



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**



**“Estudio del efecto fotoprotector *in vivo* y antioxidante *in vitro*  
del Tepozán (*Buddleja cordata*)”**

**TESIS**

**Que para obtener el título de**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

**MATAMOROS DE MARIA Y CAMPOS DIANA ROSA**

**DIRECTOR(A) DE TESIS:**

**DRA. ANA MARÍA GRACÍA BORES**

**Los reyes Iztacala, Edo. de México, 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# Agradecimientos

## ***Por su apoyo económico:***

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)  
IN213309 y IN219612

M. en C. José Luis Matamoros Tapia

## ***Por su asesoría:***

Dra. Ana María García Bores

Dr. José Guillermo Avila Acevedo

## ***Por su conocimiento:***

Dr. Ignacio Peñalosa Castro

Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez

M. en C. José del Carmen Benítez Flores

## ***Por su colaboración:***

M. en C. Rosario González Valle

Dr. Martín Palomar Morales

M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla

## ***Por su compañía:***

A los miembros del laboratorio de Fitoquímica.

# Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS .....	III
ÍNDICE DE CUADROS .....	III
LISTA DE ABREVIATURAS .....	IV
<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>3</b>
2.1 LA CUBIERTA DE LOS ORGANISMOS .....	3
2.2 LA CUBIERTA DE LOS VERTEBRADOS: LA PIEL.....	3
2.3 LA PIEL DE LOS MAMÍFEROS.....	4
2.3.1 <i>Epidermis</i> .....	4
2.3.1.1 Estrato Basal.....	4
2.3.1.2 Estrato Espinoso.....	4
2.3.1.3 Estrato Granuloso.....	5
2.3.1.4 Estrato Córneo.....	5
2.3.2 <i>Dermis</i> .....	5
2.3.3 <i>Hipodermis</i> .....	6
2.3.4 <i>Anexos cutáneos</i> .....	6
2.4 LA FUNCIÓN DE LA PIEL .....	7
2.5 DAÑOS CAUSADOS POR LA RADIACIÓN SOLAR .....	7
2.6 ALTERACIONES MOLECULARES CAUSADAS POR LA RUV .....	9
2.7 FOTOPROTECTORES .....	10
2.8 BLOQUEADORES Y FILTROS SOLARES .....	11
2.9 ANTIOXIDANTES .....	11
2.10 METABOLITOS EN PLANTAS .....	12
2.11 EL TEPOZÁN .....	13
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>4. PREGUNTA CIENTÍFICA .....</b>	<b>14</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>14</b>
<b>6. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
6.1 GENERAL.....	15
6.2 PARTICULARES .....	15
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
7.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	16
7.2 ELABORACIÓN DE LOS EXTRACTOS .....	17
7.3 BARRIDO ESPECTROFOTOMÉTRICO Y HPLC .....	17
7.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA <i>IN VIVO</i> .....	18
7.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> .....	20
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>22</b>
8.1 EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN.....	22
8.1.1 <i>Rendimiento</i> .....	22
8.1.2 <i>Absorción en UV</i> .....	23
8.1.3 <i>Cuantificación de los metabolitos principales en HPLC</i> .....	25
8.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA <i>IN VIVO</i> .....	26
8.2.1 <i>Grupo testigo</i> .....	27
8.2.2 <i>Grupo vehículo</i> .....	29

8.2.3 Grupo irradiado.....	31
8.2.4 Grupo Buddleja.....	33
8.2.5 Grupo experimental .....	35
8.2.6 Conteo de células apoptóticas .....	37
<b>8.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>42</b>
8.3.1 Cuantificación de fenólicos totales .....	42
8.3.2 DPPH• .....	44
8.3.3 O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> .....	47
8.3.4 Actividad quelante .....	51
8.3.5 HO•.....	52
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>58</b>
<b>11. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>59</b>
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>67</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Características histológicas de piel de ratón SKH-1. Simbología: Q, quistes; U, utrículos; FD, folículo en degradación; E, epidermis; D, dermis; H, hipodermis. Tinción H-E. 100 aumentos.....	27
Figura 2. Corte histológico de piel de ratón SKH-1 del grupo testigo. Simbología: CQ, célula de quemadura; Ht, hipertrofia; Hp, hiperplasia; E, edema; A, atrofia; VC, vasos congestionados. Tinción H-E. 100 aumentos. ....	28
Figura 3. Corte histológico piel de ratón SKH-1 del grupo testigo. Simbología: P, pólipo fibroepitelial. Tinción H-E. 100 aumentos.....	28
Figura 4. Corte histológico piel de ratón SKH-1 del grupo vehículo. Simbología: P, pólipo fibroepitelial; Hp-P, hiperplasia con tendencia a pólipo fibroepitelial; Hp, hiperplasia E, edema; CV, células con vacuolización. Tinción H-E. 100 aumentos.....	29
Figura 5. Corte histológico piel de ratón SKH-1 del grupo vehículo. Simbología: CV, células vacuolizadas; CA, células apoptóticas; E, edema; IC, infiltrado celular. Tinción H-E. 400 aumentos.....	30
Figura 6. Corte histológico piel de ratón SKH-1 del grupo irradiado. Simbología: Ht, hipertrofia; A, atrofia; E, edema. Tinción H-E. 100 aumentos. ....	31
Figura 7. Corte histológico de piel de ratón SKH-1 del grupo irradiado. Simbología: Hp-P, hiperplasia con tendencia a pólipo fibroepitelial; E, edema. Tinción H-E. 400 aumentos. ....	32
Figura 8. Corte histológico piel de ratón SKH-1 del grupo <i>Buddleja</i> . Simbología: P, pólipos fibroepiteliales. Tinción H-E. 100 aumentos.....	33
Figura 9. Corte histológico piel de ratón SKH-1 del grupo experimental. Simbología: P, pólipo fibroepitelial. Tinción H-E. 100 aumentos.....	35
Figura 10. Morfología característica de las células de quemadura. Simbología: CQ, célula de quemadura. Tinción H-E. 400 aumentos.....	38
Figura 11. Número de células de quemadura (CQ) por campo a 400 aumentos por grupo. Simbología: • diferencias con testigo; * diferencias con vehículo; † diferencias con irradiado; + diferencias con <i>Buddleja</i> ; ‡ diferencias con experimental. $p < 0.05$ .....	38
Figura 12. Curva patrón obtenida de la prueba Folin-Ciocalteu.....	42
Figura 13. Concentración eficaz media ( $CE_{50}$ ) del extracto de <i>B. cordata</i> contra radical DPPH• en comparación con los controles positivos: ácido gálico y ácido ascórbico. * $p < 0.05$ .....	44
Figura 14. Concentración eficaz media ( $CE_{50}$ ) del extracto de <i>B. cordata</i> contra el radical $O_2^{\bullet-}$ en comparación con los controles positivos: ácido gálico y quercetina. * $p < 0.05$ .....	48
Figura 15. Concentración eficaz media ( $CE_{50}$ ) del extracto de <i>B. cordata</i> contra radical $HO^{\bullet}$ en comparación con ácido gálico. * $p < 0.05$ .....	53

## Índice de Cuadros

Cuadro 1. Alteraciones histológicas provocados por la RUV (Saul, 2001).....	9
Cuadro 2. Tratamientos a los que fueron sometidos los ratones SKH-1 durante el experimento.....	18
Cuadro 3. Longitud de onda de los picos máximos de absorción en la región de la RUV de los distintos extractos así como la región a la que pertenecen.....	23

## Lista de abreviaturas

ABTS	2,2-azinobis (ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico)
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Células presentadoras de antígenos
BHT	Butil hidroxil tolueno
CE <sub>50</sub>	Concentración eficaz media
CQ	Célula de quemadura
BHT	Butil-hidroxil tolueno
DEM	Dosis eritematogénica mínima
DPPH•	Radical difenil-picril-hidrazilo
EDTA	Etilen-diamino tetrazolio
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EGCG	Galato de epigallocatequina
FRAP	Poder antioxidante reductor de hierro
GAG	Glucosaminoglicano
HO•	Radical hidroxilo
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IL	Interleucina
I%	Porcentaje de inhibición
MDA	Malonaldehído
MCP	Muerte celular programada
MEOS	Sistema microsomal etanol-oxidante
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NO•	Radical de óxido nítrico
NBT	Nitro azul tetrazolio
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
ORAC	Capacidad de absorción del radical oxígeno
PMS	Metosulfato de fenzina
PAF	Factor activador de plaquetas
RL	Radical libre
RS	Radiación solar
RUV	Radiación ultravioleta
SOD	Superóxido dismutasa
TNF	Factor de necrosis tumoral
UCA	Ácido urocánico

## 1. Resumen

La piel es el órgano de mayor tamaño en el cuerpo y ofrece protección contra las adversidades del ambiente como la radiación solar. La radiación ultravioleta es perjudicial pues induce daño a las biomoléculas directamente o a través de especies reactivas de oxígeno. La exposición aguda a la radiación ultravioleta produce inflamación, aumento de la pigmentación, engrosamiento dérmico y epidérmico e inmunosupresión, mientras que la exposición crónica puede generar fotoenvejecimiento y cáncer de piel. Debido a que los protectores solares no brindan una protección ideal, se ha optado por la utilización de metabolitos secundarios de plantas. El Tepozán es una especie con alto contenido de compuestos fenólicos, es de distribución amplia en México y se le atribuyen propiedades curativas.

El objetivo de éste trabajo fue determinar el potencial fotoprotector y antioxidante del Tepozán (*Buddleja cordata*). Para lo cual, se extrajeron los metabolitos de las partes aéreas de la planta con metanol y etanol obteniéndose un rendimiento de 15.66% y 11.6% respectivamente. Los extractos demostraron absorber en las tres regiones del ultravioleta y se evidenció mediante HPLC la presencia del fenilpropanoide verbascósido y el flavonoide linarina cuantificándose las cantidades de 285.38 mg/g y 72.77 mg/g respectivamente.

En la prueba de fotoprotección *in vivo*, 18 ratones SKH-1 fueron divididos en 5 grupos (testigo, vehículo, irradiado, *Buddleja* y experimental). Todos ellos presentaron hiperplasia, hipertrofia, edema, y congestión de vasos, de grado leve y extensión focalizada. El grupo vehículo se caracterizó por presentar edema mientras que el grupo irradiado mostró atrofia e hipertrofia, el grupo *Buddleja* expuso zonas con prolongaciones dermo-epidérmicas a las cuales se les equiparó con pólipos fibroepiteliales de igual manera que el grupo experimental. Al comparar los distintos grupos se observó que la piel de los ratones tratados con *Buddleja* no presentaron los daños mostrados por el vehículo y el experimental tampoco presentó hipertrofia y atrofia mostradas en el irradiado.

El grupo que presentó un mayor promedio de células de quemadura por campo fue el vehículo con 9.8, mientras que el grupo *Buddleja* obtuvo el menor promedio con 3.3. Los grupos irradiado y experimental reportaron valores similares siendo de 5.2 y 4.6 respectivamente.

En la cuantificación de compuestos fenólicos totales, el extracto metanólico del tepozán presentó  $177.13 \pm 1.97$  mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto correspondiendo a un 17.71%. En las pruebas con antioxidantes el extracto mostró actividad obteniendo una  $CE_{50}$  de  $64.19 \mu\text{g/ml}$  frente al radical DPPH•, una  $CE_{50}$  de  $133.6 \mu\text{g/ml}$  contra el radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y una  $CE_{50}$  de  $1.85 \pm \mu\text{g/ml}$  para neutralizar el radical HO•. Sin embargo el extracto no mostró actividad quelante.

El extracto de *B. cordata* mostró tener propiedades fotoprotectoras en ratones SKH-1 irradiados con luz UV, sin embargo indujo la formación de estructuras similares a pólipos fibroepiteliales. Así mismo tiene actividad antioxidante frente a los radicales DPPH•,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e HO• mas no quelante de Fe.

## **2. Marco Teórico**

### **2.1 La cubierta de los organismos**

Todos los organismos pluricelulares están cubiertos por un tejido constituido por células estrechamente unidas a manera de barrera: la epidermis, la cual sólo consta de una sola capa de células en invertebrados de cuerpo blando (ya sean acuáticos o terrestres de ambiente húmedo) como los celentereos, gusanos planos y babosas; pero siendo de varias capas en organismos superiores. En muchos gusanos, la epidermis secreta una cutícula externa no celular, delicada en gusanos de tierra pero resistente en las tenias. En los artrópodos, la epidermis produce una cubierta continua a modo de exoesqueleto, que impiden la pérdida de líquidos del cuerpo; esto les permite habitar también en ambientes secos. Todos los animales tienen alguna especie de cubierta para darle protección física e impedir la entrada de agentes patógenos y evitar la pérdida de agua (Storer y cols., 1975).

### **2.2 La cubierta de los vertebrados: la piel**

En los vertebrados la cubierta del cuerpo es un tegumento formado por dos capas principales, una superficial o epidermis y una profunda o dermis. La primera está estratificada en dos o más capas y puede dar origen a otras estructuras las cuales varían de acuerdo al taxón, mientras que la segunda es de composición uniforme (Hildebrand, 1988).

La epidermis es húmeda en muchos vertebrados inferiores. En peces y anfibios es una estructura muy sencilla (un epitelio estratificado) salvo por la presencia de glándulas y en todo su espesor está constituida por células vivas. Particularmente en los anfibios tiene cierto grado de permeabilidad ya que constituye un importante órgano para el intercambio de gases y posee una gran cantidad de vasos en las partes profundas (Romer, 1976).

Una vez que algunos anfibios y los amniotas adoptaron vida terrestre la naturaleza de la epidermis cambió y la superficie de esta se tornó seca e impermeable. Así, en amniotas las últimas capas de la epidermis la conforman células muertas muy queratinizadas (Romer, 1976).

## **2.3 La piel de los mamíferos**

En los mamíferos, la piel desde el punto de vista histológico se distinguen tres capas: epidermis, dermis e hipodermis.

### **2.3.1 Epidermis**

La epidermis es un epitelio plano estratificado queratinizado y está conformado por 4 tipos celulares: los queratinocitos, conforman el epitelio; melanocitos, le dan la pigmentación a la piel y tienen función fotoprotectora; células de Merkel con función neuroendócrina; y células de Langerhans, son células presentadoras de antígeno con función inmune (Cordero, 1996).

Los queratinocitos son las células predominantes de la epidermis y debido a que estas se descaman continuamente de la superficie de la epidermis, es necesario renovar esta población de células. Por lo que existe una diferenciación celular entre las capas más profundas, las intermedias y las superficiales, distinguiéndose 4 estratos (Arenas, 2009):

#### ***2.3.1.1 Estrato Basal***

Está constituido por una sola capa de células cilíndricas de núcleos basófilos dispuestas perpendicularmente a la dermis y están soportados por una lámina basal. Estas células están en constante mitosis. En este estrato se encuentran también los melanocitos y las células de Merkel (Azulay y cols., 2006).

#### ***2.3.1.2 Estrato Espinoso***

Es el estrato más grueso de la epidermis, está formado por varias capas de células poliédricas dispuestas en mosaico, estas también son mitóticamente activas como el estrato basal, sin embargo poseen una gran cantidad de monofilamentos de citoqueratina que se proyectan de manera radial hacia las células circundantes uniéndolas entre sí por medio de desmosomas. En este estrato también se encuentran las células de Langerhans (Gartner y Hiatt, 1997; Saul, 2001).

### ***2.3.1.3 Estrato Granuloso***

Está constituido por queratinocitos aplanados, es la última capa de la epidermis donde las células presentan núcleos. Éstas contienen gránulos irregulares de queratohialina (son basofílicos). Los filamentos de queratina se asocian a estos gránulos y son los precursores de la queratina localizada en el estrato superior (Arenas, 2009).

### ***2.3.1.4 Estrato Córneo***

Es la capa más superficial de la piel, está compuesta por numerosas capas de células queratinizadas aplanadas llamadas corneocitos. Estos carecen de núcleos y organelos, pero cuentan con una gran cantidad de filamentos de queratina embebidos en la matriz amorfa. Las células más cercanas a la superficie carecen de desmosomas por lo que tienen la característica de ser escamosas (Arenas, 2009).

## **2.3.2 Dermis**

La dermis es el tejido conectivo que se localiza por debajo de la epidermis y está compuesta por fibras, células y sustancia fundamental amorfa. En la dermis predominan las fibras de colágena (tipo 1 principalmente) y de elastina; las células encargadas de producirlas son los fibroblastos, sin embargo también encontramos otras células como mastocitos, macrófagos linfocitos y células de Langerhans. Por otro lado, la sustancia fundamental amorfa está compuesta principalmente por agua, electrolitos, mucopolisacáridos y algunas proteínas plasmáticas. Estas en conjunto con las fibras le dan resistencia, cohesión y elasticidad a la piel (Magaña y Magaña, 2011).

La dermis se divide en dos porciones: papilar y reticular. La primera es más superficial y laxa que la segunda. La dermis reticular es de constitución más densa que la papilar y es en esta donde se encuentran embebidos vasos sanguíneos y vasos linfáticos de bajo calibre además de los anexos de la piel como son las glándulas écrinas y los folículos pilosos (Saul, 2001).

### **2.3.3 Hipodermis**

La hipodermis o tejido celular subcutáneo está constituida por adipocitos organizados en lobulillos los cuales están separados entre sí por tejido conjuntivo donde pasan vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. La hipodermis tiene función protectora hacia agresiones mecánicas, como aislante térmico y reservorio de energía (Cordero, 1996; Saúl, 2001).

### **2.3.4 Anexos cutáneos**

En todos los vertebrados superiores, el epitelio rico en queratina da origen a ciertas estructuras especiales las cuales varían de acuerdo al taxón (Romer, 1976).

El pelo es un sistema de aislamiento que procede de la epidermis queratinizada. En un pelo típico encontramos un tallo externo y una raíz que ocupa una depresión en la dermis llamada folículo piloso. Los dos primeros están formados por células epiteliales muy queratinizadas y la mayoría están muertas, mientras que el último está rodeado de células vivas y tejido conjuntivo (Romer, 1976; Chu y cols., 2005).

Cerca del folículo se encuentra una glándula sebácea que lo lubrica al verter su contenido; además cada pelo posee un pequeño músculo cuya contracción lo levanta. También existen otro tipo de glándulas no asociadas al pelo: las glándulas sudoríparas, que producen una secreción acuosa que contiene sales, urea y otros productos de desecho. La evaporación de esta secreción ayuda a la termorregulación (Azulay y cols., 2006).

La glándula más característica de los mamíferos es la glándula mamaria. Se piensa que estas glándulas son derivados filogenéticos de las sudoríparas. Las glándulas mamarias presentan un gran desarrollo en las hembras y se vuelven activas después del parto mediante el efecto de las hormonas del ovario y la pituitaria (Romer, 1976; Hildebrand, 1988).

En el extremo de los dedos se encuentran estructuras dérmicas queratinizadas (garras, uñas, pezuñas) que crecen hacia fuera a partir de una capa germinativa debajo de la estructura o cerca de su base, estas estructuras ayudan a la locomoción y la alimentación (Romer, 1976).

## **2.4 La función de la piel**

La piel y sus apéndices realizan muchas funciones, pues proporcionan una protección mecánica a los tejidos blandos que están en las capas inferiores, restringen la salida de agua del cuerpo previniendo la desecación y la perturbación del balance del agua, ayudan a regular el calor transferido del ambiente, protegen contra la entrada de organismos dañinos y diversas sustancias químicas, proveen coloración adaptativa, y facilitan la locomoción de varias formas. La piel también interviene en la secreción, excreción, recepción sensitiva, en la reserva de energía por la acumulación de grasas y glucógeno; mientras que sólo en algunos organismos, interviene en la respiración (Hildebrand, 1988).

La piel también ofrece protección hacia agentes físicos como la radiación ultravioleta (RUV) emitida por el sol (Afaq y cols., 2005). Las longitudes de onda de la radiación solar (RS) que están involucradas con la inducción de daño cutáneo pertenecen a la zona de la radiación ultravioleta (RUV), la cual presenta longitudes de onda que comprenden de 200-400nm y se divide en tres regiones: onda corta C (200-280nm), onda media B (280-320nm) y onda larga A (320-400nm) (Afaq y cols., 2005). Sin embargo, la capa de ozono absorbe la totalidad de la RUV-C y el 95% de la RUV-B, en contraste, sólo el 5% de la RUV-A (Rhodes y Lim, 2007).

## **2.5 Daños causados por la radiación solar**

Las afecciones causadas por el daño producido por la RS se clasifican en agudos y crónicos. Los daños agudos incluyen inflamación por quemadura solar, pigmentación aumentada (bronceado), inmunosupresión local, engrosamiento de la dermis y la epidermis (en particular el estrato córneo), además de la fotosensibilidad. En tanto que la exposición crónica conlleva al fotoenvejecimiento y al cáncer (McGregor y Hawk, 2001).

La quemadura solar se caracteriza por la dilatación de los vasos sanguíneos circundantes al daño, un aumento del líquido tisular, la infiltración de leucocitos plasmáticos a los tejidos, el aprisionamiento de las terminales nerviosas debido al aumento de volumen tisular y aumento en la temperatura (calor, dolor, enrojecimiento y edema) (Stevens y cols. 2003). El enrojecimiento o eritema es el signo más evidente, cuyo desarrollo es dependiente de la dosis de RUV y se calcula mediante una dosis eritematogénica mínima (DEM) que se define como la menor dosis de irradiación para producir eritema sobre la piel expuesta de un organismo. Esta DEM dependerá no sólo del grado de pigmentación del mismo, sino que también de la dosis a la que es sometido (Walker y cols., 2005; Rhodes y Lim, 2007).

La RUV causa inmunosupresión al modular el número y función de las células de Langerhans, la principal célula presentadora de antígenos, ya que se ha observado que estas células disminuyen e inclusive desaparecen de la epidermis cuando es sometida a RUV. Las células de Langerhans tienen función reclutadora de macrófagos y liberadora de mediadores inflamatorios de la epidermis (Walker y cols, 2005; Rhodes y Lim, 2007).

La RUV provoca cambios en los distintos tejidos de la piel, los cuales son apreciables mediante microscopía óptica (Cuadro 1).

Zona de la piel	Alteración	Descripción
Epidermis	Hipertrofia	Aumento de volumen de una célula o estructura tisular
	Hiperplasia	Aumento del número de células de un tejido
	Espongiosis	Perdida de cohesión entre las células
	Paraqueratosis	Retención de núcleos picnóticos en estrato córneo
	Hiperqueratosis	Engrosamiento del estrato córneo
	Células de quemadura	Queratinocitos con núcleos condensados, hipercromáticos con citoplasma contraído.
Dermis	Edema	Intrusión de líquido plasmático a los tejidos circundantes y como consecuencia el espaciamiento de las fibras de colágena
	Infiltrados celulares	Intrusión de células linfocíticas a la dermis

Cuadro 1. Alteraciones histológicas provocados por la RUV (Saul, 2001).

## 2.6 Alteraciones moleculares causadas por la RUV

La RUV causa distintos perjuicios en la piel dependiendo de la longitud de onda que incide sobre las células y estos pueden ser directos o indirectos al ADN. Así, la RUV-B causa daño directo al ADN formando los dímeros de pirimidina y fotoproductos (6-4), en tanto que la RUV-A provoca daño indirecto mediante la acción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) que a su vez producen lesiones al ADN generando principalmente 8-hidroxi-guanina, glicol de timina, hidratos de pirimidina y urea, (Ichihashi, 2003). Estos cambios fotoquímicos resultan en alteraciones estructurales al ADN que al producir mutaciones en genes específicos contribuyen a la carcinogénesis (Afaq y cols., 2005).

Las ERO no sólo causan daño al ADN sino a otras biomoléculas como proteínas y lípidos, principalmente; ya que pueden ser oxidados por estas y así alterar su estructura, actividad, o funcionalidad, e incluso convertirse en radicales secundarios que tienen la capacidad de dañar otras biomoléculas (García-Bores y Avila, 2008). Las ERO como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), y el radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ), oxidan lípidos libres y lípidos de membrana reaccionando con sus dobles ligaduras, iniciando reacciones en cadena. También participan en la respuesta inflamatoria así como activando factores de transcripción de vías de la respuesta al estrés. Aunado a lo anterior, las proteínas también pueden ser oxidadas por las ERO, sin embargo estas biomoléculas se encuentran en constante degradación y síntesis. Además, gracias a los altos niveles de enzimas metionina-sulfóxido reductasa en la epidermis, mantiene los niveles de proteínas oxidadas bajos, sin embargo esta enzima sólo actúa con los sulfóxidos (Garmyn y Yarosh, 2007).

La RUV que llega a incidir sobre la piel es absorbida por los cromóforos e induce la formación de una variedad de oxidantes, y aunque los organismos están adaptados a cualquier situación inestable para prevenir reacciones indeseables y reparar moléculas así como tejidos dañados, las pequeñas cantidades de moléculas que escapan de los sistemas de prevención y reparación se van acumulando poco a poco provocando el deterioro en el organismo. Todas estas condiciones van dirigidas a la producción de varios oxidantes y si el organismo falla al neutralizarlos, estos se acumulan y reaccionan con gran variedad de biomoléculas ocasionando la situación conocida como estrés oxidativo (Sorg, 2004); el cual se podría definir como el desbalance entre los sistemas antioxidantes y las ERO a favor de estas últimas, ocasionando la pérdida de funcionalidad celular, adaptación, senescencia, muerte celular (ya sea mediante necrosis o apoptosis), e incluso heredar el daño (Halliwell y Gutteridge, 2007).

## **2.7 Fotoprotectores**

Debido a que la exposición a la radiación solar causa múltiples afecciones a la piel, se ha optado por el empleo de protectores físicos (como sombrillas, gafas para el sol, sombreros, etc.), así como de químicos, los cuales bloquean o filtran la RUV (Walker y cols., 2005).

## **2.8 Bloqueadores y filtros solares**

Una de las medidas utilizadas para contrarrestar los problemas causados por la radiación solar, ha sido el uso de protectores solares (Kligman y cols., 1982); los cuales se definen como aquellos productos de aplicación tópica que actúan absorbiendo o dispersando la RUV y son usados por el público en general para prevenir la quemadura solar (Diffey, 2005). Los protectores solares pueden clasificarse en orgánicos e inorgánicos (Nelson, 2005).

Los protectores inorgánicos contienen ingredientes químicos que reflejan o dispersan la luz como óxido de zinc, dióxido de titanio (Nelson, 2005); sin embargo, en un estudio realizado por Runford y colaboradores (1997) demostraron que el dióxido de titanio así como el óxido de zinc pueden catalizar daño oxidativo al ADN en un cultivo *in vitro* de fibroblastos humanos.

Los protectores orgánicos son moléculas capaces de absorber la RUV en ciertas longitudes de onda ya sea en la región A o B. No obstante los protectores orgánicos también generan cierto grado de toxicidad como lo observó Durrer y cols (2007) quienes administraron diferentes dosis de 4-metil, bencildien-alcanfor a ratas preñadas, obteniendo que este filtro solar afecta el desarrollo de los órganos reproductores así como su función.

## **2.9 Antioxidantes**

Actualmente, se recurre al uso de sustancias para prevenir o neutralizar los daños de los compuestos que inducen ERO llamadas antioxidantes, que se definen como aquellas sustancias que a bajas concentraciones a comparación del sustrato oxidable, retrasa o inhibe la oxidación de dicho sustrato. La importancia de estas moléculas depende de su concentración, el medio donde actúa y su capacidad para interaccionar con sistemas reguladores (Serra-Baldrich y Tribó, 1991). Además, algunos de éstos compuestos no son estables, lo que les permite funcionar en las reacciones redox. Gracias a que las moléculas antioxidantes de bajo peso protegen contra el estrés oxidativo, sería recomendable

aplicarlas directamente a la piel para evitar el daño causado por la luz UV como es el caso de los metabolitos de origen vegetal (Pinnell, 2003).

## 2.10 Metabolitos en plantas

Las plantas han desarrollado estrategias para protegerse de la radiación ultravioleta mediante diversos mecanismos: 1) reparación del ADN por escisión de nucleótidos y fotoliasa; 2) mecanismos de evasión como proyecciones epidérmicas; 3) por acumulación de compuestos fenólicos; 4) mediante la acción de antioxidantes como glutatión, ascorbato y flavonoides (Schmitz-Hoerner y Weissenböck, 2003).

En la últimas década se han evidenciado las propiedades antioxidantes de extractos de plantas como es el caso de la Mahabala (*Sida rhomboidea*) evaluada por Thounaojam y cols. (2010) quienes observaron que el extracto metanólico de ésta planta presenta una capacidad antioxidante dosis-dependiente contra las ERO,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ , óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ),  $HO^{\bullet}$  y el radical difenil-picril-hidrazilo (DPPH $^{\bullet}$ ), así como inhibición de lipoperoxidación y actividad quelante, las cuales fueron atribuidas a la presencia de polifenoles, flavonoides y ácido ascórbico. También, Wang y cols. (2007) evaluaron la actividad atrapadora de ERO del extracto etanólico-acuoso (50 v/v) de piel de cacahuete previamente desengrasado contra radical DPPH $^{\bullet}$  y contra las ERO:  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ , y  $HO^{\bullet}$ , demostrando que el extracto de piel de cacahuete atrapa efectivamente el radical DPPH y las ERO utilizadas, además de inhibir la hemólisis de eritrocitos inducida por radicales peróxido y presentar actividad quelante de  $Fe^{2+}$ .

También se han evaluado extractos de plantas con propiedades anticarcinogénicas como lo hicieron Lu y colaboradores en 2002, quienes observaron la inhibición de la carcinogénesis inducida con RUV-B aplicando cafeína y galato de epigallocatequina (EGCG) tópicamente a la piel de ratones. Estos investigadores obtuvieron que con cafeína el número de tumores malignos y no malignos decrecían en un 72% y 44% respectivamente. Mientras que con EGCG el número de tumores malignos y no malignos decrecía en un 66% y 55% respectivamente. Ambos tratamientos mostraban un incremento en la apoptosis en tumores no malignos de 72% y en tumores de células escamosas de 56%.

## 2.11 El Tepozán

Una planta que tiene alto contenido en compuestos fenólicos es el tepozán (*Buddleja cordata*) (Avila y cols., 1999; Houton, 2003). Esta especie es originaria de México y Guatemala, habita en climas semiseco y templado, entre los 2500 y 3100 msnm., pertenece a la familia de las Loganiaceas, es un árbol o arbusto de 1-10m de altura. Las hojas de esta planta son de color claro en el haz y presenta pubescencia que le brinda el color blanco en el envés, mientras que sus flores son amarillas y aromáticas (Argueta y cols. 1994).

El tepozán es de distribución amplia en México y se le atribuyen propiedades analgésicas, antisépticas, eupépticas, de remedio contra la tos, los calambres, el cáncer, mordeduras de víbora, entre otros (Argueta y cols. 1994).

Existen algunos estudios realizados del género *Buddleja* como los realizados por Avila y colaboradores (2005) quienes evaluaron la actividad fotopreventiva del extracto metanólico de *B. scordiodes* en *E. coli* y en conejillos de indias. Ellos determinaron que el extracto poseía una fotoprotección pronunciada en comparación con el control negativo así como los compuestos aislados del extracto: la linarina y verbascósido ya que ambos disminuían la muerte celular de *E. coli* inducida por la RUV. Además determinaron el factor de protección solar de estas sustancias en conejillos de indias obteniendo incluso mejores resultados que el control positivo (filtro comercial escalol). También observaron que el verbascósido tuvo un mayor efecto que la linarina tanto en *E. coli* como en los conejillos.

Así también Apablaza en 2006 evaluó la actividad analgésica tópica de un extracto activo de *Buddleja globosa* Hope (recolectada en diferentes temporadas) en ratones. Este autor observó que el extracto recolectado en verano fue más rico en compuestos flavonoides que el de otoño, y ambos presentaron actividad analgésica pero muy baja actividad antioxidante.

### **3. Justificación**

Se han desarrollado sustancias para absorber RUV eficientemente y proteger contra el eritema. Los protectores solares han sido útiles para prevenir el fotodaño, sin embargo la protección que brindan no es la ideal por no absorber en toda la región UV, su inadecuado uso y toxicidad, ya que sus componentes pueden convertirse en especies reactivas del oxígeno por activación de RUV o ser absorbidos por la piel causando daños y/o fotosensibilidad (Pinnell, 2003). Es por ello que se ha optado por experimentar con productos naturales que proveen protección contra el desarrollo de la quemadura solar ya que pueden alterar o corregir la variedad de efectos perjudiciales inducidos por la RUV.

### **4. Pregunta científica**

¿Podrá el extracto del Tepozán proteger la piel de un modelo experimental de ratón SKH-1 contra el fotodaño, y tener actividad antioxidante contra diferentes ERO?

### **5. Hipótesis**

Debido a que el tepozán es una planta capaz de soportar las condiciones excesivas de luz en las cuales habita, en parte por la presencia de antioxidantes y compuestos fenólicos, el extracto de esta planta podrá prevenir el daño de la radiación ultravioleta inducida en un modelo experimental de ratones SKH-1 y poseerá actividad antioxidante frente diferentes ERO.

## **6. Objetivos**

### **6.1 General**

Determinar el potencial fotoprotector de *Buddleja cordata* en piel de ratones SKH-1 irradiados con luz UV así como determinar sus propiedades antioxidantes.

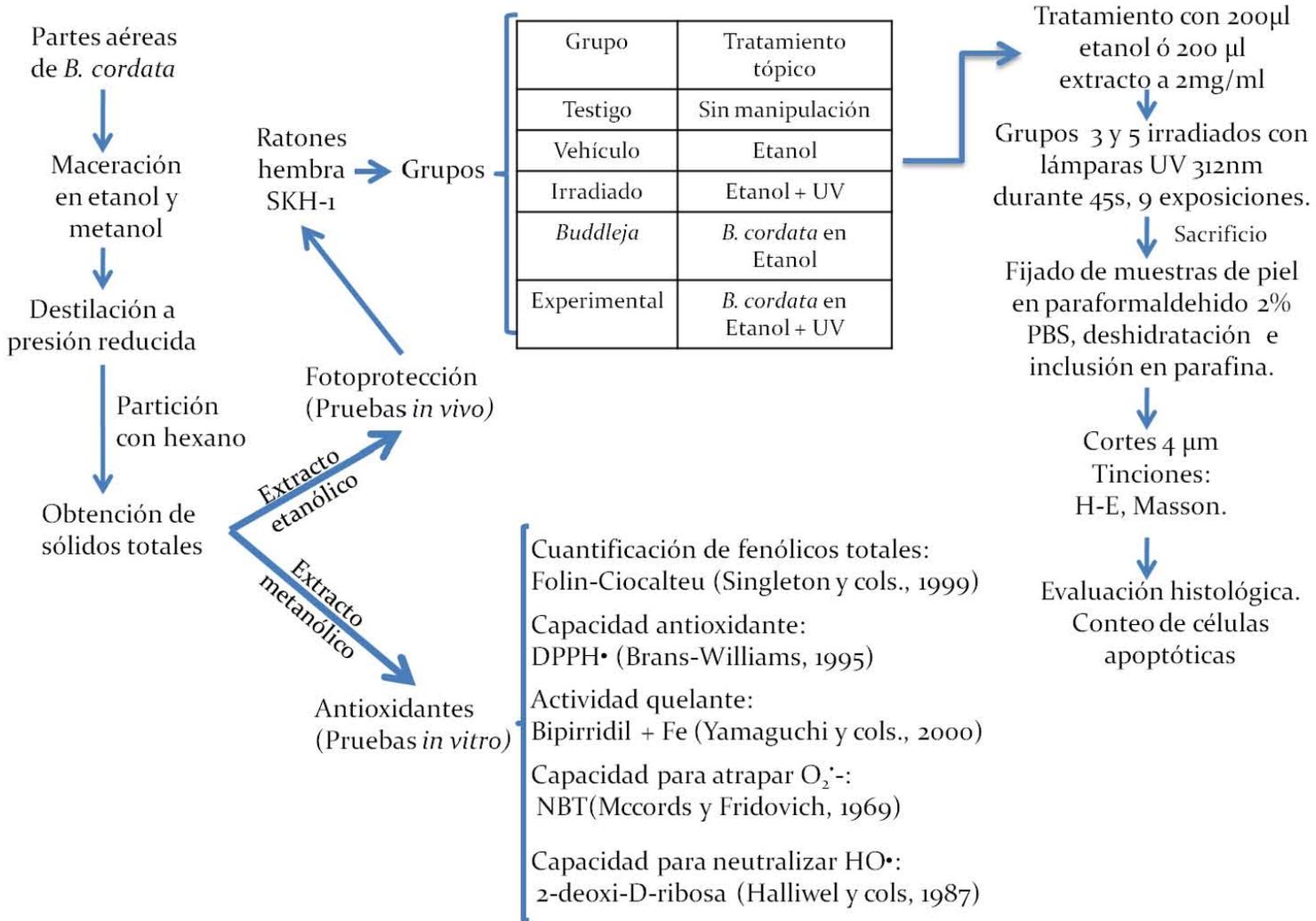
### **6.2 Particulares**

Estudiar por medios histológicos y de forma comparativa los tejidos expuestos y no expuestos a la RUV, con y sin protección, así como evaluar los daños de la piel de ratones SKH-1.

Determinar la capacidad del extracto metanólico para neutralizar los radicales DPPH, superóxido e hidroxilo y para atrapar iones metálicos (capacidad quelante).

## 7. Materiales y Métodos

### 7.1 Estrategia experimental



## **7.2 Elaboración de los extractos**

Para la elaboración de los extractos, se utilizaron las partes aéreas (tallos y hojas) de la planta previamente deshidratadas y trituradas, de las cuales 253 g se maceraron en 2 L etanol por 48 hrs y posteriormente se destilaron a presión reducida en rotavapor, para la obtención del extracto. Este extracto fue utilizado para comprobar la actividad fotoprotectora de *B cordata*.

Un segundo extracto fue elaborado a partir de aproximadamente 1kg (988.90g) del material vegetal previamente deshidratado y triturado, los cuales fueron macerados en metanol y posteriormente destilados a presión reducida en rotavapor, para la obtención de sólidos totales así como del rendimiento de la extracción. Este extracto se utilizó para obtener la capacidad antioxidante del tepozán.

## **7.3 Barrido espectrofotométrico y HPLC**

Ambos extractos se sometieron a un barrido espectrofotométrico para comprobar que absorben en la región UV en un espectrofotómetro marca UNICO modelo 2800UV/VIS. El extracto metanólico fue sometido a una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un aparato HEWLETT PACKARD serie 1100, a través de una columna Discovery C18 con número de catálogo 504971 marca SUPELCO. La fase móvil consistió en una solución 4% (v/v) de tetrahidrofurano en acetonitrilo y 0.4% (v/v) de ácido fosfórico en agua con proporción 35:65. El flujo fue de 1ml/min a 23°C y 149 bar. El volumen de inyección fue de 20µl para cada muestra. El efluente se monitoreó a 350 nm para identificar fenil propanoides y flavonoides. Los compuestos se identificaron a partir de los tiempos de retención y las características espectrales contra los estándares vervascósido y linarina proporcionados por el Instituto de Química de la UNAM.

## 7.4 Evaluación de la actividad fotoprotectora *in vivo*

Los ratones hembras SKH-1 de 6 a 8 semanas de edad (Charles River) fueron mantenidos en el bioterio de las FES-Iztacala. Los animales se aclimataron durante una semana antes de realizar los experimentos manteniéndolos con agua y alimento (Purina Chow 5001) *ad libitum*, con un ciclo de 12 hrs de luz y 12 hrs de oscuridad, a una temperatura de 23 a 25°C y a una humedad relativa del 45-55%.

Los animales fueron divididos en cinco grupos y sometidos a diferentes tratamientos:

Grupo	Tratamiento Tópico	No. Animales
Testigo	Sin ninguna manipulación	2
Vehículo	200 µL de etanol	2
Irradiado	200 µL de etanol y expuestos a RUV	4
<i>Buddleja</i>	200 µL de <i>B. cordata</i> en etanol	5
Experimental	200 µL de <i>B. cordata</i> en etanol y expuestos a RUV	5

Cuadro 2. Tratamientos a los que fueron sometidos los ratones SKH-1 durante el experimento.

Los tratamientos se aplicaron 10 minutos antes de llevar a cabo la irradiación. Los animales que fueron sometidos a RUV se colocaron en cajas de acrílico especiales para la irradiación a 15 cm de separación de la lámpara de luz UV-B (312 nm, Spectroline EB-280C). La energía de irradiación a esta distancia es de 6.0 mJ/cm<sup>2</sup> (intensidad de campo 130 watt/m<sup>2</sup>) calculada con un radiómetro (Spectroline DM-300HA calibrado). Las lámparas fueron sistemáticamente alternadas para compensar o minimizar cambios en el flujo de las mismas. El tiempo de irradiación fue de 45 s. Los animales fueron expuestos a la RUV cada tercer día durante 15 días (9 exposiciones).

24 hrs después de la última exposición a la RUV, los animales fueron sacrificados en cámaras de CO<sub>2</sub>, y se tomaron las muestras de piel de la zona dorsal de cada uno de los animales para determinar si los tratamientos previenen el daño histológico sub-crónico causado por la RUV en la piel del ratón. Las muestras de piel se fijaron 24 hr en paraformaldehído al 2% en PBS, posteriormente fueron deshidratadas e incluidas en parafina.

Se realizaron preparaciones de cada muestra para ser teñidas con la tinción de rutina H-E (hematoxilina-eosina) y tinción de Masson para fibras de colágena. A cada muestra se le asignó una clave (sin tener ninguna relación con el grupo experimental al que pertenece) y se diagnosticó mediante lo establecido por Elder y cols., (1997), el cual toma en cuenta la presencia o ausencia de las afecciones así como el grado (leve, moderado o grave) de las mismas. Además, en este trabajo se tomó en cuenta la extensión de las alteraciones tomando en cuenta el número de campos en el que se observaban las alteraciones siguiendo el siguiente criterio: focal, 1-3 campos; multifocal 4-6 campos; difuso 7-10 campos.

Así mismo se realizó un conteo de células de quemadura tomando en cuenta su morfología, para comprobar si el extracto disminuía su producción en la epidermis al inducirlas con RUV. El conteo se realizó a 400 aumentos seleccionando 10 campos por corte al azar. Una vez realizado el conteo se obtuvo el promedio de células de quemadura por campo a 400 aumentos de cada corte. A partir de estos datos se realizó un análisis estadístico mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de  $p < 0.05$  utilizando el programa Microsoft Excel 2007.

## 7.5 Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*

- a) La cuantificación de fenoles totales presentes en el extracto se llevó a cabo mediante el método Folin-Ciocalteu (Singleton y cols., 1999). Este método consiste en la reducción del arsenomolibdato (reactivo de Folin) por parte del fenólico cambiando la coloración del reactivo (de amarillo a azul).
- b) La capacidad antioxidante se determinó mediante el radical DPPH•. En éste método, se realiza una solución de radical difenil-picril-hidrazilo (DPPH•) en metanol y se le añade el extracto en dilución. Si el extracto tiene capacidad antioxidante neutralizará el radical DPPH, el cual al ser reducido torna de color morado a amarillo (método de Brans-Williams, 1995).
- c) La habilidad del extracto por atrapar el radical superóxido se obtuvo por el método de Nishikimi y cols, (1972). En éste método se utiliza metosulfato de fenazina (PMS, por sus siglas en inglés), dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH, por sus siglas en inglés) y nitro azul de tetrazolio (NBT, por sus siglas en inglés) en solución de buffer de fosfatos. El NADH reduce al PMS quien al reaccionar con el oxígeno produce radical superóxido, éste al reaccionar con al NBT lo reduce tornando la coloración de la solución de amarilla a azul. Si el extracto es capaz de neutralizar a radical superóxido evitará la reducción del NBT.
- d) La capacidad del extracto de neutralizar al radical hidroxilo se determinó por el método de Halliwell y cols., (1987). Este método consiste en una solución de peróxido de hidrógeno, cloruro férrico, 2-deoxi-D-ribosa y etilen-diamino tetrazolio (EDTA). Los dos primeros al reaccionar producen radical hidroxilo, el cual degrada la 2-deoxi-D-ribosa formando una mezcla de productos que en calor forma malonaldehido (MDA); éste junto con el ácido tiobarbitúrico en condiciones ácidas, forman un compuesto cromóforo rosa. Si el extracto puede neutralizar al radical hidroxilo evita la oxidación de la 2-deoxi-D-ribosa y por ende la formación del cromóforo.

- e) La capacidad quelante del extracto se determinó por medio del método de Yamaguchi y cols. (2000). En este método la reacción de bpirridil con  $\text{Fe}^{2+}$  produce coloración rosa. Cuando el extracto es capaz de atrapar iones metálicos evitará la coloración de la solución.

El ácido gálico se ocupó como control positivo en todas las pruebas debido a que es un compuesto con alta capacidad antioxidante y es utilizado por múltiples autores como control positivo en este tipo de ensayos (Singleton y cols., 1999; Wang y cols., 2007; Thounaojam y cols., 2010).

El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de  $p < 0.05$  utilizando el programa Microsoft Excel 2007 y confirmado por el programa SPSS 12.

## 8. Resultados y Discusión

### 8.1 Extracción y caracterización

El tepozán se recolectó en Ciudad Universitaria en el Valle de México el 5 de marzo de 2010. Una parte del material vegetal fue destinado para su identificación así como para su conservación, siendo determinado como *Buddleja cordata* H.B.K. por la M. en C. Edith López Villafranco. Se le asignó el número de registro 42663 IZTA en la Colección Científica del Herbario Iztacala.

#### 8.1.1 Rendimiento

El resto del material vegetal se desecó para la obtención del extracto por maceración. En cuanto a la preparación del extracto etanólico se inició con 253g de las partes aéreas de *B. cordata* previamente desecadas lográndose 29.55 g de extracto y por lo tanto un porcentaje de rendimiento de 11.6% en tanto que para la partición hexánica se obtuvieron 4.57g y un 1.81% de rendimiento. Para el extracto metanólico se partió de 988.90 g de la planta seca, de los cuales se obtuvieron 154.9 g de extracto correspondiendo a un 15.66% de rendimiento en la extracción; mientras que para la partición hexánica se obtuvieron 29 g (2.93% de rendimiento).

El rendimiento de una extracción nos indica que tan eficiente fue el proceso con relación al solvente utilizado y también cuál es la proporción más representativa de los compuestos pertenecientes a esa planta. Por ejemplo Mesa y cols. (2011) reportaron distintos porcentajes de rendimiento para los diferentes extractos obtenidos en *Pipper piedecuestanum* siendo el extracto metanólico el que presentó un mayor rendimiento como en el presente trabajo. Los datos presentados en el presente trabajo indican que *B. cordata* sintetiza una cantidad alta de compuestos polares.

Las plantas contienen más de 100,000 constituyentes naturales conocidos, de los cuales una gran parte son considerados fito-farmacéuticos valiosos. La cantidad de compuestos en estos organismos varía considerablemente dependiendo no sólo de la especie, sino de la

parte del material vegetal empleado, la temporada del año en que fue recolectada, así como de las condiciones ambientales que prevalecen durante la época de crecimiento por ejemplo la incidencia de patógenos, el ataque de insectos y herbívoros. Es por ello que la química de los productos naturales envuelve muchos estudios relacionados con la biosíntesis, el aislamiento y la determinación de estructuras (Cseke y cols., 2006).

En un estudio fitoquímico realizado en *B. scordioides* se realizó la extracción utilizando tres solventes de diferente polaridad: hexano cloroformo y metanol siendo el extracto metanólico el que mostró el mayor rendimiento (Avila 2002). En otro estudio, a partir de *B. myriantha*, *B. asiatica*, *B. globosa*, *B. yunanesis*, *B. globosa* y *B. officinalis* se extrajeron los metabolitos utilizando los solventes cloroformo y metanol, siendo este último el que presentó un rendimiento más elevado en las especies mencionadas (Liao y cols., 1999), coincidiendo con lo obtenido en el presente trabajo.

### **8.1.2 Absorción en UV**

Para corroborar que el tepozán posee compuestos capaces de absorber la RUV, se realizó un barrido de los extractos en el espectrofotómetro UV-VIS, en el cual se comprobó que el extracto metanólico absorbe en las tres regiones de la RUV, mientras que la partición hexánica solamente en las regiones A y C como se muestra en el cuadro 3.

<b>Extracto</b>	<b><math>\lambda</math> (nm)</b>	<b>Región UV</b>
<b>Metanólico</b>	<b>324</b>	<b>UVA</b>
	<b>290</b>	<b>UVB</b>
	<b>225</b>	<b>UVC</b>
	<b>220</b>	<b>UVC</b>
<b>Hexánico</b>	<b>320</b>	<b>UVA</b>
	<b>280</b>	<b>UVC</b>
	<b>225</b>	<b>UVC</b>

Cuadro 3. Longitud de onda de los picos máximos de absorción en la región de la RUV de los distintos extractos así como la región a la que pertenecen.

Por otro lado, el extracto etanólico sólo presentó dos picos máximos de absorbancia siendo de 282nm y 380nm correspondientes a las regiones B y A de la RUV respectivamente.

La RUV es una forma de energía correspondiente al espectro electromagnético cuyas unidades de cuantos o paquetes de energía son llamados fotones; los cuales pueden ser absorbidos por los electrones de ciertas moléculas lo que genera que pasen de un estado basal a uno excitado. Cualquier molécula que absorbe la energía de un fotón se le conoce como cromóforo, este proceso fotoquímico está determinado por la energía del fotón, es decir, la longitud de onda (Biset y cols 1990).

Los resultados obtenidos muestran la presencia de sustancias cromóforas a la RUV los cuales tienen la característica de poseer: dobles enlaces conjugados con grupos carbonilos y/o anillos aromáticos, es decir, poseen sistemas de enlaces  $\pi$  (pi) conjugados. Cuanto mayor sea el número de insaturaciones o de sustituyentes sobre el sistema conjugado, mayor será el desplazamiento del pico de absorción hacia longitudes de onda mayores como el visible (Ege, 1998).

Para el género *Buddleja* se ha reportado la presencia de los siguientes compuestos:

**Sesquiterpenos:** Buddledinas A, B, C, D y E; dihidrobuddleina A; zerumbona.

**Diterpeno:** 11,14-dihidroxi-8,11,13-abietatrien-7-ona.

**Triterpenos:**  $\beta$ -amirina,  $\beta$ -amirina acetato, 11-ceto- $\beta$ -amirina glutinol,  $\delta$ -amirina, ester de crocetina.

**Esteroles:** sitosterol, condriasterol, estigmasterol.

**Flavonoides:** linarina, kaempferol, quercetina, luteolina, 6-hidroxluteolina, rutina, acacetin, escutellareina-7-O-glucósido, pectolinarigenina, salvigenina, acacetin-7-O-rutinósido, quercetin-3-O-rutinósido.

**Fenil etanoides:** calceriósido, campneósido, equinacósido, forsitísido B, angorosido A, siringina.

**Fenil propanoides:** ácidos caféico, ferúlico y  $\rho$ -coumárico, éster metílico de ácido felúrico, verbascósido, coniferaldehído, americanina A, balanofonina, buddlenol A, B, C, D, E y F, orobránchido, buddlenoides A y B, leucosceptósido A y B, martinósido, jionósido, angorósido.

**Iridoides:** aucubina, catalpol, metilcatalpol.

**Azucares:** manitol.

**Saponinas:** Buddlejasaponinas A y B.

También se ha reportado la presencia de lignanos (Ortiz, 1996; Liao y cols., 1999; Avila, 2002). De acuerdo a su estructura, los grupos de compuestos que son capaces de absorber la RUV son los fenilpropanoides así como los feniletanoides y los flavonoides. Los cuales podrían estar presentes en el extracto metanólico de *B. cordata*.

En cultivos celulares de *B. cordata* Estrada-Zuñiga y colaboradores (2009) obtuvieron el fenil propanoide conjugado verbascósido, el flavonoide linarina y los ácidos hidroxycinamicos: *p*-coumárico, caféico, felúrico y sinápico.

### **8.1.3 Cuantificación de los metabolitos principales en HPLC**

En este trabajo mediante HPLC se evidenció la presencia de verbascósido en el extracto metanólico, cuantificándose la cantidad de 285.38 mg/g del mismo; que corresponde a un 28.53%.

Al realizar la partición hexánica se obtuvo un precipitado blanquecino de 8.05 g, correspondiendo al 0.81% del rendimiento de la extracción. Posteriormente se realizó una cromatografía en capa fina en paralelo con linarina, pues se ha reportado que se encuentra en *Buddleja* en altas concentraciones (Avila, 2002). Además esta sustancia presentó un pico máximo de absorbancia y un punto de fusión idéntico al reportado para este compuesto. Al correr la cromatografía se observó que ambas sustancias (la linarina y el precipitado) obtuvieron el mismo  $R_f$ , tratándose muy probablemente del mismo compuesto. Una vez hecho esto, se realizó un HPLC de ambas sustancias confirmando mediante este método la identidad de la linarina, pues coincidió el pico máximo en tiempo de retención. Así también se determinó su cantidad en el extracto obteniéndose 72.77 mg/g y por lo tanto existiendo un 7.27% de rendimiento (Ver apéndice).

La presencia de verbacósido y linarina en el extracto metanólico de *B. cordata* pueden explicar la capacidad de absorber en el espectro UV ya que poseen sistemas de dobles enlaces conjugados entre el anillo aromático y una doble ligadura exocíclica típicos de fenil propanoides y de flavonoides (Ver apéndice).

## 8.2 Evaluación de la actividad fotoprotectora *in vivo*

Para la evaluación de la actividad fotoprotectora del extracto, se utilizaron ratones SKH-1, los cuales se caracterizan principalmente por la ausencia de pelaje, que es debida a una mutación autosómica recesiva en el alelo *hr*, aunque también se ha reportado que esta alopecia es causada por la presencia de un retrovirus integrado en el exón 6 del gen *hr* resultando en un corte y empalme aberrante en el 95% de las transcripciones de *hr*. La proteína Hr reprime la expresión de marcadores de diferenciación de queratinocitos progenitores promoviendo el desarrollo de folículos pilosos (Benavides y cols., 2009).

La epidermis de los ratones SKH-1 no presenta grandes diferencias en comparación con el murino velludo, sin embargo tanto la dermis como la hipodermis de los primeros es más gruesa, probablemente para la conservación del calor debido a la ausencia de pelaje (Crew & Mirskaia, 1932). Histológicamente, existen 2 anomalías características en la piel del ratón SKH-1: la primera es el utrículo que es una estructura ampuliforme revestida por epitelio hiperqueratótico y conectada a la superficie de la piel, pareciendo surgir del infundíbulo del eje del pelo; la segunda es el quiste dérmico, el cual está localizado en dermis profunda y no se encuentra conectado con la epidermis suprayacente, está revestido por epitelio queratinizado y contiene cebocitos en la pared. El quiste puede derivarse de las células progenitoras del bulbo piloso que experimentan un fracaso en la diferenciación de la glándula sebácea (Benavides y cols., 2009), el quiste así formado, proviene de la degeneración de la glándula sebácea.

El murino SKH-1 es el modelo preferido para estudios relacionados con RS y RUV como estudios de fotoprotección, fotodaño, fotocarcinogénesis, fotoenvejecimiento, fotoinmunosupresión, fotosensibilizadores, entre otros; debido en gran parte a la ausencia de pelaje, a su tamaño y fácil manejo, pero sobre todo porque generan una respuesta eritema-edema similar a humanos e incluso, histológicamente el desarrollo de tumores de piel es aún más similar (Kim y cols., 2003). Sin embargo, tomando en cuenta otros parámetros moleculares característicos de daño por RUV como factor de necrosis tumoral (TNF) que no incrementa su expresión y glucosaminoglicanos (GAGs) que aumenta su cantidad pero no iguala en el curso del tiempo en SKH-1. Por lo que este tipo de ratón no es el modelo más parecido al humano (Sharma y cols., 2011).

### **8.2.1 Grupo testigo**

En el presente estudio se observó en cada uno de los grupos de ratones SKH-1 la presencia de utrículos, células de quemadura así como la de células gigantes debido a la degradación de glándulas sebáceas y folículos pilosos además de la presencia de quistes sebáceos en dermis reticular característicos de estos animales (Crew y Mirskaia, 1932; Montagna y cols., 1952), estas características se muestran en la figura 1.

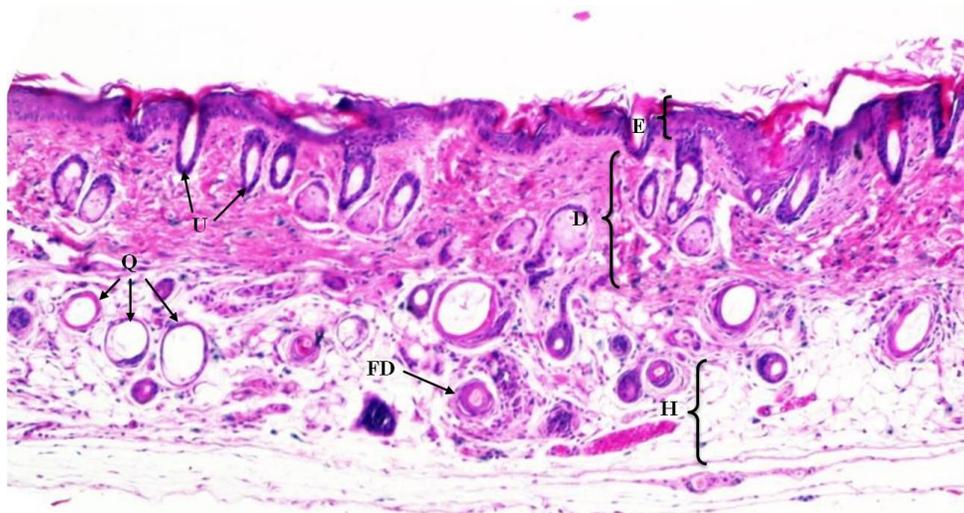


Figura 1. Características histológicas de piel de ratón SKH-1. Simbología: Q, quistes; U, utrículos; FD, folículo en degradación; E, epidermis; D, dermis; H, hipodermis. Tinción H-E. 100 aumentos.

Al realizar la evaluación histológica de los distintos grupos, se observó en el grupo testigo, zonas con hiperplasia, hipertrofia y edema, así como congestión de vasos, todos ellos de grado leve y extensión focalizada (figura 2); de igual forma que en los demás grupos. Los daños observados en el grupo testigo no se mencionarán más adelante.

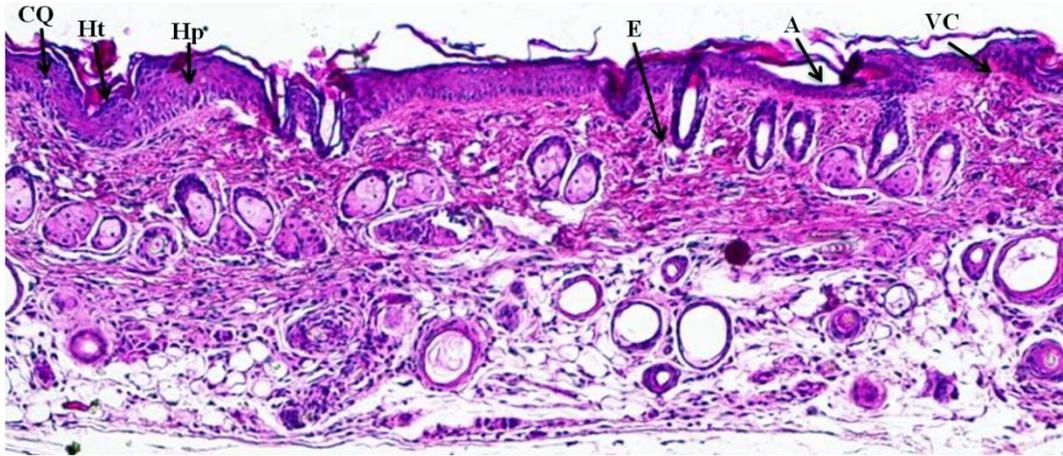


Figura 2. Corte histológico de piel de ratón SKH-1 del grupo testigo. Simbología: CQ, célula de quemadura; Ht, hipertrofia; Hp, hiperplasia; E, edema; A, atrofia; VC, vasos congestionados. Tinción H-E. 100 aumentos.

Sin embargo, tanto en el grupo testigo como en los demás grupos se observaron zonas con prolongaciones epidérmicas hiperplásicas, (la mayoría además con hipertrofia), algunas incluso presentaban dermis secuestrada entre epidermis. A estas formaciones dermo-epidérmicas se les denominará a partir de este punto pólipos fibroepiteliales debido a su parecido histológico con el fibroma péndulo (Moreno y cols., 2007). Cabe mencionar que estas formaciones no han sido reportadas para el tipo de ratón SKH-1.

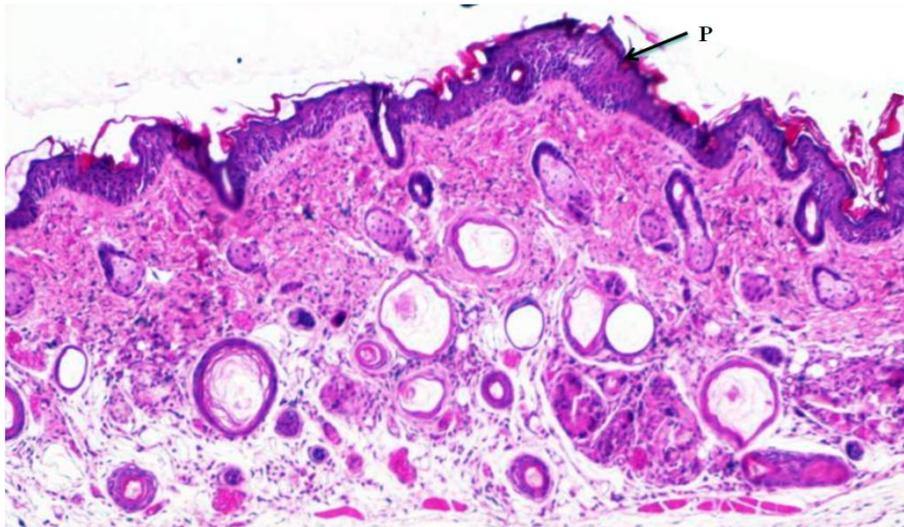


Figura 3. Corte histológico piel de ratón SKH-1 del grupo testigo. Simbología: P, pólipo fibroepitelial. Tinción H-E. 100 aumentos.

### **8.2.2 Grupo vehículo**

El grupo tratado con etanol presentó zonas hiperplásicas multifocales con tendencia a formación de pólipos fibroepiteliales así como pólipos fibroepiteliales focalizados, células con vacuolización focales (células con degradación hidropica), edema leve a moderado difuso y congestión leve multifocal (figura 3).

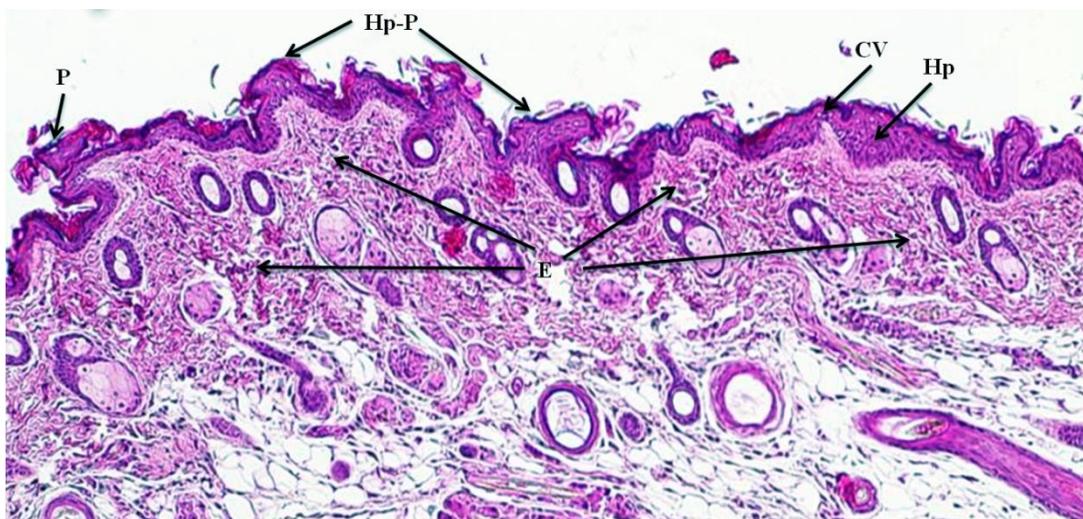


Figura 4. Corte histológico piel de ratón SKH-1 del grupo vehículo. Simbología: P, pólipo fibroepitelial; Hp-P, hiperplasia con tendencia a pólipo fibroepitelial; Hp, hiperplasia E, edema; CV, células con vacuolización. Tinción H-E. 100 aumentos.

El etanol por sí solo no presenta efectos perjudiciales en los tejidos, debido a ellos su amplio uso en la farmacia, la cosmética y la gastronomía. Sin embargo, el etanol como cualquier xenobiótico es metabolizado por la célula para su eliminación, así el alcohol puede ser metabolizado por tres vías: a) Alcohol deshidrogenasa (ADH) en el citosol; b) sistema microsomal etanol-oxidante (MEOS) en el retículo endoplásmico; c) a través de catalasa en los peroxisomas. El principal mecanismo es el primero mencionado, ADH transforma etanol en acetaldehído valiéndose de NAD como cofactor. La segunda ruta nombrada es citocromo dependiente, utiliza NADH y  $O_2$ , es de alta velocidad y sólo se activa cuando hay altas concentraciones de etanol en torrente sanguíneo. En la tercer vía citada, la catalasa oxida etanol en presencia de  $H_2O_2$  y su contribución a la eliminación de etanol no es significativa (Lieber y cols., 1987).

La piel tiene una alta capacidad de oxidación de etanol pues es el mayor reserva de alcohol deshidrogenasa (ADH) extrahepática (Brand y Jendrzewski, 2008). El producto de esta, el acetaldehído, posee varios efectos adversos en el organismo, pues reacciona con grupos aminos y grupos sulfhidrilo, principalmente de hemoglobina y proteínas microsomales, induce entrecruzamientos de ADN y se encuentra asociado a intercambios entre cromátides hermanas; en la mitocondria existe una reducción de citocromo a y b, baja la actividad de succinato deshidrogenasa así como la capacidad respiratoria; en el citosol reduce los niveles de glutatión, incrementa la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favoreciendo la lipoperoxidación, se une a la tubulina alterando su polimerización y provocando el rompimiento de microtúbulos y la acumulación de vesículas secretoras (Lieber y cols., 1987). Es probable que debido a esto último, se hayan observado la vacuolización de células en el grupo vehículo (figura 5).

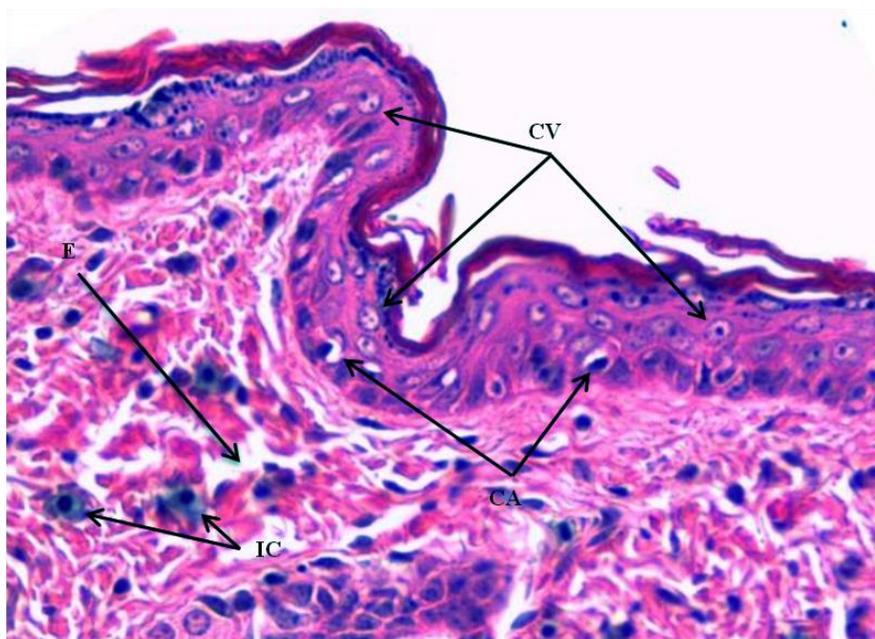


Figura 5. Corte histológico piel de ratón SKH-1 del grupo vehículo. Simbología: CV, células vacuolizadas; CA, células apoptóticas; E, edema; IC, infiltrado celular. Tinción H-E. 400 aumentos.

El etanol induce vasodilatación, y que esta mediada principalmente por mecanismos centrales de control vasomotor (Malpas y cols., 1990). Así mismo, se ha mostrado que el etanol inhibe la vasoconstricción causada por agonistas neurohumorales (como catecolaminas, angiotensina y vasopresina) sugiriendo una disminución directa en las células del músculo liso vascular posiblemente por interferencia con la traslocación del Ca<sup>2+</sup> (Altura y cols., 1979).

Así, el etanol induce un aumento en el flujo sanguíneo, se promueve la difusión del fluido vascular al tejido provocando edema y congestión de vasos sanguíneos como el observado en los ratones tratados con etanol en el grupo vehículo (figura 3).

### **8.2.3 Grupo irradiado**

El grupo irradiado mostró hipertrofia del estrato espinoso así como del granuloso y atrofia leve a moderada multifocal (figura 6) y zonas de hiperplasia focales-multifocales con tendencia a la formación de pólipos como en el vehículo así como edema leve multifocal (figura 7).

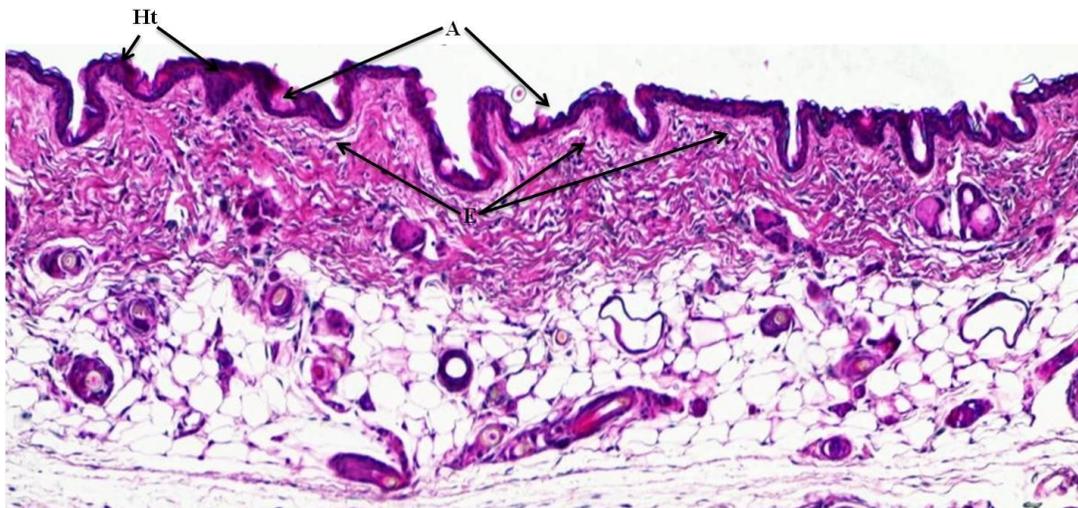


Figura 6. Corte histológico piel de ratón SKH-1 del grupo irradiado. Simbología: Ht, hipertrofia; A, atrofia; E, edema. Tinción H-E. 100 aumentos.

Ha sido documentado que la RUV produce el engrosamiento epidérmico, e incluso se sugiere que esta hiperplasia o hipertrofia es un mecanismo adaptativo de la piel para la fotoprotección (Walker y cols., 2005); no obstante en el presente estudio también se observó atrofia del epitelio. La atrofia encontrada (figura 6) no concuerda con estudios anteriores (Bissett y cols., 1987; Sharma y cols., 2011), pues estos reportan un engrosamiento epidérmico uniforme, sin embargo hay que tomar en cuenta que en dichos estudios se utilizaron dosis de irradiación mayores siendo de  $60 \text{ mJ/cm}^2$  y  $100 \text{ mJ/cm}^2$  respectivamente, y en el caso del primer citado un mayor número de exposiciones (siendo de 18-45).

Gracias a que las lámparas utilizadas en estos experimentos poseían una mayor potencia de irradiación, la piel de los ratones SKH-1 estuvo expuesta a un mayor daño y debido a ello, la piel de los animales utilizados en estos experimentos tuvo en proporción una mayor oportunidad de respuesta adaptativa a las condiciones a las que fue sometida.

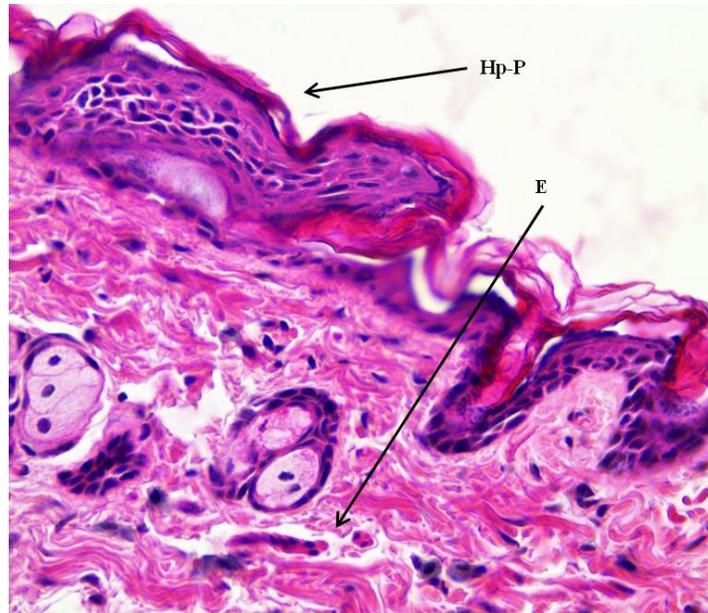


Figura 7. Corte histológico de piel de ratón SKH-1 del grupo irradiado. Simbología: Hp-P, hiperplasia con tendencia a pólipo fibroepitelial; E, edema. Tinción H-E. 400 aumentos.

A pesar de que al grupo irradiado se le aplicó etanol al igual que el grupo vehículo, el primero presentó edema en menor extensión que el segundo: Esto se le puede atribuir a la acción inmunosupresora de la RUV, la cual provoca la isomerización del ácido urocánico (UCA por sus siglas en inglés) de la forma *trans* a *cis*, que actúa por diferentes mecanismos: mediada por activación del receptor de serotonina 5-HT<sub>2A</sub> promoviendo la activación de mastocitos y la liberación de citocinas proinflamatorias, o activando a mastocitos estimulando la liberación de factor activador de plaquetas (PAF por sus siglas en inglés) y activando la cascada de citocinas responsables de la inmunosupresión, otro mecanismo por efecto indirecto es al estimular los nervios periféricos que expresan receptor 5-HT<sub>2A</sub> a producir neuropéptido que activa a los mastocitos (Walterscheid y cols., 2006).

Se ha estudiado también que el *cis* UCA eleva la producción de interleucina 10 (IL-10) de las células T activadas por CD4<sup>+</sup>. La IL-10 inhibe la función de células presentadoras de antígenos (APC por sus siglas en inglés) de la epidermis así como la producción de citocinas Th1 que modulan la acción de APC e induciendo anergia antígeno específica en las células T, suprimiendo así la respuesta inmune. El *cis* UCA también induce un aumento en la síntesis de TNF $\alpha$  que suprime a las células de Langerhans (Holán y cols., 1998). Así, es probable que la inmunosupresión provocada por la RUV atenúe los efectos provocados por el etanol. Por otro lado, las RUV-B tiene un grado de penetración muy pequeño en la dermis, provocando la mayor parte del daño en la epidermis (Walker y cols., 2005).

#### **8.2.4 Grupo *Buddleja***

El grupo tratado con *Buddleja* se caracterizó por presentar pólipos fibroepiteliales pequeños de extensión multifocal y pólipos fibroepiteliales más grandes de extensión focal (figura 8).

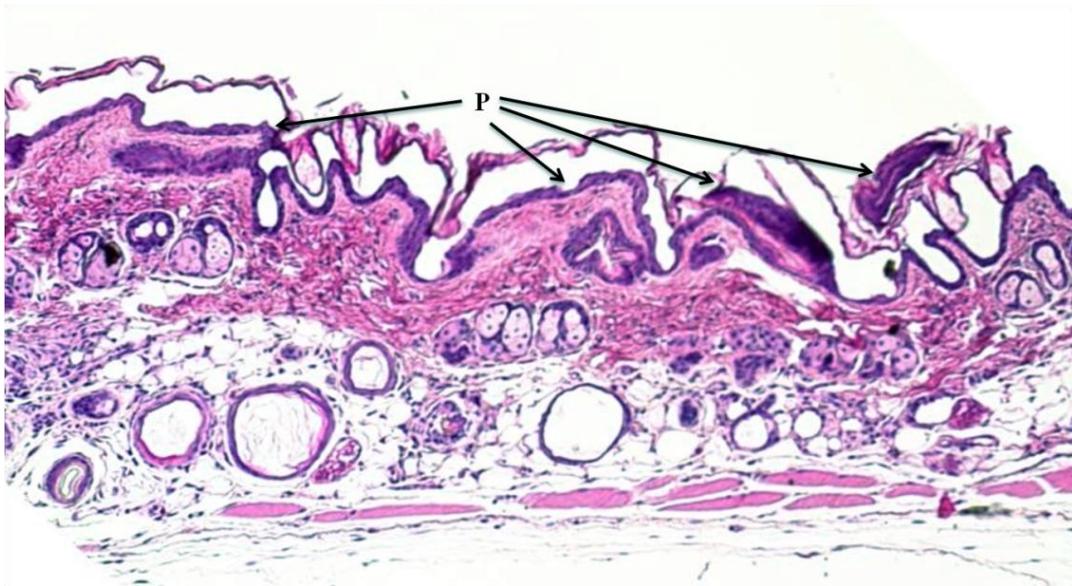


Figura 8. Corte histológico piel de ratón SKH-1 del grupo *Buddleja*. Simbología: P, pólipos fibroepiteliales. Tinción H-E. 100 aumentos.

Como se puede apreciar en la figura 8, en el grupo tratado con *Buddleja* no se aprecian diferencias notables en comparación con el testigo a excepción de la presencia de las prolongaciones epidérmicas hiperplásicas mencionadas anteriormente. Las cuales tienen cierta semejanza con acrocordones, que son lesiones exofílicas pedunculadas o filiformes constituidas por un acumulo pseudotumoral de estroma. Estas formaciones no son neoplasias verdaderas, son hiperplasias localizadas de tejido dérmico (Moreno y cols., 2007).

Puesto que el extracto de *Buddleja* se aplicó disuelto en etanol, el grupo tratado con el extracto no presentó edema como el observado en el grupo vehículo, posiblemente debido a la actividad antiinflamatoria por parte del extracto. Apablaza (2006) evaluó la actividad antiinflamatoria de *Buddleja globosa* Hope, planta del mismo género que la evaluada en el presente trabajo pero recolectada en diferentes temporalidades y experimentada en ratones tipo CF-1, encontrando que el extracto recolectado en verano tuvo un mayor porcentaje antiinflamatorio tópico que el recolectado en otoño.

Uno de los constituyentes de los extractos de plantas de polaridades altas, son los flavonoides, a los cuales se les han atribuido distintas propiedades como antimicrobianas, antitumorales, antitrombóticas, antiinflamatorias, entre otros. Algunos de ellos han mostrado inhibir la inflamación crónica en modelos animales. Además de su actividad antioxidante, estos compuestos pueden regular la actividad de células del sistema inmune como macrófagos, linfocitos y neutrófilos. También, se ha documentado que ciertos flavonoides inhiben la liberación de histamina de mastocitos mientras que otros inhiben la proliferación de linfocitos T, algunos de ellos modulan la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo del ácido araquidónico como la fosfolipasa A2, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa y las implicadas en la síntesis del óxido nítrico (NO) como la óxido nítrico sintetasa (NOS). La inhibición de cualquiera de estas enzimas por los flavonoides reduce la producción de ácido araquidónico, las prostaglandinas, leucotrienos y NO que son mediadores cruciales de la inflamación (Kim y cols., 2004).

Por otro lado, Martínez-Vázquez M. y cols., (1998) realizaron un estudio comparativo de la actividad analgésica y antiinflamatoria entre los flavonoides pectolarina y linarina, aislados de las plantas *Cirsium subcoriaceum* y *Buddleia cordata* respectivamente. Encontrando que la linarina resultó ser un agente antiinflamatorio más efectivo que la pectolarina e incluso mayor que el control indometacina, sin embargo pectolarina tuvo un mayor efecto analgésico que linarina. Debido a lo anterior, es probable que este flavonoide cuya presencia fue evidenciada en el presente trabajo, haya inhibido el edema provocado por el etanol (figuras 4 y 8).

### **8.2.5 Grupo experimental**

Por último, los ratones del grupo experimental que fueron tratados con *B. cordata*, presentaron atrofia e hiperplasia focales asociados a la formación de pólipos fibroepiteliales así como pólipos fibroepiteliales de extensión multifocal como en el grupo antes mencionado (figura 9).

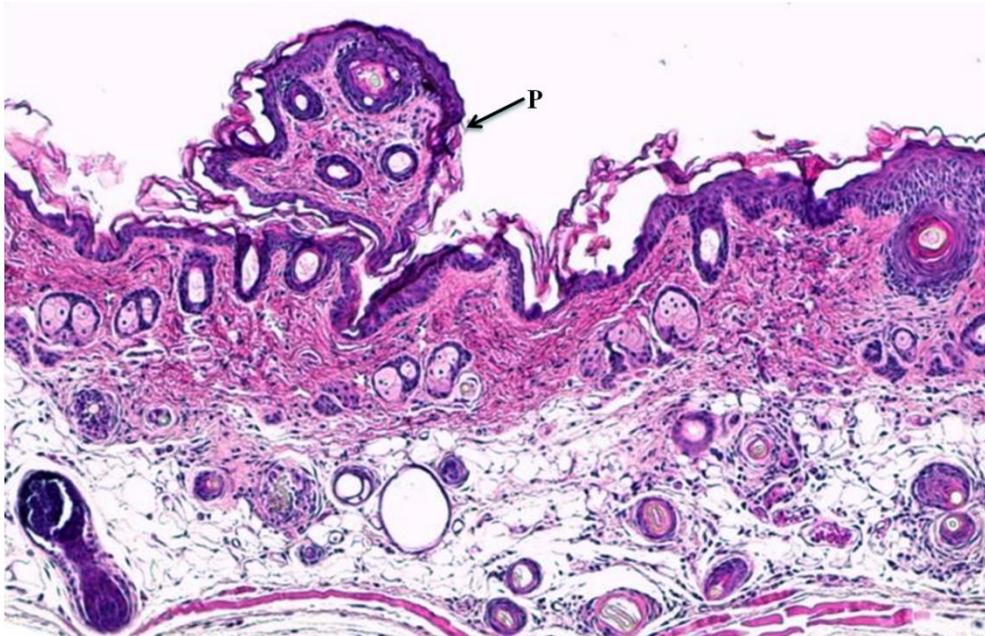


Figura 9. Corte histológico piel de ratón SKH-1 del grupo experimental. Simbología: P, pólipo fibroepitelial. Tinción H-E. 100 aumentos.

De igual forma que en el grupo anterior, el extracto de *Buddleja* se aplicó disuelto en etanol. Se ha reportado que este vehículo actúa directamente en la piel incrementando la fluidez lipídica, permitiendo una mayor difusión y particionando para permeantes hidrofílicos. (Kownatzki, 2003). Gracias a estas propiedades el etanol, es ampliamente usado en la farmacia (Porrás-Luque, 2007). No obstante, debido a su función como solvente orgánico, esta sustancia disuelve los lípidos del estrato córneo, que al evaporarse, aunque los lípidos permanezcan ahí, no reasumen el arreglo original que le provee la función de sellado a la piel y por tanto, destruye la barrera impermeable conllevando a la pérdida de agua transepidermal o como se conoce comúnmente, resequedad de la piel (Kownatzki, 2003).

Así, al disolver los lípidos del estrato córneo, el etanol aplicado a los grupos *Buddleja* y experimental, facilita la difusión de los compuestos contenidos en el extracto a través de la piel. De este modo, las moléculas presentes en el extracto interactúan con las células epidérmicas, que reaccionan con estas provocando los daños mostrados en la figura 8 y 9.

Al contrastar los distintos grupos, es notable que hay diferencias uno con respecto al otro. En resumen, grupo vehículo se caracterizó por presentar edema mientras que el grupo irradiado mostró atrofia e hipertrofia, el grupo *Buddleja* expuso pólipos fibroepiteliales al igual que el grupo experimental. Así, al comparar los grupos expuestos a RUV (grupo irradiado y experimental) se observó que el grupo experimental no mostró ninguno de los daños presentados en el grupo irradiado.

De igual forma se han realizado estudios para evaluar el efecto fotoprotector de extractos de plantas contra RUV como el realizado por Petrova y cols., (2011) quienes irradiaron la piel de ratones SKH-1 previamente tratados tópicamente con extracto etanólico crudo y fermentado de *Cyclopia* spp, así como sus metabolitos principales: hesperidina y mangiferina. Ambos extractos protegieron a la piel contra la inflamación y la proliferación celular, así como el daño oxidativo inducido por RUV, en tanto que los compuestos aislados de la planta no fueron tan efectivos en comparación con los extractos, sugiriendo un efecto sinérgico entre los compuestos de los extractos.

Otro estudio se realizó en piel de pacientes dañada con RUV y previamente tratada con ácido felúrico, un fenilpropanoide previamente reportado para *B. cordata*, en combinación de vitamina C y E, mostrando tener un efecto fotoprotector al reducir el eritema, el número de células de quemadura, la formación de dímeros de timina, la expresión de p53 y la expresión de RNAm de citocinas proinflamatorias (Murray y cols., 2008).

Como se mencionó en el apartado anterior, se evidenció mediante espectrofotometría la presencia de compuestos cromóforos a la RUV-B en el extracto etanólico de *B. cordata*. Así, la aplicación tópica de compuestos cromóforos o mezclas de ellos como el extracto, impide que los fotones de energía incidan en las biomoléculas de las células que son cromóforas para la RUV como el ADN evitando el daño.

La presencia de estos compuestos explica la eficacia del extracto al neutralizar los efectos perjudiciales de la RUV observados en el grupo irradiado (figura 6), pero induce la formación de pólipos fibroepiteliales (figura 9) por lo que no se puede afirmar que el extracto posee efecto fotoprotector.

Los pólipos fibroepiteliales son las neoplasias fibrosas cutáneas más frecuentes, pues afectan prácticamente al 50% de las personas (Cabanillas y cols., 2009). Sin embargo, este tipo de neoplasias benignas no han sido reportadas para el murino SKH-1, de modo que no podemos asegurar que se trate de una característica de este tipo de ratón. Por otra parte, los datos obtenidos en el presente trabajo parecen indicar que la aplicación tópica de sustancias presentes en el extracto de *B. cordata* a la piel del murino SKH-1 así como la exposición a la RUV, incrementa la aparición de las formaciones mencionadas (figura 7 y 8), sugiriendo una sinergia entre los compuestos embebidos en el extracto etanólico de *B. cordata* y los efectos causados por la RUV pues en el caso del grupo experimental, existe un aumento en el número y tamaño de pólipos fibroepiteliales.

### **8.2.6 Conteo de células apoptóticas**

Una característica de daño a la piel por radiación solar es la formación de células de quemadura (CQ) en la epidermis, que no es más que un queratinocito apoptótico luego de ser expuesto a RUV. Las CQ se observan como queratinocitos disqueratóticos con núcleo picnótico (Lowe y cols., 1997) como se muestra en la figura 10.

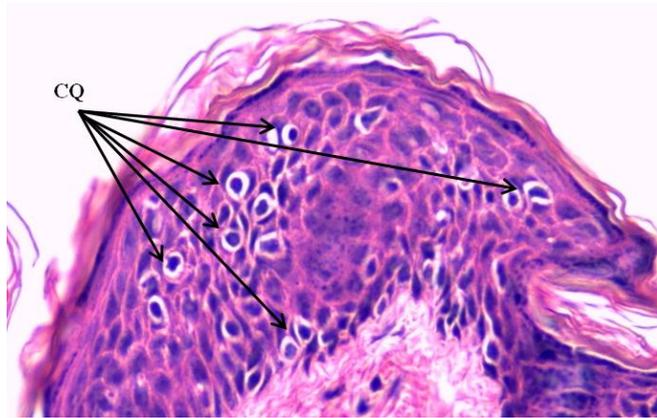


Figura 10. Morfología característica de las células de quemadura. Simbología: CQ, célula de quemadura. Tinción H-E. 400 aumentos.

Debido a que estas células presentan una morfología característica y se distinguen con cierta facilidad del resto de queratinocitos se procedió a realizar un conteo de estas en los distintos grupos. Los resultados del conteo se muestran en la figura 11.

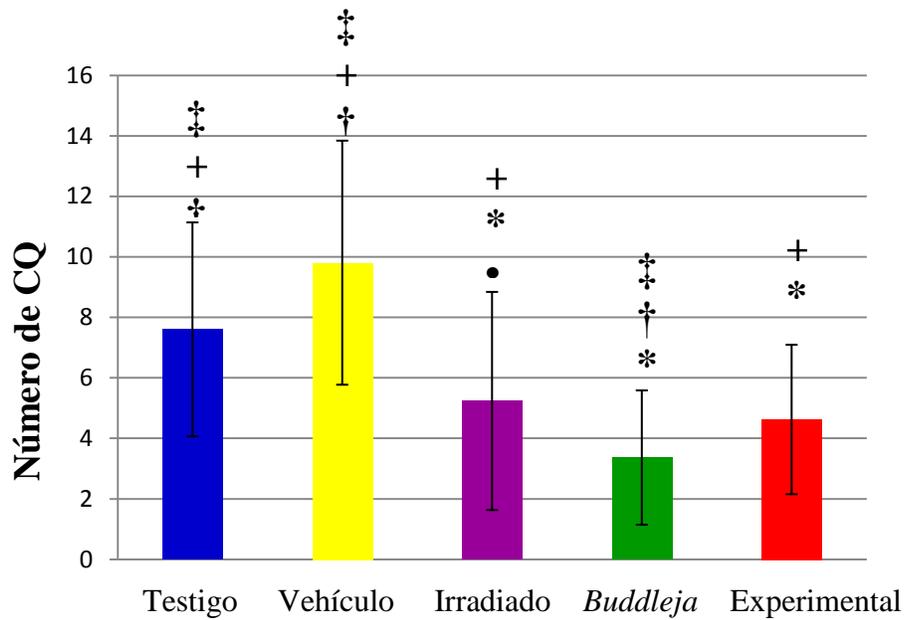


Figura 11. Número de células de quemadura (CQ) por campo a 400 aumentos por grupo. Simbología: • diferencias con testigo; \* diferencias con vehículo; † diferencias con irradiado; + diferencias con *Buddleja*; ‡ diferencias con experimental.  $p < 0.05$ .

Como se observa en la figura 11, el grupo testigo tuvo un número promedio de CQ de 7.6 por campo a 400 aumentos, en tanto que el grupo vehículo alcanzó el valor más alto siendo de 9.8 por campo a 400 aumentos, mientras que el grupo *Buddleja* logró el valor más bajo con una media de 3.3 por campo a 400 aumentos, obteniéndose diferencias significativas entre cada uno de los grupos mencionados. El grupo irradiado y el grupo experimental adquirieron promedios de 5.2 y 4.6 por campo a 400 aumentos respectivamente, no presentando diferencias significativas entre ambos.

La apoptosis o muerte celular programada (MCP) es la muerte de una célula mediada por genes que sigue un patrón ordenado de cambios morfológicos y bioquímicos y que no desencadena reacciones inflamatorias (Jordán, 2003; Chu y cols., 2005).

En la piel, la MCP actúa en la remodelación durante el desarrollo, la regulación de la cantidad de células y en la defensa contra células dañadas, infectadas o transformadas. Es por ello que la apoptosis tiene una elevada incidencia en la epidermis, principalmente por alteraciones en la cinética celular, en la diferenciación y en la cohesión. La diferenciación terminal de queratinocito a corneocito es una modificación de la MCP (Chu y cols., 2005).

Debido a los anterior, no es poco común encontrar este tipo de células en tejidos no dañados como lo obtenido en el grupo testigo (figura 11) puesto que la piel se encuentra en constante remodelación, ya que en todo organismo multicelular, debe existir un equilibrio entre la generación, la proliferación y la desaparición o muerte de las células que lo componen, con el fin de mantener un tamaño constante. La alteración de este equilibrio conduce a situaciones patológicas como el cáncer, cuando la proliferación aumenta, o las enfermedades degenerativas, cuando los procesos de muerte celular están incrementados (Jordán, 2003).

El grupo vehículo sin embargo, fue el que presentó un mayor número de células apoptóticas, esto podría explicarse gracias a los efectos adversos del etanol como lo reportó Neuman y cols., (2002) quienes trataron células epidermales de la línea A431 y células primarias neonatales de la piel con diferentes concentraciones de etanol y por diferentes periodos de tiempo. Encontrando que el etanol mostró ser citotóxico de forma dosis y tiempo dependiente e incrementó el porcentaje de células apoptóticas, así como la

liberación de la citocina factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y su expresión en las células. Al examinar las células tratadas con etanol al microscopio electrónico exhibieron daño de organelos, cromatina condensada y cuerpos apoptóticos. Sugiriendo que el etanol induce apoptosis en células de la piel por elevación de los efectos de TNF- $\alpha$ .

El grupo irradiado en cambio, obtuvo un valor promedio menor que el anterior mencionado a pesar de que también fue tratado con etanol, e incluso obtuvo una media menor que el testigo (figura 11). Como se mencionó con anterioridad, la RUV causa daño directo a DNA produciendo dímeros de pirimidina y fotoproductos 6-4 (Ichihashi, 2003).

Cuando el daño al ADN es muy severo y este no se puede reparar, se activan las vías apoptóticas para eliminar las células dañadas. El gen *p53* juega un importante papel en esta vía, cuya proteína induce apoptosis al sobreregular genes proapoptóticos como *Bax*, *Fas/Apo-1*, o por disminuir la expresión de genes supresores de apoptosis como *Bcl-2* (Matsumura y Ananthaswamy, 2004). Se ha reportado que a las 24 hrs post-irradiación existe una mayor incidencia de apoptosis (Lee y cols., 2003).

En este trabajo, los ratones irradiados fueron sometidos a 9 exposiciones de RUV cada 3er día, por lo que es probable se haya aumentado el índice apoptótico durante las exposiciones, pero al momento de hacer las observaciones al día 15, en el tejido se observó atrofia en el grupo irradiado (figura 6). Con esto se plantea que al finalizar la experimentación solo hayan permanecido las células menos susceptibles al daño. No obstante, no se cuentan con las suficientes evidencias para asegurar lo mencionado previamente.

Como se muestra en la figura 11, el grupo *Buddleja* fue el que presentó el menor valor promedio de CQ. Ciertos productos naturales de plantas son conocidos por inducir apoptosis en células neoplásicas pero no en células normales. Así mismo, se ha mostrado que los efectos citotóxicos de los fenoles sobre diferentes tumores están mediados por apoptosis. Por ejemplo el ácido gálico ha mostrado inducir MCP en varias líneas de células transformadas al inducir la generación e ROS, flujo de  $Ca^{2+}$  y la activación de calmodulina. Otro ejemplo es el ácido caféico que induce fragmentación de DNA, mientras otros

monómeros de fenilpropanoides como ácido felúrico y *p*-coumárico no presentan este efecto (Taraphdar y cols., 2001).

Así, es posible que los metabolitos del extracto no indujeran apoptosis debido a que las células en la piel de los ratones SKH- no estaban transformadas o que estas sustancias no posean esta capacidad. También es probable que los compuestos incluidos en el extracto induzcan la expresión de genes supresores de apoptosis, sin embargo, hacen falta estudios al respecto para sustentar esta idea.

Por último, el grupo experimental no presentó diferencias significativas con el grupo irradiado, sin embargo en el primero se observó un promedio ligeramente menor al segundo. Lo cual se lo podemos atribuir a los efectos producidos por el extracto y la RUV. En contraste con lo obtenido en el presente trabajo, Filip y cols., (2011) quienes irradiaron a ratones SKH-1 durante 10 días consecutivos a  $240\text{mJ}/\text{cm}^2$ , obtuvieron un incremento significativo en el número de CQ con respecto al control negativo y observaron una inhibición del 41% en el grupo pretratado con extracto hidroetanólico de semilla de uva.

Aún faltan más estudios para considerar el uso tanto comercial como terapéutico del extracto como los metabolitos secundarios de esta planta.

## 8.3 Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*

### 8.3.1 Cuantificación de fenólicos totales

La presencia de compuestos fenólicos se cuantificó mediante la prueba de Folin-Ciocalteu obteniéndose  $177.13 \pm 1.97$  mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto, y por lo tanto un 17.71% de fenólicos en el extracto.

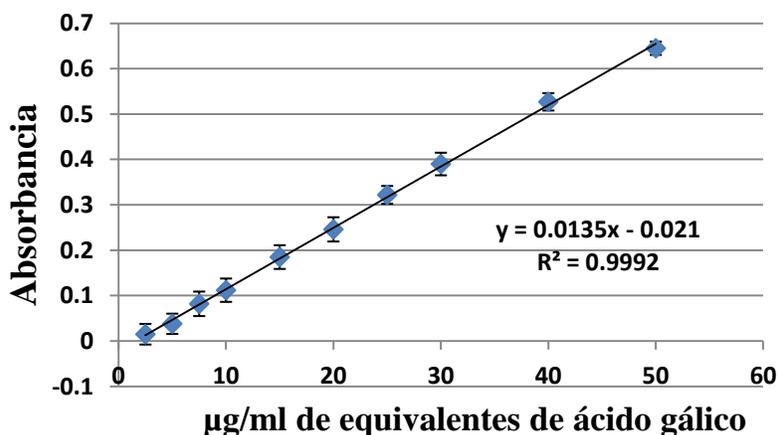


Figura 12. Curva patrón obtenida de la prueba Folin-Ciocalteu.

Mahlke y cols. (2009) obtuvieron en el extracto etanólico de *Buddleja thyrsoides* un total de  $214.07 \pm 3.6$  mg de equivalentes de ácido gálico/g, en tanto que Pan y cols. (2010) obtuvieron 113.56 mg/g de equivalentes de pirocatecol usando el método de extracción con microondas (MEB) y 100.94 mg/g de los mismos mediante la extracción con soxhlet (SEB) en *Buddleja officinalis*; ambas plantas del igual género que la utilizada en este trabajo. En comparación con los trabajos mencionados, es claro que *B. cordata* posee una menor cantidad de compuestos fenólicos que *B. thyrsoides* pero mayor que ambos extractos de *B. officinalis*.

Por otro lado, en un estudio realizado por Dudonné y cols. (2009) se compararon las propiedades antioxidantes y el contenido de fenólicos totales de 30 extractos de diferentes plantas de interés comercial mediante diferentes ensayos como ABTS, FRAP, SOD, y ORAC además de DPPH, obteniendo valores de 6.86 hasta 397.03 mg de equivalentes de

ácido gálico/g en las plantas evaluadas; estos datos indican que el extracto metanólico de *B. cordata* posee un valor intermedio con los reportados por éstos autores (figura 12).

Así Dudonné y cols. (2009), al correlacionar los datos obtenidos la prueba Folin-Ciocalteu con los porcentajes de inhibición alcanzados en las diferentes pruebas, comprobaron que existe una alta correlación entre el contenido total de fenólicos y los distintos ensayos realizados. Evidenciando de este modo, que existe una relación entre la concentración de compuestos fenólicos en la planta y su capacidad de neutralizar radicales libres así como reducir al hierro. Con todo lo anterior, podemos asumir que la cantidad de fenólicos presentes en el extracto metanólico de *B. cordata* (figura 12) le proporcionan capacidad antioxidante ante los radicales DPPH•, O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, HO•. Es por ello que se optó por cuantificar los compuestos fenólicos en el tepozán.

Un compuesto se considera como antioxidante cuando este es capaz de donar un electrón o un átomo de hidrógeno y prevenir o detener la oxidación de un sustrato oxidable actuando por distintas vías: quelando metales al prevenir la formación de RL, atrapando radicales libres, actuando como rompedores de cadena, es decir, deteniendo la propagación de RL), siendo parte de la red redox antioxidante, y/o regulando la expresión de genes (Packer, 2005). Las propiedades antioxidantes de los fenólicos están ligados a su estructura: uno o varios anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo (Roberfroid y Buc-Calderon, 1995). De modo que el grado de hidroxilación, la posición, la polaridad, la solubilidad y el potencial reductor, son los factores principales que influyen la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos (Dawidowicz y Olszowy, 2012). Así, podemos decir que no es solamente la cantidad de fenólicos presentes en el extracto del Tepozán sino el tipo de compuestos presentes en éste los que le confieren la actividad antioxidante, como por ejemplo la presencia de fenil propanoides, fenil etanoides y flavonoides.

La actividad redox de los compuestos fenólicos para neutralizar RL pueden ser por las siguientes vías: protón acoplado a la transferencia de electrón, transferencia del electrón seguida por el protón, transferencia del electrón por pérdida secuencial del protón, y

formación de aductos. El balance de estos mecanismos depende del ambiente de reacción (Dawidowics y Olszowy, 2012).

### **8.3.2 DPPH•**

El radical artificial 2,2-difenil-1picril hidrazilo (DPPH•) permite evaluar mediante espectrofotometría la propiedad antioxidante de un compuesto por medio de la donación de un electrón o un átomo de hidrógeno. Debido a que la concentración eficaz media (CE<sub>50</sub>) es definida como la concentración a la cual es disminuida la cantidad de radicales libres (RL) en un 50%, se considera que mientras más pequeña sea la cantidad de la sustancia utilizada mayor será su capacidad para neutralizar las ERO y por lo tanto tendrá un mayor potencial antioxidante (Brand-Williams y cols, 1994).

Como se puede apreciar en la figura 13, el extracto de *B. cordata* presentó la CE<sub>50</sub> más alta siendo de  $64.19 \pm 2.09$  µg/ml, mientras que los controles ácido ascórbico y ácido gálico fue de  $5.9 \pm 0.55$  µg/ml y  $2.6 \pm 0.12$  µg/ml respectivamente. Existen diferencias significativas entre cada una de las sustancias empleadas con una  $p < 0.05$ . El valor de CE<sub>50</sub> obtenido para la partición hexánica fue  $409.44 \pm 2.66$  (no presentado en la gráfica). Debido a este hecho, no se evaluó en las siguientes pruebas.

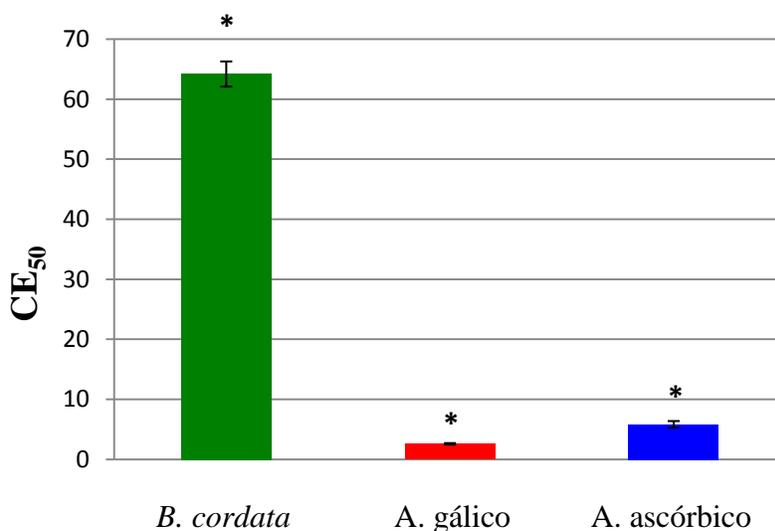


Figura 13. Concentración eficaz media (CE<sub>50</sub>) del extracto de *B. cordata* contra radical DPPH• en comparación con los controles positivos: ácido gálico y ácido ascórbico.\*  $p < 0.05$ .

Los radicales centrados en el nitrógeno como el DPPH•, reaccionan con los fenoles por 2 mecanismos: Abstracción directa del átomo e hidrógeno (protón acoplado a la transferencia de electrón) y transferencia de electrón del fenol o el anión fenóxido (transferencia del electrón por pérdida secuencial del protón) al DPPH•. La contribución de una u otra vía depende de la naturaleza del solvente y del potencial redox del compuesto. En solventes polares, como el utilizado en este trabajo (metanol), predomina la transferencia del electrón debido a la formación de puentes de hidrógeno con los compuestos fenólicos (Villaño y cols., 2007).

Como se observa en la figura 13, el extracto metanólico del tepozán presentó una  $CE_{50}$  de  $64.19 \pm 2.09 \mu\text{g/ml}$  contra el radical DPPH•. De la igual manera, se han realizado estudios de la actividad antioxidante de extractos de alta polaridad en diferentes especies del género *Buddleja* utilizando el método para reducir el radical DPPH•. Por ejemplo, en *B. thyrsooides*, se reportó una  $CE_{50}$  de  $186.04 \pm 10.8 \mu\text{g/ml}$  para el extracto crudo, (Mahlke y cols., 2009). Por otro lado, en *B. globosa* se obtuvo una  $CE_{50}$  en extracto metanólico  $8.4 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ , mientras que en el extracto metanólico libre de grasas se obtuvo una  $CE_{50}$   $6.0 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ , siendo verbascósido y luteolina los componentes mayoritarios del extracto metanólico libre de grasas (Backhouse y cols. 2008). Mientras que en *B. officinalis* se obtuvieron una  $CE_{50}$  de  $9.93 \pm 0.31$  y  $11.68 \pm 0.26 \mu\text{g/ml}$  para MEB y SEB respectivamente, siendo ambos significativamente más bajos que los controles utilizados BHT ( $14.50 \pm 0.50 \mu\text{g/ml}$ ) y resveratrol ( $12.50 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$ ) (Pan y cols., 2010).

Así, al contrastar los datos obtenidos en el presente trabajo con los reportados en otras especies de *Buddleja* es notable que el extracto metanólico de *B. cordata* posee una capacidad antioxidante mayor que el extracto de *B. thyrsooides* pero menor que los de *B. globosa* y *B. officinalis* en el ensayo para neutralizar el radical DPPH•. Así también, al comparar el resultado (de la misma prueba) del tepozán con los controles usados en este trabajo (A. ascórbico y A. gálico), es evidente que el extracto metanólico posee menor capacidad antioxidante (figura 13). Sin embargo hay que considerar que los controles mencionados son compuestos puros mientras que el extracto es una mezcla.

Como se puede apreciar en los trabajos citados, existen diferencias considerables en los datos reportados entre las diversas especies de *Buddleja*; lo cual, puede atribuirse a variaciones ambientales, así como en la época de recolección de la planta, sin mencionar a que pertenecen a distintas especies, entre otros aspectos mencionados previamente (Csekel y cols., 2006).

Sin embargo algunos estudios han demostrado que ciertos factores pueden influir en la obtención de la capacidad antioxidante de un extracto o un compuesto. Por ejemplo, la presencia de iones metálicos en el extracto o en el sistema de medición impide la transferencia de electrones por parte de los fenólicos presentes en este, además el bloqueo del proceso de captación dependerá del tipo de anión existente en el sistema. Por otro lado, un aumento en la concentración de iones hidrógeno (pH ácido) permite que se torne el mecanismo de reacción, del fenol al radical, de transferencia de electrón a transferencia de hidrógeno afectando así la cinética de la reacción haciéndola más lenta (Dawidowics y Olszowy, 2012).

Además, como se señaló con anterioridad, los extractos son mezclas de incluso cientos de compuestos, por lo tanto la cantidad de los mismos que poseen la actividad existen en trazas más pequeñas, por lo que es necesario emplear una mayor cantidad de extracto en comparación con los controles para observar el mismo efecto.

Pan y cols. (2010) aislaron luteolina de *B. officinalis* obteniendo una  $EC_{50}$  de  $3.09 \pm 0.10$   $\mu\text{g/ml}$  para la prueba DPPH•. Por otro lado, Shicanga y cols., (2010) obtuvieron verbascósido de cuatro especies del género *Lippia* obteniendo contra radical DPPH• una  $CE_{50}$  de 89.0  $\mu\text{g/ml}$  para el verbascósido un valor muy cercano al de su control (A. ascórbico) con un valor de 75  $\mu\text{g/ml}$ , atribuyendo este autor las propiedades antioxidantes de las plantas utilizadas a la presencia de este compuesto y a su cantidad. Mientras que Abdel-Mageed y cols (2012) quienes evaluaron los glucósidos de fenilpropanoides e iridoides de *Tecoma mollis* obtuvieron una  $CE_{50}$  para el verbascósido de 6.1  $\mu\text{g/ml}$  en la prueba para neutralizar el radical DPPH•, en tanto que el control utilizado (A. ascórbico) presentó una  $CE_{50}$  de 2.1  $\mu\text{g/ml}$ .

Por otro lado, Yokozawa y cols. (1998) quienes estudiaron el efecto inhibitor de taninos y flavonoides sobre el radical DPPH•, reportaron un valor superior a 500µM para la linarina, concluyendo estos autores que este compuesto no posee actividad sobre el radical mencionado. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por estos autores, se podría deducir que la linarina presente en el extracto metanólico de *B. cordata* no aporta a la actividad antioxidante presentada por el mismo contra el radical DPPH• (figura 13).

Por otra parte, Villaño y cols. (2007) quienes compararon la habilidad secuestradora de compuestos fenólicos característicos de los vinos frente al radical DPPH•, obtuvieron una CE<sub>50</sub> para ácido caféico de 12.1±0.2 µM y para el ácido ferúlico de 24.7±0.4 µM; los cuales han sido reportados para *B. cordata* y podrían estar contribuyendo en parte a la actividad observada en el extracto metanólico de dicha planta frente al radical DPPH•.

Debido a que el extracto metanólico demostró poseer capacidad antioxidante se procedió a determinar la CE<sub>50</sub> del extracto contra los radicales superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (figura 14) e hidroxilo (HO•) (figura 15).

### **8.3.3 O<sub>2</sub><sup>•-</sup>**

El radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) se origina por interacción del oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) con metales de transición, a través de enzimas (como xantina oxidasa) y en la cadena transportadora de electrones principalmente. En soluciones acuosas no reacciona del todo con la mayoría de las moléculas y a pH 7.4 no es altamente reactivo, de modo que la velocidad de reacción con ADN, lípidos, aminoácidos y otras biomoléculas es baja e incluso nula, por lo que su reactividad con moléculas no radicales está influenciada por el solvente y el pH. En cambio el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> es muy reactivo en solventes orgánicos, perjudicando principalmente membranas. El daño por O<sub>2</sub><sup>•-</sup> es muy selectivo y usualmente involucra reacción con otros radicales como NO• o iones hierro y además de dañar membranas, inactiva enzimas y genera otras ERO como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los radicales ONOO<sup>-</sup> y HO• (Halliwell y Gutteridge, 2007).

El radical hidroperoxil ( $\text{HO}_2^\bullet$ ) es la forma protonada del radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , existe en pequeñas trazas junto con el radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , formándose cerca de la superficie de la membrana celular donde el pH tiende a ser más ácido favoreciendo su creación. Es más reactivo que el radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  debido a la ausencia de carga, la cual le permite atravesar membranas, iniciando la peroxidación de ácidos grasos (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Los resultados sobre la capacidad del extracto metanólico de *B. cordata* para atrapar el radical superóxido se muestran en la figura 14. Donde se observa la misma tendencia que en la prueba anterior entre el extracto de *B.cordata* y los controles, siendo el extracto el que presenta el valor de  $\text{CE}_{50}$  más elevado y el ácido gálico el más bajo. En éste método, el extracto presenta una  $\text{CE}_{50}$  contra el radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  de  $133.6 \pm 35.2 \mu\text{g/ml}$ , en tanto que para los controles ácido gálico y quercetina la  $\text{CE}_{50}$  fue de  $30.09 \pm 6.85 \mu\text{g/ml}$  y de  $50.19 \pm 3.86 \mu\text{g/ml}$  respectivamente. Cabe mencionar que existen significativas entre cada una de las sustancias evaluadas con una  $p < 0.05$ .

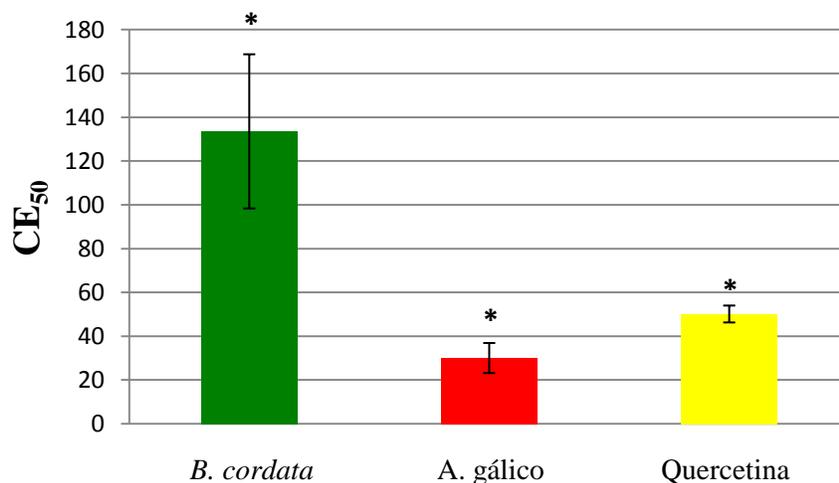


Figura 14. Concentración eficaz media ( $\text{CE}_{50}$ ) del extracto de *B. cordata* contra el radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en comparación con los controles positivos: ácido gálico y quercetina. \*  $p < 0.05$ .

En otros estudios se suele reportar la actividad antioxidante no en términos de la  $\text{CE}_{50}$  sino en el porcentaje de inhibición (I%) lo cual se refiere al porcentaje máximo de neutralización del radical a una concentración dada (Huang y cols., 2005). De esta forma se reportó en *B.*

*globosa* un I% de  $51 \pm 2.5$   $\mu\text{g/ml}$  en el extracto metanólico general, mientras que en el extracto libre de grasas un I% de  $68.0 \pm 3.0$  ambos a  $50$   $\mu\text{g/ml}$  (Backhouse y cols., 2008).

Al comparar estos resultados con los obtenidos en el presente trabajo, es notable que *B. globosa* presento mayor actividad que *B. cordata* frente al radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ; sin embargo hay que mencionar que el radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  se generó mediante un sistema enzimático a diferencia del que se realizó en este estudio.

Wang y cols, (1996) evaluaron la capacidad antioxidante frente al radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  del verbascósido y el leucosceptósido A obtenidos a partir de *Pedicularis striata* y *P. alashnica*, obteniendo una  $\text{CE}_{50}$  de  $0.063$  mM y  $0.294$  mM respectivamente utilizando el sistema xantina-xantina oxidasa. Posteriormente, Piao y cols. (2003) obtuvieron una  $\text{CE}_{50}$  de  $9.1$   $\mu\text{g/ml}$  para luteolina (obtenida de *B. officinalis*) en el ensayo para neutralizar radical superóxido utilizando el mismo sistema. Debido a que no ha sido reportada la presencia de leucosceptósido A y luteolina en *B. cordata* podemos atribuir la actividad del extracto metanólico de esta planta sobre el radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  al verbascósido.

La rápida desaparición del radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en una solución acuosa está dada por la reacción de dismutación, en la cual el radical puede ser oxidado (a  $\text{O}_2$ ) o reducido (a  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Esta reacción es rápida en un medio ácido pues es necesario para protonar  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , pero lenta en medios alcalinos debido a que cualquier molécula que reaccione con  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en una solución acuosa estará compitiendo con la reacción de dismutación. De modo que cualquier sistema generador de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  producirá  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a menos que éste sea interceptado por alguna otra molécula. Así  $\text{O}_2^{\bullet-}$  puede ser una molécula reductora frente a NBT u oxidante al reaccionar con ascorbato (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo el radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  se produjo *in vitro* mediante la reacción de PMS con NADH, sin embargo al haber antioxidantes en el sistema como los ácidos hidroxicinámicos y el verbascósido presentes en el extracto de *B. cordata* o en el caso de los controles el ácido gálico y la quercetina, evitan la reducción del NBT y por ende la producción del cromóforo al reducir al radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Para considerar la capacidad antioxidante de un compuesto como óptima, se deben tomar en cuenta dos principios: la alta reactividad de la sustancia con radicales de distintos orígenes ó distintos tipos y la alta estabilidad en el radical intermediario que se puede formar a partir del antioxidante (Roberfroid y Buc-Calderon, 1995). Así, cuando un fenólico dona un electrón o átomo de hidrógeno para neutralizar un RL, ellos mismos se transforman en RL, sin embargo, el electrón desapareado es menos reactivo debido a que es deslocalizado por resonancia alrededor del anillo aromático, lo cual le confiere una gran estabilidad y menos reactividad (Surch y Parcher, 2005). De manera que los compuestos fenólicos presentes en el extracto metanólico de *B. cordata* son menos peligrosos en su forma radicalar al ser reducidos por los RL que neutralizaron como los utilizados en este estudio DPPH•, O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> y HO•.

La capacidad antioxidante de un compuesto se ve influenciada también por la estequiometría de la reacción, que se refiere al número de moléculas oxidantes reducidas por una molécula antioxidante. Lo cual está determinado por la estructura del antioxidante y su mecanismo de reducción. El número de grupos hidroxilo disponibles y los productos de la reacción como los dímeros o quinonas capaces de reaccionar con un radical adicional, incrementan la estequiometría (Villaño y cols., 2007). Lo anterior explica la razón de que el ácido gálico haya presentado los valores más bajos de CE<sub>50</sub> en las pruebas para neutralizar los radicales DPPH• y O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> pues este compuesto posee 3 hidrógenos para donar, en tanto que el ácido ascórbico utilizado contra radical DPPH• tiene 2, y la quercetina utilizada contra radical O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> posee 5.

Se conoce bien que los polifenoles tiene un mayor potencial antioxidante que los monofenoles, debido a que pueden donar más hidrógenos. La posición del segundo y el tercer grupo hidroxilo es importante. Aquellos compuestos con grupos hidroxilo en *orto* y en *para* tienen una mayor actividad que aquellos en *meta*, cuya eficiencia se debe a la estabilización del anillo (del radical arilo) por enlaces “puentes” hidrógeno o por regeneración de otro fenol. La sustitución orto-metoxi también estabiliza el radical arilo por donación de electrón, incrementando la eficiencia antiradical, la cual también varía dependiendo el antioxidante y su concentración (Brand-Williams y cols., 1994).

### **8.3.4 Actividad quelante**

Los metales de transición promueven la transferencia de electrones superando la restricción del spin en la reacción directa del oxígeno con los no radicales. El potencial de los metales de transición depende de los ligandos a los que este asociado, los cuales le permiten catalizar diferentes reacciones. Estas características les proveen sus efectos biológicos, actuando por ejemplo en la respiración, el transporte de oxígeno, la formación de NO•, la defensa antioxidante, la actividad de proteínas y enzimas, entre otros (Halliwell y Gutteridge, 2007). Debido a que los metales de transición intervienen indirectamente en el daño oxidativo, es útil medir la capacidad quelante de un extracto o compuesto debido a que puede prevenir la producción de EROs.

El extracto metanólico de *B. cordata* no mostró actividad quelante contra el ion hierro mediante el método de Yamaguchi y cols. (2000). Así también Zhou y cols. (2006) reportaron en una prueba similar que el ácido ferúlico (que ha sido reportado en *B. cordata*) no tiene actividad quelante contra el ion Fe. Sin embargo, otros autores han reportado que los polifenoles como los fenilpropanoides y sus respectivos glucósidos tienen la propiedad de quelar metales de transición si presentan dos grupos hidroxilos adyacentes o catecólicos (Korkina, 2007). La capacidad quelante de los compuestos fenólicos se atribuye principalmente a los flavonoides ya que presentan dos puntos de ataque del metal al fenol uno en el anillo B y otro en el anillo C del flavonoide. Las glicosilaciones en ciertas posiciones influyen en la actividad quelante (Rice-Evans y cols., 1997). El principal flavonoide encontrado en *B. cordata* fue la linarina, sin embargo, debido a que este se separó del extracto al realizar la partición con hexano, la cantidad de este compuesto se vio disminuida en el extracto, lo que pudo haber causado que este último no mostrara actividad quelante. Por otro lado, este compuesto no posee grupos catecólicos en su estructura, por lo que es probable que no tenga dicha actividad. Además, no se encontraron estudios relacionados con la actividad quelante de este compuesto.

Por otra parte, Zhao y cols (2005) estudiaron el efecto protector del verbascósido contra el daño inducido por la reacción Fenton en el plásmido pBR322, observando que el verbascósido quelata iones hierro (II) y (III). Además proponen que el Fe (II) y (III) en solución puede unirse al verbascósido formando complejos, previniendo así la formación del radical HO•. Por otro lado, como se ha señalado anteriormente, este compuesto actúa también como neutralizador de radicales libres (Wang y cols., 1996; Shicanga y cols., 2010; Abdel-Mageed y cols., 2012). Como se mencionó previamente, este compuesto fue detectado en el extracto metanólico de *B. cordata* mediante HPLC, sin embargo es probable que la cantidad de este compuesto en el extracto no haya sido suficiente tener efecto en el ensayo de Tamaguchi y cols. (2000). Además, es frecuente que valores mayores a 500 µM se reporten como “sin actividad”, ya que cualquier compuesto que se suponga como quelante debe tener un valor menor al mencionado para ser considerado como tal (Yokozawa y cols., 1998).

### **8.3.5 HO•**

El radical hidroxilo (HO•) es el radical de oxígeno más reactivo conocido, con un alto potencial reductor. Tan pronto como se forma el radical HO• reacciona casi de inmediato con las moléculas vecinas. Las reacciones que involucran HO• son de 3 tipos: 1] abstracción de hidrógeno, en la cual se abstrae un átomo de hidrógeno para formar agua; 2] adición, donde reacciona con dobles ligaduras o anillos aromáticos; 3] y transferencia de electrón, reaccionando con iones haluros o nitritos (Halliwell y Gutteridge, 2007).

La formación del radical HO• *in vivo* ocurre mediante cuatro mecanismos principalmente: a) Catálisis por metales de transición principalmente Fe y Cu; b) exposición del medio a la radiación; c) reacción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> con NO• para dar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), el cual puede descomponerse en NO<sub>2</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>•</sup> y HO•; d) reacción de HOCl con O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Halliwell, 1995). También puede formarse a través de la interacción del radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Halliwell y Gutteridge, 2007). En este trabajo se utilizó la reacción de fenton como el mecanismo para evaluar la capacidad antioxidante del extracto frente al radical HO•, esta reacción involucra una molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con un ión metálico (cobre o hierro).

En la figura 15 se observa la  $CE_{50}$  del extracto para neutralizar el radical  $HO\bullet$  mediante el método de Halliwell y cols, (1987) alcanzándose un valor de  $1.85 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ , mientras que para el control (ácido gálico) fue de  $335.38 \pm 3.06 \mu\text{g/ml}$ , teniendo un valor más alto en comparación con el extracto, obteniéndose diferencias significativas entre el extracto y el ácido gálico utilizado como control con una  $p < 0.05$ .

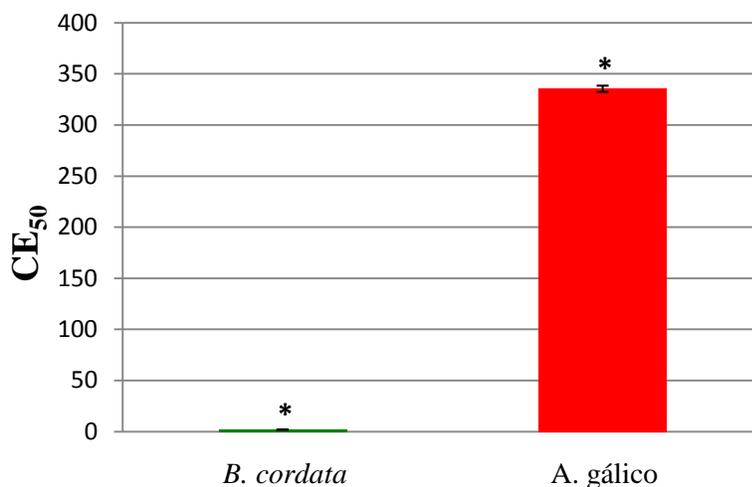


Figura 15. Concentración eficaz media ( $CE_{50}$ ) del extracto de *B. cordata* contra radical  $HO\bullet$  en comparación con ácido gálico. \*  $p < 0.05$ .

Esta actividad puede explicarse por lo hallado por Wang y cols. (1996) quienes evaluaron la capacidad captadora de radicales libres de distintos fenilpropanoides mediante el método de captura del spin, obteniendo una  $CE_{50}$  contra  $HO\bullet$  para el verbascósido de 0.434 mM, mientras que leucosceptósido A obtuvo un I% de 27.8% a 0.55mM. Ambos compuestos reportados para el género *Buddleja*.

Gracias a que el radical hidroxilo reacciona con cualquier molécula en su vecindad debido en gran medida a su corta vida media y a su potencial redox, prácticamente toda sustancia podría funcionar como neutralizadora del radical  $HO\bullet$  sin necesidad de ser antioxidante estrictamente. Aquel antioxidante que prevenga o detenga en el daño ocasionado por  $HO\bullet$  actuará bloqueando los precursores de su formación como son  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $ONOO^{\bullet}$ ,  $HOCL$  e iones metálicos (Halliwell, 1995).

Como se describió anteriormente en el método para neutralizar el radical HO• según Halliwell y cols, (1987), al añadir un antioxidante al sistema el radical HO• competirá entre éste y el azúcar inhibiendo la formación del cromóforo. Sin embargo, el antioxidante además de actuar sobre el radical hidroxilo, podría también actuar sobre sus precursores imposibilitando su producción. Así, la remoción de metales de transición del sistema podría llevarse a cabo mediante dos formas: en la primera, la unión del antioxidante al metal altera su potencial redox o la accesibilidad de éste al peróxido evitando la producción de HO•; en la segunda, la unión del antioxidante con el metal no impide la producción de HO•, pero el radical formado por el complejo metal-antioxidante es absorbido por éste. Por lo tanto, si un antioxidante se une a un ion metálico y decrece la cantidad detectada de HO•, puede ser que el complejo no catalice la formación de HO• ó que el HO• producido es mayormente interceptado por el antioxidante en la mezcla de reacción (Halliwell, 1995).

Como se mencionó anteriormente el extracto no presentó actividad quelante contra el ion Fe, no obstante, otros autores han reportado la actividad quelante de ciertos compuestos reportados para el género *Buddleja* y que podrían estar también presentes en *B. cordata* (como verbascósido). De tal manera que estos compuestos podrían estar influenciando en la actividad de el extracto. Sin embargo el método utilizado para evaluar la capacidad del extracto de atrapar radical HO• descarta en cierta medida esta posibilidad, pues el empleo de iones Fe se realiza en conjunto con EDTA, facilitando la reacción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No obstante, siendo el EDTA un quelador de iones metálicos, y teniendo el ion Fe preferencia por éste que por verbascósido como comprobaron Zhao y cols. en 2005, este compuesto fenólico competiría con el EDTA para ligar al ion Fe.

Los compuestos en el extracto metanólico de *B.cordata* también podrían estar atrapando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> evitando la formación de HO•. Además podría el antioxidante estar interfiriendo con la formación del cromóforo dando un falso positivo, sin embargo no ha sido reportado para el método utilizado así como la formación de “falsos cromóforos” a partir del HO• con el antioxidante (Halliwell, 1995).

Como se ha dicho previamente, los antioxidantes son compuestos capaces de impedir, retardar o prevenir los procesos de oxidación y dependiendo el modo de acción pueden ser clasificados como: terminadores de radicales libres, queladores de iones metálicos o atrapadores de oxígeno (que reaccionan con el oxígeno en sistemas cerrados). También se les suele clasificar como antioxidantes primarios y antioxidantes secundarios. Los primarios reaccionan con los RL de alta energía para convertirlos en productos termodinámicamente más estables y son capaces de funcionar solos, mientras que los secundarios o preventivos, funcionan retardando la velocidad de la cadena de iniciación y funcionan combinados con los antioxidantes primarios (Gardziella y cols., 2000; Shahidi y Naczki, 2004; Dawidowicz y Olszowy 2012). Así, una sustancia tiene efecto sinérgico cuando elevan la actividad de los antioxidantes sin poseer actividad antioxidantes por sí mismos (Shahidi y Naczki, 2004). De modo que es probable que la presencia de compuestos queladores de iones metálicos (como verbascósido), además de los antioxidantes presentes en el extracto (como luteolina, ácido caféico y felúrico, verbascósido, entre otros) tengan un efecto sinérgico en ensayo para neutralizar radical HO•.

A diferencia de las otras pruebas realizadas en los distintos radicales en donde el control ácido gálico presentó una mayor capacidad antioxidante a comparación del extracto de *B. cordata*, en la prueba para neutralizar radical HO• el control tuvo una actividad antioxidante muy baja en comparación con el extracto (figura 15). Esto puede deberse (en esta prueba) a que el ácido gálico tenga una mayor preferencia por el ión Fe que por el radical HO• regenerando el ion ( $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ ) para la catalización de cada vez más HO•. El ensayo FRAP mide la capacidad de una sustancia de reducir un mol de de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  en condiciones ácidas (Huang y cols., 2005). Usando este método, Soobrattee y cols. (2005) obtuvieron valores de  $5.25 \pm 0.18$  mM Fe(II)/L para el ácido gálico mientras que Ozgen y cols. (2006) reportaron  $3.4 \pm 0.1$   $\mu\text{M}$  equivalentes de trolox utilizando el mismo ensayo; demostrando ambos trabajos mediante el ensayo mencionado que el ácido gálico posee una alta capacidad reductora.

En la prueba para evaluar la capacidad antioxidante del extracto metanólico de *B. cordata* frente al radical HO•, el sistema de reacción para generar éste radical consiste en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe, EDTA y ácido ascórbico. El ácido ascórbico es considerado un antioxidante eficaz *in vitro* debido a su acción reductora, sin embargo también puede tener efecto pro-oxidante *in vitro* pues el sistema para generar HO• el ácido ascórbico funciona reduciendo al ion Fe de Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>. Se ha documentado la capacidad de este antioxidante de regenerar a otro antioxidante como es el caso del α-tocoferol para evitar la lipoperoxidación (Halliwell y Gutteridge, 2007). Del mismo modo que el ácido ascórbico, ácido gálico podría no estar reduciendo al Fe por el mismo, sino regenerando al ácido ascórbico el cual reduce al Fe a su vez. Así, el ácido gálico en este sistema presenta un efecto pro-oxidante.

## 9. Conclusiones

El extracto meta-etanólico de *B cordata*:

Absorbe en las tres regiones de la RUV.

Contiene una cantidad considerable de compuestos fenólicos, de los cuales el verbascósido y la linarina son los principales metabolitos.

Previene los daños provocados por la RUV y el etanol.

Induce la formación de estructuras similares a pólipos fibroepiteliales en ratones SKH-1.

Produce disminución de células de quemadura en piel no irradiada y una ligera disminución de estas en la piel irradiada de ratones SKH-1.

Ofrece actividad antioxidante moderada frente a los radicales DPPH• e O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> pero alta contra radical HO• y no presenta actividad quelante.

## 10. Perspectivas

Estudiar la probable toxicidad e irritabilidad del extracto de *B. cordata*

Evaluar la actividad del extracto utilizando mayor potencia de irradiación.

Realizar un experimento de exposición prolongada al extracto de *B. cordata*  
(Modelo crónico)

Estudiar los principales metabolitos del extracto del tepozán como fotoprotectores en ratones SKH-1

Evaluar la actividad antioxidante del extracto contra otras ERO

## 11. Literatura citada

- Abdel-Mageed W.M., Backhet E.Y., Khalifa A.A., Ibraheim Z.Z., Ross S.A. 2012. Antiparasitic phenylpropanoids and iridoids glycosides from *Tecoma mollis*. *Fitoterapia*. 83: 500-507.
- Afaq F., Adhami V.N., Mukhtar H. 2005. Photochemoprevention of ultravioleta B signaling and photocarcinogenesis. *Mutation Research*. 571: 153-173.
- Altura B.M., Ogunkoya A. Gebrewold A., Altura B.T. 1979. Effects of ethanol on terminal arterioles and muscular venules: Direct observations on the microcirculation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1:97-113
- Apablaza, E. C. 2006. Diseño de la estandarización química y evaluación de la actividad analgésica tópica de *Buddleja globosa* Hope, Buddlejaceae, matico. Tesis de Químico Farmacéutico, para obtener el grado de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Santiago, Chile. [http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2006/apablaza\\_c/sources/apablaza\\_c.pdf](http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2006/apablaza_c/sources/apablaza_c.pdf).
- Arenas R. 2009. Dermatología: atlas, diagnóstico y tratamiento. 4ª Ed. McGraw Hill. China.
- Argueta V. A., Cano-Asselei L.M, Rodarte M. E. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional en México. Instituto Nacional Indigenista. México.
- Avila A.J.G. 2002. Estudio fitoquímico de *Buddleja perfoliata* y *Buddleja scordioides*. Evaluación de la actividad antibacteriana y fotoprotectora de sus principales metabolitos secundarios. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Avila A.J.C., Castañeda C.M.C. Benitez F.J.C., Durán D.A, Barroso V.R., Martinez C.G., Muñoz L.J.L, Martinez C.A., Romo de Vivar A. 2005. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia*. 76: 301-309.
- Avila J.G, Liverant J.G., Martínez A., Martínez G., Muñoz J.L., Arciniegas A., Romo de Vivar A. 1999 Mode of action of *Budleja cordata* verbascoside against *Staphilococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 66: 75-78.
- Azulay R.D., Azulay D.R., Azulay-Abulafia L. 2006. Dermatología. 2ª Ed. Guanabara Koogan. Río de Janeiro.
- Backhouse N., Rosales L., Apablaza C., Goity L., Erazo S., Negrete R., Theodoluz C., Rodríguez J., Delporte C. 2008. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa* Buddlejaceae. *Journal of Ethnopharmacology*. 116: 263-269.

- Benavides F., Oberyshyn T.M., VanBuskirk A.M., Reeve V.E., Kusewitt D.F. 2009. The hairless mouse in skin research. *Journal of Dermatological Science*. 59:10-18.
- Bissett D.L., Hannon D.P., Orr T.V. 1987. An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochemistry and Photobiology*. 46(3):367-378.
- Brand R.M., Jendrzewski J.L. 2008. Chronic ethanol ingestion alters xenobiotic absorption through the skin: Potential role of oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*. 46:1940-1948.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1994. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*. 28(1):25-30.
- Cabanillas M., Monteagudo B., Labandeira J., Heras C., Toribio J. 2009. Acrocordones secundarios a fricción por muleta. *Actas Dermosifiliográficas*. 100:77-83
- Chu D.H., Haake A.R., Holbrook K., Loomis C.H. 2005. Estructura y desarrollo de la piel. En: Freedberg I.M., Eisen A.Z., Wolff K., Austen K.F., Goldsmith C.A., Katz S.I. *Fitzpatrick Dermatología en medicina general*. 6ª Ed. Tomo 1. Medica Panamericana. Argentina.
- Cordero A.A. 1996. *Biología de la piel*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Crew F.A.E., Mirskaia L. 1932. The character "hairless" in the mouse. *Journal of Genetics*. 25(1)17-24.
- Cseke L.J., Kirakosyan A., Kaufman P.B., Warber P.B., Duke J.A., Brielman H.L. 2006. *Natural products from plants*. 2<sup>nd</sup> Ed. CRC Press.
- Dawidowicz A.J., Olszowy M. 2012. Mechanism change in estimating of antioxidant activity of phenolic compounds. *Talanta*. 97: 312-317
- Diffey B.L. 2005. A perspective on the need for topical sunscreens. In: Shaath N. *Sunscreens: Regulations and commercial development*. 3ª Ed. Taylor & Francis. USA.
- Dudonné S., Vitrac X., Coutière P., Woillez M., Mérillon J-M. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:1768-1774.
- Durrer S., Ehnes C., Fuetsch M., Maerkel K., Schlumph M., Lichtensteiger W. 2007. Estrogen sensitivity of target genes and expression of nuclear receptor co-regulators in rat prostate after pre and postnatal exposure to the ultraviolet filter 4-methylbenzylidene camphor. *Environmental Health Perspectives*. 115(1): 42-50

- Ege S. 1998. Química Orgánica: estructura y reactividad. Reverté. España.
- Elder D., Elenistas R., Jaworsky C., Johnson B. 1997. Lever's Histopathology of the skin. 8th ed. Lippincott-Raven. USA.
- Estrada-Zuñiga M.E., Cruz-Sosa F., Rodriguez-Monroy M., Verde-Calvo J.R., Vernon-Carter E.J. 2009. Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 97:39-47
- Filip A., Daicoviciu D., Clichici S., Bolfa P., Catoi C., Baldea I., Bolojan L., Olteanu D., Muresan A., Postescu I.D. 2011. The effects of grape seeds polyphenols on SKH-1 mice skin irradiated with multiple doses of UV-B. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 105:133-142.
- García-Bores A.M., Avila J.G. 2008. Natural Products: Molecular mechanism in the photochemoprevention of skin cancer. *Revista Latinoamericana de Química.* 36(3): 83-102.
- Gartner L.P., Hiatt J.L. 1997. Histología texto y atlas. McGraw-Hill Interamericana. México.
- Gardziella A., Pilato L.A., Knop A. 2000. Phenolic resins (Chemistry, applications, standardization). 2<sup>nd</sup> Ed. Springer. Germany.
- Garmyn M., Yarosh D.B. 2007. The molecular and genetic effects of ultraviolet radiation exposure on skin cells. In: Lim H.W., Hönigsman H., Hawk J.L.M. *Photodermatology.* Informa Healthcare. New York.
- Halliwell B. 1995. Antioxidant characterization, methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology.* 49(10):1341-1348.
- Halliwell B., Gutteridge M.C.J. 2007. Free radicals in biology and medicine. 4<sup>th</sup> Ed. Oxford University.
- Halliwell B., Gutteridge. J.M.C., Aruoma O.I. 1987. The desoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry.* 165: 215-219.
- Hildebrand M. 1988. Anatomía y desarrollo de los vertebrados. Editorial Limusa. México.
- Holán V., Kuffová L., Zajícová A., Krulová M., Filipec M., Holler P., Jančárek. 1998. Urocanic acid enhances IL-10 production in activated CD4+ T cells. *The Journal of Immunology.* 161: 3237-3241.
- Houton P.J. 2003. *Buddleja globosa*: A medicinal plant of Chile, their chemistry, biological activity and traditional uses. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 2(3): 36-41.

- Huang D., Ou B., Prior R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:1841-1856
- Ichihashi M., Ueda M., Budiyanto A., Bito A., Oka M., Fukunaga M., Tsuru K., Horikawa T. 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology*. 189: 21-39.
- Jordán J. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM*. 22(6):100-106.
- Kim H.P., Son K.H., Chang H.W., Kang S.S. 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanism. *Journal of Pharmacological Sciences*. 96: 229-245
- Kim T., Ananthaswamy H.N., Kripke M.L., Ullrich S.E. 2003. Advantages of using hairless mice versus haired mice to test sunscreen efficacy against photoimmune suppression. *Photochemistry and Photobiology*. 78(1):37-42.
- Kligman H. L., Akin F.J., Kligman A.M. 1982. Prevention of ultraviolet damage to the dermis of hairless mice by sunscreens. *The Journal of Investigative Dermatology*. 78 (2): 181-189.
- Korkina L.G. 2007. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cellular and Molecular Biology*. 53(1):15-25.
- Kownatzki E. 2003. Hand hygiene and skin health. *Journal of Hospital Infection*. 55:239-245
- Lee J.K., Kim J.H., Nam K.T., Lee S.H. 2003. Molecular events associated with apoptosis and proliferation induced by ultraviolet-B radiation on the skin of hairless mice. *Journal of Dermatological Science*. 32:171-179.
- Liao Y., Houghton P.J., Hoult J.R.S. 1999. Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. *Journal of Natural Products*. 62(9):1241-1245.
- Lieber C.S., Baraona E., Leo M.A., Garro A. 1987. Metabolism and metabolic effects of ethanol, including interaction with drugs, carcinogens and nutrition. *Mutation Research*. 186:201-233.
- Lowe N.S., Shath N.A., Pathak M.A. 1997. Sunscreens: Development evaluation and regulatory aspects. 2<sup>nd</sup> Ed. Marcel Dekker. E.U.
- Lu Y., Lou Y, Xie J., Peng Q., Liao J., Yang C., Huang M., Conney A. H. 2002. Topical applications of caffeine or epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selective increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice. *Pharmacology*. 99 (19): 12455-12460.

- Magaña G.M., Magaña L.M. 2011. Dermatología. 2ª Ed. Editorial Médica Panamericana. México.
- Mahlke J.D., Bolignon A.A., Mahado M.M., Spader T.B., Alves S.H., Canto-Dorow T., Athayde M.L. 2009. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of a crude extract and fractions from *Buddleja thyrsoides* Lam. leaves. *Quim Nova*. 32(2):277-281
- Malpas S.C., Robinson B.J., Maling T.J. 1990. Mechanism of ethanol-induced vasodilation. *Journal of Applied Physiology*. 68: 731-734.
- Martínez-Vázquez M., Ramírez A.T.O., Lastra A.L., Bye R. 1998. A comparative study of the analgesic and anti-inflammatory activities of Pectolinarin isolated from *Cirsium subcoriaceum* and Linarin isolated from *Buddleia cordata*. *Planta Medica*. 64(2):134-137.
- Matsumura Y., Ananthaswamy H.N. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 195:298-308
- McGregor J.M., Hawk J.L.M. 2001. Efectos agudos de la radiación ultravioleta sobre la piel. En: Fitzpatrick T. B., Freedberg I.M., Eisen A.Z., Wolff K., Austen K.F., Goldsmith L.A., Katz S.I. *Dermatología en medicina general*. 5ª Ed. Médica Panamericana. Argentina.
- Mesa A.M., Rincón D.C., Toro J.F., Tamayo A., Blair S., Rojano B.A. 2011. Actividad antioxidante de *Piper piedecuanum* Trel. & Yunck y *Piper subpedale* Trel. & Yunck. *Rev Latinoamer Quím*. 39(3): 91-99.
- Montagna W., Chase H.B., Melaragno H.P. 1952. The skin of hairless mice. I. The formación of cysts and the distribution of lipids. *The Journal of Investigative Dermatology*. 19(1):83-94.
- Moreno D.A., Bordas X., Juglà A. 2007. Fibroma de péndulo y acrocordones. En: Herrera C.E., Moreno C.A., Rodríguez P.J.L. *Dermatopatología: Correlación clínico-patológica*. Área Científica Menarini. Madrid. <http://www.menarini.es/es/profesionales-de-la-salud/biblioteca/fondo-documental-propio/48-libro/328.html>. 06/02/2013.
- Murray J.C., Burch J.A., Streilein R.D., Iannaccione M.A., Hall R.P., Pinell S.P. 2008. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by feluric acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet radiation. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 59(3):418-425
- Nelson C.G. 2005. Photoprotection. In: Shaath N. *Sunscreens: Regulations and commercial development*. 3ª Ed. Taylor & Francis. USA.
- Neuman M.G., Haber J.A., Malkiewicz I.M. 2002. Ethanol signals for apoptosis in cultured skin cells. *Alcohol*. 26:179-190

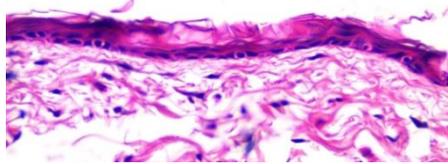
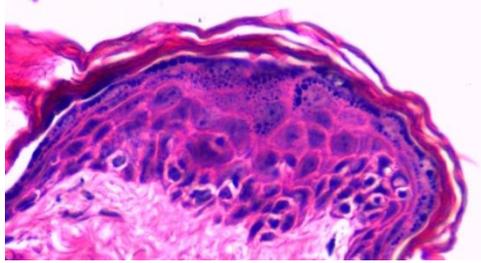
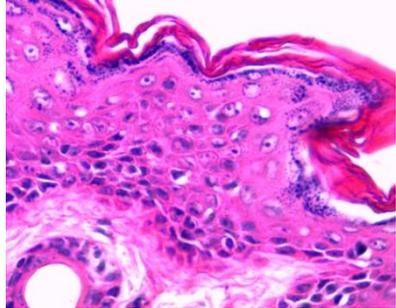
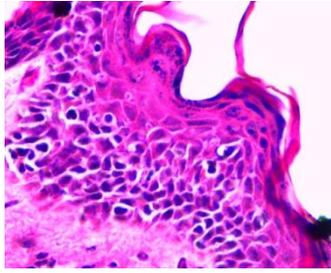
- Ortiz Z.E.H.1996. Actividad antibacteriana de la raíz de *Buddleja cordata*. Tesis para obtener el grado de Bióloga. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Ozgen M., Reese R.N., Tulio A.Z., Scheerens J.C., Miller A.R. 2006. Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Food and Chemistry*. 54:1151-1157
- Packer L. 2005. Oxidants and antioxidants: Mechanism of action and regulation of gene expression by bioflavonoids. In: Surh J-J, Parcher L. 2005. *Oxidative stress, inflammation and health*. Taylor & Francis. California.
- Pan Y., He C., Wang H., Ji X., Wang K., Liu P. 2010. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of *Buddleia officinalis* and its major active component. *Food Chemistry*. 121:497-502.
- Petrova A. Davids L.M., Rautenbach F., Marnewich J.L. 2011. Photoprotection by honeybush extracts, hesperidin and mangiferin against UVB- induced skin damage in SKH-1 mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 103:126-139.
- Piao M.S., Kim M-R., Lee D.G-, Park Y., Hahm K-S., Moon Y-H., Woo E-R. 2003. Antioxidative constituents from *Buddleia officinalis*. *Archives of Pharmaceutical Research*. 26(6):453-457.
- Pinnell S.R. 2003. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *American Academy of Dermatology*. 48: 1-19.
- Porras-Luque J.I. 2007. Antimicrobianos tópicos en dermatología. *Actas Dermosifiliográficas*. 98(1) 29-39
- Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en México. 2001. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/rhnm-01/rhnm-01.htm>
- Rhodes L.E., Lim H.W. 2007. The acute effects of ultraviolet radiation on the skin. In: Lim H.W., Höningsman H., Hawk J.L.M. *Photodermatology*. Informa Healthcare. New York.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. 2(4):152-159.
- Roberfroid M., Buc-Calderon P. 1995. *Free radicals and oxidation phenomena in biological systems*. Marcel Dekker. E.U.

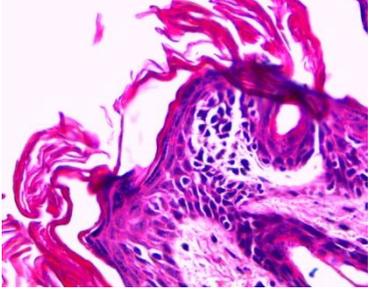
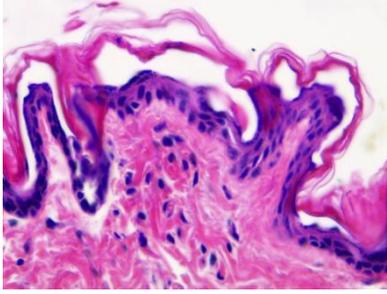
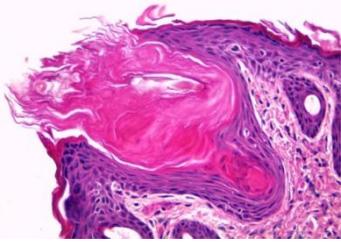
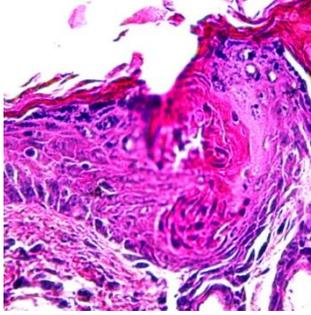
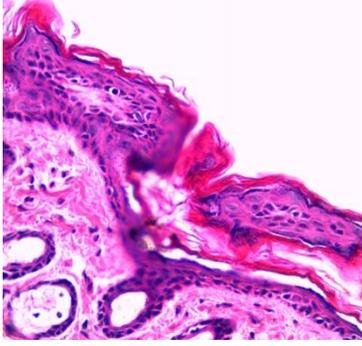
- Romer A.S. 1976. Anatomía comparada. 4ª Ed. Interamericana. México.
- Saul A. 2001. Lecciones de dermatología. 14ª Ed. Méndez Editores. México.
- Schmitz-Hoerner R., Weissenböck G. 2003. Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels. *Phytochemistry*. 64:243–255.
- Serra-Baldrich E. Tribó B.M.J. 1991. Antioxidantes. *Nutrición Clínica*. 11: 34-44.
- Shahidi F., Naczk M. 2004. Phenolics in food and Nutraceuticals. CRC Press. USA.
- Sharma M.R., Werth B., Werth V.P. 2011. Animal models of acute photodamage: Comparisons of anatomic, cellular and molecular responses in C57BL/6J, SKH1 and Balb/c mice. *Photochemistry and Photobiology*. 87:690-698.
- Shicanga E.A., Combrinck S., Regnier T. 2010. South African *Lippia* herbal infusions: Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. *South African Journal of Botany* 76: 567:571
- Soobrattee M.A., Neergheen V.S., Luximon-Ramma A., Auroma O.I., Bahorun T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*. 579:200-213.
- Sorg O. 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*. 324:649-662.
- Stevens A., Lowe J.S., Joung B. 2003. Wheater Histopatología Básica. 4ª Ed. Elsevier. España.
- Storer T.I., Usinger R.L., Stebbins R.C., Nybakken J.W., 1975. Zoología general. 5ª Ed. Ediciones Omega Barcelona.
- Taraphdar A.K., Roy M., Bhattacharya R.K. 2001. Natural products as inducers of apoptosis: implication for cancer therapy and prevention. *Current Science*. 80(11):1387-1396
- Thounaojam M.C., Jadeja R.M., Devkar R.V., Ramachandran A.V. 2010. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Sida rhomboidea* Roxb methanolic extract determined using different in vitro models. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 9 (3): 191-198.
- Villaño D., Fernández-Pachón Moyá M.L., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 71(1):230-235.

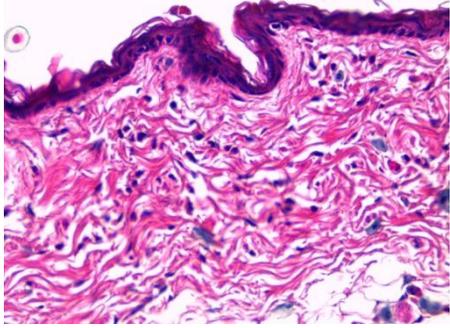
- Yokozawa T., Chen C.P., Dong E., Tanaka T., Nonaka G-I., Nishioka I. 1998. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology*. 56:213-222.
- Walker S.L., Hawk J.L.M., Young A.R. 2005. Efectos agudos y crónicos de la radiación ultravioleta. En: Freedberg I.M., Eisen A.Z., Wolff K., Austen K.F., Goldsmith L.A., Katz S.I. Fitzpatrick Dermatología en medicina general. 6ª Ed. Médica Panamericana. Argentina.
- Walterscheid J.P., Nghiem D.X., Kazimi N., Nutt L.K., McConkey D.J., Norval M., Ulrich S.E. 2006. *Cis*-urocanic acid, a sunlight-induced immunosuppressive factor, activates immune suppression via the 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *PNAS*. 103(46):17420-17425.
- Wang P., Kang J., Zheng R., Yang Z., Lu J., Gao J., Jia Z. 1996. Scavenging effects of phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* on superoxide anion and hydroxyl radical by the spin trapping method. *Biochemical Pharmacology*. 51:687-691.
- Wang J., Yuang X., Jin Z., Tian Y., Song H. 2007. Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of peanut skins extract. *Food Chemistry*. 104: 242-250.
- World Health Organization. 2010. <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html> 15/02/2010.
- Zhao C., Dodin G., Yuan C., Chen H., Zheng R. Jia Z., Fan B. 2005. “*In vitro*” protection of DNA from Fenton reaction by plant polyphenol verbascoside. *Biochimica et Biophysica Acta* 1723: 114-123
- Zhou K., Yin J., Yu L. 2006. ESR determination of the reactions between selected phenolic acids and free radical or transition metals. *Food Chemistry*. 95:446-457.

## 12. Anexos

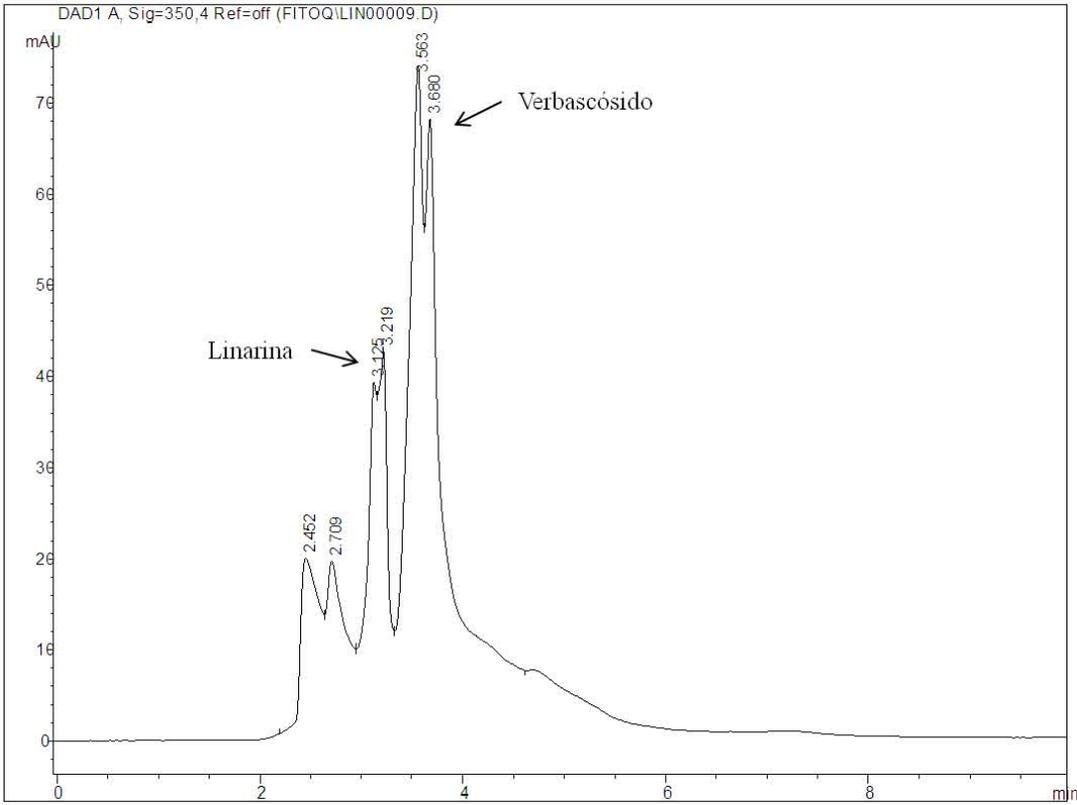
**Tabla de las alteraciones observadas**

Zona de la piel	Daño	Representación
Epidermis	Atrofia	
	Hipertrofia	
	Hiperplasia	
	Espongiosis	

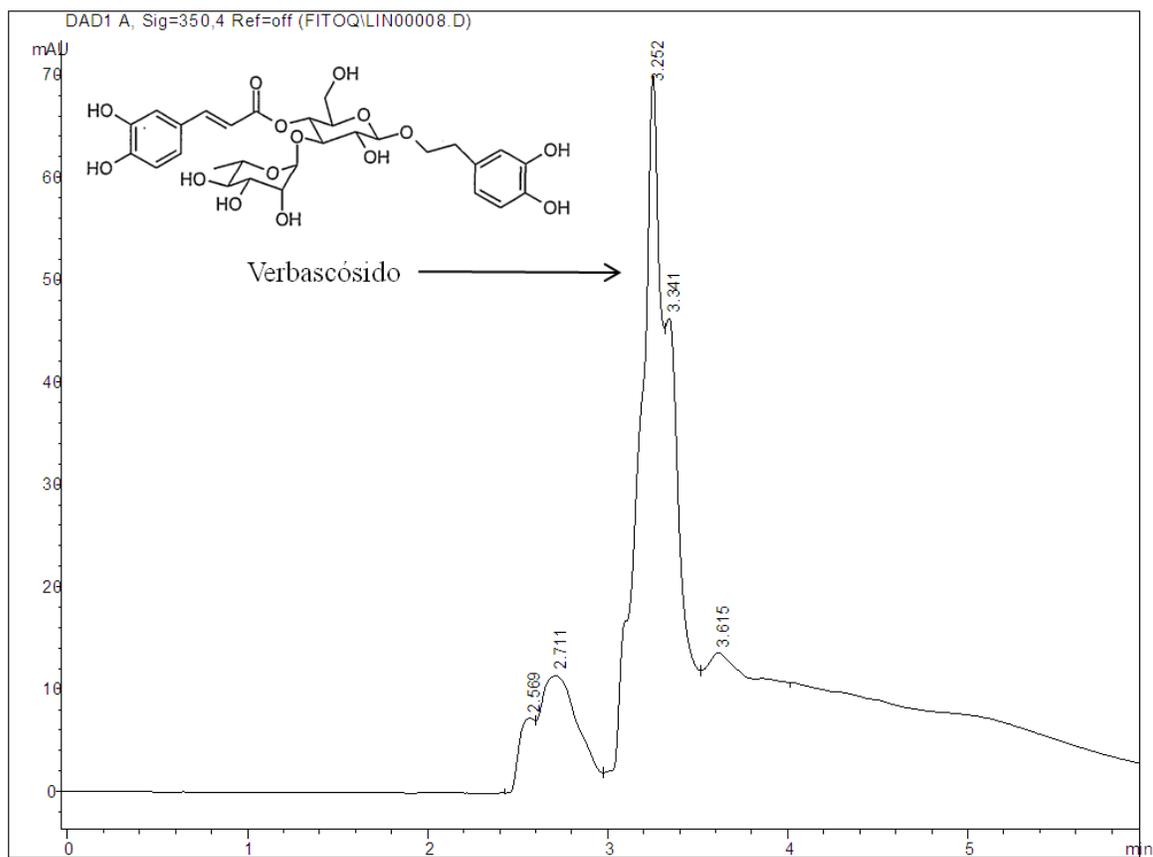
<p>Necrosis</p>	
<p>Paraqueratosis</p>	
<p>Hiperqueratosis</p>	
<p>Disqueratosis</p>	
<p>Papilas</p>	

Dermis	Inflamación	Edema	
		Infiltrados celulares	

**Cromatograma de *B. cordata***



## Cromatograma de verbascósido



# Cromatograma de linarina

