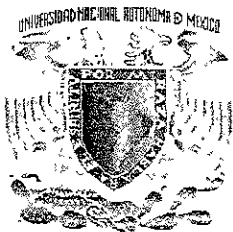


110



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION Y DETERMINACION DE LA
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE
IRIDOIDES, XANTONAS Y CUMARINAS
AISLADOS DE PLANTAS MEXICANAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ARACELI LARA VILLALOBOS

DIRECTOR DE TESIS: Dr. ARTURO NAVARRO OCAÑA



MÉXICO, D.,F.



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

298313



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 está 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Evaluación y determinación de la capacidad antióxidante de los
Iruidoides, Nantones y Querarinas aislados de plantas medicinales,
realizado por **Dr. Carlos López Villalobos**
con número de cuenta **1933363-3**, pasante de la carrera de **Química**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Antonio Navarro Cosío

Propietario

Dr. Ricardo Rojas Chaly

Propietario

Dr. Susana Guzmán Pérez

Suplente

Dr. Carlos María Martínez Santiago

Suplente

Dr. M. del Rosario Arriaga García

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

T E S I S

“Evaluación y Determinación de la Capacidad Antioxidante de Iridoides, Xantonas y Cumarinas, Aisladas de Plantas Mexicanas”

Por.

Araceli Lara Villalobos

Esta Tesis fue elaborada en.

Dpto De Productos Naturales, Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

Director de tesis: Dr Arturo Navarro Ocaña

Cd. Universitaria, México, D.F del 2001

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, a la **Facultad de Ciencias** y a todos los profesores por haberme dado una educación profesional

Al Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (**PROBETEL**), por haberme otorgado la beca durante el desarrollo del presente proyecto

Al **Instituto de Química** y sobre todo al **Dr. Manuel Jiménez Estrada** por su asesoría y apoyo para desarrollar este proyecto

Un especial agradecimiento a mi director de tesis, **Dr. Arturo Navarro Ocaña**, por su apoyo y tiempo brindado durante la realización de este proyecto

Al **Dr. Ricardo Reyes Chilpa** por su asesoría y valiosa amistad

A la **Dra. Patricia Guevara Fefer** por sus comentarios y apoyo brindado.

y

A **TODOS** aquellos quienes colaboraron con el desarrollo de este trabajo

GRACIAS.

DEDICATORIA

El presente trabajo esta dedicado:

A mis padres:

Jorge Lara Gómez y Josefina Villalobos Ordoñez

Y

A mi hermano:

Jorge F. Lara Villalobos

ÍNDICE

INDICE
RESUMEN
ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
III 1 Objetivo General	
III 2 Objetivo Particular	
III. ANTECEDENTES	3
III 1 Radicales Libres	3
III 1 1 Definición	5
III 1 2 Mecanismos de formación de radicales libres	7
III 1 3 Causas que originan la formación de radicales libres.	8
III 1 4 Importancia biológica	10
III 1 5 Efectos sobre la salud	11
III 1 6 Sistemas fisiológicos de defensa frente a la producción de RL.	12
III 1 7. Hongos xilófagos y producción de RL.	14
III 2 Antioxidantes	17
III 2 1 Historia de los antioxidantes	17
III 2 2 Definición	18
III 2 3 Clasificación de los antioxidantes	18
III 2 4 Antioxidantes sintéticos	20
III 2 5 Antioxidantes naturales	24
III 3 Compuestos fenólicos	26
III 3 1 Generalidades	26
III 3 2 Definición.	26
III 3 3 Compuestos fenólicos como antioxidantes naturales	27
III 3 4 Iridoides	28
III 3 5 Xantonas	30
III 3 6 Cumarinas	32
IV. METODOLOGIA.	34
Diagrama de flujo de la metodología	35
IV Material y métodos.	36
IV 1. Pruebas antioxidantes químicas y biológicas	39
IV 2 Pruebas químicas cualitativas (1ª etapa)	39

IV 4 Método del blanqueo con β -carotenos	40
IV 5 Prueba química cualitativa (2ª etapa)	41
IV 6 Prueba biológica (3ª etapa)	42
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	45
VI. CONCLUSIONES	58
VII. PERSPECTIVAS	60
VIII. BIBLIOGRAFÍA	61

RESUMEN

Avances en investigaciones bioquímicas y moleculares han mostrado que diversos padecimientos están relacionados con los radicales libres (RL)⁽¹⁾ Una forma de contrarrestar tales efectos, es el uso de *antioxidantes*: sustancias que disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales autooxidables⁽²⁾ Los hay naturales y sintéticos, éstos últimos han exhibido efectos negativos contra la salud.⁽³⁾ Debido a estos efectos indeseables los compuestos naturales son preferidos como agentes antioxidantes (fenoles, flavonoides, carotenoides, etc)⁽⁴⁾

En el presente trabajo, se dan a conocer los resultados de nuestros estudios de evaluación de la capacidad antioxidante de Iridoides, Xantonas y Cumarinas, recientemente aislados de plantas mexicanas La actividad antioxidante de estos fitocompuestos, se comprobó mediante diferentes métodos. a) análisis cualitativo, método con el radical libre DDPH y método del blanqueo, b) análisis cuantitativo, espectrofotometría con UV, y c) prueba biológica, inhibición del crecimiento micelial del hongo de pudrición morena que secreta H₂O₂ y genera radicales libres^(5,6,7)

ABSTRACT

Advances in biochemistry and molecular biology research have shown that some illnesses are related to or generated by free radicals (RL)⁽²⁾. One way to avoid or prevent such effects is the use of antioxidants. These substances minimize the oxidation rate of autooxidizable materials. Antioxidants can be natural or synthetic, the later have shown some adverse effects to human health⁽³⁾. Due to these unwanted effects natural compounds are preferred as antioxidants agents (phenols, flavonoids, carotenoids, etc)⁽⁴⁾.

We present here the results from our research on the antioxidant activity of iridoids, xanthones and coumarins recently isolated from mexican plants.

The antioxidant activity of these phytochemicals was tested through different methods: a) qualitative analyses, free radical DDPH method and bleaching method, b) quantitative analyses, UV spectrophotometry and c) biological test, inhibition of micelial growth of a wood rotting fungus that secretes H_2O_2 and generates free radicals^(5,6,7).

INTRODUCCION

I. Introducción

El estudio de productos naturales de plantas, ha cambiado sustancialmente en pocos años, las razones, incluyen los avances tecnológicos en los métodos de análisis y purificación, técnicas nuevas para evaluar la actividad biológica, selección y colección de plantas y un mejor conocimiento de las rutas de biosíntesis. Estos cambios, han permitido ampliar y encontrar nuevas aplicaciones a estos ⁽⁸⁾

El desarrollo de sustancias antioxidantes de fuentes naturales propias que puedan usarse en la industria de alimentos, farmacéutica y de otras especialidades químicas y biológicas, es de suma importancia, ya que a medida que se cuente con más estudios acerca de la capacidad antioxidante y de la estabilidad físico-química de este tipo de moléculas, se podrá evaluar su empleo en la industria. El interés que ha despertado la bioactividad de los antioxidantes extraídos de plantas superiores se debe en parte, a su potencial beneficio a la salud, para la prevención ó cura de numerosas enfermedades ⁽⁹⁾

Las razones anteriormente expuestas, y el hecho de que es necesario desarrollar agentes antioxidantes naturales que tengan las mismas propiedades (abundantes, bajo costo, estabilidad térmica y química), que los de síntesis química, ⁽¹⁰⁾ nos ha motivado a proponer la realización del presente proyecto, que tiene como objetivo principal evaluar la capacidad antioxidante de algunos iridoides, xantonas y cumarinas aislados de plantas mexicanas mediante pruebas químicas y biológicas

OBJETIVOS

II: Objetivos

II.1. Objetivo General:

Evaluar la Capacidad antioxidante de algunos Iridoides, Xantonas y Cumarinas aislados de plantas mexicanas

II.2. Objetivos particulares:

- ◆ Obtener iridoides, xantonas y cumarinas, en cantidad suficiente para realizar las diferentes pruebas y determinar su capacidad como agentes antioxidantes
 - ◆ Realizar pruebas químicas cualitativas (prueba del blanqueo con β -carotenos y con el radical libre DDPH), que indiquen la actividad antioxidante de los iridoides, xantonas y cumarinas estudiados⁽⁹⁾
 - ◆ Determinar cuantitativamente (método espectrofotométrico), la capacidad antioxidante de los iridoides, xantonas y cumarinas que dieron positiva la prueba preliminar⁽¹⁰⁾
 - ◆ Evaluar y determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de los fitocompuestos estudiados, en un modelo biológico que involucra radicales libres y antioxidantes, mediante la inhibición del crecimiento micelial del hongo xilófago *Postia placenta*.
-

ANTECEDENTES

III. Antecedentes

III.1. Radicales libres.

Desde el inicio de la vida en nuestro planeta ya sea simple ó compleja, toda materia viva está constituida primariamente de compuestos de carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno, que al parecer fueron abundantes en la primitiva atmósfera de la Tierra en forma de gases tales como vapor de agua, nitrógeno y dióxido de carbono. Todos estos gases son producto de la actividad volcánica, muy frecuente en aquella época.

Al principio el oxígeno que producían las plantas quedaba "fijado" al reaccionar o combinarse con otras sustancias y minerales. Al fin, hace unos 2,2 mil millones de años, el oxígeno libre ya empezaba a hallarse presente en la atmósfera. Los seres vivos consumían esta sustancia reactiva para llevar a cabo las funciones bioquímicas de sus propias células⁽³¹⁾

Puesto que el oxígeno es un elemento químico extremadamente reactivo, que puede interaccionar con la mayoría de los constituyentes citoplasmáticos, debió ser tóxico para muchos de los organismos primitivos, al igual que lo es para muchas de las bacterias anaeróbicas actuales. Sin embargo, esta reactividad también proporciona una fuente de energía química, y por lo tanto es sorprendente que haya sido utilizada por los organismos en el transcurso de la evolución. Utilizando oxígeno, los organismos pueden oxidar de manera mas completa las moléculas que ingieren. La energía liberada en la respiración -la oxidación aeróbica de las moléculas alimenticias- se utiliza para impulsar la síntesis de ATP, de manera muy parecida a la que utilizan los organismos fotosintéticos para producir ATP a partir de la energía de la luz solar⁽³²⁾

El estado terrestre del oxígeno molecular, O_2 , es esencial para muchos procesos metabólicos que son indispensables en todas las formas de vida aeróbicas que van desde los procariontes, protistas, plantas y hongos hasta los animales

A pesar de que el oxígeno es indispensable para la vida aeróbica, es potencialmente tóxico y su utilización en los procesos metabólicos sólo es posible si los organismos cuentan con una gama de moléculas que los protejan de los derivados del oxígeno llamados especies reactivas de oxígeno (ROS). Algunas de las más importantes se muestran en la Tabla 1 ⁽¹⁶⁾

Los radicales de oxígeno son capaces de destruir bacterias e inactivar enzimas. También pueden interactuar con lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, alterando la estructura y función de los componentes celulares ⁽¹⁷⁾

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno (ROS).

ROS	
Fórmula	Nombre
O_2^-	Superóxido
1O_2	Oxígeno singulete
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
$\cdot OH$	Radical hidroxilo
$LO\cdot$	Radical alcoilo
$LOO\cdot$	Radical alquilperoxil
$LOOH$	Alquil hidroperóxido

Fuente: Scott, G. 1995. *Chemistry in Britain*

Las especies y reacciones radicales son el punto central para mantener la homeostasis en los sistemas biológicos. Las especies radicales juegan un papel cardinal en procesos fisiológicos, mediado por las transformaciones de las reacciones oxidativas. Una generación excesiva de especies radicales (ROS), pueden generar un estado de daño permanente que afecta a moléculas específicas del organismo es lo que se conoce como stress oxidativo ⁽¹⁵⁾.

Por lo que a este estudio compete, es primordial comprender la naturaleza de dichas especies

III.1.1. Definición.

Los radicales libres (RL), son especies químicas neutras o cargadas derivadas de átomos o de moléculas que contienen uno o más electrones desapareados es decir, célibes en su orbital externo, lo que les confiere su característica inestable ⁽¹⁹⁾(Fig 1)

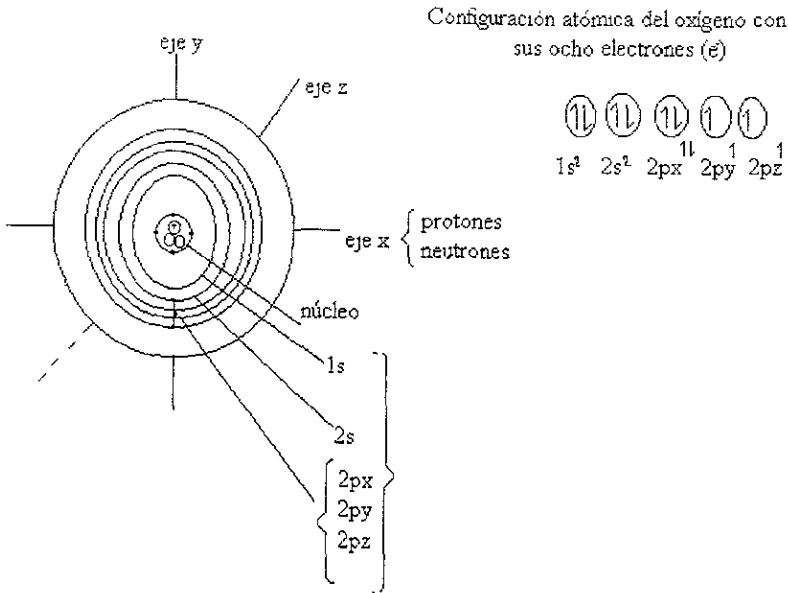


Figura 1. Configuración atómica y molecular del oxígeno.

Dentro de las moléculas los electrones habitualmente se reúnen en pares. Así en la molécula de agua, el oxígeno se encuentra rodeado de cuatro pares de electrones (dobletes), dos pares se ligan débilmente en uniones OH y dos pares no ligados (Figura 2).

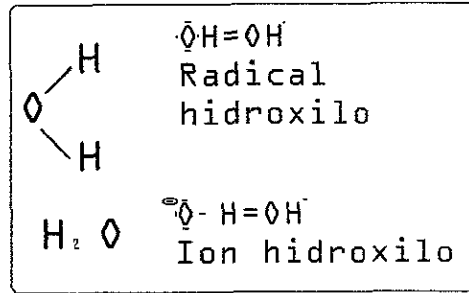


Figura 2. Estructura del radical
Estructura iónica.

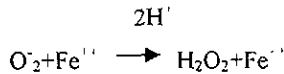
Un doblete electrónico es más estable que un electrón aislado, porque aparentemente dos electrones con sping opuestos permiten la anulación de los campos magnéticos recíprocos

El electrón célibe le confiere al radical libre una cierta inestabilidad tanto en el plano energético como cinético. Desde el punto de vista energético, los radicales libres tienden a obtener electrones célibes de sus compañeros electrónicos El resultado alcanzado puede ser.

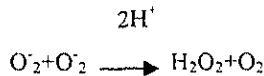
- Que se pierda un electrón El radical es entonces reducido Este es el caso del radical COO^-
- Que gane electrones El radical sufre oxidación, como por ejemplo el OH (radical hidroxilo)
- Podría acontecer que, según la composición de su opositor, un radical pueda ser oxidado o bien reducido. Así el anión superóxido O_2^- puede reducir los iones cúpricos



O bien oxidar los iones ferrosos.



Por otra parte, un radical puede oxidarse él mismo, por una reacción de dismutación



En esta reacción uno de los radicales O_2^- es oxidado, mientras el otro es reducido

Y desde el punto de vista cinético, el hecho de que los radicales libres tengan un electrón no acoplado su capa periférica, favorece considerablemente las coaliciones bimoleculares y su aproximación con otras moléculas. En efecto la repulsión coulombiana interviene entre las capas periféricas y es en este caso menos débil. Es así que, la rapidez de una reacción química está determinada por la eficacia de las colisiones. Estando aumentada en esta última, las reacciones entre los radicales son frecuentemente muy rápidas⁽⁴³⁾

III.1.2. Mecanismos de formación de las especies radicales

El anión superóxido O_2^- es el producto de la reducción monovalente del oxígeno molecular

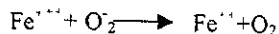
Para la adquisición de un electrón célibe y mediante un aporte de energía, la molécula de oxígeno O_2 se transforma en anión superóxido O_2^-

En presencia de iones H^+ , el anión superóxido súbitamente sufre *in vitro* una reacción espontánea de dismutación (proceso de óxido-reducción entre moléculas de la misma naturaleza) con formación de oxígeno fundamental y peróxido de hidrógeno

El efecto destructor del O_2^- Podría ejercerse *in vivo* indirectamente puesto que en presencia de H_2O_2 , el O_2^- sería el precursor del radical hidroxilo OH. Para la reacción de Haber y Weiss (Figura 2).



Esta reacción muy lenta, no puede intervenir sin catálisis. Suponiendo que los iones férricos jugarán el papel de catalizador^(15,17)



El peróxido de hidrógeno H_2O_2 puede ser formado secundariamente por la dismutación del O_2^- ó ser producto de la reducción bivalente del oxígeno la adición de un segundo electrón conduce a la formación de agua oxigenada H_2O_2

El H_2O_2 con un fuerte poder oxidante en presencia del ion ferroso (Fe^{2+}), se descompone en un simple ion OH^- y un radical hidróxilo OH . Capaz de atacar las estructuras orgánicas más estables

El radical hidroxilo OH^{\cdot} su formación se hace a partir del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en presencia de hierro y es llamada reacción Fenton. La reactividad de los radicales OH^{\cdot} es más grandes en los medios biológicos (vida de duración del orden 10^{11} seg) y sus reacciones con las moléculas vecinas, algunas de las cuales son producto de radicales secundarios por arrancamiento de un átomo de hidrógeno o por transferencia del electrón célibe. Ello constituye una oxidación⁽¹⁴⁾

Los radicales alcoxi RO^{\cdot} Y peroxi ROO^{\cdot} . Estos radicales pueden generarse por la acción de un radical libre de oxígeno (O_2OH^{\cdot}) sobre las cadenas de los ácidos grasos poliinsaturados. Los radicales peroxi son conocidos por ser menos reactivos y más selectivos que los radicales OH^{\cdot} . Ellos son el origen de las reacciones en cadena, que como es sabido, constituyen el proceso de base de la lipoperoxidación, proceso de combinación de ácidos grasos con un RL del oxígeno para la formación de peróxidos en las membranas celulares⁽¹⁸⁾

III.1.3. Causas que originan la formación de Radicales libres.

En los sistemas biológicos, los radicales libres son generados a través del metabolismo xenobióticos de las drogas y los químicos, la irradiación incluyendo la radiación ionizante y la luz, la transición de una oxidación de un electrón de metal catalizado por minerales tales como el hierro y el cobre, y la secreción de oxidantes desde leucocitos inflamatorios y otros procesos inmunodefensivos. La catalisis enzimática y no enzimática también generan RL en sistemas biológicos⁽⁶⁶⁾

La radiación ionizante es muy bien conocida como un productor de RL en sistemas vivientes. Similarmente, la luz puede excitar moléculas que transfieren su energía al oxígeno o directamente excitan al oxígeno para producir un oxígeno sencillo. De acuerdo con Pryor, la luz que induce reacciones en los RL es especialmente dañina al ojo humano⁽⁴³⁾

Los contaminantes ambientales que contienen RL en si mismos o que contienen

toxinas que generan radicales libres también juegan un papel muy importante en estos fenómenos. De hecho, la producción de radicales generada por xenobióticos parece ser el mecanismo más importante in vivo que causa un daño patológico. Xenobióticos pueden producir RL por tres diferentes mecanismos: (i) algunos son por sí mismo radicales libres y consecuentemente reaccionan para formar biopoliradicales, (ii) algunos, aunque no son propiamente radicales libres, son tan reactivos que pueden hacer que se formen radicales libres en una célula, y (iii) algunos requieren una activación enzimática para producir RL ⁽²²⁾

El ozono (O_3) es todavía otro ejemplo de un contaminante reactivo ambiental. Aunque no es un radical libre por sí solo, el ozono puede reaccionar con materiales biológicos para producir RL. En contraste, algunos xenobióticos requieren una activación enzimática para producir RL. El tetracloruro de carbono (CCl_4) es típico de este grupo, es metabolizado en un sitio de citocromo P-450 que últimamente conlleva a la formación del radical libre triclorometilo. Algunas de las drogas usadas en las terapias de cáncer también son reducidas enzimáticamente para producir RL ⁽¹⁹⁾.

El cuerpo humano también produce RL durante el curso de su metabolismo normal. Son necesarios para el curso normal de varios de sus procesos bioquímicos. La respiración es la principal fuente de energía (bajo la forma de ATP) de las células vivientes en medio aerobio, ésta se efectuará a nivel mitocondrial e implica una reducción del oxígeno para llegar hasta agua, en esta reacción los electrones son desplazados por pares. Los radicales libres oxigenados son los productos fisiológicos potencialmente más peligrosos, de la respiración celular.

Aunque el oxígeno es esencial en los procesos de generación de energía celular, un incremento en RL también puede ser dañino, incluyendo radicales de súperoxido e hidroxilos. Incluso, las células fagocíticas que se encuentran en las defensas naturales del cuerpo generan RL en el proceso de destrucción de bacterias, hongos, virus, y otras sustancias antigénicas ⁽⁴³⁾

Los RL pueden ser producidos como productos normales de la respuesta de un cuerpo saludable debido a varios elementos de stress. Traumas, inflamaciones, ciertas medicaciones y algunas enfermedades pueden llevar a un incremento de estas especies ⁽⁴⁶⁾.

III.1.4. Importancia biológica

La membrana celular es un sistema biológico elemental donde la unidad de base son los fosfolípidos, moléculas dispuestas de un polo hidrófilo y de un polo hidrófobo, constituido de dos cadenas de ácidos grasos insaturados que poseen muchos dobles enlaces carbono-carbono.

Es en las cadenas de ácidos grasos insaturados y específicamente sus dobles enlaces donde son extremadamente sensibles a la agresión de los radicales.

El ataque de los radicales (OH) sobre las membranas celulares fosfolípídicas genera una reacción en cadena, debida posiblemente en parte, a la existencia de dobles enlaces carbono-carbono a nivel de los ácidos grasos insaturados, dobles enlaces que facilitan la descolocación del electrón libre y por otra parte, a la presencia de oxígeno molecular O_2 que fácilmente se aparea por uno de sus electrones con el electrón libre desalojado, el cual potencializará el daño primario ⁽²¹⁾.

Los radicales libres son particularmente dañinos para las proteínas que contengan un grupo sulfhidrilo (SH). Este es el caso de numerosas enzimas celulares y proteínas de transporte, que pueden por esta vía, ser oxidadas e inactivadas. De este ataque de los radicales libres sobre las proteínas, resultan graves alteraciones del metabolismo celular. Las proteínas constituyen el tejido conjuntivo (microfibrillas de colágeno, ácido hialurónico) son igualmente sensibles a la acción de los radicales libres. Se induce así, una esclerosis y fibrosis del tejido de sostén que pierde su troficidad.

Los ácidos nucleicos son particularmente sensibles a la acción de los radicales: el sitio de acción es el seno de la molécula del ADN (entre las bases púricas y pirimidicas) que conlleva a la ruptura de éstas y las mutaciones correspondientes. Esta desnaturalización del ADN puede tener graves consecuencias sobre la transmisión o replicación del mensaje genético, así como sobre la síntesis de proteínas ⁽¹⁸⁾.

III.1.5. Efectos sobre la salud

Se sabe que los radicales libres, están relacionados con múltiples padecimientos (Tabla 2).

Tabla 2. Patologías en las que están implicados los radicales libres

INFLAMACION, PADECIMIENTOS INMUNOLOGICOS

Glomerulonefritis (idiopática, membranosa)
 Vasculitis (Hepatitis B, drogas)
 Enfermedades autoinmunes
 Artritis reumatoide

ESTADOS DE ISQUEMIA Y REPERFUSION

Embolia/infarto al miocardio/arritmias
 Rechazo a transplantes
 Inflamación de articulaciones
 Daños por congelación
 Contractura de Dupuytren
 Osteonecrosis isbárica

REACCIONES INDUCIDAS POR DROGAS Y TOXINAS

Sobrecarga de hierro
 Hemocromatosis idiopática
 Sobre carga dietaria de hierro (Bantu)
 Talasemia y otras anemias crónicas
 Deficiencias nutricionales (Kwashiorkor)
 Alcoholismo
 Sobrecarga de hierro inducida por alcohol

Miopatía alcohólica

DAÑO POR RADIACION

Exposición nuclear o accidental
 Radioterapia
 Sensibilización celular a la hipoxia

ENVEJECIMIENTO

Desórdenes propios de envejecimiento prematuro

CAMBIOS RELACIONADOS CON LAS CELULAS ROJAS DE LA SANGRE

Intoxicación por plomo
 Fotooxidación de la protoporfirina
 Malaria

Anemia de células falciformes

Anemia de Fanconi

Anemia hemolítica del prematuro

Metabolismo de la fenilhidracina

Metabolismo de la primaquina y drogas relacionadas

NEUMOLOGIA

Efectos del humo de cigarrillo

Enfisema pulmonar

Oxidaciones derivadas de contaminación (O₃ NO₂)

Algunas formas del síndrome de stress respiratorio (ARDS)

Pneumoconiosis por polvos minerales

Carcinogenicidad del asbesto

Toxicidad de la biconcavina

Toxicidad del Parquat

SISTEMA VASCULAR Y CORAZON

Cardiomiopatía alcohólica

Enfermedad de Keshan (deficiencia de selenio)

Arteriosclerosis

Cardiotoxicidad a la asnamicina
NEFROLOGÍA
Síndrome nefrótico autoimmune
Nefrotoxicidad a aminoglicósidos
Nefrotoxicidad por metales pesados (Pb, Cd, Hg)
TRACTO GASTROINTESTINAL
Lesión endotóxica del hígado
Lesión hepática por hidrocarburos hidrogenados (vg. Bromobenzeno, tetracloruro de carbono, halotano)
Acción diabética de la aloxana
Pancreatitis
Lesiones gastrointestinales inducidas por drogas antiinflamatorias no esteroides (NSAID)
Envenenamiento por Hierro
CEREBRO/SISTEMA NERVIOSO/DESORDENES NEUROMUSCULARES
Oxígeno hiperbárico
Deficiencia de vitamina E
Neurotoxinas inclusive plomo
Enfermedad de Parkinson
Lesión cerebrovascular hipertensiva
Lupofuccinosis neuronal ceroid
Encefalomielitis alérgica y otras enfermedades desmielinizantes
Sobrecarga de aluminio (Enfermedad de Alzheimer)
Potenciación de daño traumático
Distrofia muscular
Esclerosis múltiple
OFTALMOLÓGICOS
Cataratas
Hemorragia ocular
Daño degenerativo de la retina
Fibroplasia retrolental (Retinopatía del prematuro)
Retinopatía fótica
DERMATOLÓGICOS
Lesiones por radiación solar
Lesiones por calor
Porfina
Fotosensibilización
Dermatitis por contacto
CANCER, tumores
DIABETES

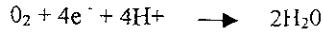
III.1.6. Sistemas fisiológicos de defensa frente a la producción de radicales libres.

Frente a la producción fisiológica más potencialmente peligrosa de radicales libres oxigenados, el organismo dispone de sistemas de defensa enzimáticos específicos. Estas enzimas, presentes en el sitio de producción de los radicales libres, los mantienen en concentraciones muy bajas ⁽²⁵⁾.

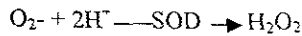
Todas las células cuentan con diversos mecanismos de protección natural para manejar la carga fisiológica de radicales libres generados en las células, ya sea impidiendo su

formación o neutralizándolos una vez formados, entre estos sistemas protectores se encuentran los siguientes:

a) Sistema citocromo-oxidasa: Existe a nivel mitocondrial y consiste en evitar la reducción univalente del oxígeno, por reducción tetravalente, sin liberar intermediarios ⁽¹⁹⁾



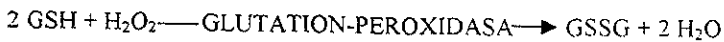
b) Superóxido-dismutasa (SOD): Es una familia de metaloenzimas (dependientes de Zn^{2+} , Cu^{2+} , y Mn^{2+}) que catalizan la dismutación del radical anión superóxido para dar peróxido de hidrógeno (reacción b) ⁽²⁸⁾



c) Catalasa: Cataliza la transformación de dos moléculas de peróxido de hidrógeno, en dos moléculas de agua más una molécula de oxígeno (33)



d) Peroxidasas: Catalizan la reducción del peróxido de hidrogeno por diversos donadores de electrones dentro de estas enzimas destaca la glutathion-peroxidasa, que cataliza la siguiente reacción.



e) Carotenos, vitamina E y vitamina C. Los β -carotenos neutralizan al singulete de oxígeno, una molécula de esta puede inactivar centenares de moléculas de oxígeno singulete mediante un mecanismo de apagador (quenching) físico, la energía del siguiente de oxígeno se utiliza para convertir la forma cis.

Sin embargo, cuando los sistemas antiradicales fisiológicos (enzimas específicas y captadores de radicales libres) son desbordados, bien sea en razón a una disminución de la actividad enzimática (ejemplo envejecimiento) o en razón a una exagerada producción de

radicales (situaciones patológicas diversas, exposición a las radiaciones ionizantes o una radiación ultravioleta), la neutralización de los radicales libres suele afectar otros sistemas celulares tales como las membranas, los ácidos nucleicos y las proteínas, desencadenándose el poder patógeno de los RL. De la oxidación de los radicales de los lípidos de membrana, de proteínas y de los ácidos nucleicos, resulta una alteración profunda de las membranas y del metabolismo celular con la muerte de las células^(45, 24)

Para contrarrestar dicho efecto, existen moléculas que ayudan a disminuir los efectos patógenos de los RL, por lo que su estudio minucioso abre alternativas complementarias frente a la producción fisiológica potencialmente peligrosa para el organismo vivo y es precisamente, lo que se estudiará a continuación. Pero antes, abordaremos el estudio de hongos xilófagos y su posible relación en la generación de RL⁽⁴³⁾

III.1.7. Hongos xilófagos y producción de RL

Los hongos son organismos heterótrofos, incapaces de usar el CO₂ como única fuente de carbono. Ellos requieren de compuestos complejos sintetizados por otros organismos principalmente plantas autótrofas⁽⁵⁸⁾

Son considerados como parásitos facultativos. Así los hongos tienen la capacidad de atacar madera, ya sea como producto extraído o como parte de un hospedero, teniendo a esta fuente de materia orgánica, de la que obtendrá los elementos necesarios para realizar sus funciones. Dependiendo de la fuente de carbono que el hongo utiliza y por tanto el modo en que afecta la madera, se clasifican en tres tipos que serían:

a) **Mohos**: se alimentan de azúcares simples como la glucosa, producen mal aspecto a la superficie de la madera (Deuteromicetes).

b) **Hongos cromógenos**: se alimentan de azúcares simples como la glucosa y colorean la madera (Ascomicetes).

c) **Hongos xilófagos**: desintegran las paredes de las células leñosas, lo que explica la habilidad de éstos hongos para producir enzimas o sustancias degradadoras de los polímeros de la pared celular y la lignina (Basidiomicetes). Los hongos xilófagos están constituidos de filamentos llamados hifas, estas estructuras se desarrollan en abundancia, se ramifican y anastomosan,

formando una estructura filamentosa llamada micelio

Es sabido, que los hongos xilófagos o causantes de pudrición, viven en la madera y despolimerizan las macromoléculas estructurales de la pared celular de los elementos celulares de la madera es decir, son un tipo de organismos que participan activamente en la degradación biológica de la madera ⁽⁴⁶⁾

En la clasificación actual de los daños que causan estos hongos se consideran algunos cambios en la madera, por ejemplo, cambio de color, cambio de densidad, ablandamiento y consistencia inducida en la madera y la forma de penetrar a través de las paredes celulares. Esto se debe principalmente, a la actividad enzimática de los hongos xilófagos sobre la madera, o a la acción de las hifas al secretar sustancias que biodegradan los componentes principales de la madera (celulosa, lignina y hemicelulosa). Entonces, se considera que la alteración de las propiedades de plasticidad, elasticidad, tensión y resistencia mecánica de la madera es una pudrición ⁽⁴⁷⁾

Con base en estas características, se reconocen tres tipos básicos de pudrición blanca, morena y suave según Cartwright y Findlay, 1946, 1958; y Garrat 1962 y Cote, 1968 ⁽⁴⁶⁾. En el caso de la pudrición morena se degradan celulosa y hemicelulosa parcialmente lignina. El proceso de degradación difiere con el tipo de pudrición blanca y blanda ya que este no es completamente enzimático

En el caso de este trabajo, la pudrición que nos interesa es la pudrición morena, porque, se trabajó con *Postia placenta* que es un hongo xilófago causante de pudrición morena la cual, se caracteriza por la descomposición de la celulosa, hemicelulosas y pentosas asociadas. El aspecto que adquiere la madera es cúbico y fraccionado

Según J.W Koenigs 1972, la naturaleza de la degradación de la celulosa causada por el hongo de pudrición morena sugiere que un pequeño producto metabólico puede estar involucrado en las etapas iniciales de la degradación. Evidencia circunstancial sugiere que este pequeño producto metabólico puede ser el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este en presencia de Fe^{++} u otros metales de transición forma radicales altamente reactivos que inician la degradación oxidativa de carbohidratos ⁽⁴⁶⁾

Más adelante (1979), Koenigs descubrió evidencia de que el mecanismo de

degradación de la celulosa causada por el hongo de pudrición morena no es enzimático y que el agente activo podría ser el sistema H_2O_2/Fe^{++} . Encontró que el hongo de la pudrición morena produce suficiente H_2O_2 para degradar la celulosa con las cantidades presentes de Fe^{++} en la madera. Además, los efectos de H_2O_2/Fe^{++} en la celulosa imitan a los hongos de la pudrición morena⁽⁵¹⁾

La molécula de peróxido de hidrógeno es suficientemente pequeña para penetrar la microestructura de la pared celular secundaria, atacar la celulosa o tal vez hacer a la celulosa susceptible de ser degradada por celulasas en un segundo plano. Este tipo de mecanismo sería oxidativo. Recientemente Highley y otros, presentaron evidencia de que el hongo de la pudrición morena si oxida a la celulosa⁽⁵⁰⁾

Teniendo en cuenta la base anterior y puesto que en la actualidad no existe evidencia clara del mecanismo de degradación de las macromoléculas por el hongo, para el desarrollo de este experimento *in vitro*, se planteó lo siguiente: siendo que el hongo *Postia placenta*, en el curso de la degradación de las macromoléculas produce radicales libres (H_2O_2 , OH, etc.), al adicionarle compuestos antioxidantes, se esperaría una inhibición de su metabolismo. Por consiguiente, su crecimiento y producción de sustancias degradadoras, quedaría reducido o inhibido por completo

III.2. Antioxidantes

III.2.1. Historia de los Antioxidantes.

El uso empírico de los antioxidantes es una práctica muy antigua para la conservación de los alimentos como carnes y pescados que eran cortados en trozos e impregnados de compuestos fenólicos del ahumado

Posteriormente, diversos científicos observaron que al adicionar ciertos compuestos a los alimentos éstos eran capaces de retardar el deterioro, describieron las principales etapas que han marcado el descubrimiento de los antioxidantes y de su mecanismo de acción. Los nombres a retener son los de Deschamps farmacéutico de Avallon, que demostró el efecto antioxidante del benjuí y de las yemas del álamo, de Chevril que puso en evidencia la acción de la madera del roble, de los hermanos Lumiere y de Seyewets que descubrieron el efecto antioxidante de la hidroquinona y de los compuestos análogos y Moureu y Dufraise que resumieron su trabajo en una memoria titulada "Catalyse et autoxidation active antioxygene et protooxygene", del Dr Roy C. Newton y William D. Richardsson que fueron los investigadores claves en la búsqueda de una disminución o eliminación de la rancidez oxidativa en las carnes y grasas comestibles inspirados en los trabajos de Dufraise, en 1930 patentaron un procedimiento "Método de estabilización en carnes y grasas", incorporando aceite de palma, rica en pigmentos carotenoides, y por último, del Dr Donald P. Gettie que basándose en el uso de antioxidantes fenólicos para estabilizar carnes y grasas, encontró que la goma guaiac era un antioxidante efectivo y lipídicamente soluble. La goma guaiac se convirtió en el primer antioxidante aprobado para la elaboración de alimentos ⁽¹¹⁾.

III.2.2. Definición

Un **antioxidante** ha sido definido como aquella sustancia que presente en concentraciones bajas (comparadas con las de un sustrato oxidable), decrementa de forma significativa o bien previene la oxidación de aquél sustrato ⁽⁹⁾

La oxidación se produce cuando un átomo o grupo de átomos ceden electrones. De forma simultánea, se produce la correspondiente reacción de reducción que implica la captación de los electrones por otro átomo diferente o grupo de átomos. Las reacciones de oxidación pueden o no incluir la adición de átomos de oxígeno o la pérdida de átomos de hidrogeno de la sustancia que se está oxidando. Las reacciones de óxido-reducción son comunes en los sistemas biológicos (lipoperoxidación, β -oxidación, respiración, etc.) y también en los alimentos. Si bien algunas reacciones de oxidación son beneficiosas para los alimentos, otras son perjudiciales como ocurre con la degradación oxidativa de las vitaminas, pigmentos y lípidos⁽¹²⁾

III.2.3. Clasificación de los antioxidantes.

Antes de que se desarrollara una tecnología química específica para el control de los radicales libres responsables de la oxidación de los lípidos, el término "antioxidante" se aplicó a todas las sustancias que inhibían las reacciones de oxidación, independientemente de su mecanismo de acción

Actualmente, existen en general dos grupos de antioxidantes, clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción. En primer término, se presentan los antioxidantes preventivos o primarios, los cuales actúan al inicio del proceso de oxidación, reduciendo la frecuencia de inicio de una cadena de oxidación, y los antioxidantes secundarios que actúan bloqueando dicha cadena (chain-breaking) y captan radicales directamente, acortando por tanto, la longitud de la cadena de oxidación (Tabla 3):

Tabla 3 Clasificación de los antioxidantes de acuerdo a su mecanismo de acción.

Antioxidantes	
Primarios:	Secundarios:
Reductores de peróxidos orgánicos e inorgánicos hidroxiperóxidos (catalasa, glutión peroxidasa, etc.)	Vitamina E, vitamina C, superóxido dismutasas, etc.)

De acuerdo a su naturaleza química, los antioxidantes han sido clasificados también como: a) **no enzimáticos** (secuestradores de radicales libres y especies reactivas vitamina C y E, β-carotenos, ácido úrico, bilirrubina, etc) y b) **enzimáticos** (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa)

Para efectos prácticos de este estudio y hacia donde esta dirigido nuestro interés, se han clasificado los antioxidantes por el tipo de reacción que llevan a cabo al adicionarse al alimento (figura 3):

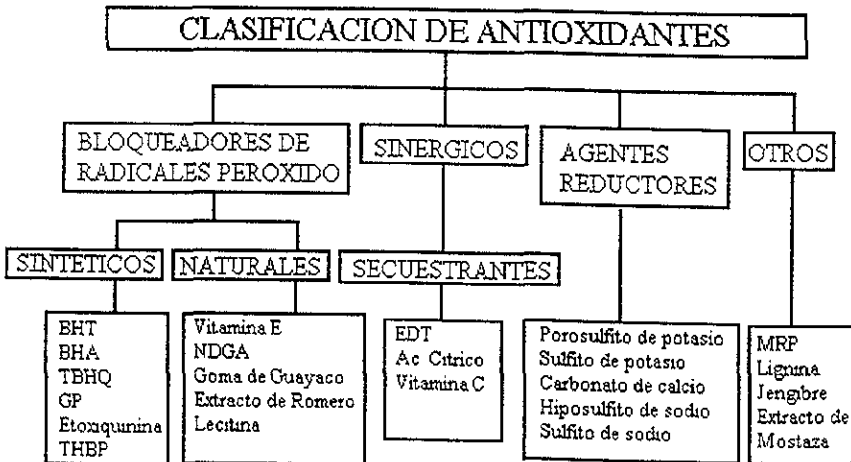


Figura 3. Clasificación de los antioxidantes según su reacción al ser adicionados al alimento

Los bloqueadores de radicales peróxido son antioxidantes que funcionan como aceptores de radicales libres que dan lugar a radicales libres estables bloqueando así la oxidación en la fase de iniciación ⁽¹⁹⁾

Entre las moléculas de origen natural o sintética, dotada de propiedades de este tipo, existe una lista que, sin ser exhaustiva, no deja de ser bastante completa, la elección por la industria alimentaria se ha dirigido a un número bastante restringido de compuestos ⁽¹²⁾

Los agentes sinérgicos son aquellos antioxidantes que al combinarse con otros antioxidantes aumenta la efectividad que la misma cantidad antioxidante simple. Los secuestrantes se encuentran en este tipo de antioxidantes y se define como "los compuestos de coordinación en el que un átomo, generalmente un metal, está unido mediante enlaces de coordinación a dos o más átomos de una o mas moléculas o iones, llamados quelantes o secuestrantes", entre los que se encuentran el ácido cítrico, el ácido ascórbico y el EDTA ⁽⁵⁴⁾.

Los agentes reductores son antioxidantes que se definen como sustancias que pierden uno o más electrones y en este proceso se oxida. En este grupo encontramos al carbonato de sodio, sulfito de potasio, hiposulfito de sodio entre otros

III.2.4. Antioxidantes Sintéticos.

La mayoría de los antioxidantes sintéticos son compuestos fenólicos y son los más empleados en alimentos, corresponden a la fórmula general que se muestra en la Figura 4 ⁽¹²⁾.

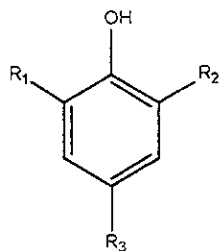


Fig. 4. Fórmula general de los compuestos fenólicos

Los derivados orto y para son los más eficaces porque dan radicales libres relativamente estables, debido a la localización del electrón entre dos formas de resonancia, como se muestra en la Figura 5

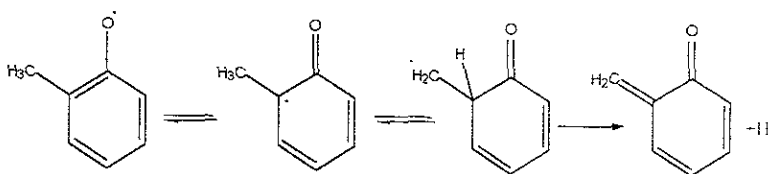


Fig. 5. Derivados orto y para

El radical libre antioxidante es tanto más estable cuanto más grande sea el grupo sustituyente: sin embargo, la acción antioxidante disminuye⁽³⁾

Sherwin propuso un esquema muy simplificado del mecanismo de acción de tales moléculas (Fig 6)⁽³⁰⁾

Según este esquema las sustancias fenólicas funcionan como aceptores de radicales libres estables bloqueando así la oxidación en la fase de iniciación. Tal mecanismo demuestra que la acción de un antioxidante está por tanto limitada por el tiempo ya que carece de poder cuando la oxidación de las grasas está muy avanzada por dar un ejemplo.

En cualquier caso, siempre hay que tener presente que un antioxidante no podrá proteger eficazmente productos en los que la autooxidación ya esté muy avanzada, puesto que el inhibe la propagación de la reacción en cadena, es decir, que interviene en la fase inicial de este fenómeno⁽¹²⁾.

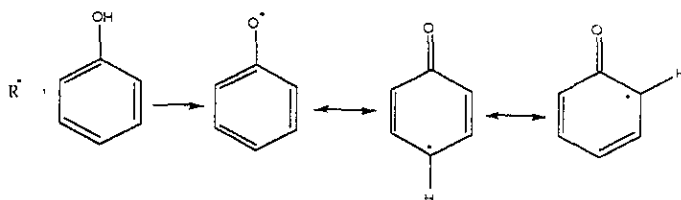


Fig. 6. Mecanismo de acción de un Antioxidante fenólico frente a un radical de ácido graso (según Sherwin 1976)

Como ejemplo de antioxidantes sintético tenemos el **BHT** (Butilhidroxitolueno), es uno de los antioxidantes fenólicos más utilizado en la industria de los alimentos ⁽¹⁾ Su estructura química se muestra en la Figura 7.

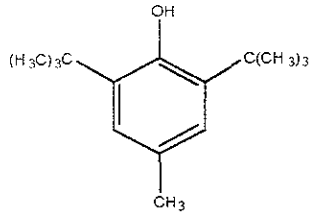


Fig. 7. Estructura Química del BHT.

Es uno de los antioxidantes que es resistente al calor y se almacena en contenedores bien cerrados y lugares frescos. El BHT es soluble en alcohol y aceites; insoluble en agua y propilenglicol, presenta una alta acción sinérgica con el BHA ^(5,8,23) Presenta el inconveniente de tener aroma desagradable y evaporarse rápidamente; esto hace su empleo más difícil en alimentos deshidratados

El uso de antioxidantes esta regulada por la legislación de los distintos países, por ejemplo la FDA permite su uso en concentraciones no mayores al 0.02% en peso de BHT en lípidos ⁽³¹⁾

El BHT es un cancerígeno débil , pero refuerza su actividad de otros cancerígenos tanto en el hígado como en el colon, vejiga y pulmón de mamíferos La ingestión diaria admitida (IDA) ha recomendado una ingestión de BHT de 0.5 a 0.125 mg de BHT/kg

Otro aspecto negativo en la utilización de BHT: "Inhibe la biosíntesis de prostaglandinas" A una concentración de 100.6 μM de BHT inhibió un 50% (con respecto a otros antioxidantes utilizados) la biosíntesis de prostaglandinas de la vesícula seminal de bovinos ⁽¹³⁾

El **BHA** (butilhidroxianisol) fue el primer antioxidante usado en productos alimentarios en 1940 El BHA es un sólido blanco encerado, con un ligero olor característico, soluble en alcohol, en propilenglicol e insoluble en agua Es un compuesto

volátil a temperaturas elevadas y en presencia de vapor de agua. La concentración permitida es de 0.02% (200 ppm) en peso del BHA. La Figura 8 muestra la estructura química del BHA ⁽¹²⁾

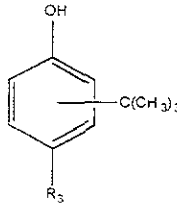


Fig. 8. Estructura Química del BHA.

La toxicidad más relevante del **BHA** es la carcinogénesis del preestómago de roedores, demostrada con concentraciones del 2% en la dieta. En el ser humano no hay evidencias de afectaciones.

También inhibe la biosíntesis de prostaglandinas hasta en un 50% utilizando 6.7 μ M de BHA en la vesícula de bovinos.

El **TBHQ** es un antioxidante con olor característico, de cristales blancos soluble en alcohol, éter e insoluble en agua ⁽⁸⁾. La Figura 9 muestra su estructura química.

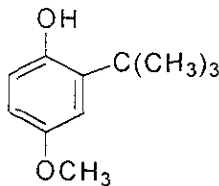


Fig. 9. Estructura química del TBHQ

Debido a los efectos toxicológicos que han presentado los antioxidantes sintéticos (mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos, así como promotores de diversas patologías) ⁽⁸⁷⁾,

actualmente, se ha despertado un gran interés en la industria alimenticia y en la investigación, sobre todo en el área médica en búsqueda de nuevas alternativas. Se han encontrado diversos compuestos potencialmente viables que han demostrado ser eficaces como atrapadores de radicales libres al ser adicionados a los alimentos y no causan efectos secundarios al organismo vivo, como lo son los antioxidantes naturales.

III.2.5. Antioxidantes naturales.

Entre los antioxidantes naturales, llamados así por ser extraídos de diferentes orígenes vegetales se encuentra el **extracto de romero** que manifiesta un gran poder antioxidante debido a la presencia de compuestos fenólicos como los ácidos clorogénico y rosmarínico ⁽⁵⁾. Las investigaciones han demostrado que a una concentración de 0.02% de **Extracto de romero** es efectiva su actividad como antioxidante ⁽³⁰⁾.

La **lecitina** le debe su poder antioxidante a la cefalina que es un compuesto fenólico ^(45,47). La lecitina como otro antioxidante natural, es un fosfátido formado por un diglicérido que puede contener los ácidos estearico, palmítico, oleico y la base nitrogenada colina unida al glicerol por medio de un grupo fosfato ⁽²⁸⁾.

Numerosos aceites vegetales como la soya, maíz, algodón, contienen tocoferoles por lo que se encuentra en parte autoprotegidas contra la oxidación ⁽⁵⁾.

Por el hecho de contener compuestos fenólicos, siguen el mismo mecanismo de acción de los antioxidantes sintéticos que ha sido descrita anteriormente.

Como algunos ejemplos de antioxidantes naturales que son usados ampliamente en la industria tenemos:

A la **vitamina E** (Tocoferol), es un antioxidante que a nivel comercial es dl- α -tocoferol; es un líquido amarillo pálido, algo viscoso, se oxida y se oscurece en contacto con el aire y por acción de la luz, la estructura química se muestra en la figura 10 ⁽⁶¹⁾.

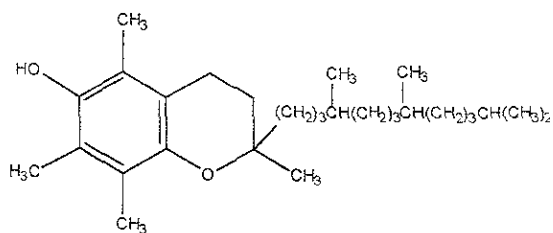


Fig. 10. Estructura Química de la vitamina E.

La vitamina E o tocoferoles α , β y δ poseen actividad vitamínica; esta actividad decrece en el sentido de α a δ mientras que la actividad antioxidante aumenta en el mismo sentido.

Los tocoferoles así como los antioxidantes fenólicos previenen la oxidación de los lípidos al donar un átomo de hidrógeno a los radicales hidroperóxidos ⁽³⁰⁾.

La vitamina E disminuye el riesgo de cataratas y ha demostrado retardar la severidad de la diskinesia (movimientos involuntarios)

Se utiliza como antioxidante en grasas animales a un 0.3%, 30% en grasas vegetales 0.05% en tocinos, 0.3% en pollo. Se utiliza como nutrimento y suplemento alimenticio ⁽⁸⁾

Los **carotenos** son intermediarios a partir de los cuales, por sucesivas deshidrogenaciones, se biosintetiza el licopeno. Los carotenoides son pigmentos amarillos, naranjas o rojos, que son naturalmente sintetizados por las plantas superiores, algas, hongos y bacterias. La mayoría de los carotenoides no son moléculas polares. Recientemente, los carotenoides han tomado un considerable interés ya que se tienen reportes que abren el camino para la investigación anticancerígena ⁽⁴⁵⁾

Como podemos percatarnos, los antioxidantes naturales deben su efecto a las sustancias fenólicas que contienen, en el presente estudio, nuestro interés justamente está dirigido hacia algunos de estos compuestos y es sobre lo que abundaré en el siguiente apartado.

III.3. Compuestos fenólicos

III.3.1. Generalidades.

El interés científico y comercial en los compuestos fenólicos de los alimentos ha sido extremadamente activo en los años recientes. Aparte del estudio puramente académico de su origen natural, distribución, y atributos cualitativos en los alimentos, los compuestos fenólicos se están volviendo cada vez más importantes en la ciencia aplicada. Estos compuestos, ayudan a la preservación (olor, sabor, color) y prevención (deterioro por oxidación) de los alimentos. En particular, muchos compuestos fenólicos están atrayendo la atención de científicos de las áreas médica y alimenticia en razón de sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas, anticancerígenas y su capacidad de regular algunas funciones celulares enzimáticas claves⁽⁸⁾

Los compuestos fenólicos incluyendo los fenoles simples y ácidos fenólicos, derivados del ácido hidroxicinámico y los flavonoides son sustancias bioactivas que se encuentran ampliamente en plantas comestibles.

III.3.2. Definición.

El término fenólico o polifenol puede ser definido químicamente como una sustancia que posee un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo incluyendo derivados funcionales (ésteres, éteres metílicos, glicósidos, etc.) la mayor parte de los compuestos fenólicos tienen dos o más grupos hidroxilo y son sustancias bioactivas que existen en abundancia en plantas comestibles que son regularmente consumidas por un sustancial número de personas (Figura 11)⁽⁵³⁾

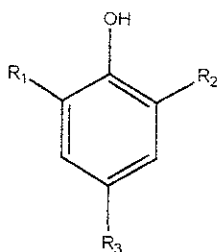


Fig. 4. Formula general de los compuestos fenolicos.

Los compuestos fenolicos que existen comúnmente en los alimentos pueden ser clasificados en tres grupos que son fenoles simples y ácidos fenólicos, derivados del ácido hidroxicinámico y flavonoides

Los fenoles simples incluyen los monofenoles tales como el p-cresol y difenoles como la hidroquinona

Los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados son casi exclusivamente derivados de el ácido p-cumárico, ácido cafeico y el ácido ferúlico

Los flavonoides son un grupo de compuestos fenólicos importante en los alimentos los cuales, consisten principalmente de catequinas, proantocianinas, antocianidinas y flavones, flavonoles y sus glicósidos⁽¹²⁾

III.3.3. Compuestos fenólicos como antioxidantes naturales.

Los antioxidantes son añadidos a las grasas y aceites o alimentos que contienen grasas para prevenir la formación de malos sabores y otros compuestos desagradables que son el resultado de la oxidación de los lípidos. El BHA y el BHT, los antioxidantes sintéticos más ampliamente usados, tienen una eficacia no superada en varios sistemas alimenticios además de su alta estabilidad, bajo costo y otras ventajas prácticas. Sin embargo, su utilización en los alimentos ha ido disminuyendo debido a que se sospecha que tienen una acción promotora de carcinogénesis así como al rechazo general de los aditivos alimenticios sintéticos por tener

efectos toxicológicos⁽⁵³⁾

Los antioxidantes naturales más importantes que se explotan comercialmente son los tocoferoles. Los tocoferoles tienen una potente habilidad de inhibir in vivo la peroxidación de los lípidos atrapando los radicales peroxilo. La búsqueda y desarrollo de otros antioxidantes de origen natural es altamente deseable. Tales antioxidantes nuevos también son bienvenidos para el combate en contra de la carcinogénesis y del proceso de envejecimiento⁽⁷¹⁾

La mayor parte de los antioxidantes naturales son de naturaleza fenólica por lo cual se decidió estudiar la actividad antioxidante de compuestos fenólicos de origen vegetal como xantonas y cumarinas. Con fines de comparación también se estudiaron compuestos no fenólicos como los iridoides.

III.3.4. Iridoides

Los iridoides pertenecen al grupo de los monoterpenos ciclopentanoides, que se caracteriza por presentar un anillo de ciclopentano y un pirano. Se pueden dividir en iridoides glucosídicos, que presentan un doble enlace entre las posiciones 3 y 4, mientras en la posición 1, se encuentra una β -Dglucosa o algún otro carbohidrato (Fig 12), y en iridoides no glucosídicos, también llamados aglucones (Fig.13), los cuales no presentan carbohidratos en la posición número 1⁽⁵⁴⁾.

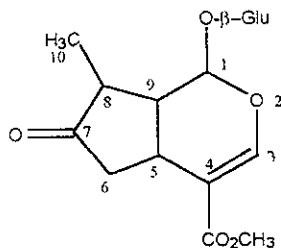


Fig. 12. Loganina

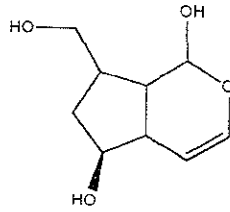


Fig. 13. Aglucón de la Aucubina.

El término iridoides fue sugerido por Briggs, Cain, Le Quesne y Soler, debido a que el esqueleto monobásico de estos monoterpenos heterocíclicos corresponden al iridoidal (Fig 14), el cual presenta un grupo enol-hemiacetal característico de estos compuestos (45), y que por primera vez fue aislado de una hormiga australiana denominada *Iridomyrmez detectus*; otros nombres con los cuales se pueden encontrar a los iridoides son pseudo-Indikans, debido a la coloración que presenta al hidrolizarse en el medio ácido, y, de manera menos común, han recibido el nombre de aglucones de la aucubina II ⁽³⁷⁾

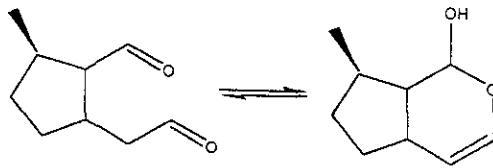


Fig 14 Iridoidal.

En el campo de la farmacología, se ha encontrado que algunos iridoides tienen actividad biológica como antibióticos, antitumorales, antimicrobianos, analgésicos y anti-inflamatorios, laxantes, diuréticos, espasmódicos, carminativos y antioxidantes, estos últimos como una futura alternativa para evitar enfermedades como cáncer y arteriosclerosis causadas por la presencia de radicales libres ^(31, 57)

Los fitocompuestos evaluados y reportados aquí como posibles antioxidantes naturales llamados Iridoides son: 1) Boschnalósido extraído de la planta *Pestemon*

roseus (Familia Scrophulariaceae), 2) Catalpol; 3) Aucubina, 4) Lemorouxia 5) y el fenilpropanoide Acteósido, se muestran en la figura 15.

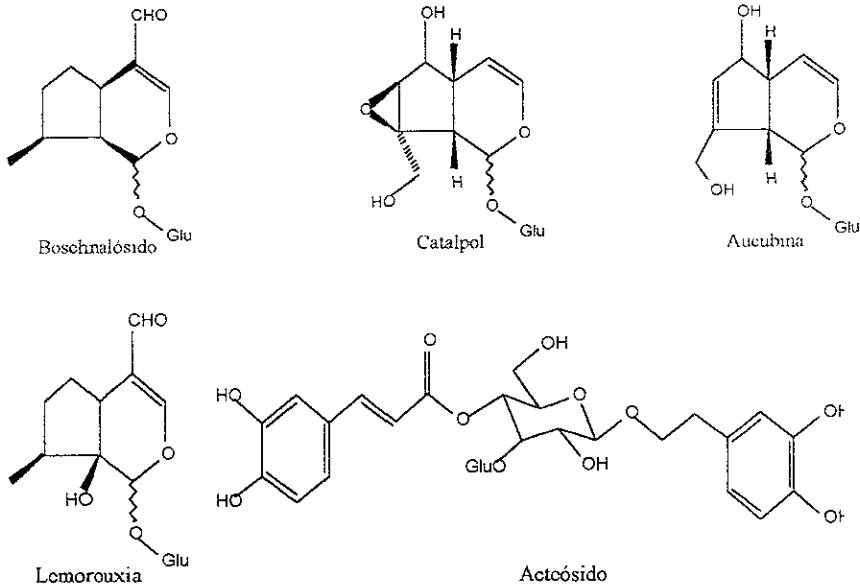


Fig. 15. Iridoides como antioxidantes en el presente trabajo.

III.3.5. Xantonas.

Las xantonas son aisladas de plantas superiores, presentan un esqueleto básico derivado de la benzofenona. Tiene su origen en la fenilalanina merced a su producto de degradación, el ácido m hidroxibenzoico (C-6-C1) y su posterior condensación con tres unidades de malonato. Otra ruta podría ser: la combinación de una unidad C6-C3, por ejemplo un ácido cinámico con dos unidades de malonato para obtener benzofenona. El acoplamiento oxidativo podría conducir a la formación de la xantona (figura 16) ⁽⁷³⁾

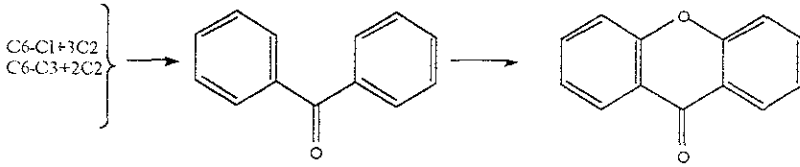


Fig. 16. Origen biosintético de las xanonas.

Las xanonas pueden ser simples o modificadas. En este último caso por la presencia de un sustituyente glicosídico o grupo prenilado (2,2 dimetil) (figura 17). Además del grado de oxigenación que presenta, pueden ser clasificadas como mono, di, tri o tetraoxigenadas⁽⁶⁸⁾

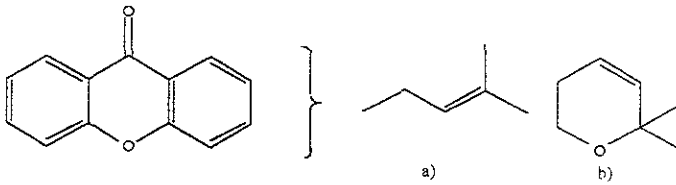
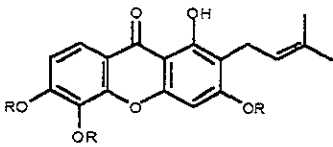
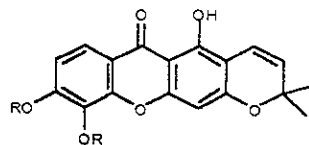


Fig. 17. Esqueleto de la xanona y sus substituyentes, a) substituyente isoprenilo (2,2-dimetil), b) substituyente cromeno producto de la ciclización del isoprenilo con un OH fenólico de la xanona.

Los fitocompuestos fenólicos estudiados agrupados como xanonas son los siguientes I. Jacareubeina + 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xanona y II. (1,3,5,6 tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xanona (Figura 18). Estos compuestos, fueron aislados de la corteza del árbol caducifolio *Calophyllum brasiliensis* (Familia Guttiferae)⁽²²⁾



I. 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xanona



II. Jacarobeina + 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xanona

Fig. 18. Xanonas estudiadas.

I.3.6. Cumarinas.

La hidroxilación de los ácidos cinámicos **orto** como ocurre en la biosíntesis del ácido salicílico es un paso crucial en la formación de un grupo de derivados lactónicos del ácido cianímico **las cumarinas**. Mientras la hidroxilación directa del anillo aromático en los ácidos cianímicos es común, la hidroxilación involucra generalmente, de manera inicial, la posición **4 par** hacia la cadena lateral y las hidroxilaciones subsecuentes continúan entonces **orto** hacia este sustituyente. En contraste, para las cumarinas la hidroxilación del ácido cianímico o ácido 4 cumárico puede ocurrir de forma **orto** hacia la cadena lateral en el último caso. El ácido 2,4-dihidroxicinnámico producido parece de manera confusa tener el patrón de hidroxilación **meta**, característico de los fenoles derivados por la vía del acetato⁽²⁹⁾

Las cumarinas están ampliamente distribuidas en plantas, en las familias tales como la Umbelíferae y Rutaceae tanto en forma libre como glicósidos, por ser un metabolito secundario en algunas especies contribuye al olor⁽⁶⁸⁾

Los compuestos evaluados como antioxidantes denominados cumarinas (CFCHC, CFSHC, CHH₂₇) se muestran en la figura 19. Estas sustancias se aislaron del fruto del árbol *Cataphyllum brasiliensis* (Familia Guttíferae)⁽³²⁾.

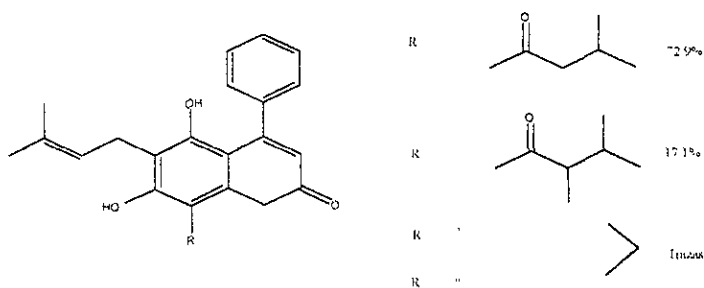


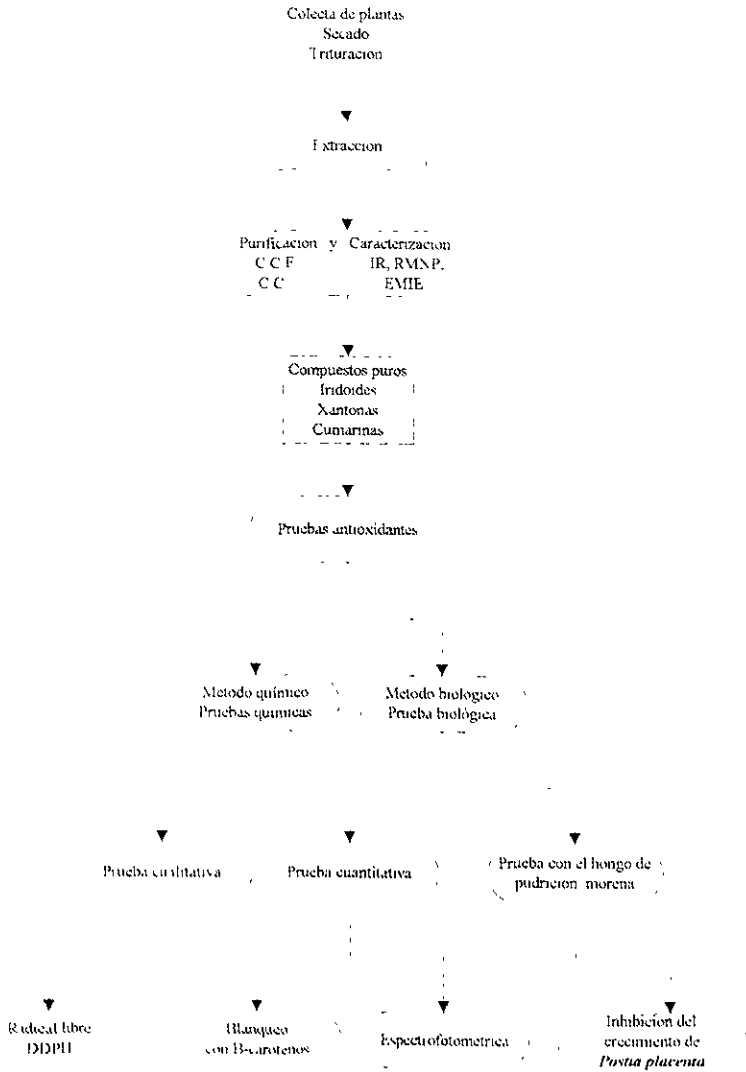
Fig.18. Mezcla de cumarinas evaluadas en el presente estudio como agente antioxidante.

Los compuestos fenólicos se encuentran en la inmensa mayoría de las plantas comestibles y por lo tanto, una cantidad significativa es consumida en nuestra dieta diaria. Ellos están estrechamente asociados con las propiedades nutricionales de las plantas comestibles frescas y procesadas. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos ha sido conocida por décadas y la investigación y desarrollo en el uso de sustancias naturales o ingredientes de alimentos que contienen antioxidantes fenólicos continuará siendo de gran interés para la industria alimenticia.

La actividad biológica de los compuestos fenólicos se ha llegado a conocer en años recientes. Las más importantes propiedades biológicas de los compuestos fenólicos son probablemente sus múltiples efectos inhibitorios observados sobre la mutagénesis y la carcinogénesis⁽³¹⁻³⁰⁾

METODOLOGÍA

Diagrama de Flujo de la Metodología



MATERIAL Y MÉTODOS

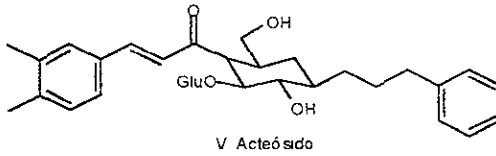
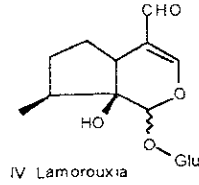
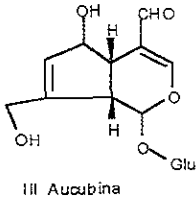
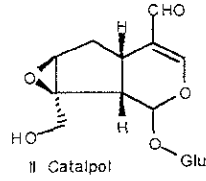
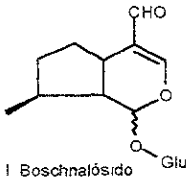
IV. Material y Métodos

En esta apartado, se examinarán las posibles propiedades antioxidantes de diversas sustancias naturales de origen vegetal de tipo fenólico (xantonas y cumarinas) así como no fenólicas (iridoideas) Y, determinar si las sustancias naturales con actividad antioxidante pueden bloquear in vitro un sistema biológico (metabolismo de hongos xilófagos de pudrición morena) que emplea radicales libres (secreción de H_2O_2).

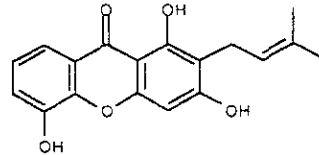
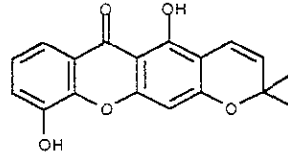
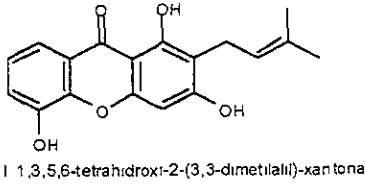
El proceso de aislamiento e identificación de los compuestos aquí estudiados se describe en detalle en otras publicaciones.

Compuesto	Fuente	Parte	Lugar	Referencia
Iridoides				
I. Boshnalósido	Pestemon roseus	hojas	D F	Gómez, 1997
II Catalpol	Pestemon apoteticus	partes aéreas	D F	Jiménez, 2001
III Aucubina	Pestemon	partes aéreas	D.F	Jiménez, 2001
IV Lemorouxia	Lamourouxia Dasyantha	partes aéreas	Hidalgo Actoçpan	López, 1995
V Acteósido	Pestemon roseus	partes aéreas	D.F	Jiménez, 2001
Xantonas.				
I	Calophyllum brasiliensis	madera	Chiapas	Reyes, etal. 1997.
II	Calophyllum brasiliensis	madera	Chiapas	Reyes, etal. 1997
Cumarinas.				
A/BA+A/BB=CHH ₂₇	Calophyllum brasiliensis	hojas	Veracruz, Sta. Martha	Estrada, 2000
A/BA+A/BB=CFSHC	Calophyllum brasiliensis	semilla	Veracruz, Sta. Martha	González, 1999
A/BA+A/BB=CFCHC	Calophyllum brasiliensis	cáscara de semilla	Veracruz, Sta. Martha	González, 1999

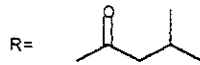
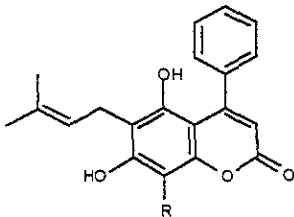
IRIDOIDES



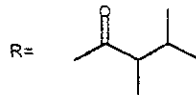
XANTONAS



CUMARINAS



72.9% Mammea A/ BA



17% Mammea A/BB

Fig. Compuestos estudiados.

IV.1. Pruebas antioxidantes químicas y biológicas

Una vez obtenido los fitocompuestos en cantidad suficiente, se desarrollaron tres etapas. La primera etapa, consistió en la evaluación antioxidante de los compuestos a través, de las pruebas cualitativas siguientes: Método con el radical libre DDPH y Método del blanqueo con β -carotenos.

En la segunda etapa, se evaluaron los fitocompuestos que dieron positivo en etapa 1, mediante la prueba cuantitativa espectrofotométrica.

Finalmente, la tercera etapa, se aplicó la prueba biológica con el hongo xilófago de pudrición morena *Postia placenta* ⁽²⁴⁾.

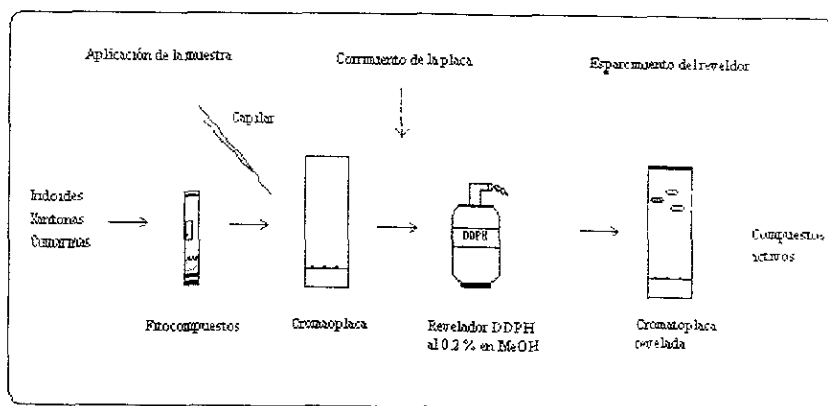
IV.2. Pruebas químicas cualitativas (1ª etapa)

IV.3. Método con el radical libre DDPH

La prueba se hizo en c.c.f., se tomaron diferentes placas (3cm x 6cm de longitud) para cada grupo de compuestos fenólicos, usando como testigos a los antioxidantes sintéticos: **A.** BHA (Butilhidroxianisol), **B.** BHT (Butilhidroxitolueno) y **C.** TBHQ (Butilhidroxiquinona terciaria). Se utilizaron los compuestos naturales de referencia: **D.** Cacalol y **E.** Trinervinol. La polaridad empleada para los Iridoides fue la siguiente: **I.** Boshnalósido: AcEt.-MeOH 8:2, **II.** Catalpol: AcEt.-MeOH 1:1, **III.** Aucubina: AcEt.-MeOH 1:1, **IV.** Lemorouxia: AcEt.-MeOH 8:2, **V.** Acteósido: AcEt.-MeOH 1:1. Para las Xantonas la polaridad fue: **I.** Xantona: AcEt.-MeOH 9:1, **II.** Mezcla Jacareubeina: Hex.-AcEt. 1:1. Por último, la polaridad para las Cumarinas: **I.** CFSHSL, **II.** CFSHC, **III.** CFCHC y **IV.** CHH₂₇ fue: Hex.-AcEt. 9:1.

Después del corrimiento de las cromatoplasas, se aspersan con DDPH (radical 2,2-diphenylpicrylhydrazyl) al 0.2% solución en Me-OH⁽⁷⁸⁾. Esta solución es usada como revelador y es de color púrpura. Al cabo de 10 minutos aproximadamente los compuestos activos aparecen en color amarillo. Ver figura 20.

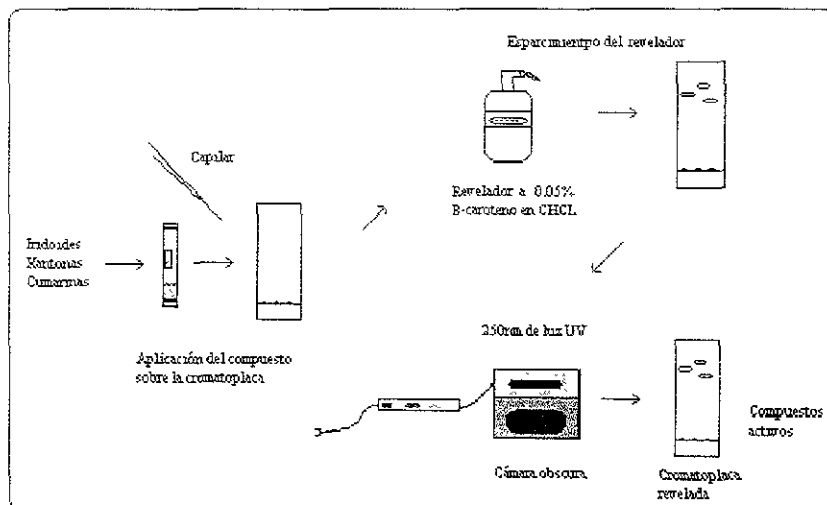
Figura 20. Esquema que muestra el procedimiento seguido para la prueba química cualitativa con el radical libre DDPH.



IV.4. Método del blanqueo con β -caroteno

Esta prueba básicamente sigue el mismo principio que la prueba anterior, se hizo en c.c.f. Los compuestos probados fueron los mismos, se eluyeron con las mismas polaridades. Después del corrimiento, las placas fueron aspersadas con 0.05% de solución de β -caroteno en CHCl_3 ^(78.) Más tarde, para el revelado final de estas, se colocaron bajo 250 nm de luz UV hasta la decoloración del fondo ⁽⁴³⁾ El compuesto activo aparece en color naranja (Ver figura 21):

Figura 21. Esquema que muestra el procedimiento seguido para la prueba química cualitativa del blanqueo con β -carotenos.



El revelador usado a base de β -caroteno, se obtuvo de la siguiente forma. se compró un $\frac{1}{4}$ Kg de zanahoria, con la ayuda de un extractor se obtuvo el gajazo Inmediatamente, éste, se virtió en un vaso de precipitado con metanol (100 ml), se calentó por 15 minutos a una temperatura constante de 50° C Consecutivamente, se hicieron tres extracciones con diclorometano y se filtró. Finalmente, se guardó en un frasco ámbar previamente etiquetado.

IV.5. Prueba química cuantitativa (2^a etapa)

IV.5.1. Espectrofotométrica

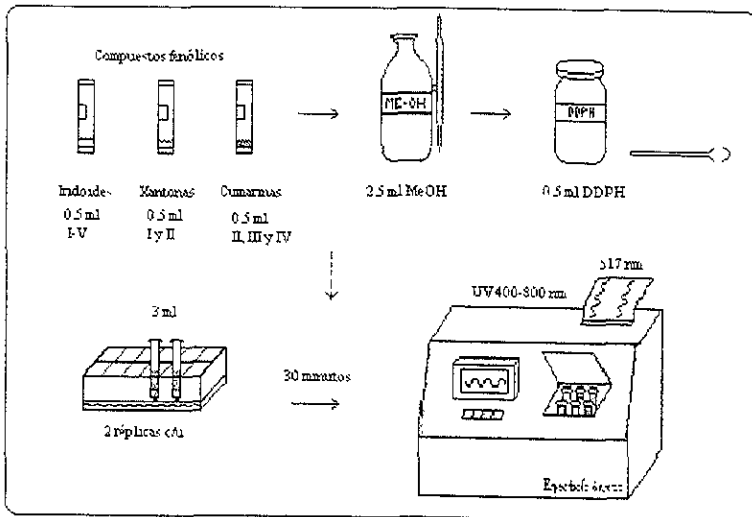
La prueba se adaptó según el método descrito por Cavin A y etai en 1998⁽⁵⁾. Se calculó por medio de una proporción matemática la concentración para cada uno de los

fitocompuestos estudiados, testigos, controles y compuestos de referencia (basándose en el peso molecular)

Enseguida, se prepararon 10 ml de DDPH al 0.022% solución en MeOH. De esta solución se tomó una alícuota de 0.05 ml, se le adicionaron otros 0.05 ml del fitocompuesto solución en MeOH y 2.5 ml de MeOH, lo que nos dió un volúmen final de 3ml por alícuota aproximadamente. Para cada una de ellas, se llevaron a cabo 2 repeticiones. Las muestras fueron analizadas después de 30 minutos bajo el espectrofotómetro (Shimadzu UV 160U) en el rango del espectro de luz visible UV de 400 a 800nm. Se registró la absorbancia (abs) a una sola longitud de onda (λ) de 517 nm, bajo este mismo procedimiento, fueron analizados todos nuestros compuestos (Ver figura 22)

Como paso final, se tomaron los datos de absorbancia para ser analizados calculando el porcentaje de actividad antioxidante

Figura 22. Esquema que muestra el procedimiento seguido para la prueba química cuantitativa.



IV.6. Prueba biológica (3ª etapa)

La cepa 698 del hongo *Postia placenta* fue proporcionada por el Forest Products Laboratory, Madison U.S.A

Medio de cultivo maltar agar 1.5% BIOXON (Becton Dickinson de México, S A de C V)

En la prueba biológica, se emplearon diversos aparatos de microbiología una autoclave (SUREX) para la esterilización del medio de cultivo y cajas Petri, una campana de flujo laminar (VECO) en la siembra e inoculación de los hongos y, una incubadora de cultivo (SEV E-41)

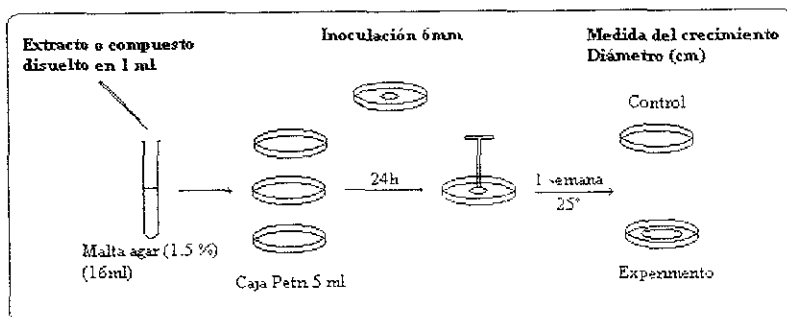
IV.6.1. Procedimiento experimental

El efecto antioxidante de los compuestos (Iridoïdes, Xantonas y Cumarinas), se evaluó *in vitro* contra el crecimiento micelial del hongo de pudrición morena *Postia placenta*. Los compuestos fueron disueltos en 1 ml de acetona. La solución se vertió en un tubo de ensaye que contenía 16 ml de medio de cultivo para hongos, BIOXON (malta-agar 1.5%) previamente esterilizado (15 atmósferas de presión durante 15 minutos). La mezcla se homogenizó completamente con un vórtex. Se tomaron 3 alícuotas de 5 ml las cuales se vertieron en 3 cajas Petri (60 X 15 mm).

La cantidad necesaria de los fitocompuestos se calculó para obtener concentraciones finales definidas. En el caso de todos los extractos esta fue de acuerdo con el peso molecular de cada molécula, las concentraciones fueron en el orden de mg/ml^(24, 12).

Las cajas Petri con el medio se dejaron dentro de la campana durante 24 horas para eliminar completamente el disolvente, al término de este periodo en cada placa de agar se colocó un inóculo (6 mm) con una muestra de micelio, la cual se tomó con un sacabocado de un cultivo del hongo *Postia placenta* de dos semanas de crecimiento. Cada experimento consistió de tres réplicas, éstas se incubaron en una estufa de cultivo a 25°C durante una semana. Los controles, fueron tratados únicamente con disolvente (acetona). Para tener una referencia de comparación se utilizó pentaclorofenol (Sigma). Ver figura 23

Figura 23. Esquema que representa el método biológico que se elaboró para comprobar el efecto antioxidante de los compuestos.



El crecimiento micelial (diámetro de la colonia) de las placas se midió diariamente con una regla (escala. 1 10 cm) La prueba se dio por concluida cuando el micelio de las placas control alcanzó los bordes de la caja Petri

La inhibición del crecimiento causado por los compuestos sobre el crecimiento micelial fue calculado utilizando la expresión matemática ^(24 56)

$$\%I = \frac{C_c - C_t}{C_c} * 100 \quad \dots$$

$$\%Inhibición = \frac{\text{Crecimiento del control} - \text{Crecimiento del tratamiento}}{\text{Crecimiento del control}} * 100$$

Para corroborar la capacidad antioxidante de nuestros fitocompuestos, fue necesario plantear una correlación entre los datos obtenidos de la inhibición micelial con los datos obtenidos del estudio cuantitativo espectrofotométrico

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. Resultados y discusión

En el presente apartado, se muestran los resultados que se obtuvieron durante la evaluación química y biológica de la capacidad antioxidante de los fitocompuestos fenólicos Iridoides, Xantonas y Cumarinas, en comparación con los antioxidantes sintéticos usados como testigos, y los compuestos naturales de referencia, así como, el análisis de estos y su respectiva interpretación

En primera lugar, los compuestos puros que se identificaron fueron los **Iridoides** **I.** Boschnalósido, **II.** Catalpol, **III.** Aucubina, **IV.** Lemorouxia y **V.** Acteosido, las **Xantonas:** **I.** Xantona V (1,3,5,6 tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil-xantona) y **II.** Mezcla Jacareubeina y 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3 dimetil alil) xantona, y las **Cumarinas:** **I.** CFHSL, **II.**CFSHC **III.**CFCHC y **IV.** CHH₂₇ como se muestran en la figura 24

Los *r_f* (factor de retención o factor de desplazamiento de los compuestos en cromatografía en placa) fueron los siguientes para los iridoides **I.** Boschnalósido 84, **II.** Catalpo 76, **III.** Aucubina 90, **IV.** Lemorouxia 57 y **V.** Acteosido 57 Para las Xantonas **I.**Xantona V (1,3,5,6 tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil-xantona) 57 y **II.** Mezcla Jacareubeina y 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3 dimetil alil) xantona 42 Para las cumarinas **II.**CFSHC 5, **III.** CFCHC 5, **IV.** CHH₂₇ 5.

efectividad antioxidante(+), no así, para el compuesto de referencia E. (Tabla 6):

Tabla 6 Prueba cualitativa para Cumarinas: Metodo del blanqueo.
se muestran los fitocompuestos que dieron positivo (-) como
agentes antioxidantes.

CUMARINA			
S			
Compuestos	blanqueo	Testigos	Referencias
I	+	A +	D +
II	+	B +	E -
III	+	C +	

La capacidad antioxidante se evaluó por el cambio de color, como se cita en la literatura ⁽⁵⁶⁾. Se observó, que los fitocompuestos que presentaron dicha propiedad al ser esparcidos con el revelador preparado con β -carotenos, durante 2h de exposición a los rayos UV, cambiaron de su color original a un color naranja, al igual que lo hicieron los testigos (ver figura 27), no así para el compuesto de referencia E. Trinervinol el cual al finalizar las pruebas en los tres grupos de compuestos, no mostró cambio alguno en su coloración. Los compuestos que son antioxidantes tienen la capacidad de no oxidarse atrapan los radicales libres. El color naranja lo adquieren al ser esparcidos con β -carotenos porque estos al ser expuestos a los rayos UV se oxidan.

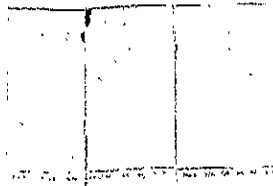


Figura 27. Prueba del blanqueo para los compuestos estudiados

Cabe mencionar, que se observó una diferencia en la velocidad de cambio de la coloración en los Iridoides probados y en los testigos. En el caso del compuesto I, muestra una coloración muy rápida. Se presume, que esto es debido a la capacidad intrínseca a cada compuesto y a su velocidad de reacción. Incluso, suponemos también que se debe a la solubilidad y concentración de la muestra que se toma al efectuar la cromatoplaça.

Los resultados demuestran la capacidad antioxidante que presentan los compuestos

iridoidales estudiados.

Para tener otro punto de referencia de los resultados hasta aquí observados, fue necesario hacer una segunda evaluación cualitativa usando el mismo principio de cambio en la coloración para lo cual, se empleó el radical libre DDPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl). En esta prueba, también se trabajó con diversas cromatoplasacas para los tres grupos de compuestos estudiados, empleando nuevamente los testigos y compuestos de referencia ya conocidos en la prueba anterior.

La segunda prueba cualitativa antioxidante con el radical libre DDPH, se evaluó por el cambio de color púrpura a amarillo que mostraron los compuestos al ser esparcidos con el revelador (Ver figura 28). Los resultados observados para los Iridoides I-V, nos muestran su capacidad como neutralizadores de RL (+), al ser comparados con los antioxidantes sintéticos A, B, y C, y, con los compuestos de referencia D y E. En esta prueba, el compuesto E, sigue mostrando un efecto negativo (-). (Tabla 7):



Figura 28. Prueba con el radical DDPH para todos los compuestos.

Tabla 7. Prueba cualitativa para Iridoides: Método con el radical libre DDPH
Se muestran los fitocompuestos que dieron positivo (+) como agentes antioxidantes.

IRIDOIDES			
Compuesto	Prueba con el radical DDPH	Testigo	Referencia
I	+	A +	D +
II	+	B +	E -
III	+	C +	
IV	+		
V	+		

Posteriormente, se hizo lo propio con las Xantonas I y II y las Cumarinas I- III. Se pudo observar la misma constante en ellos, demostrándose su efectividad antioxidante. No se

aprecia ninguna actividad en el caso del compuesto referencia E. (Tabla 8 y 9).

Tabla 8 Prueba cualitativa para Xantonas Método con el radical libre DDPH. Se muestran los fitocompuestos que dieron positivo (+) como agentes antioxidantes

XANTONAS			
S			
Compuesto	Prueba con el radical DDPH	Testigo	Referencia
I	+	A +	D +
II	+	B +	E -
		C +	

Tabla 9. Prueba cualitativa para Cumarinas Método con el radical libre DDPH Se muestran los fitocompuestos que dieron positivo (+) como agentes antioxidantes

CUMARINA			
S			
Compuesto	Prueba con el radical DDPH	Testigo	Referencia
I	+	A +	D +
II	+	B +	E -
III	+	C +	

El cambio en la coloración se debió a que el DDPH es un radical y se oxida entonces por lo tanto se toman amarillos los compuestos estudiados

Se pudo constatar la diferencia en la velocidad de cambio en la coloración, en general en esta prueba, se dio de forma más rápida y la coloración fue mas intensa que en la prueba del blanqueo

Los resultados arrojaron un comportamiento positivo ya observado en la prueba anterior, ratificando la capacidad antioxidante de los compuestos en cuestión, al menos en términos cualitativos.

Como un primer sondeo, se comprobó lo que se sospechaba ya que son compuestos

fenólicos e iridoidales por tanto, son buenos candidatos como agentes antioxidantes. Sin embargo, es necesario hacer una prueba que nos dé resultados más objetivos del comportamiento de éstos fitocompuestos, que es lo que en realidad nos interesa, por lo que se aplicó una prueba cuantitativa

Prueba cuantitativa (etapa 2)

Para la evaluación cuantitativa antioxidante de los fitocompuestos que dieron positivo en las pruebas cualitativas preliminares, se aplicó la prueba espectrofotométrica. La lectura se hizo a λ de 517 nm del espectro, con luz UV. Los compuestos I-V, mostraron valores del orden de 0.753-1.056 abs, como testigos, se utilizaron los antioxidantes sintéticos A, B, y C que van del orden 0.065-0.368 abs; el compuesto D (cacalol) de referencia con un valor de 0.065 abs. Además, se evaluó el rango del radical DDPH, y del Me-OH que se emplearon como controles en esta prueba.

Los resultados obtenidos muestran una baja capacidad antioxidante, y sobre todo si se observa el valor del compuesto G (DDPH) 1.146 abs. Tal como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Absorbancia, a 517 nm de UV. Fitocompuestos iridoidales:
I-V, testigos: A, B y C; referencia: D y controles: F y G.

IRIDOIDES					
Compuesto	Valor	Testigo	Valor	Referencia	Valor
I	0.876	A	0.123	D	0.095
II	0.793	B	0.368		
III	0.965	C	0.065	Control	
IV	0.872			F(DDPH)	0.006
V	1.056			G(Me-OH)	1.046

A pesar, de que las pruebas cualitativas anteriores presentaron capacidad antioxidante, en el caso de la cuantitativa se muestra que dicha actividad antioxidante es baja, considerando el valor del radical DDPH que es de 1,046. Valores casi cercanos a 1 como de los compuestos aquí probados solo neutralizan en pequeña medida a los radicales libres. El compuesto II resulta uno de los compuestos más efectivos con un valor de 0.793 abs. Aunque se observa que todos los valores son cercanos a 1, no es despreciable su comportamiento. En este orden de ideas, se esperaría un efecto negativo si por el contrario se obtuvieran valores mayores de

1.0, ya que si pensamos que un mol de radical libre reacciona con un mol del compuesto antioxidante, si tiende a 0 se esperaría obtener un proceso de neutralización de cargas en el plano energético y cinético. Por lo que podemos asumir que los compuestos estudiados presentan cierto potencial antioxidante. Y se podrían variar las concentraciones y poder mejorar su actividad.

Por otra parte, los compuestos naturales que se usaron como referencia **D** Cacalol como podemos verificar en la literatura, el cual se describe como un compuesto antioxidante se ha comportado en las diferentes pruebas como tal, y **E** trinervinol, concuerda con lo reportado en la literatura y en nuestros experimentos se reproduce su comportamiento, al no presentar actividad antioxidante⁽¹⁴⁾.

En el caso de las xantonas, se hicieron las lecturas a la misma longitud de onda y usando los mismos controles (Ver tabla 11) se obtuvo para este tipo de compuestos una actividad muy buena, en el caso del compuestos **I** el valor medido fue de 0.092 abs. Comparándolo con los antioxidantes sintéticos (0.65-0.358 abs), se puede decir que, es un antioxidante natural muy potente. También, el compuesto **II**, que registró un valor de 0.117 abs, incluso, superando la efectividad del testigo **B**.

El grupo de xantonas, nos muestra una mejor respuesta antioxidante, a diferencia, del grupo de compuestos iridoidales.

Tabla 11. Absorbancia, a 517 nm. Xantonas I y II:
testigos: A, B y C; referencia: D y controles: F y G.

XANTONAS					
Compuesto	Valor	Testigo	Valor	Referencia	Valor
I	0.092	A	0.123	D	0.095
II	0.117	B	0.368		
		C	0.065	Control	
				F	0.006
				G	1.146

Para las Cumarinas, se observó que la mezcla **II**, presenta la mejor respuesta antioxidante con un valor de 0.368 abs, que es el mismo valor con el que trabaja el antioxidante sintético **B**. En el caso de la mezcla **III**, también se registró un valor cercano al

testigo **B** Esto demuestra, una efectividad antioxidante satisfactoria para ambos compuestos Por último, el compuesto **IV**, nos habla de una menor eficacia (0.531 abs) sin embargo, este valor es aceptable para ser considerado como un posible antioxidante natural (Tabla 12)

Tabla 12. Absorbancia, a 517 nm. Mezcla de cumarinas, II, III y IV.
testigos: A, B y C; referencia: D y E; y controles: F y G.

CUMARINAS					
Compuesto	Valor	Testigo	Valor	Referencia	Valor
II	0.368	A	0.123	D	0.095
III	0.370	B	0.368	E	0.753
IV	0.531	C	0.065	Control	
				F	0.006
				G	1.146

Prueba biológica (3ª etapa)

Finalmente, la tercera etapa consistió en la aplicación de la prueba biológica con el hongo xilófago de pudrición morena *Postia placenta*

Podemos observar en esta prueba, el comportamiento que presentaron los organismos vivos al incorporarles la sustancia antioxidante a metabolizar

Los resultados que se obtuvieron del porcentaje de crecimiento micelial (%C) del hongo *Postia placenta* para el grupo de los iridoides fueron variables. A la concentración empleada (0.020mg/ml), para el compuesto **II**, Catalpol, se observó un crecimiento del hongo del 83.6%, este fue perceptible a partir del segundo día y se incremento bruscamente del 5º día hasta el final de la prueba (9º día) Se registró una inhibición del 16.4% sobre el crecimiento micelial.

Como podemos examinar es mínimo el porcentaje de inhibición por lo que se puede decir, que el modelo biológico aplicado no se adecuó a lo que se esperaba, es decir, se esperaba un mayor porcentaje de inhibición al aplicarle nuestros compuestos antioxidantes Sin embargo se presume una tendencia mayor con el grupo de las xantonas

Los resultados que se obtuvieron del porcentaje del crecimiento micelial del hongo *Postia placenta*, para el grupo de los iridoides fueron variables, como se observa en la Tabla 13, pero se puede decir, que no se obtuvieron valores relevantes que nos hablaran de una respuesta efectiva en el caso de los iridoides.

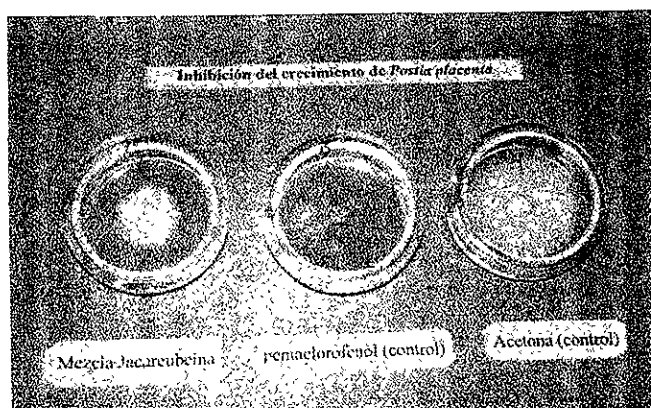


Figura 24. Muestra el comportamiento inhibitorio seguido por la mezcla de jacareubina +1,3,5-trihidroxi-2-(3,3 dimetilalil)-xantona.

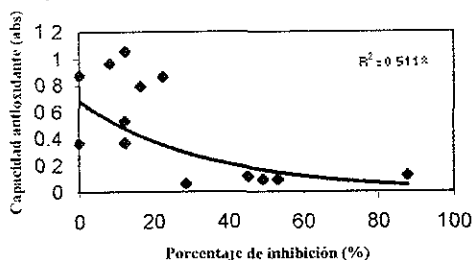
En el caso de las cumarinas es parecido a la respuesta de los iridoides, osea, la capacidad antioxidante no fue muy efectiva mostrando valores altos en el % de crecimiento lo que nos habla de una capacidad antioxidante baja. Es indispensable conocer como es el comportamiento de respuesta antioxidante cuando se trabaja con organismos vivos, podemos observar su capacidad de respuesta al incorporar en su metabolismo sustancias que pueden cambiar el curso natural en su crecimiento, tal y como lo muestran nuestros resultados. Ver tabla 15.

Tabla 15. Prueba biológica que muestra el % de crecimiento de las Cumarinas: I y IV, testigos: A, B y C; referencia: D y E; y controles: F y G.

CUMARINAS					
Compuesto	% de crec.	Testigo	% de crec.	Referencia	% de crec.
II	87.7	A	12.2	D	49.9
IV	91.8	B	100	E	79.5
		C	71.4	Control	% de crec.
				F	100
				G	0

Intentamos correlacionar el porcentaje de inhibición contra la capacidad antioxidante de los compuestos probados, lo que esperábamos una r^2 (coeficiente de correlación) cercano a 1. Al generarse radicales libres los compuestos antioxidantes inhibirían el crecimiento

micelial. Los compuestos fungísticos más efectivos serían pues las xantonas, estas habían mostrado una efectividad buena en pruebas anteriores. Sin embargo, nuestra $r^2=0.51$ lo que sugiere que hay un 50% de probabilidades de que existe una correlación (ver gráfica 1). Por lo que hace falta tener mayor número de datos y sobre todo condiciones controladas (concentración de la sustancia) para poder concluir algo. Quizá como se menciona en la literatura, hay una producción al inicio del metabolismo de $H_2O_2^{51}$ pero, en nuestro experimento falta agregar Fe^{2+} , para que se dé la reacción e inicie la despolimerización efectivamente.



Gráfica 1. Correlación entre el porcentaje de inhibición (%) y la capacidad antioxidante (abs) de todos los compuestos.

CONCLUSIONES

VI. Conclusiones

Los objetivos que se plantearon en un inicio se cumplieron se obtuvo material suficiente, se montaron las pruebas antioxidantes para los grupos de compuestos: Iridoides, Xantonas y Cumarinas

Al evaluar y determinar la capacidad antioxidante de los compuestos mediante los diferentes métodos químicos tanto cualitativos como cuantitativos, se pudo demostrar su efectividad como compuestos naturales antioxidantes Presentando una capacidad para neutralizar los RL, lo cual, ofrece expectativas amplias para posteriores investigaciones en la química de los productos naturales, en la búsqueda de sustancias biológicamente activas presentes en plantas mexicanas, en la evaluación y utilización en diversas áreas tales como: farmacología, en la industria de alimentos y en la agricultura También, se pudo establecer una comparación entre una mejor respuesta antioxidante y su efecto como agente neutralizador de RL. Demostrándose que las Xantonas, es el grupo de compuestos que presenta una respuesta antioxidante muy efectiva, es decir, comparando la efectividad con respecto al BHA (un antioxidante sintético, frecuentemente usado en la industria alimenticia) Seguido por las Cumarinas y, finalmente, no menos despreciable pero si con efectividad antioxidante se tienen al grupo de los compuestos iridoidales

Es importante destacar aquí, que el compuesto: Mezcla de Jacareubeína + 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3 dimetilalil)-xantona (asignado con el número II), del grupo de compuestos agrupados como Xantonas, resulto ser un antioxidante natural óptimo para aplicar pruebas en alimentos

De igual forma, con la prueba biológica se obtuvo que el grupo de las Xantonas fue el que inhibió casi un 50% el crecimiento micelial del hongo xilófago de pudrición morena *Postia placenta*, sin embargo no se pudo establecer que no existió ninguna correlación entre la

capacidad antioxidante y el porcentaje de inhibición que se había planteado al inicio (a mayor capacidad antioxidante mayor la inhibición micelial) Falta tener mayor número de datos y sobre todo condiciones controladas (concentración de la sustancia) para poder concluir si hubo una correlación o no la hubo

PERSPECTIVAS

VII. Perspectivas

- 1 - Generar más conocimiento, estudiando a sustancias iridoidales, cumarinas y xantonas que tengan el potencial de ser buenos candidatos como posibles agentes antioxidantes (ampliar el espectro de plantas mexicanas)
- 2.- Elaborar más experimentos con el grupo de xantonas a diferentes concentraciones
- 3.-Se sugiere hacer 5 repeticiones por muestra aumentando la concentración en cada una de ellas
- 4 - Obtener fitocompuesto en cantidad suficiente para adaptar otro tipo de modelo experimental.
- 5.-Hacer estudios con hongos xilófagos cambiando el sustrato en madera para conocer un poco más acerca del metabolismo de estos
- 6.- Medir el H_2O_2 generado en un modelo diseñado directamente para medir la cantidad de peróxido producido por hongos xilófagos.
- 7.-Aplicar una prueba de laboratorio para saber en que medida se generan RL y poder así incorporar los antioxidantes y observar directamente si se produce una neutralización
- 8.- Aplicar pruebas en alimentos con las xantonas y observar su comportamiento ya que podrían emplearse en la industria de alimentos.
- 9.- Sería interesante después de probar la capacidad antioxidante de las xantonas, saber por medio de otro experimento la selectividad que existe entre el antioxidante y el órgano específico en el organismo, para conocer a que nivel actúa dentro de la célula.

BIBLIOGRAFÍA

VIII. Bibliografía

- (1) O' Brien, J.P. 1994 Antioxidants and Cancer Molecular Mechanisms. Free Radicals in Diagnostic Medicine Plenum Press, New York 215-232 pp
- (2) Dapkevicius, A., Venskutoms, R., A van Beek, T., and Linssen, JPH 1998 Atioxidant Activity of Extracts Obtained by Aromatic Herbs Grown in Lithuania. *J Sci Food Agric.* 77:140-146.
- (3) Fauré, M., Lissi, E., Torres, R. And Videla, A 1990 Antioxidant Activities of Lignans and Flavonoids *Phytochemistry* 29(12).3773-3775
- (4) Cano, A., Hernández-Ruiz, J., García-Cánovas, F., Acosta, M. And Arnao, M 1998. an End-point Meted for Estimation of the Total Antioxidant acivity in Plant Material *Phytochemistry Analysis* 9:196-202
- (5) Cavin, A , Hostettmann, k., Dyatmyko, W And Potterat, O. 1998. *Planta Médica.* 64 393-396
- (6) Estrada, M E 1998 Estudio Químico y Actividad Biológica de las Xantonas Aisladas del Duramen de Calophyllum brasillensis. Tesis de Licenciatura. F.C. Ciencias, UNAM México, D.F. 91 pp.
- (7) Waffo, T P., Fauconneau, B , Deffeux, G , Huguet, F., Vercauteren, J And Mérillon, J:M: 1998. Isolation, Identification, and Antioxidant Activity of Three Stilbene Glucosides Newly Extracted from *Vitis vinifera* Cell Cultures *J.Nat. Prod.* 61:655-657
- (8) Tórrrez, O J. 1997 Antioxidantes. *Tecnología de Alimentos Industria y Mercado* 52(11).34-40.
- (9) Larson, A. R 1988 Review Article Number 30. The Antioxidants of Higher Plants *Phytochemistry* 27(4)·969-978

- (10) Gamez, J C , Luyengi, L , Lee, S K , Zhu, L-F., Zhou, B-N., Fong, H. S., Pezzuto, M And Kinghorn, D 1998 Antioxidant Flavonoid Glycosides from Daphniphyllum calycinum *J. Nat. Prod* 61 706-708
- (11) Donnelly, T H 1996 The Origins of the Use of Antioxidants in Foods *Journal of Chemical Education* 73 (2) 158-161
- (12) Reynoso, O A 1998 Los antioxidantes en Alimentos Perspectivas de Aplicación Tesis de Licenciatura F C Estudios Superiores Cuauhtitlán, UNAM Edo de México 98pp
- (13) Stumpf, P K and E E Conn The biochemistry of plants. a comprehensive treatise Plant Products 1981 269-294
- (14) Ahmad, S 1997 Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology. Chapman & Hall. New York, Usa 447 pp
- (15) Bostek, C C Oxygen Toxicity An Introduccion *AANA J* , 1989, 57(3): 231-237
- (16) Buechter, D D Free radicals and oxygen toxicity *Pharm. Res* 1988, 5(5):253-260.
- (17) Holliweill, B. Tell me about free radical, doctor: a reviw journal of the Royal Society of Medicine, 1989, 82:747-752
- (18) Perret, L. y M Deman M Mecanimes cellulaires de la protection contre la toxicité de l'oxygène Arch. *Fr. Pediatr* 1983, 40 585-595
- (19) Southorn, P A and G Powis Free radicals in medicine Chemical Nature and Biologic Reactions *Mayo Clin. Proc.* 1988 63(4).381-389
- (20) Bisby, R H Interactions of vitamin E with free radicals and membranes. *Free Radic. Res. Commun.* 1990 8(4-6) 299-306
- (21) Holliwel, B Free radicals and antioxidant protection mechanisms and significance in toxicology and disease *Human Toxicol* 1989 2988.7.7-13
- (22) Halliwel, B And M C Gutteridge. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transnition metals and disease Review article. *Biochem J* 1984. 219 1-14
- (23) Dormandy, T L Free radical pathology and medicine *Areview J.R. Coll Physicians Lond* 1989 22(4).221-227
- (24) Southrn, P A and G Powis Free radicals in medicine I. Chemical nature and biologic reactions *Mayo Clin. Proc* 1988. 63(4).381-389.

- (25) Bannister, V, W H. Bannister and G Rotilio Aspects of the structure, function and aplicatios of superoxide desmutasa CRC Crit. *Biochem* 1987 22(2) 111-180
- (26) Cross, C. E And etal Oxygen radicals and human disease clinical conference Ann *Inter. Med* 1987 107(4) 525-545
- (27) Housset, B Aberrations of proteins and nucleic acid metabolism in againg Role of free radicals. *Rev.Med. Interne* 1990 11(1) 62-68)
- (28) Pollack, R L and DR Morse Free radicals and antioxidants relation to chronic disease and againg Int *J. Psychosom* 1988 35 (1-4) 43-48
- (29) Derwick, MP Medicinal Natural Products a Biosynthetic Approach John Wiley & Sons. USA. 1997. 449pp
- (30) Ahmad, S. Oxidative Stress and antioxidant Defenses in Biology Chapman & Hall USA 1996 447pp
- (31) Krohausen, D.E, P Kronhausen and H B Demopoulos Formula for Live The anti-oxidant, Free.Radical Detoxification program William Morrow & Company USA 1989 601pp
- (32) Berlitz, H.D. y W Grosch Química de los alimentos Acriba, S A España 1992 1064pp
- (33) López, V.N. 1995. Aslamiento y transformación de Iridoides Glucosidicos de Lamarouxia dasyantha. Tesis de Licenciatura F C Química, UNAM, México, D F 80pp.
- (34) Isiguro, K, M Yamaki; S Takagi; Y Ikeda, K Kawakami; and T Nose Studies on Iridoid-related Compounds IV Antitumor Activty of Iridoid Aglycones *Chem Pharm. Bull.* 1986. 34(6). 2375-2379
- (35) Cuendet, M; K Hostettmann y O Potterat Iridoid Glucosides with Free Radical Scavening Properties from Fagraea blumei *Helvética Chimica Acta.* 1997 80 1144-1152
- (36) Navarro, O A. 1991 Empleo de los Productos Naturales como Fuente de Itermediaros Sintéticos (Bosnalósido) Tesis de Maestría F.C. Química, UNAM México, D.F. 91pp.
- (37) Gómez, G K. 1997. Sintesis y Evaluación de la Actividad del Alcaloide Boshniaquina como atrayente de Felis cactus Tesis de Licenciatura F C Ciencias, UNAM México, D.F 61pp
- (38) Carpenter, H D and F. Scheinmann. Xanthones in Higher Plants Biogenetic Proposals and a Chemotaxonomic Survey. *Phytochemistry.* 1969 8 2013-2026

- (39) Gottlieb, O R Biogenetic Proposal Regarding Aucuparins and xanthones. *Phytochemistry*. 1968 7 411-421
- (40) Graham, J B and H H Lee Xanthones from guttiferæ. *Phytochemistry* 1989 28 967-998
- (41) Clausen, C A and F Green III Characterization of polygalacturonase from the brow-rot fungus *Postia placenta* *Appl Microbiol Biotechnol* 1996 750-754
- (42) Serret, G M 1996 Los radicales libres y el proceso de lipoperoxidación como posible causa de daño hepático en pollos Tesis de Licenciatura. F.C Medicina, UNAM Mexico, D F 73 pp
- (43) Romero, B G. Determinación de cumarinas como adulterantes en extractos de vainilla y en algunos productos alimenticios comerciales Tesis de Licenciatura F.C. Química, UNAM. México, D F 67pp
- (44) Medina, N.R. 1997. Concentración de lipoperóxidos y capacidad antioxidante del suero sanguíneo humano, efecto de la contaminación atmosférica y el tabaquismo Tesis de Maestría. F C Ciencias, UNAM México. D.F 99pp
- (45) García, P M 1994 Capacidad degradadora de hongos xilófagos en madera. Tesis de Licenciatura ENEP-Ixtacala UNAM México, D F. 72pp
- (46) Martínez M. J 1983 Ensayo de agresividad de hongos xilófagos en madera Tesis de Licenciatura ENEP Ixtacala, UNAM México, D F. 87 pp
- (47) Jordan, C.R; W V Dashex and T L Higley Detection and Quantification of oxalic acid from the brow-rot decay fungus, *Postia placenta* *Holzforchung* 1996 312-318
- (48) Attenborough, D. P Whitfield, D P Moore y B. Cox *El Planeta Vivo* Plaza & Janés. Alemania. 1990 219 pp
- (49) Kerem, Z , A.J. Kenneth and E H Kenneth. Biodegradative mechanism of brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction. *FEBS Letters* 1999. 446 49-54
- (50) Koenigs, J.W. *Wood and Fiber*. 1974. 6 66
- (51) Koenigs, J.W *Phytopathology*. 1972. 62. 100
- (52) Hon, S and S. T Chang Participation of singlet oxygen en the photodegradation of wood surfaces. *Wood Sci. Technol*. 1982 16 193-201

- (53) Huang, M.T., C.T. Ho., C.Y. Lee Phenolic compounds in food and their effects on health II. Antioxidants and cancer prevention. American Chemical Society Washington 1992
- (54) Nicoletti, M. 1989 Iridoids *Rev. Latinoamer. QUIM. Suppl* 1 133-159
- (55) Briggs, L.H., B.F. Cain y P.W. Le Quesne 1963. The structure of Asperuloside *Tetrahedron Letters* 2 69-74
- (56) Bors, W., Christa, M. And Saran, M. 1984 Inhibition of the Bleaching of the Carotenoid Crocin a Rapid Test for Quantifying Antioxidant Activity *Biochimica et Biophysica Acta* 796 312-319
- (57) Cronquist, A., 1968 The evolution and clasification of flowering plants Houghton Mifflin. Boston. P 315-319
- (58) Alexopolus, C.J. 1990. Introducción a la micología. Universitaria de Buenos Aires Edit. Argentina 579 pp
- (59) Armstrong, D. 1994. Free Radicals in Diagnostic Medicine. Plenum Press, New York 1-183 pp.
- (60) Krasovskaya, N.P., Kulesh, N.I. and Denisenko, V.A. 1989. Natural Antioxidants Furanoeremophilanes from *Cacalia* roots. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii* 5:643-646
- (61) Miyamoto, S., Koga, T. And Terao, J. 1998. Synthesis of a Novel Phosphate Ester of Vitamin E Derivate and Its Antioxidants Activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 62 (12):2463-2466
- (62) Laurens, A. Leboeuf, M., y Cavé, A. 1998 Las Sorprendentes Virtudes del Té Verde. *Mundo Científico*.191 42-45
- (63) Arguilés, J. y López-Soriano, J. F. 1998. El Resveratrol, ¿Una molécula Mágica?. *Mundo Científico* 192: 38-41.
- (64) Cordell, G. A. 1995 Changing Strategies in Natural Products Chemistry *Phytochemistry*. 40 (6).1585-1612.
- (65) Rice-Evans, C. A., Miller, J. N. and Paganga, G. 1996. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical & Medicine* 20 (7).933-956
- (66) Cuendet, M., Hostettmann, K. and Potterat, O. 1997 Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*. *Helvética Chimica acta* 90:1144-1152.

- (67) Dufresne, C., Cormier, F. and Dorion, S. 1997. In Vitro Formation of Crocetin Glucosyl Esters by *Crocus sativus* Callus Extract. *Planta Médica*. 63:150-153.
- (68) Minami, H., Kinoshita, M., Kodama, M., Yoshizawa, T., Sugira, M., Nakagawa, K. And Tago, H. 1994 antioxidant Xanthones from *Garcinia Subelliptica* *Phytochemistry*. 36(2)501-506.
- (69) Konig, G., Rimpler, H. And Hunkler, D. 1987. Iridoid Glucosides in *Avicennia officinalis*. *Phytochemistry* 26(2):423-427.
- (70) Kikuzaki, H. And Nakatani, N. 1993. Antioxidant Effects of Some Ginger Constituents. *Journal of Food Science*. 58(6).1407-1410.
- (71) Wang, M., Shao, Y., Li, J., Zhu, N., Rangaranjan, M., La Voie, J. and Ho, C-T. 1999. Antioxidant Phenolic Glycosides from Sage (*Salvia officinalis*). *J. Nat. Prod.* 62:454-456.
- (72) Kerem, Z., Kenneth, A., Kenneth, E.H. 1999. Biodegradative mechanism of brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction. *FEBS Letters*. 446:49-51.
- (73) Carpenter, H. D., Locksley and Scheinmann, F. 1969. Xanthones in Higher Plants. Biogenetic Proposal and Chemotaxonomic survey. *Phytochemistry*. 8:2013-2023.
- (74) González, P. A. 1999. Identificación y determinación de metabolitos secundarios en los frutos de *Calophyllum brasiliensis*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa, México. D.F. 27pp.