron diferentes concentraciones del extracto, hasta obtener el mejor espectro. De acuerdo a este resultado observamos que si hay absorción en la región del UV-B (290-320 nm), por lo que se evidencia que el extracto de *Y. filifera* presenta capacidad de filtro solar, haciendo notar que dicho espectro muestra absorción en el UV-C (200-290 nm) pero no en el UV-A (320-400 nm).

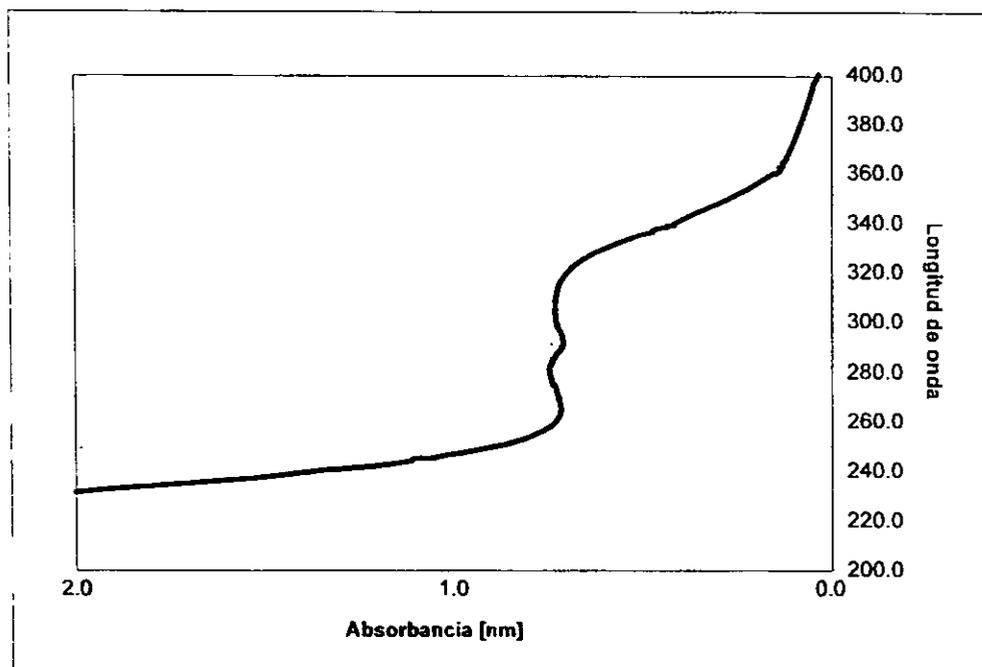


Figura 11. Patrón de absorción del extracto metanólico de *Y. filifera* (26 $\mu\text{g/ml}$).

7.2 Aislamiento y elucidación del filtro solar.

El extracto etanólico presentó una concentración de sólidos del 10%; mediante cromatografía de filtración en gel se obtuvo un compuesto puro de color rojizo, al cual se le determinó el punto de fusión, el espectro de absorción en la región del U.V. y se sometió a la reacción del cloruro férrico, que indica la presencia de fenoles. En la tabla 9 se muestran los resultados de las características fisicoquímicas del filtro solar de *Y. filifera*.

| | |
|---|-----------------------------|
| Rendimiento del compuesto puro a partir de la corteza | 4.0% (peso seco de corteza) |
| p.F. | Descompone a 230 °C |
| U.V. | λ max a 308 nm |
| Reacción al cloruro férrico | Positiva |

Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas del filtro solar de *Y. filifera*, donde se puede observar, el rendimiento del compuesto puro a partir de la corteza, el punto de fusión (p.F.), el pico máximo de absorción en la región del ultravioleta (U.V.) y la reacción al cloruro férrico.

De acuerdo a estos resultados: reacción positiva al FeCl_3 , el origen del compuesto (corteza) y la solubilidad en metanol y etanol, la sustancia es un compuesto fenólico.

7.2.1 Determinación del peso molecular.

El peso molecular se determinó mediante cromatografía de filtración en gel y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

La figura 12 muestra la gráfica del patrón de elución en el HPLC y la figura 13 los resultados en la filtración en gel, en ambos casos se emplearon como estándares internos las siguientes sustancias: Cianocobalamina (PM 1,350), Mioglobina equina (PM 17,000), Ovoalbúmina de pollo (PM 44,000), Globulina bovina (PM 158,000), Tiroglobulina bovina (PM 670,000), Dextrán (PM 65,600), Ficol (PM 400,000), y Dextrán (PM 2'000,000).

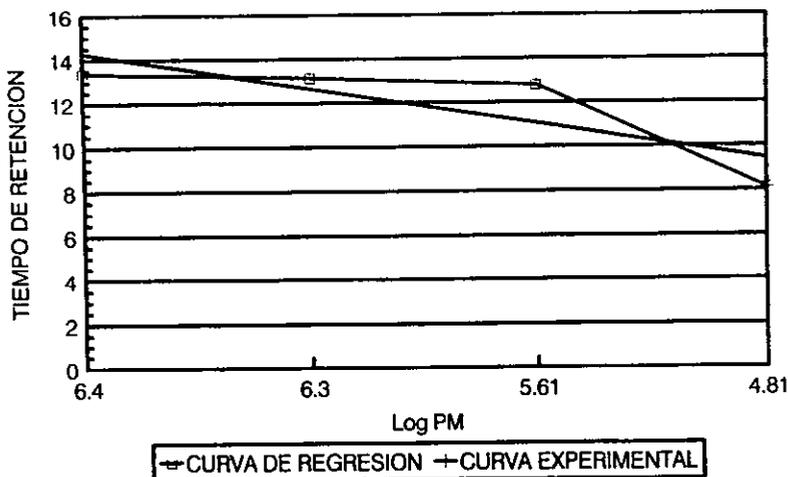


Figura 12. Determinación del PM utilizando HPLC.

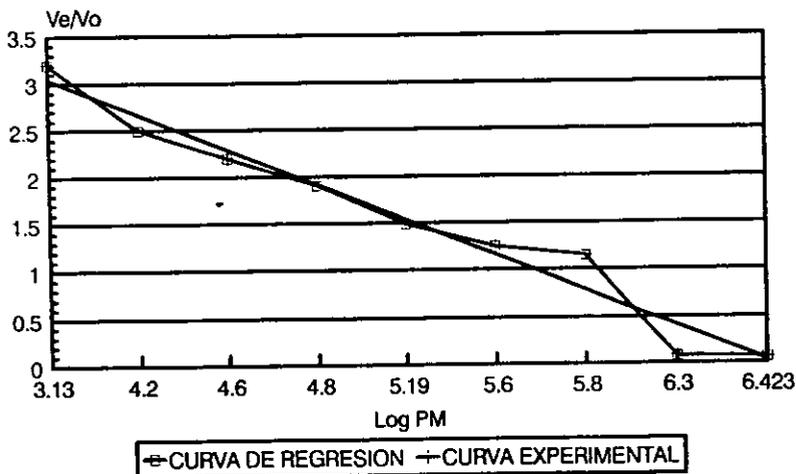


Figura 13. Determinación del PM mediante cromatografía de filtración en gel.

De acuerdo a estos resultados, el compuesto presenta un peso molecular de aproximadamente 2.6×10^6 , haciendo notar que existen pocos compuestos fenólicos presentes en plantas que presenten este peso molecular, restringiéndose a dos tipos, del tipo de las ligninas y de los taninos condensados o rranqantocianidinas (polímero de antocianidinas).

7.2.2 Estudio espectroscópico del filtro solar.

El estudio de la estructura del monómero lo realizamos usando técnicas espectroscópicas de infrarrojo (IR), y Resonancia Magnética Nuclear Protónica y de ^{13}C .

Infrarrojo (IR).

Las principales bandas de absorción en el IR se muestran en la tabla 10.

| Intervalo cm^{-1} | Grupo Químico |
|----------------------------|-------------------------------------|
| 3,280 | OH fenólico |
| 2,914 | Metileno |
| 1,260 | C-O aromático |
| 1,037 | CH-OH Grupo alcohol de carbohidrato |
| 860-870 | Benceno p-sustituído |

Tabla 10. Bandas de absorción en el infrarrojo (IR) del filtro solar.

De acuerdo a estos resultados, se comprueba que el filtro solar es un compuesto fenólico; además, se presenta señal de CH-OH (1,037) que puede indicar la presencia de carbohidratos dentro de la estructura de la molécula.

Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN^1H).

El espectro de resonancia magnética nuclear de protones del filtro solar presentó los siguientes desplazamientos químicos (tabla 11):

Protones en campos altos correspondientes a un metileno cuya señal se presenta a 1.23 partes por millón (ppm) (Metilenos de anillo pirano). Protón acoplado con los dos anteriores cuyo desplazamiento químico se presenta en 2.5 ppm. Una señal a 2.9 ppm que corresponde a un protón unido a un carbono que sostiene enlace con oxígeno. Señales entre 3 y 4 ppm, que corresponden a protones característicos de carbohidratos. Por último, resonancias protónicas en el rango de 6 y 7 ppm que corresponden a protones de grupos fenólicos.

| Señal en (ppm) | Interpretación |
|----------------|-------------------------------------|
| 1.23 | Metileno de anillo pirano |
| 2.5 | Protones acoplados a los anteriores |
| 2.9 | Carbono unido a oxígeno |
| 3 - 4 | Carbohidratos |
| 6 - 7 | Grupos fenólicos |

Tabla 11. Desplazamientos de la resonancia magnética de protones.

Los resultados obtenidos del espectro de resonancia magnética protónica indicaron que se trata de un compuesto fenilglucósido del tipo de los antocianos, por la presencia de metileno correspondiente a los protones del carbono # 3 del anillo C (pirano) del antociano, además del protón influenciado por C-O (o sea, el protón unido al carbono # 2) y por los protones de anillos aromáticos correspondientes a los ciclos A y B de este tipo de compuestos.

En la Figura 14 se muestra la asignación de los protones en la estructura teórica del monómero del polímero:

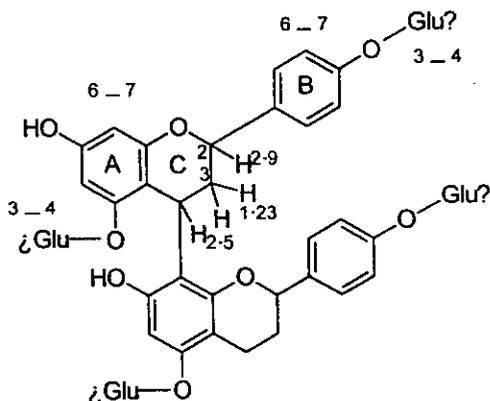


Figura 14. Asignación teórica de los protones en el monómero del filtro solar.

Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C).

El espectro de resonancia magnética de ^{13}C del filtro solar presentó señales químicas que se asignaron a los carbonos de la estructura anterior siguiendo el modelo publicado por Porter, en 1989 para proantocianidinas.

Las asignaciones de los desplazamientos químicos se muestran en la Figura 15.

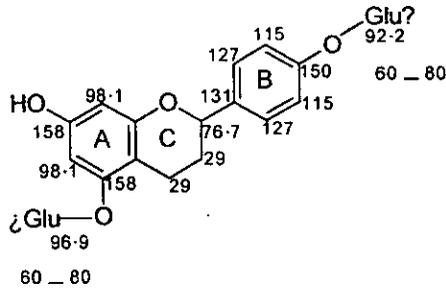


Figura 15. Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C , asignaciones de los desplazamientos químicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la estructura propuesta para el filtro solar es la siguiente:

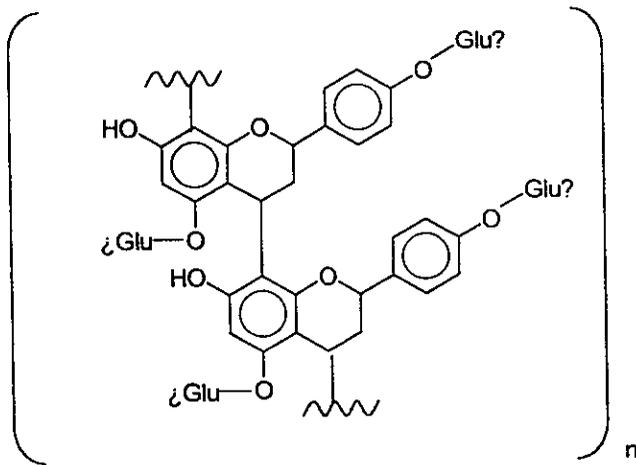


Figura 16. Estructura propuesta para el filtro solar de *Y. filifera*.

La estructura que se propone es el de una 3-desoxiproantocianidina polimérica. Cabe hacer notar que aún falta por determinar el tipo de carbohidrato, el tipo de enlace glucosídico y la secuencia del o los azúcares. Sin embargo, la presencia de estos es indiscutible como lo evidencia la RMN ^1H (señales entre 3 y 4 ppm) y la presencia de 2 carbonos anoméricos (92.2 y 96.9). La posición de los azúcares que proponemos es la más común en este tipo de proantocianidinas (Hemingway, R.W., 1989).

7.3 Evaluación de la capacidad fotoprotectora en la región del UV-B del compuesto activo.

7.3.1 Protección usando bacterias.

Se evaluó la capacidad fotoprotectora del compuesto aislado de *Y. filifera*, el control positivo fue etil-hexil-metoxicinamato (escalol, ISP VAN DIK) y el control negativo metanol al 90%. Se realizó el conteo del número de sobrevivientes de acuerdo al método de Eisenstadt, 1994.

En la Figura 17, se observa que tanto en los cultivos protegidos con escalol y con el filtro solar de *Y. filifera*, la población de bacterias no varía significativamente ($p < 0.05$) con respecto al inóculo inicial en todos los tiempos, a diferencia de los cultivos sin protección, en los cuales disminuye el número de bacterias significativamente en un orden de magnitud de los 60 a los 120 segundos y posteriormente llega a cero por el efecto letal de la radiación, por lo tanto se puede considerar que el compuesto activo sí protege a las bacterias de la radiación continua hasta los 240 segundos. Los resultados se muestran por triplicado y se analizaron mediante el análisis de varianza simple (ANOVA).

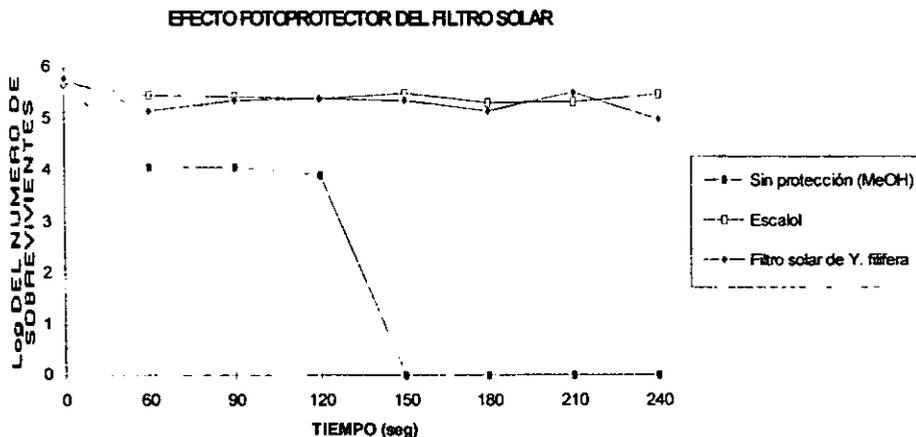


Figura 17. Evaluación de la capacidad fotoprotectora de filtro solar de *Y. filifera*.

7.3.2 Protección usando conejos.

Después de que se irradió a los conejos (6 a 24 horas) se observó la formación de eritema en las zonas sin protección, mientras que en las zonas en las que se colocaron los filtros solares (de *Y. filifera* y el comercial) no había eritema.

En la foto 1, se observa el corte histológico de la piel de conejo irradiada y sin protección, en la zona epidérmica está el estrato córneo (a) y el epitelio estratificado (b); en la zona dérmica encontramos folículos pilosos agrupados (c) y partes de tejido conectivo normal (d), además de una pequeña lesión en el arreglo de las fibras de colágena. La foto 2 es el corte de piel irradiada con protección de escalol (2 mg/cm²), en el cual sólo se observa la región dérmica donde se presenta una glándula sebácea (a), folículos pilosos (b) y el tejido conectivo normal (c). La piel irradiada con protección del filtro solar de *Y. filifera* (2 mg/cm²) se muestra en la foto 3, se ven folículos pilosos (a) y tejido conectivo normal (b).



Foto 1. Corte histológico de piel irradiada, sin protección (zonas epidérmica y dérmica), a) Estrato córneo, b) Epitelio estratificado, c) Folículos pilosos, d) Tejido conectivo normal, e) Tejido conectivo dañado.



Foto 2. Corte histológico de piel irradiada y protegida con escalol, a) Glándula sebácea, b) Folículos pilosos, c) Tejido conectivo normal.



Foto 3. Corte histológico de piel irradiada y protegida con el filtro solar de *Y.filifera*, a) Folículos pilosos, b) Tejido conectivo normal.

7.4 Actividad anti-radicales del compuesto activo.

Los resultados obtenidos de la prueba de decoloración del difenil-picril-hidracil (DPPH) con el ácido tánico y el compuesto activo de *Y filifera* se muestran en la figura 18. En lo referente al ácido tánico se observa que independientemente de la concentración se obtuvieron porcentajes de decoloración por arriba del 85 +/- 0.78%, mientras que en el filtro solar la actividad limpiadora de radicales aumenta con la concentración, hasta llegar a un punto máximo de decoloración del 75.54 +/- 1.63 % con 200 ppm. Los resultados se muestran por triplicado.

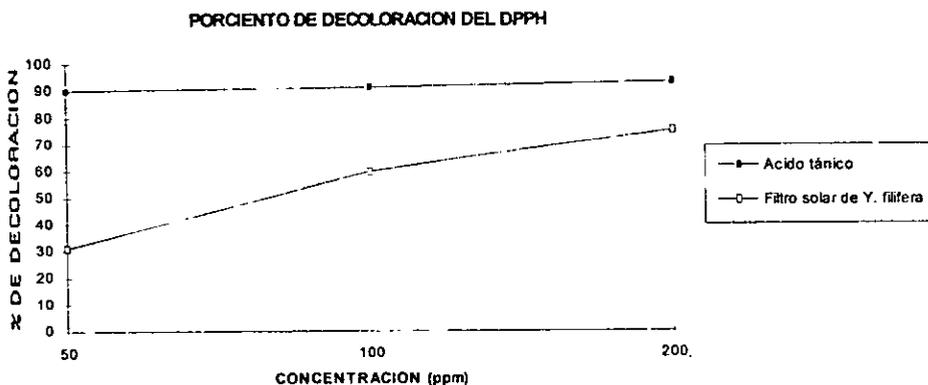


Figura 18. Porcentaje de decoloración de una solución metanólica de difenil-picril-hidracil (DPPH, 20mg/l) por la adición del compuesto activo de *Y filifera* y por el ácido tánico (25, 50, 100 y 200 ppm).

7.5 Biodegradabilidad.

En la gráfica 19 se observa el crecimiento de los microorganismos, el cual empieza a las 8 horas de incubación, aumentando continuamente hasta llegar a un pico máximo a la 60 horas con una D.O. de 0.31, la cual se mantiene hasta las 90 horas, también se observó crecimiento micelial, lo que indica la presencia de hongos filamentosos, estos crecieron hasta que se agotó el medio de cultivo, alcanzando una biomasa de 266.6 $\mu\text{g/ml}$ (peso seco) (figura 19).

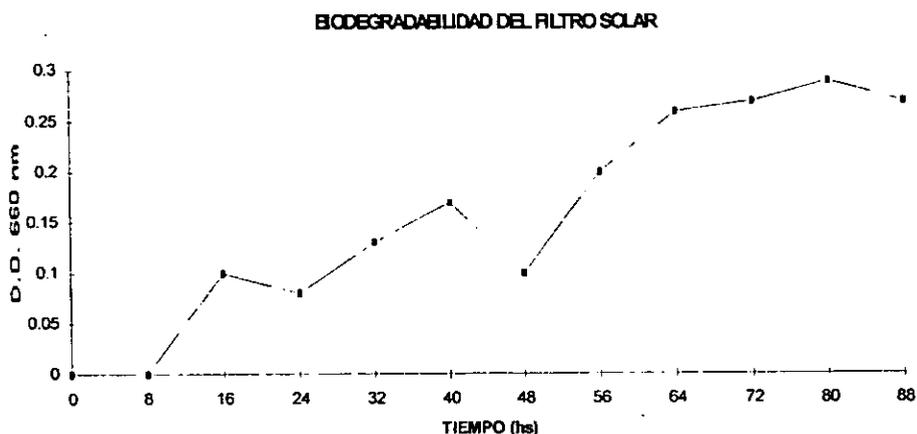


Figura 19. Crecimiento de hongos y bacterias, empleando como sustrato el filtro solar de *Y. filifera*.

8. Discusión.

El compuesto aislado de la corteza de *Yuca filifera* presenta un pico máximo de absorción a 308 nm, en la región del UV-B (290 – 320 nm), también se observa un pico en la región del UV-C (200 – 280 nm), sin embargo, no absorbe en el UV-A, de acuerdo a lo anterior podemos considerar que sí presenta la capacidad de filtro solar (Madhukar, A., 1992).

El filtro solar que se obtuvo presenta un rendimiento del 4.0% a partir de corteza, presenta reacción positiva al cloruro férrico y tiene un peso molecular de 2.6×10^6 , el cual se determinó mediante cromatografía de filtración en gel y HPLC; basándose en estos resultados y teniendo el antecedente de que existen pocos compuestos fenólicos en las plantas que presenten un peso molecular tan alto, el tipo de metabolito secundario se limitaba a ligninas o taninos condensados (proantocianidinas). Gracias a las técnicas de resonancia magnética nuclear de protones y de C^{13} y al espectro de infrarrojo, se pudo determinar que se trata de una 3-desoxiproantocianidina polimérica, aún falta por determinar el tipo de carbohidrato, el tipo de enlace glucosídico, así como la secuencia de azúcares, si existe más de uno, sin embargo la posición propuesta es la más común en este tipo de taninos condensados (Hemingway, R. W., 1989).

La capacidad fotoprotectora del compuesto aislado de *Y filifera* se evaluó en cultivo de *E coli*, los cuales fueron irradiados con luz ultravioleta, la protección del filtro experimental y el control positivo (escalol), es evidente, ya que la población de bacterias no decrece, además de que se encuentran diferencias significativas con el control negativo. En lo referente a la evaluación empleando conejos, los resultados del estudio histopatológico, concuerdan con el estudio anterior, ya que en la piel irradiada y protegida con los dos filtros solares (experimental y control) no muestra daño, comparándola con la irradiada y sin protección, cabe mencionar que el daño causado en las fibras de colágena es mínimo, pero después de que transcurrieron aproximadamente 6 a 24 hr de los experimentos se observaba la formación de eritema en los conejos irradiados sin protección.

La actividad anti-radicales libres nos indica que el filtro solar tiene un porcentaje de decoloración del DPPH del 75.54% a la concentración de 200 ppm, mientras que el ácido tánico obtuvo 85 % de 50 a 200 ppm. Según lo reportado por Joyeux, M., 1995, se considera a un buen atrapador de radicales a aquellos compuestos que logren el 50% de decoloración, por lo tanto el filtro solar de *Y filifera*, es un buen atrapador de radicales libres, lo cual concuerda con lo descrito para compuestos fenólicos (Larson, R., 1988; Bahorun, T., 1993; Ritov, V., 1995).

De acuerdo al estudio de biodegradabilidad, se observa crecimiento, de microorganismos a partir de las 8 horas de incubación, el cual continúa hasta llegar a un pico de crecimiento (D.O. 0.165) a las 40 horas, posteriormente decrece a las 48 horas (D.O. 0.1), en esta etapa del experimento se observaba turbidez, igual que en un cultivo bacteriano, a las 60 horas el crecimiento alcanzo un pico máximo de crecimiento (D.O.0.31), cabe mencionar que a partir de las 56 horas se observó el crecimiento micelial, lo que indica la presencia de hongos filamentosos, los cuales alcanzaron una biomasa de 266.6 $\mu\text{g/ml}$ (peso seco) a las 88 horas.

9. Conclusiones.

- ❖ El compuesto aislado de *Y. filifera* es un filtro solar, puesto que presenta absorbancia en la región del UV-B y del UV-C y muy poca en el UV-A.
- ❖ El compuesto activo es un polímero de alto peso molecular del tipo de las glucosilproantocianidinas.
- ❖ El filtro solar de *Y. filifera* protege de manera similar que el escalol en los experimentos de desafío usando radiación UV-B sobre bacterias y conejos.
- ❖ El filtro solar atrapa radicales libres con una eficiencia de 75.54% a una concentración de 200 ppm.
- ❖ El filtro solar es biodegradable puesto que se utilizó como sustrato alimenticio de hongos y bacterias.

10. Bibliografía.

1. Aiache, J.M. 1983 Biofarmacia. Manual Moderno, México, D.F., México.
2. Ancheson, R. M., 1981. Química heterocíclica. Publicaciones culturales. México. 230-247.
3. Athar, M., Agarwal, R., Bickers, D., and Mukhtar, H. 1992. Role of reactive oxygen species in skin. In: Pharmacology of the skin. CRC Press Series in Pharmacology and Toxicology. 270-276.
4. Bahorun, T.; Trotin, F.; Pommery, J.; Vasseur, J.; and Pinkas, M. 1993 Antioxidants activities of *Crataegus monogyna* extracts. In: Plant Med. Vol. 60 323 – 328.
5. Avendaño, A.1996. Estudio de las flavonas y metabolitos secundarios de *Buddleia parviflora*. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Química. 42-50.
6. Beindic, A., 1994 Role of antioxidants in the maintenance of immune function. In: Natural antioxidants in human health and disease. Academic Press Inc. USA.
7. Bisby, R., and Parker, A. 1993. Radiation-induced free radical reactions. In: Free radicals from basic Science to Medicine. Brikhäuser Verlag Basel. Switzerland. 31-36.
8. Cross, E., Hallwell, B., Borish, E., Pryor, W. Ames, B., Saul, R., Mc Cord, J., and Harman, D., Los radicales de oxígeno en las patologías humanas. Conferencia Davis. Davis and Berkeley. EUA.1-16.
9. Eckert, R.1992. Fisiología animal. Mecanismos y adaptaciones. Tercera edición. Mc Graw Hill EUA. 297-209.
10. Eisenstadt, E., Carlton, B.C. and Brown, B.J. 1994 Gene mutation. In: Gerhardt, P. ed. Methods for general and molecular bacteriology. ASM, Washington D.C., USA., 297-303.
11. Fernández, G., 1994 La pérdida de ozono en la estratósfera y su repercusión en piel. Dermatología Rev Mex. Vol. 38. No. 2. 121-124.
12. Fiore, M.H. 1986 Atlas de histología normal. 7ª edición. Ed. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina.
13. Franco de la Cruz, N. 1979. Utilización de *Prosopis juliflora* var. *gandulosa*, *Atriplex canescens*, *Curbita foetidissima* y *Yucca filifera* para alimento del conejo de la raza Nueva Zelanda. Ciencia Forestal. Instituto Mexicano de Investigaciones Forestales. Vol.14 No.4. México.
14. Freeman, S.; Hacham, H.; Gange, R.; Maytum, D.; Sutherland, J.; and Sutherland, B. 1989 Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated *in situ* with ultraviolet light. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol 88 5605 – 5609.
15. Galvez, J., De la Cruz, P, Zaruela, A., and Sanchés de la Cuesta, F. 1995. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enymes. Pharmacology. 51:127-133.
16. Garcia, C., y Aragon, S. 1975. Descripción de plántulas de cuatro especies de *Yucca*,cactáceas y suculentas mexicanas. Organo de la Sociedad Mexicana de Cactología A.C. Tomo XX México.

17. Gerschman, R., Gilbert, D., Nye, S., and Ferr, W., 1954. Oxygen poisoning and X radiation a mechanism in common. *Science* 119. 623-626.
18. Gilbert, P. 1981 Oxygen and living processes. An interdisciplinary approach. Springer Verlag EUA. 44-64.
19. Gilchreot, B.A., Soter, N.A., Hawk, J.L., Barr, R.M., Black, A.K., Hensby, C.N., Mattet, A.I., Greaves, M.W., and Parrish, J.A. 1983 Histologic changes associated with ultraviolet-A- induced erythema in normal human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 9 (2): 213-219.
20. Harbone, J., 1984 *Phytochemical Methods*. Second edition. Chapman and Hall. London. 69 – 89.
21. Haslam, E., 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *J. Nat. Prod.* 59: 205-215.
22. Hemingway, R.W. 1989 Structural variations in proanthocyanidins and their derivatives. In: Hemingway, R.W. and Karchesy, J. (Eds.) *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York, USA., 83-107.
23. Joyeux, M., Lobstein, A., Anton, R. and Mortier, F. 1995 Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from *Ginkgo* and some flavonoids. *Planta Med.*, 61 (2): 6-129.
24. Jürgen, 1992 Antioxidants in the skin. In: *Pharmacology of the skin*. CRC Press Series in Pharmacology and Toxicology. 250-260.
25. Jyunkai, S., and Barta, R. 1996) Metabolic efficiency and turnover of soil microbial communities in biodegradation tests. *Applied Environmental Microbiology*, July, 2411 -2415.
26. Lehninger, A., 1981. *Principios de Bioquímica*. Omega. España.
27. López, A. 1996. Flavonoides con actividad biológica aislados de *Prunus serotina* ssp *capuli*. Tesis de licenciatura. UNAM Facultad de Química. 7-18.
28. Larson, R., 1988 The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. Vol. 27. No. 4. 969 – 978.
29. Leeson, T., Leeson R., and Paparo, A., 1989. *Texto/Atlas de histología*. Mc Graw Hill México. 363-393.
30. Madhukar, A. 1992 Sunscreens: Principles of photoprotection. In: *Pharmacology of the skin*. CRC Press Series in Pharmacology and Toxicology. 230-247.
31. Maldonado, L. 1979. Uso múltiple de los recursos naturales de las zonas áridas. *Ciencia Forestal*. Instituto Mexicano de Investigaciones Forestales. Vol 4. No.17. México.
32. Maldonado, L., 1985 a. Sistemas de producción forestal de zonas áridas. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. No.72. México
33. Maldonado, L., 1985b. Descripción y desarrollo de las regiones áridas de México. *Ciencia Forestal*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Vol. 10 No. 58.
34. Mathiesen, L., Mølterud, K.E., and Sund, R.B. 1995 Antioxidant activity of fruit exudate and C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale*. *Planta Med.*, 61(6): 515 - 518.
35. Matuda, E. y Piña, L. 1980 Las plantas mexicanas del género *Yucca*. Colección Miscelánea, Edo. Méx. México. 102-104

36. Niki, E., 1993 Antioxidants defenses in eukariotic cells: an overview. In: Free radicals: from basic science to medicine. Poli. E. Albano & M.V. Drazani. Switzerland.
37. Packer, L. 1994. Vitamin E is nature's master antioxidant. *Sci Am Sci Med.* 1: 54-63.
38. Porter, L.J. 1989 Tannins. In: Dey, P.M. and Harborne, J.B. (Eds.) *Methods in plant biochemistry*, Vol. 1: Plant Phenolics. Academic Press. Boston Mass., USA., 415-419.
39. Pryor, W., 1994 Oxidants and antioxidants. Free radicals and lipid peroxidation: What they are and how they got that way. In: *Natural antioxidants in human health disease*. Academic Press Inc. USA. 1-62
40. Ritov, V.; Goldman, R.; Stoyanovskiy, D.; Menshikova, E; and Kagan, V. 1995 Antioxidant paradoxes of phenolic compounds: Peroxyl radical scavenger and lipid antioxidant, etoposide (VP-16), inhibits sarcoplasmic reticulum Ca^{+2} - ATPase via thiol oxidation by its phenoxyl radical. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 321. No. 1. Pp 140 -152.
41. Robertfroid, M. and Calderon, P., 1995 Free radicals and oxidation in biological systems. Marcel Dekker. USA. 206-221.
42. Roger, H. And Bisby, H., 1993 Radiation induced free radical reactions. In: *Free radicals: from basic science to medicine*. Poli. E. Albano & M.V. Drazani. Switzerland.
43. Romo de Vivar, A., 1985 *Productos naturales de la flora mexicana*. Limusa. México. 198 - 200.
44. Romo de Vivar, A., Arreguín, B., Camacho, R., Guerrero, C., Ortega, A. y Castillo, M.J. 1975 Saponinas esteroidales de *Yucca filifera*. *Rev. Latinoam. de Química*, 5, 240 - 245.
45. Rusell, O., 1992 Structure of the skin. In: *Pharmacology of the skin*. CRC Press Series in Pharmacology and Toxicology. 14-25
46. Salvayre, R., Negree, A., Affany, A., Lenoble, M., and Douste-Blazy, L., 1988. Protective effect of plants flavonoids, analogs and vitamin E against lipid peroxidation membranes. *Plant flavonoids in Biology and Medicine*. In: *Biochemical Cellular and Medicinal Properties*. 313-316.
47. Swisher, R.D. 1987 *Surfactant biodegradation*. 2nd Ed. Surfactant Science Series. Marcel Dekker, Inc. New York, USA., 129-131.
48. Wolf, B.; Werner, H.; Christa, M.; and Manfred, S. 1990 Flavonoids as antioxidants: Determination of radical - scavenging efficiencies. In: *Methods in Enzymology*. Vol 186. 343 - 456.
49. Wolf, B., Werner, H., Christa, M., and Kurt, S., 1993. Electron paramagnetic resonance studies of flavonoid aocompus. In: *Free radicals from Basic Science to Medicine*. Birkhäuser Verlag Basel Switzerland. 374-387.
50. Zhu, M., Philipson, D., Greengrass, P and Bowbry, C. 1997. Plant polyphenols: Biologically activity compounds or non-selective binders to protein?. *Phytochemistry*. Vol 44. No. 3. 441-447.