



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y  
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LA  
CORTEZA DE *Byrsonima crassifolia* (nanche)**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA  
GRANADOS PINEDA JESSICA**



México D.F

2012



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.

## **Jurado asignado**

**Presidente:** Dr. Arturo Navarro Ocaña

**Vocal: Dra.** Sobeida Sánchez Nieto

**Secretario:** Dr. José Fausto Rivero Cruz

**1er. suplente:** M. en C. Gloria Díaz Ruiz

**2do. suplente:** Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111. Edificio E

Facultad de Química UNAM

Asesor

---

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

---

Granados Pineda Jessica

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz, por su asesoría durante el trabajo experimental y la revisión del escrito.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión del presente manuscrito.

A la Dra. Gloria Díaz Ruiz por el apoyo técnico en la realización de los ensayos bacteriológicos que se desarrollaron durante este trabajo.

Al subprograma 127 "Formación Básica en Investigación".

Al proyecto PAPIIT105907 por el apoyo económico otorgado para la realización de esta tesis.

Al personal técnico de los laboratorios de RMN y Espectrometría de Masas de la USAI-FQ por el registro de los espectros de resonancia magnética y de masas.

---

|   |          |
|---|----------|
| Lista de Tablas .....   | v        |
| Lista de Diagramas .....  | vi       |
| Lista de Figuras.....   | vi       |
| Lista de Abreviaturas.....  | x        |
| <br>  |          |
| <b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>  | <b>1</b> |
| <br>  |          |
| <b>2. ANTECEDENTES .....</b>  | <b>4</b> |
| 2.1 Estrés oxidativo .....  | 4        |
| 2.1.1 Generalidades y concepto .....                                  | 4        |
| 2.1.2 Radicales libres y especies reactivas.....                      | 4        |
| 2.1.2.1 Origen .....  | 5        |
| 2.1.2.2 Efectos nocivos.....  | 5        |
| 2.1.3 Sistemas de defensa contra el estrés oxidativo .....            | 6        |
| 2.1.3.1 Sistemas enzimáticos .....                                    | 6        |
| 2.1.3.2 Sistemas no enzimáticos .....                                 | 8        |
| 2.2 Antioxidantes .....   | 10       |
| 2.2.1 Clasificación.....  | 10       |
| 2.2.2 Compuestos fenólicos.....                                       | 12       |
| 2.2.2.1 Compuestos fenólicos simples.....                             | 13       |
| 2.2.2.2 Ácidos fenólicos y aldehídos.....                             | 14       |
| 2.2.2.3 Acetofenonas y ácidos fenilacéticos .....                     | 14       |
| 2.2.2.4 Ácidos cinámicos .....  | 14       |
| 2.2.2.5 Cumarinas .....   | 14       |
| 2.2.2.6 Flavonoides .....   | 16       |
| 2.2.3 Relación estructura química – actividad antioxidante .....      | 19       |
| 2.2.4 Actividad antioxidante de los flavonoides <i>in vitro</i> ..... | 21       |
| 2.3 Medición de la cantidad de compuestos fenólicos .....             | 24       |
| 2.3.1. Ensayo de Folin-Ciocalteu.....                                 | 24       |
| 2.3.2 Ensayo de la vainillina.....                                    | 25       |

---

---

|  |    |
|--|----|
| 2.4 Medición de la cantidad de la capacidad antioxidante .....                               | 26 |
| 2.4.1 Ensayos asociados con la peroxidación de lípidos .....                                 | 26 |
| 2.4.1.1 Ensayo del ácido tiobarbitúrico .....  | 26 |
| 2.4.1.2 Ensayo de Malonaldehído/Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (MA/CLAE) ..... | 27 |
| 2.4.1.3 Ensayo de Malonaldehído/Cromatografía de Gases (MA/CG) .....                         | 27 |
| 2.4.1.4. Ensayo del dieno conjugado.....   | 27 |
| 2.4.1.5 Ensayo de blanqueamiento del $\beta$ -caroteno.....                                  | 27 |
| 2.4.2 Ensayos asociados con el atrapamiento de electrones y radicales .....                  | 27 |
| 2.4.2.1 Ensayo del DPPH .....  | 27 |
| 2.4.2.2 Ensayo del ABTS .....  | 28 |
| 2.4.2.3 Ensayo del Poder Antioxidante/Reductor de hierro (FRAP) .....                        | 29 |
| 2.4.2.4 Ensayo de Oxidación de hierro-Anaranjado de Xilenol (FOX) .....                      | 29 |
| 2.4.2.5 Ensayo del tiocianato férrico (FTC).....   | 30 |
| 2.4.2.6 Ensayo del aldehído/ácido carboxílico .....  | 30 |
| 2.5 Enfermedades periodontales.....  | 30 |
| 2.5.1 Concepto.....  | 30 |
| 2.5.2 Factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad periodontal ....               | 30 |
| 2.5.3 Biopelículas.....  | 30 |
| 2.5.3.1 Concepto .....   | 30 |
| 2.5.3.2 Características .....  | 31 |
| 2.5.3.3 Estructura .....   | 32 |
| 2.5.4 Caries dental.....   | 34 |
| 2.5.4.1 Concepto .....   | 34 |
| 2.5.4.2 Etiología .....  | 34 |
| 2.5.4.3 Microorganismos relacionados a la caries dental .....                                | 35 |
| 2.5.4.4 Factores de virulencia de los microorganismos relacionados con caries dental .....   | 35 |
| 2.5.5 Antimicrobianos .....  | 36 |
| 2.5.5.1 Generalidades .....  | 37 |
| 2.5.5.2 Clorhexidina.....  | 37 |

---

|  |           |
|--|-----------|
| 2.6.5.3 Fluroruros .....   | 38        |
| <b>2.6 <i>Byrsonima crassifolia</i> .....</b>  | <b>39</b> |
| 2.6.1 Sinonimia .....  | 39        |
| 2.6.2 Descripción .....  | 39        |
| 2.6.3 Distribución geográfica.....   | 40        |
| 2.6.4 Usos.....  | 40        |
| 2.6.5 Reportes sobre <i>B. crassifolia</i> .....   | 41        |
| <br>   |           |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>  | <b>46</b> |
| <br>   |           |
| <b>4. OBJETIVOS.....</b>   | <b>47</b> |
| 4.1 Objetivos generales.....   | 47        |
| 4.2 Objetivos particulares .....   | 47        |
| <br>   |           |
| <b>5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....</b>   | <b>48</b> |
| 5.1 Métodos generales de análisis .....  | 48        |
| 5.1.1. Análisis cromatográficos .....  | 48        |
| 5.1.2. Determinación de las constantes espectroscópicas.....   | 48        |
| 5.2 Material vegetal .....   | 48        |
| 5.3 Tratamiento previo del material vegetal .....  | 48        |
| 5.4 Estudio fitoquímico de la corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> .....  | 49        |
| 5.4.1. Obtención del extracto hexánico.....  | 49        |
| 5.4.1.1 Obtención e identificación de la mezcla de $\alpha$ y $\beta$ -amirina.....  | 49        |
| 5.4.1. 2 Detección e identificación del lupeol.....  | 49        |
| 5.4.2 Obtención del extracto metanólico.....   | 49        |
| 5.4.2.1 Fraccionamiento primario del extracto metanólico derivado de la corteza desengrasada de <i>Byrsonima crassifolia</i> ..... | 49        |
| 5.4.2.2 Obtención e identificación de la (-)-epicatequina.....   | 50        |
| 5.5 Determinación del contenido de antioxidantes.....  | 51        |
| 5.5.1 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu ..   | 51        |

---

|  |           |
|--|-----------|
| 5.6 Ensayos de capacidad antioxidante .....  | 52        |
| 5.6.1 Ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH') .....  | 52        |
| 5.6.2 Ensayo del 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS <sup>•+</sup> ) .....                         | 52        |
| 5.6.3 Poder antioxidante/reductor de Fe <sup>3+</sup> (FRAP) .....   | 53        |
| 5.7 Capacidad para neutralizar la lipoperoxidación por medio del ensayo de blanqueamiento de β-caroteno.....               | 53        |
| 5.8 Determinación del efecto de los extractos y compuestos puros sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ..... | 53        |
| 5.8.1 Microorganismos de prueba .....  | 53        |
| 5.8.2 Preparación de las muestras .....  | 53        |
| 5.8.3 Procedimiento general .....  | 53        |
| 5.8.4 Determinación de la CMI .....  | 54        |
| <b>6. RESULTADOS.....</b>  | <b>55</b> |
| 6.1 Determinación del contenido de antioxidantes .....   | 55        |
| 6.1.1 Determinación de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu.....   | 55        |
| 6.2 Ensayos de capacidad antioxidante .....  | 56        |
| 6.2.1 Ensayo del DPPH .....  | 56        |
| 6.2.2 Ensayo del ABTS .....  | 58        |
| 6.2.3 Poder Antioxidante/Reducción de Fe <sup>3+</sup> (FRAP) .....  | 59        |
| 6.3 Capacidad para neutralizar la lipoperoxidación por medio del ensayo de blanqueamiento de β-caroteno.....               | 61        |
| 6.4 Actividad sobre del crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> .....   | 62        |
| 6.4.1 Determinación de la CMI.....   | 62        |
| <b>7. DISCUSION DE RESULTADOS.....</b>   | <b>64</b> |
| 7.1 Contenido de antioxidantes .....   | 64        |
| 7.1.1 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu .....  | 64        |
| 7.2 Determinación de la capacidad antioxidante .....   | 64        |
| 7.2.1 Ensayo del DPPH .....  | 65        |

---

|  |           |
|--|-----------|
| 7.2.2 Ensayo del ABTS .....  | 66        |
| 7.2.3 Poder antioxidante/reductor de Fe <sup>3+</sup> (FRAP) .....   | 67        |
| 7.3 Capacidad para neutralizar la lipoperoxidación por medio del ensayo de blanqueamiento de β-caroteno.....               | 67        |
| 7.4 Relación de los ensayos de capacidad antioxidante .....  | 68        |
| 7.5 Determinación del efecto de los extractos y compuestos puros sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ..... | 68        |
| <b>8. CONCLUSIONES .....</b>   | <b>70</b> |
| <b>9. PERSPECTIVAS.....</b>  | <b>71</b> |
| <b>10. REFERENCIAS.....</b>  | <b>72</b> |

#### Lista de Tablas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Ejemplos de algunos compuestos fenólicos. Diseño de estructuras modificado de Vermerris <i>et al.</i> , 2006  | 15 |
| <b>Tabla 2.</b> Estructuras de los principales flavonoides encontrados en la naturaleza   | 17 |
| <b>Tabla 3.</b> Compuestos reportados que se han aislado de <i>B. crassifolia</i>   | 43 |
| <b>Tabla 4.</b> Contenido de fenoles totales determinados para el extracto total metanólico y para cada fracción  | 56 |
| <b>Tabla 5.</b> Resumen de los parámetros de actividad antioxidante para el extracto metanólico, el estándar Trolox y las sustancias de referencia para el ensayo de DPPH.                                  | 57 |
| <b>Tabla 6.</b> Resumen de los parámetros de actividad antioxidante para el extracto metanólico (C= 0.002 mg/mL), el estándar Trolox y las sustancias de referencia (C= 0.01 mg/mL) para el ensayo de ABTS. | 59 |

**Lista de Tablas (continuación)**

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 7.</b> Resumen de los parámetros de actividad antioxidante para el extracto metanólico y las sustancias de referencia para el ensayo de FRAP (C= 0.5 mg/mL). | 61 |
| <b>Tabla 8.</b> Parámetros de capacidad antioxidante de lípidos (%AA) mediante el ensayo de blanqueamiento de $\beta$ -caroteno                                       | 62 |
| <b>Tabla 9.</b> Concentraciones mínimas inhibitorias calculadas para el extracto total metanólico total, las fracciones primarias y el flavan-3-ol aislado.           | 63 |

**Lista de Diagramas**

|   |    |
|---|----|
| <b>Diagrama 1.</b> Diagrama multifactorial de Keyes. Modificado de Sacyl, 2006                  | 34 |
| <b>Diagrama 2.</b> Proceso de la obtención y fraccionamiento del extracto metanólico de nanche. | 51 |

**Lista de Figuras**

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Reacciones catalizadas por la SOD   | 6  |
| <b>Figura 2.</b> Descomposición del peróxido de hidrógeno en especies neutras  | 7  |
| <b>Figura 3.</b> Descomposición del peróxido de hidrógeno por el glutatión en conjunto con la glutatión peroxidasa.        | 7  |
| <b>Figura 4.</b> Regeneración del glutatión oxidado por la glutatión reductasa. Modificado de Ríos de Molina, 2003.        | 7  |
| <b>Figura 5.</b> Serie de reacciones en la formación de EROs, donde se involucra la reacción de Fenton.                    | 8  |
| <b>Figura 6.</b> Regeneración del radical tocoferilo por la ubiquinona   | 9  |
| <b>Figura 7.</b> Reacción del radical peroxilo con la molécula de $\beta$ -caroteno para formar el aducto correspondiente. | 9  |
| <b>Figura 8.</b> Estabilización del radical libre por el ácido ascórbico   | 10 |

---

**Lista de Figuras (continuación)**

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 9.</b> Estructura básica de los flavonoides. Modificado de Iglesias-Neira, 2009   | 16 |
| <b>Figura 10.</b> Estructura de catecol (orto-dihidroxi). Modificada de Procházková <i>et al.</i> , 2011  | 20 |
| <b>Figura 11.</b> Doble enlace 2,3 conjugado a un grupo 4-oxo del anillo C. Modificada de Procházková <i>et al.</i> , 2011  | 20 |
| <b>Figura 12.</b> Atrapamiento de EROs por los flavonoides. El radical libre FI-O. puede reaccionar con un segundo radical, formándose una estructura estable de quinona. Reproducida de Procházková <i>et al.</i> , 2011 | 22 |
| <b>Figura 13.</b> Sitios de unión para los metales en la estructura del flavonoide. Tomada de Procházková <i>et al.</i> , 2011.   | 23 |
| <b>Figura 14.</b> Reacción en el ensayo de Folin-Ciocalteu  | 25 |
| <b>Figura 15.</b> Reacción de identificación de flavonoides por vainillina. Modificado de Martínez-Vásquez, 2007  | 25 |
| <b>Figura 16.</b> Formación del aducto MA-TBA. Reproducido de Moon <i>et al.</i> , 2009   | 26 |
| <b>Figura 17.</b> Formación de los aductos de $\beta$ -caroteno y antioxidante con el radical peroxilo. Reproducido de Moon <i>et al.</i> , 2009  | 27 |
| <b>Figura 18.</b> Reacción entre DPPH y molécula antioxidante. Modificado de Moon <i>et al.</i> , 2009.   | 28 |
| <b>Figura 19.</b> Formación del radical catiónico de ABTS con persulfato de sodio. Modificado de Moon <i>et al.</i> , 2009.   | 28 |
| <b>Figura 20.</b> Formación del complejo ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) a partir del ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ). Reproducido de Moon <i>et al.</i> , 2009.  | 29 |
| <b>Figura 21.</b> Formación del complejo $\text{Fe}^{3+}$ -naranja de xilenol a partir de $\text{Fe}^{2+}$ por un oxidante, seguido del tratamiento naranja de xilenol. Modificado de Moon <i>et al.</i> , 2009.          | 29 |

---

**Lista de Figuras (continuación)**

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 22.</b> Etapas de la formación de una biopelícula sobre una superficie biológica. Reproducida de Negroni, 2009.  | 32 |
| <b>Figura 23.</b> Tipos de bacterias involucradas en la colonización de una superficie dental. Modificada de Negroni, 2009.  | 33 |
| <b>Figura 24.</b> Molécula de clorhexidina   | 37 |
| <b>Figura 25.</b> Disociación del fluoruro de hidrógeno  | 38 |
| <b>Figura 26.</b> Detalle de la corteza de <i>B. crassifolia</i>   | 39 |
| <b>Figura 27.</b> Distribución del nanche en América. Modificado de <a href="http://ntsavanna.com/nance-macho">http://ntsavanna.com/nance-macho</a>  | 40 |
| <b>Figura 28a.</b> Curva patrón de ácido gálico para la determinación de fenoles totales en las muestras de prueba.  | 55 |
| <b>Figura 28b.</b> Coloraciones en la determinación de fenoles totales. Tubo de ensayo de la izquierda: control negativo, tubo de ensayo de la derecha: muestra de extracto metanólico.  | 55 |
| <b>Figura 29.</b> Coloraciones en el ensayo de atrapamiento del radical DPPH. El color morado indica la presencia del radical estable no neutralizado, mientras que el color amarillo indica la neutralización del mismo.        | 56 |
| <b>Figura 30.</b> Curva temporal de la neutralización del radical DPPH.  | 57 |
| <b>Figura 31.</b> Coloraciones en el ensayo de atrapamiento del radical ABTS. El color azul-verde indica la presencia del radical estable no neutralizado, mientras que la ausencia de color indica la neutralización del mismo. | 58 |
| <b>Figura 32.</b> Curva temporal de la neutralización del radical ABTS.  | 58 |

---

**Lista de Figuras (continuación)**

- Figura 33.** Curva patrón de ácido ascórbico para el ensayo de FRAP. 59
- Figura 34.** Curva patrón de Trolox® para el ensayo de FRAP. 60
- Figura 35.** Coloraciones en el ensayo de FRAP. El color azul indica la formación del complejo colorido por reducción del hierro, mientras que la ausencia de color indica que éste no se formó. 60
- Figura 36.** Coloración en el ensayo de blanqueamiento de  $\beta$ -caroteno. En el tubo de ensayo de la izquierda se muestra la decoloración total del  $\beta$ -caroteno (control negativo) y a la derecha, disminución del color del  $\beta$ -caroteno (extracto metanólico). 61
- Figura 37.** Placa ELISA donde se muestra la inhibición del crecimiento de *S. mutans* por las fracciones del extracto metanólico en la primera hasta la tercer columna y se muestra la turbidez en los pozos G y H del control negativo. 63
- Figura 38.** Estabilización del aroxi-radical en el anillo B de los flavonoides. 66

**Lista de Abreviaturas**

| <b>Abreviatura</b>              | <b>Significado</b>   |
|---------------------------------|--|
| A                               | absorbancia  |
| %AA                             | porcentaje de actividad antioxidante   |
| ABC                             | área bajo la curva   |
| ABTS <sup>+</sup>               | radical 2,2'-azino- <i>bis</i> -(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio |
| AcOEt                           | acetato de etilo   |
| ADN                             | ácido desoxirribonucleico  |
| Asch                            | ácido ascórbico  |
| Asc <sup>-</sup>                | ácido dehidroascórbico   |
| ATCC                            | American Type Culture Collection   |
| ATP                             | adenosín trifosfato  |
| BHA                             | <i>ter</i> -butilhidroxianisol   |
| BHI                             | brain heart infusion   |
| BHT                             | <i>ter</i> -butilhidroxitolueno  |
| C <sup>+</sup>                  | control positivo   |
| C <sup>-</sup>                  | control negativo   |
| C-C                             | enlace carbono - carbono   |
| CAT                             | catalasa   |
| ccf                             | cromatografía en capa fina   |
| CG                              | cromatografía de gases   |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | diclorometano  |
| CI <sub>50</sub>                | concentración inhibitoria cincuenta  |
| CLAE                            | cromatografía de líquidos de alta eficiencia                                 |
| CMI                             | concentración mínima inhibitoria   |

**Lista de Abreviaturas (continuación)**

| <b>Abreviatura</b> | <b>Significado</b>   |
|--------------------|--|
| CONABIO            | Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad |
| COX                | enzima ciclooxigenasa  |
| $\text{Cu}^+$      | ión cobre (I)  |
| $\text{Cu}^{2+}$   | ión cobre (II)   |
| DPPH               | 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo                                    |
| DPPH $\cdot$       | radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo                      |
| DRc                | rapidez de degradación del control                               |
| DRs                | rapidez de degradación de la muestra                             |
| $e^-$              | electrón   |
| EA                 | eficiencia anti-radical  |
| ELISA              | enzyme-linked immunosorbent assay                                |
| EpRE               | respuesta elemento electrofílico                                 |
| ERO                | especie reactivas del oxígeno                                    |
| ERN                | especie reactiva de nitrógeno                                    |
| ESR                | resonancia magnética de espín electrónico                        |
| ET                 | electron transfer  |
| EtOH               | etanol   |
| Exto               | extracto   |
| $\text{F}^-$       | ión fluoruro   |
| $\text{Fe}^{2+}$   | ión hierro (II)  |
| $\text{Fe}^{3+}$   | ión hierro (III)   |
| FLA2               | fosfolipasa 2  |
| Fl                 | flavonoide   |
| FIO $\cdot$        | radical flavonoide   |
| FOX                | oxidación de hierro/anaranjado de metilo                         |

**Lista de Abreviaturas (continuación)**

| <b>Abreviatura</b>                           | <b>Significado</b>                    |
|--|---------------------------------------|
| FRAP   | poder antioxidante/reductor de hierro |
| FTC  | tiocianato férrico                    |
| Fx   | fracción                              |
| GSH  | glutación reducido                    |
| GSSG   | glutación oxidado                     |
| GSP  | glutación peroxidasa                  |
| H <sup>+</sup>                               | ión hidrógeno                         |
| HAT  | hydrogen atom transfer                |
| HCOOH  | ácido fórmico                         |
| HF   | fluoruro de hidrógeno                 |
| H <sub>2</sub> O                             | agua                                  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                | peróxido de hidrógeno                 |
| IgA1   | inmunoglobulina A tipo 1              |
| K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> | persulfato de potasio                 |
| LDL  | lipoproteína de baja densidad         |
| LOO <sup>·</sup>                             | radical peroxilo                      |
| LOOH   | peróxido lipídico                     |
| LOX  | lipooxigenasa                         |
| m  | masa                                  |
| MA   | malonaldehído                         |
| Mac  | maceración                            |
| MeOH   | metanol                               |
| MEXU   | herbario nacional                     |
| Mo <sub>8</sub> O <sub>23</sub>              | óxido de molibdeno                    |
| MPO  | mieloperoxidasa                       |

**Lista de Abreviaturas (continuación)**

| <b>Abreviatura</b>              | <b>Significado</b>                                |
|---------------------------------|---|
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | bicarbonato de sodio                              |
| NADH                            | dinucleótido de nicotinamida y adenina            |
| NADPH                           | dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato    |
| Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> | molibdato sódico                                  |
| Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> | tungstato sódico                                  |
| NO                              | óxido nítrico                                     |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>    | radical peroxinitrito                             |
| NPD                             | detector de fósforo y nitrógeno                   |
| O <sub>2</sub>                  | oxígeno molecular                                 |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup>     | radical superóxido                                |
| OH <sup>-</sup>                 | radical hidroxilo                                 |
| OH <sup>-</sup>                 | ión hidroxilo                                     |
| -OH                             | grupo funcional alcohol                           |
| OMS                             | organización mundial de la salud                  |
| ON                              | óxido nítrico                                     |
| ONS                             | óxido nítrico sintasa                             |
| PEC                             | polisacárido extracelular                         |
| QH                              | ubiquinona  |
| Q <sup>·</sup>                  | radical ubiquinona                                |
| r                               | factor de correlación                             |
| RMN                             | resonancia magnética nuclear                      |
| RMN <sup>1</sup> -H             | resonancia magnética nuclear protónica            |
| SOD                             | enzima súper óxido dismutasa                      |
| SOD-Cu <sup>2+</sup>            | enzima súper óxido dismutasa dependiente de cobre |

## Lista de Abreviaturas (continuación)

| <b>Abreviatura</b>             | <b>Significado</b>   |
|--------------------------------|--|
| TBAR                           | ácido tiobarbitúrico   |
| TBHQ                           | <i>ter</i> -butilhidroxiquinona                              |
| TEAC                           | capacidad antioxidante en equivalentes trolox                |
| TO <sup>·</sup>                | radical tocoferilo   |
| TOH                            | tocoferol  |
| TPTZ                           | 2,4,6-tripiridil-s-triazina                                  |
| Trolox®                        | ácido (±)-6-hidroxi-2, 5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico |
| UDP                            | uridina difosfato  |
| UFC                            | unidades formadoras de colonias                              |
| UV                             | ultravioleta   |
| WapA                           | proteína asociada a pared celular                            |
| W <sub>8</sub> O <sub>23</sub> | óxido de tungsteno   |
| X <sup>·</sup>                 | radical libre  |
| XO                             | xantina oxidasa  |

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad, cuando el hombre recurría a la naturaleza en busca de alimento y para cuidar de su salud, aprendiendo a conocer las plantas que lo curaban (Hernández, 1981). A través de los siglos, culturas como la Griega y la China, por mencionar algunas, adquirieron conocimientos empíricos sobre las propiedades medicinales de varias plantas y hierbas, los cuales fueron transmitidos oralmente o de manera escrita (Rojas-Alba, 2010). Este cúmulo de información y prácticas son parte de la Medicina Tradicional, la cual es definida por la Organización Mundial de la Salud como “la suma total de todos los conocimientos y prácticas, ya sean explicables o no, que se utilizan para el diagnóstico, la prevención y la eliminación de todo desequilibrio físico, mental o social y que se basan exclusivamente en la experiencia práctica y la observación, transmitidos de generación en generación, ya sea de forma oral o escrita”. Sin embargo, con el auge de la tecnología e industria, se abandonó esta práctica y se volvió cada vez más frecuente el uso de principios activos sintéticos para aliviar las enfermedades.

En la actualidad los medicamentos alopáticos enfrentan la problemática de la falta de abastecimiento para atender los problemas prioritarios de salud, así como los elevados costos, e incluso inalcanzables por ciertos sectores de la población. (Osuna-Torres, 2005). Aunado a esto, la población desconfía de la eficacia de los medicamentos alopáticos, por lo que el consumo de medicamentos de origen herbolario se ha convertido nuevamente en una opción para el tratamiento de diversos padecimientos en varios países. Es así como, desde el último cuarto del siglo XX, comienzan a aparecer grupos de investigación científica para el estudio de las plantas medicinales, y ahora reconocidos y promocionados por el programa internacional de “Promoción de la Medicina Tradicional en los Países en Desarrollo” promovido por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2012).

Particularmente en México, donde el uso de las plantas medicinales constituye una tradición, en 1991 el Instituto Nacional Indigenista emitió una colección de monografías de las plantas medicinales de mayor uso en México bajo

el título de “Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana”, el cual fue reeditado en 2009 por el Programa Nación Multicultural de la UNAM dentro de “Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana”. El trabajo concentrado en esta biblioteca se obtuvo por medio de estudios de campo en las comunidades de la República Mexicana, tomando el testimonio directo de los médicos indígenas. Lo que dio como resultado una colección de cuadernos que contienen una breve historia de la comunidad y de la zona de estudio, mapa de localización regional, dibujos de las plantas hechos por personas de las comunidades, además de la descripción, hábitat, calidad de la planta, localización y aspectos ecológicos. Se abunda en los datos sobre el uso medicinal, causas y síntomas de la enfermedad para la que es empleada la planta en cuestión. Se cuenta hasta ahora con un listado de 852 especies de plantas medicinales (Argueta *et al.*, 1994; Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

En el Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, se enlista el “nanche”, cuya denominación botánica es *Byrsonima crassifolia*. Este árbol se encuentra descrito desde los siglos XVI al XX en diversos documentos haciendo especial alusión a sus diversas propiedades curativas en desórdenes de tipo digestivo como diarrea, disentería, dolor de estómago, “empacho”, falta de digestión, “bilis” y “tapado”. También son muy conocidas sus propiedades para curar afecciones de la piel como la sarna, el salpullido y las heridas (Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana, 1999).

Por su parte, la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) cuenta con una monografía de *B. crassifolia*, haciendo una descripción física y de sus variados usos tradicionales adicionalmente al medicinal, a continuación se enlistan algunos de ellos, indicando la parte de la planta que se usa para dicho fin.

- ✓ Colorante (fruto). La cáscara del fruto produce un tinte de color castaño claro que se usa para pigmentar tejidos de algodón.
- ✓ Combustible (madera). Leña y carbón.

- ✓ Comestible (fruto). Se consumen crudos y procesados (bebidas, jaleas, dulces, nieves, conservas).
- ✓ Construcción (madera). Su madera dura y flexible, fuerte y pesada se utiliza en la construcción rural y elementos estructurales.
- ✓ Curtiente (corteza).
- ✓ Forrajero (hoja).
- ✓ Maderable (madera). Se emplea en muebles, gabinetes, pisos, torneados, molduras y marcos para puertas, ventanas y cuadros.

El interés en *B. crassifolia* se centra en sus propiedades antioxidantes, que constituyen una alternativa en el tratamiento de las enfermedades crónico-degenerativas que, según la Dra. Margaret Chan directora general de la OMS, son actualmente la principal causa de morbilidad y mortalidad (OMS, 2010).

A la vez cobra especial interés su actividad antibacteriana como alternativa del tratamiento de las enfermedades orales, incluyendo las caries dentales y enfermedades periodontales, las cuales ocasionan considerables costos sociales y económicos (OMS, 2010).

---

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Estrés oxidativo**

#### **2.1.1. Generalidades y concepto**

Las enfermedades crónico-degenerativas se adquieren como resultado de una mala alimentación y el hábito de fumar, por mencionar algunas causas; además pueden tener un componente hereditario. Estas avanzan progresivamente hasta que terminan con la vida de la persona sin que exista alguna cura para detenerlas. Las enfermedades crónico-degenerativas más comunes son la obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial, cirrosis hepática y neoplasias. En todas estas enfermedades se ha encontrado cierto daño celular que puede ser ocasionado por diversas causas, entre ellas, el estrés oxidativo (Nevarez-Aceves, 2006).

El estrés oxidativo es un estado en la cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular, es decir hay un desbalance entre los mecanismos oxidantes y los mecanismos antioxidantes. Cuando las especies reactivas oxidantes superan las defensas antioxidantes se produce el estrés oxidativo y como consecuencia hay daño a las macromoléculas celulares como proteínas, ADN y lípidos. Por ejemplo la lipoperoxidación, proceso antes descrito, conduce a la pérdida de las propiedades de la membrana celular por lo que se asocia como la etiología de enfermedades como aterosclerosis y artritis reumatoide (Ríos de Molina, 2003).

#### **2.1.2. Radicales libres y especies reactivas**

Los radicales libres son átomos o moléculas que contiene uno o más electrones desapareados y pueden existir en forma independiente (Díaz-Cruz, 2007). Estas especies se producen durante el funcionamiento normal del organismo. En el humano, principalmente se originan el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), el radical superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical peroxinitrito ( $\text{NO}_3^\cdot$ ) (Mora, 2002).

### 2.1.2.1. Origen

Una fuente de estas especies radicales activas es la mitocondria puesto que sólo el 90% del total del oxígeno inhalado se consume en la cadena respiratoria; del restante 10%, alrededor del 2%, se transforma en el radical superóxido. Otra fuente la constituyen los fagocitos activados porque estos producen el superóxido como mecanismo protector frente a agentes u organismos extraños. Por último, el endotelio produce óxido nítrico como factor relajante durante las reacciones inflamatorias, mismo que es transformado en el radical peroxinitrito por acción del radical superóxido (Ferrer-Viant *et al.*, 1999).

Adicionalmente a las fuentes endógenas, la producción de los radicales libres se ve influenciada por factores ambientales externos como son los componentes del humo del cigarro, los contaminantes ambientales, las radiaciones gamma y la luz ultravioleta (Lima-Hernández, 2002).

### 2.1.2.2. Efectos Nocivos

Con las evidencias anteriores se deduce claramente que los radicales pueden causar daño e incluso, la muerte celular por interacción con las diferentes macromoléculas. A continuación se exponen las reacciones entre las macromoléculas y los radicales libres.

*Lípidos.* El radical  $\text{OH}^\cdot$  ataca las cadenas laterales de los ácidos grasos de los fosfolípidos membranales originando radicales peroxilo. Los nuevos radicales tienen la capacidad de atacar los fosfolípidos adyacentes en un intento por estabilizar su estructura, generándose en una reacción en cadena llamada lipoperoxidación (Velázquez-Paniagua *et al.*, 2004).

*Proteínas.* Algunas cadenas laterales de los aminoácidos que conforman a las proteínas son susceptibles de ser atacadas por el radical hidroxilo, en consecuencia, las proteínas pueden perder su estructura cuaternaria y finalmente, su actividad biológica (Velázquez-Paniagua *et al.*, 2004).

*Carbohidratos.* Los monosacáridos oxidados por los radicales libres pueden combinarse con los grupos carbonilos de las proteínas (Velázquez-Paniagua *et al.*, 2004).

*Ácidos nucleicos.* La interacción de los radicales libres con estas moléculas causa cambios conformacionales por modificación de las bases nitrogenadas y pérdida de nucleótidos. Lo anterior conlleva a mutaciones y carcinogénesis, pérdida de expresión por daño a un gen específico (Velázquez-Paniagua *et al.*, 2004).

### **2.1.3. Sistemas de defensa contra el estrés oxidativo**

Los efectos biológicos de los radicales libres son controlados en los seres vivos por una gama de mecanismos fisiológicos, tanto enzimáticos como no enzimáticos (Ferrer- Viant *et al.*, 1999).

#### **2.1.3.1. Sistemas enzimáticos**

En primera instancia, se cuenta con el sistema enzimático de defensa antioxidante que está compuesto por tres enzimas: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSP) y la catalasa. Estas sólo eliminan las sustancias potencialmente iniciadoras de la oxidación y no intervienen en las reacciones desencadenadas por las especies reactivas (Ferrer-Viant *et al.*, 1999).

La superóxido dismutasa, es una metaloenzima de cobre que convierte al radical superóxido en peróxido de hidrógeno mediante la reacción siguiente (Nacher *et al.*, 2007):



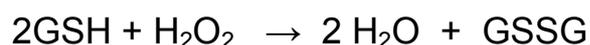
**Figura 1.** Reacción catalizada por la SOD.

La catalasa, ampliamente distribuida, se sitúa en los peroxisomas de las células donde catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno (González-Torres *et al.*, 2000):



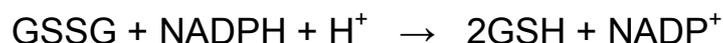
**Figura 2.** Descomposición del peróxido de hidrógeno en especies neutras.

La glutatión peroxidasa es otra metaloenzima (dependiente de selenio) que se localiza en el citosol y en la mitocondria de la célula. Cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno por medio del glutatión (GSH) (González-Torres *et al.*, 2000):



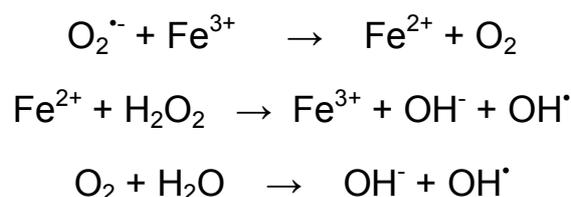
**Figura 3.** Descomposición del peróxido de hidrógeno por el glutatión en conjunto con la glutatión peroxidasa. Reproducido de González-Torres *et al.*, 2000.

En la reacción anterior se obtiene el glutatión oxidado (GSSG) que será reconstituido por la acción de la glutatión reductasa y NADPH (González-Torres *et al.*, 2000; Iglesias-Neira, 2009):



**Figura 4.** Regeneración del glutatión oxidado por la glutatión reductasa. Modificado de Iglesias-Neira, 2009.

Además se cuenta con proteínas (la ferritina, transferrina y ceruloplasmina) que se unen a metales que limitan la disponibilidad de hierro necesario para formar el radical  $\text{OH}^\cdot$  por la reacción de Fenton (Ferrer-Viant *et al.*, 1999).



**Figura 5.** Serie de reacciones en la formación de EROs, donde se involucra la reacción de Fenton.

### 2.1.3.2. Sistemas no enzimáticos

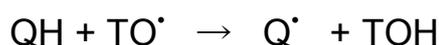
En segunda instancia, está la inactivación no enzimática que consiste en la acción de sustancias como la ubiquinona, los tocoferoles, los carotenoides y el ácido ascórbico. Son llamadas “antioxidantes verdaderos” porque intervienen en la cadena de formación de los radicales libres, convirtiendo los hidroperóxidos y radicales en compuestos estables, inactivando a los radicales lipídicos y dando lugar a la formación de un radical más estable, por lo que se denominan “scavengers”. La efectividad de estos antioxidantes es dependiente de sus propiedades químicas como las energías de enlace, la posibilidad de formación de distintas estructuras resonantes del radical formado y la susceptibilidad a la oxidación, que está determinado por el valor de su potencial estándar de reducción (Ferrer-Viant *et al.*, 1999). Así como, de su disponibilidad en el organelo y el lugar de formación de los radicales libres.

#### *Tocoferoles*

Su actividad se debe a su estructura fenólica que es capaz de estabilizar el radical tocoferilo resultante de la neutralización de los radicales peroxilo ( $\text{LOO}^\cdot$ ). El radical tocoferilo puede reaccionar con otro radical tocoferilo para producir un dímero que es más estable. La molécula de tocoferol se regenera gracias a otras sustancias como el ascorbato o el glutatión (Ferrer-Viant *et al.*, 1999).

### *Ubiquinona*

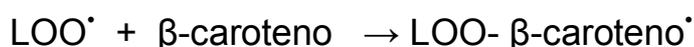
También llamada coenzima Q, se encuentra en la membrana mitocondrial de las células, donde participa como componente esencial de la cadena transportadora de electrones. La forma reducida neutraliza radicales peroxilo, pero con menos eficacia que los tocoferoles. Se encarga de regenerar al  $\alpha$ -tocoferol, según la siguiente ecuación (Ferrer-Viant *et al.*, 1999):



**Figura 6.** Regeneración del radical tocoferilo por la ubiquinona

### *Carotenoides*

Son compuestos liposolubles susceptibles a la oxidación, por ejemplo al ataque de radicales peroxilo, los cuales no son capaces de abstraer el hidrógeno del carotenoide por lo que es adicionado al sistema conjugado y se da lugar a la formación de un aducto (Ferrer-Viant *et al.*, 1999).



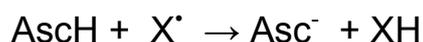
**Figura 7.** Reacción del radical peroxilo con la molécula de  $\beta$ -caroteno para formar el aducto correspondiente.

Los carotenoides son buenos protectores de la oxidación lipídica catalizada por la luz ya que interfiere en la activación del oxígeno triplete a singulete. El  $\beta$ -caroteno no es destruido en este proceso ya que regresa al estado fundamental disipando la energía en forma de calor (Ferrer-Viant *et al.*, 1999).

### *Ácido ascórbico*

El ácido ascórbico es hidrosoluble y se encuentra desprotonado bajo condiciones fisiológicas. El ascorbato dona un electrón para producir el radical semidehidroascorbato que es oxidado después a dehidroascorbato, el cual no es reactivo (Sánchez, 2001).

Por otra parte, es importante mencionar que también tiene la capacidad de secuestrar metales y por lo tanto, de neutralizar la actividad catalítica de los mismos. También neutraliza EROs como el oxígeno singulete y el radical superóxido, como se muestra en la reacción (Ferrer-Viant *et al*, 1999):



**Figura 8.** Estabilización del radical libre por el ácido ascórbico.

Posteriormente el ascorbato es regenerado por medio de la reducción en sistemas enzimáticos por NADPH o NADH.

## 2.2. Antioxidantes

Un antioxidante puede ser definido como cualquier sustancia que retarda, previene o remueve el blanco del daño oxidativo de una molécula (Procházková *et al.*, 2011). Esto lo logra cediendo electrones a los radicales libres para estabilizarlos y por lo tanto, combaten la degeneración y muerte de las células. El radical generado en la molécula antioxidante es inocuo ya que ésta tiene la capacidad de deslocalizar el electrón gracias su estructura. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos (Venéreo, 2002).

### 2.2.1. Clasificación

Se ha clasificado a los flavonoides bajo diversos criterios como los son: origen, sitio donde ejercen su acción y la fuente. A continuación se describe cada apartado con los ejemplos correspondientes.

a) Según su origen (Venéreo, 2002).

- **Endógenos.** Constituidos por los mecanismos de defensa del propio organismo. Por ejemplo: SOD, GSP, catalasa, tocoferol, ubiquinona, carotenoides y el ácido ascórbico.
- **Exógenos.** Son aquellos adquiridos por medio de la dieta. Principalmente se encuentran:

✓ *Vitamina E*. Es el antioxidante por excelencia de los medios lipídicos del organismo. Se encuentra en el aceite de soya, aceite de oliva, almendra, cacahuate, mantequilla, huevo, leche entera, entre otros (Lima-Hernández, 2002).

✓ *Vitamina C*. Es el principal agente antioxidante en los medios acuosos del organismo. Gracias a su potencial de oxidación reducción evita que en su presencia se oxiden otros compuestos. Debido su naturaleza hidrosoluble es eliminada del organismo, por lo que debe ingerirse con frecuencia. Esta vitamina se encuentra en las frutas cítricas, los pimientos crudos, la alfalfa, el perejil, el hinojo, la col de Bruselas, la coliflor, el kiwi, el hinojo y otras verduras (Lima-Hernández, 2002).

✓ *Flavonoides*. Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales, así como en el té negro, el café, la cocoa, la cerveza y el vino rojo (Lima-Hernández, 2002). La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus excelentes propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, así como de la inhibición de oxidasas tales como la lipoxigenasa (LOX), la ciclooxigenasa (COX) la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO). Otros mecanismos incluyen la inhibición de enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, este es el caso de la fosfolipasa A2 (FLA2) y la estimulación de la catalasa y la superóxido dismutasa (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

b) Según el sitio donde ejercen su acción (Venéreo, 2002).

- Intracelular
  - ✓ Superóxido dismutasa
  - ✓ Catalasa
  - ✓ Peroxidasa

- 
- ✓ Glutación peroxidasa
  - ✓ Proteínas que ligan metales
  
  - Membrana
    - ✓ Vitamina E
    - ✓  $\beta$ -carotenos
    - ✓ Ubiquinol-10
  
  - Extracelulares
    - ✓ Ceruloplasmina
    - ✓ Transferinas
    - ✓ Lactoferrinas
    - ✓ Albúminas
    - ✓ Haptoglobinas
    - ✓ Vitamina C
    - ✓ Ácido úrico
    - ✓ Vitamina E

c) Según su fuente (Iglesias-Neira, 2009).

- Naturales. Obtenidos principalmente de plantas y vegetales, por ejemplo, el eugenol, ácidos caféico y ferúlico, ácido clorogénico, apigenina, por mencionar algunos.
  
- Sintéticos. Aquellos sintetizados como: *ter*-butilhidroxitolueno (BHT), el *ter*-butilhidroxianisol (BHA) y la *ter*-butilhidroxiquinona (TBHQ).

### 2.2.2. Compuestos fenólicos

El interés por los compuestos fenólicos o polifenoles, como benéficos para la salud, se ha incrementado debido a que se han observado potentes actividades antioxidantes y atrapadoras de radicales libres en estudios *in vitro*. Sin embargo,

su papel *in vivo* aún no está claro ya que, su aparición en plantas como una mezcla compleja de compuestos polifenólicos crea grandes dificultades en el análisis de su biodisponibilidad y de sus efectos nutricionales y fisiológicos (Procházková *et al.*, 2011).

Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario por lo que se pueden encontrar en una gran variedad de plantas comestibles: frutos, hortalizas, bebidas (como té, café, cerveza y vino tinto), en el aceite de oliva, en cereales y en algunas semillas. El aporte de polifenoles en la dieta puede estar entre 50 y 800 mg/día, dependiendo del consumo de productos que lo contienen. Un nivel importante de antioxidantes, se alcanza cuando el consumo es de unos 800 mg/día, que puede lograrse con una dieta rica en frutas y hortalizas (Estrella-Pedrola, 2007).

Algunos polifenoles son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos.

La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos (Quiñones *et al.*, 2012).

Los polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias, con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de 8,000 compuestos distintos. Químicamente, son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilo. Estos compuestos se pueden clasificar en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y de los elementos estructurales que unen a los anillos (Manach *et al.*, 2004).

#### **2.2.2.1. Compuestos fenólicos simples**

Son básicamente fenoles sustituidos. El patrón de sustitución del anillo bencénico por grupos –OH se encuentra en posiciones 1,2-, 1,3- y 1,4-. Con tres

sustituyentes, el patrón de sustitución puede ser 1,3,5-, la cual si se trata de tres sustituyentes idénticos se llama *meta*-tri-sustitución. Como ejemplos se tiene al resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) y el floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) (Vermerris *et al.*, 2006).

#### **2.2.2.2. Ácidos fenólicos y aldehídos**

Los ácidos hidroxibenzoicos se caracterizan por la presencia de un grupo carboxilo sustituido en un fenol. Como ejemplos están el ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido protocatequico, ácido salicílico y ácido vanílico (Vermerris *et al.*, 2006).

#### **2.2.2.3. Acetofenonas y ácidos fenilacéticos**

Las fenonas son compuestos C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub> que raramente se encuentran en la naturaleza. Ejemplos de estos compuestos incluyen a 2-hidroxiacetofenona y ácido 2-hidroxifenil acético (Vermerris *et al.*, 2006).

#### **2.2.2.4. Ácidos cinámicos**

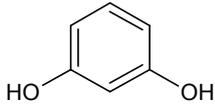
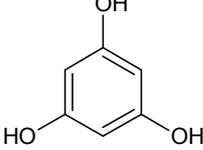
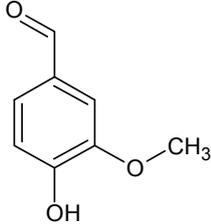
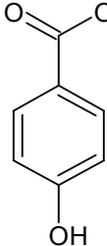
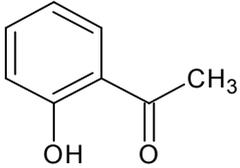
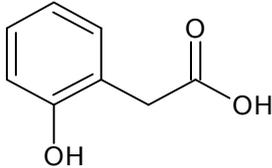
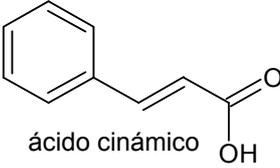
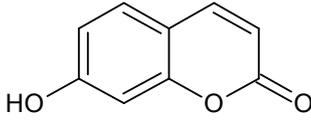
Hay seis tipos comunes de ácidos cinámicos, los cuales comparten un esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Todas las plantas contienen al menos tres de estos compuestos. Como ejemplos están ácido cinámico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido sinápico. Los ácidos cinámicos se encuentran con frecuencia en las plantas como ésteres del ácido quínico, ácido siquímico y ácido tartárico. Por ejemplo, el ácido clorogénico es el éster del ácido cafeico (Vermerris *et al.*, 2006).

#### **2.2.2.5. Cumarinas**

Estos compuestos tienen en común una estructura 2*H*-1-benzopiran-2-ona, denominada cumarina. Sobre esta estructura, que se origina biosintéticamente por lactonización del ácido cumárico, se disponen sustituyentes de distinta naturaleza química dando lugar a diversos derivados. Prácticamente todas las cumarinas, poseen un sustituyente hidroxílico en posición 7 ya sea libre o combinado.

Muchas cumarinas juegan un papel importante en la resistencia a enfermedades y pestes, así como en la tolerancia a la radiación UV (Vermerris *et al.*, 2006).

**Tabla 1.** Ejemplos de algunos compuestos fenólicos. Diseño de estructuras modificado de Vermerris *et al.*, 2006.

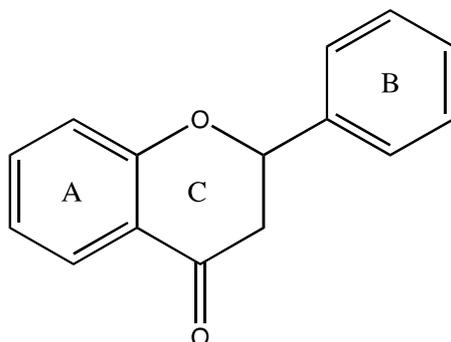
| Clase                               | Ejemplos  |  |
|-------------------------------------|---|--|
| Fenólicos simples                   |  <p data-bbox="715 763 831 790">Resorcinol</p>               |  <p data-bbox="1134 801 1273 828">Floroglucinol</p>                     |
| Ácidos fenólicos y aldehídos        |  <p data-bbox="703 1111 794 1137">vainillina</p>            |  <p data-bbox="1038 1122 1318 1149">ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico</p> |
| Acetofenonas y ácidos fenilacéticos |  <p data-bbox="643 1402 887 1429">2-hidroxiacetofenona</p> |  <p data-bbox="1026 1402 1334 1429">ácido 2-hidroxifenilacético</p>   |
| Ácidos cinámicos                    |  <p data-bbox="663 1603 895 1630">ácido cinámico</p>       |  <p data-bbox="1078 1626 1238 1653">ácido cafeico</p>                  |
| Cumarinas                           |  <p data-bbox="895 1850 1046 1877">umbeliferona</p>       |  |

### 2.2.2.6. Flavonoides

A estos compuestos, miembros del grupo de polifenoles, además de su actividad antioxidante, se les ha atribuido una gran diversidad de efectos terapéuticos, tales como actividad cardiotónica, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antineoplásica, antimicrobial, entre otras (Procházková *et al.*, 2011).

En la naturaleza, las plantas son la única fuente natural de flavonoides, por ejemplo, se encuentran en frutas, verduras, semillas, cereales y en algunos productos manufacturados como la cerveza, el té y el vino (Iglesias-Neira, 2009).

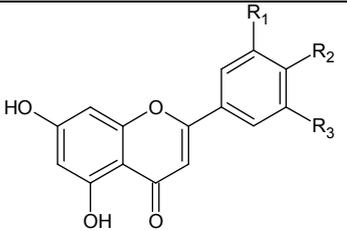
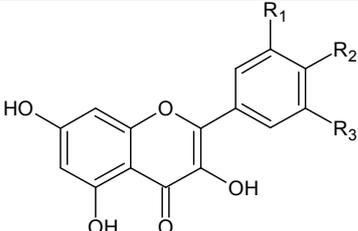
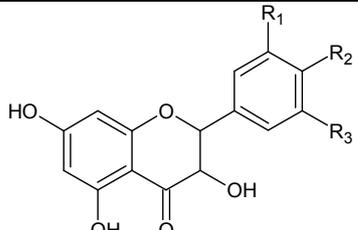
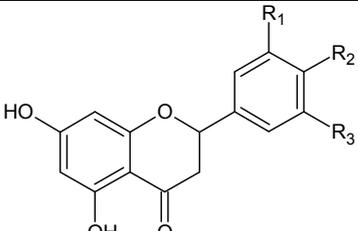
De forma general, el anillo B deriva de la ruta del acetato-malonato y el anillo B proviene de la fenilalanina. Por último, el heterociclo se nombra anillo C (Iglesias-Neira, 2009).



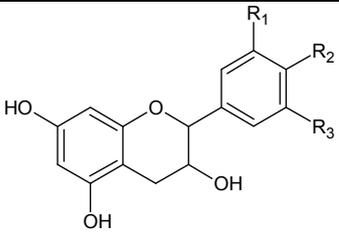
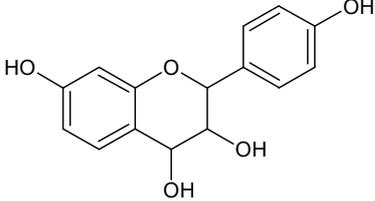
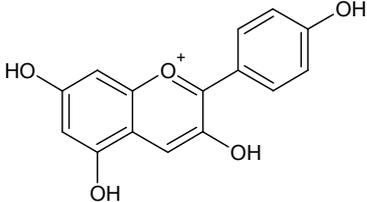
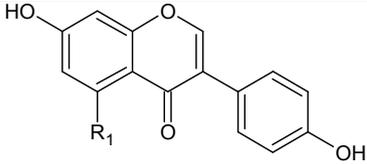
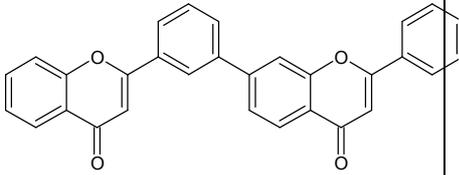
**Figura 9.** Estructura básica de los flavonoides. Modificado de Iglesias-Neira, 2009.

A partir de sus variaciones estructurales, los flavonoides se clasifican en 13 subgrupos. Dentro del grupo de los flavonoides propiamente dicho, se destacan las flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas y antocianidinas, ilustrados en el **Tabla 2** (Pérez-Trueba, 2001).

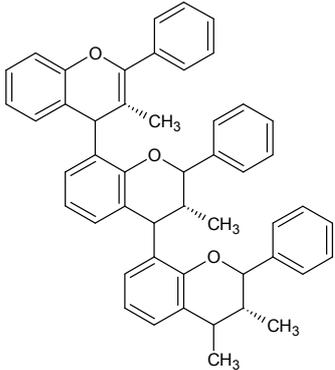
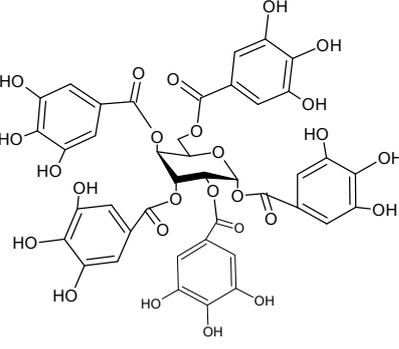
**Tabla 2.** Estructuras de los principales flavonoides encontrados en la naturaleza.

| Subclase                     | Estructura base   | Ejemplos  | Fuente natural  | Bibliografía   |
|------------------------------|---|---|---|--|
| Flavona                      |    | Sinensetina<br>Apigenina<br>Diosmina<br>Luteolina | Apio<br>Pimentón<br>Uva<br>Naranja<br>Limón                     | Drago-Serrano, 2007<br>Ochoa, 2004<br>Manach <i>et al.</i> , 2004                          |
| Flavonol                     |   | Quercetina<br>Miricetina<br>Caempferol            | Cebolla<br>Vino<br>Tomate<br>Naranja<br>Manzana<br>Frutas rojas | Drago-Serrano, 2007<br>Martínez-Flores <i>et al.</i> , 2002<br>Manach <i>et al.</i> , 2004 |
| Dihidroflavonol o flavanones |  | Taxifolina<br>Aromadendrina<br>Fustina            | Vino  | Hidalgo-Torres, 2003   |
| Flavanona                    |  | Naringenina<br>Hesperidina<br>Isoxanthohumol      | Miel<br>Cítricos<br>Tomate<br>Lúpulo                            | Drago-Serrano, 2007<br>Manach <i>et al.</i> , 2004   |

**Tabla 2.** Estructuras de los principales flavonoides encontrados en la naturaleza (continuación).

|                                 |   |   |   |  |
|---------------------------------|---|---|---|--|
| Flavanol                        |    | Catequina<br>Epicatequina<br>Galocatequina                | Vino<br>Chocolate<br>Cocoa<br>Té<br>Uva | Drago-Serrano, 2007<br><br>Manach <i>et al.</i> , 2004                                     |
| Flavandiol o leucoantocianidina |    | Leucocianina<br>Leucodelfidina<br>Leucopelargonina        | Vino                                    | Hidalgo-Torres, 2003   |
| Antocianidina                   |   | Malvidina<br>Pelargonidina<br>Delfinidina<br>Peonidina    | Frutas rojas<br>Pera<br>Uva<br>Naranja  | Drago-Serrano, 2007<br>Manach <i>et al.</i> , 2004   |
| Isoflavonoide                   |  | Genisteina<br>Daidzeina<br>Gliciteina                     | Soya<br>Leguminosas                     | Drago-Serrano, 2007<br>Manach <i>et al.</i> , 2004<br>Martínez-Flores <i>et al.</i> , 2002 |
| Biflavonoide                    |  | Mentoflavona<br>Bilobetina<br>Ginkgetina<br>Isoginkgetina | <i>Ginkgo biloba</i>                    | Osorio, <i>et al.</i> , 2009   |

**Tabla 2.** Estructuras de los principales flavonoides encontrados en la naturaleza (continuación).

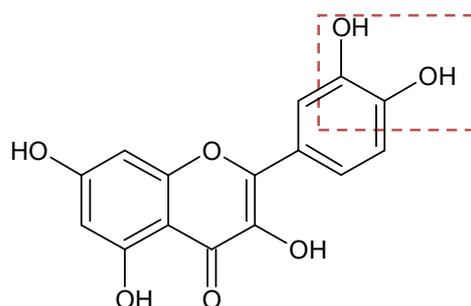
|   |   |  |   |  |
|---|---|--|---|--|
| <p>Tanino condensado o proantocianidina</p> |    | <p>Granatina<br/>Punicalagina<br/>Punicalina<br/>Tercataina<br/>Terflavina<br/>Tergalagina</p> | <p>Corteza de pino<br/>Ciprés<br/>Semillas de uva</p> | <p>Martínez-Flores <i>et al.</i>, 2002</p> |
| <p>Tanino hidrolizable</p>                  |  | <p>Galotaninos</p>   | <p>Rosa<br/>Roble<br/>Eucalipto</p>                   | <p>Hidalgo-Torres, 2003</p>                |

### 2.2.3. Relación estructura química – actividad antioxidante

La estructura básica de los flavonoides permite una multitud de patrones de sustitución por lo que su actividad antioxidante dependerá de los grupos funcionales que posea y de la posición de los mismos. A continuación se enlistan una serie de parámetros estructurales que afectan a su actividad (Iglesias-Neira, 2009)

a) *Grupos hidroxilo.* Son fundamentales para la actividad neutralizadora de radicales libres, por ejemplo, los hidroxilos del anillo B pueden donar fácilmente hidrógenos y electrones a EROs y ERNs. Entre los homólogos estructurales de

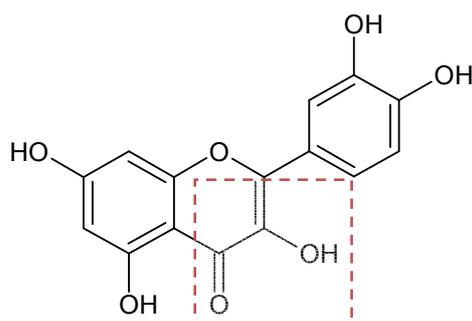
flavonas y flavanonas, la capacidad neutralizadora de radicales libres e incrementa de manera lineal y curvilínea, respectivamente con el número de grupos hidroxilo de su estructura. La formación del grupo catecol (un –OH en posición 3' y en 4') en el anillo B, aumenta considerablemente la capacidad antioxidante. También es importante la presencia de este grupo funcional en la posición 3 del anillo B, mismo que al encontrarse sustituido por grupos metilo o unidades de carbohidratos, carece de actividad ( *et al.*, 2011).



**Figura 10.** Estructura de catecol (*orto*-dihidroxi). Modificada

*et al.*, 2011.

b) *Doble enlace en las posiciones 2-3 conjugado a un grupo oxo en el anillo C.* Dicha conjugación provee la deslocalización electrónica del anillo B *et al.*, 2011).



**Figura 11.** Doble enlace 2,3 conjugado a un grupo 4-oxo del anillo C.

*et al.*, 2011.

c) *Esterificación con grupos no glucosídicos.* Comúnmente se encuentran esterificados ácidos orgánicos en el hidroxilo de la posición 3, a los flavonoides bajo esta forma se les denomina galatos (Iglesias-Neira, 2009).

d) *Esterificación de grupos glicosídicos*. La actividad antioxidante de un flavonoide glicosilado depende de la estructura y la posición del azúcar. La posición 3 es la que con más frecuencia se conjuga a un azúcar, que generalmente es D-glucosa (Iglesias-Neira, 2009).

e) *Grado de polimerización*. Los fenoles poliméricos presentan una estructura compleja por lo que aún no se cuenta con correlaciones estructura – actividad. Aunque existen estudios sobre la capacidad antioxidante y el grado de polimerización de procianidinas, encontrando que los dímeros y trímeros resultaron más efectivos que sus respectivos monómeros contra el radical superóxido (Iglesias-Neira, 2009).

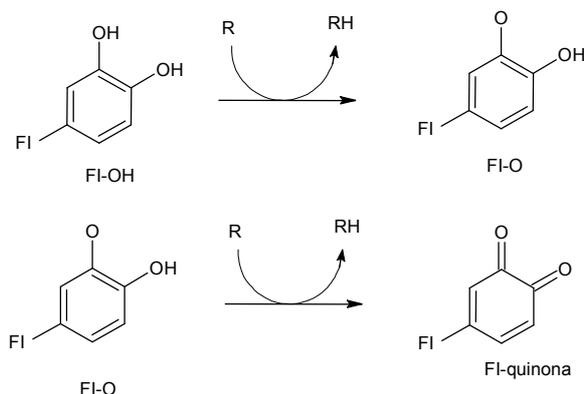
#### **2.2.4. Actividad antioxidante de los flavonoides *in vitro***

La capacidad antioxidante de muchos flavonoides es mucho mayor que la de otros antioxidantes como la vitamina C y E. Por ejemplo, el potencial de reducción de un electrón del galato de epigallocatequina bajo condiciones estándar es de 550 mV, un valor más bajo que el del glutatión (920 mV) y comparable al del  $\alpha$ -tocoferol (480 mV) (Procházková *et al.*, 2011).

Los mecanismos mediante los cuales los flavonoides pueden prevenir daño causado por radicales libres, son los siguientes (Procházková *et al.*, 2011):

##### **1) Atrapamiento directo de las EROs**

El atrapamiento se lleva a cabo por donación de un átomo de hidrógeno, convirtiendo los radicales inactivos, según la siguiente reacción:



**Figura 12.** Atrapamiento de EROs por los flavonoides. El radical libre FI-O• puede reaccionar con un segundo radical, formándose una estructura estable de quinona. Reproducida de Procházková *et al.*, 2011.

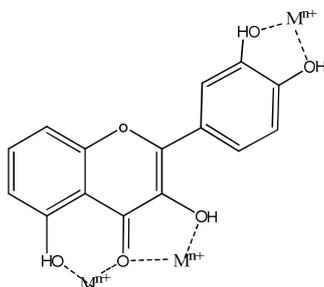
### 2) Activación de enzimas antioxidantes

Es otro mecanismo por el cual actúan los flavonoides, que puede ser combinado con la capacidad atrapadora de radicales. Los flavonoides son capaces de inducir a las enzimas de detoxificación de fase II (por ejemplo, la NAD(P)H-quinona oxidoreductasa, la glutatión S-transferasa y la UDP-glucoronil transferasa), las cuales son las enzimas de defensa de primera línea contra tóxicos electrófilos y estrés oxidativo. La regulación de la expresión génica puede estar mediada por una respuesta de elemento eletrofílico (EpRE), que es una secuencia regulatoria que codifica para genes de las enzimas de fase II. Se ha encontrado que la capacidad para activar las respuestas vía EpRE correlaciona con las propiedades redox.

### 3) Actividad quelante de metales

Se sabe que hay flavonoides específicos que quelan Hierro y Cobre por remoción del factor causal del desarrollo de radicales libres. Tal es el caso de la quercetina, que puede prevenir el daño oxidativo inducido con agentes a la membrana de eritrocitos ya que el daño a estas células sanguíneas produce la liberación de hierro en forma libre. Algunos investigadores han propuesto que los sitios de unión en el flavonoide para metales traza se ubica en el anillo de catecol,

en el hidroxilo de la posición 3 y los grupos oxo del anillo heterocíclico, así como el grupo oxo de la posición 4 y hidroxilo en posición 5 entre los anillos A y C.



**Figura 13.** Sitios de unión para los metales en la estructura del flavonoide. Reproducido de Procházková *et al.*, 2011.

#### 4) Reducción de radicales $\alpha$ -tocoferilo

El  $\alpha$ -tocoferol es el antioxidante de mayor abundancia en la membrana de las células y en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de humano que protegen las partículas de lipoproteína del daño oxidativo. Se ha sugerido que los flavonoides pueden actuar donando un hidrógeno al radical tocoferilo, mismo que es una molécula con alto potencial prooxidante. Además, poseen una gran capacidad para retardar la oxidación de LDL.

#### 5) Inhibición de oxidasas

Los flavonoides inhiben las enzimas responsables de la producción de  $O^{2-}$ , como la xantina oxidasa y la proteína cinasa C, aunque también se ha observado que inhiben a la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, la succinoxidasa microsomal y la NADH oxidasa.

#### 6) Disminución de estrés oxidativo causado por óxido nítrico (ON)

El óxido nítrico (ON) es importante en el mantenimiento de la dilatación de los vasos sanguíneos, pero en altas concentraciones puede causar daño oxidativo. El ON se produce por la oxidación de L-arginina, catalizada por la óxido nítrico sintasa (ONS). Su toxicidad se debe principalmente al peroxinitrito, que se forma por la reacción del ON con  $O^{2-}$ .

El mecanismo por el cual se inhiben la actividad de la ONS y la producción de ON aún no se ha elucidado, pero se tienen varias teorías acerca de su acción. La primera se deriva de la propiedad antioxidante característica de los flavonoides por la cual pueden atrapar EROs. La segunda, se basa en la capacidad de los flavonoides de actuar como inhibidores de la señalización de lipopolisacáridos.

#### *7) Incremento de niveles de ácido úrico*

Se ha demostrado que el consumo de alimentos ricos en flavonoides, aumenta la cantidad de urato en la sangre, el cual es el mayor contribuyente a la capacidad antioxidante total del plasma. Sin embargo, el mecanismo por el cual se ejerce la actividad antioxidante aún no se conoce.

#### *8) Incremento de propiedades antioxidantes de compuestos de bajo peso molecular*

Se han realizado algunos estudios que sugieren que la combinación, de  $\beta$ -caroteno con naringenina, rutina o quercetina, disminuye el riesgo de una actividad prooxidante por parte del  $\beta$ -caroteno cuando se somete a ciertas condiciones como la exposición a radiación UV.

### **2.3. Medición de la cantidad de compuestos fenólicos**

Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales son el ensayo de la vainillina y el de Folin-Ciocalteu (Gutiérrez-Avella *et al.*, 2008).

#### **2.3.1. Ensayo de Folin-Ciocalteu**

El método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos cromógenos de color azul

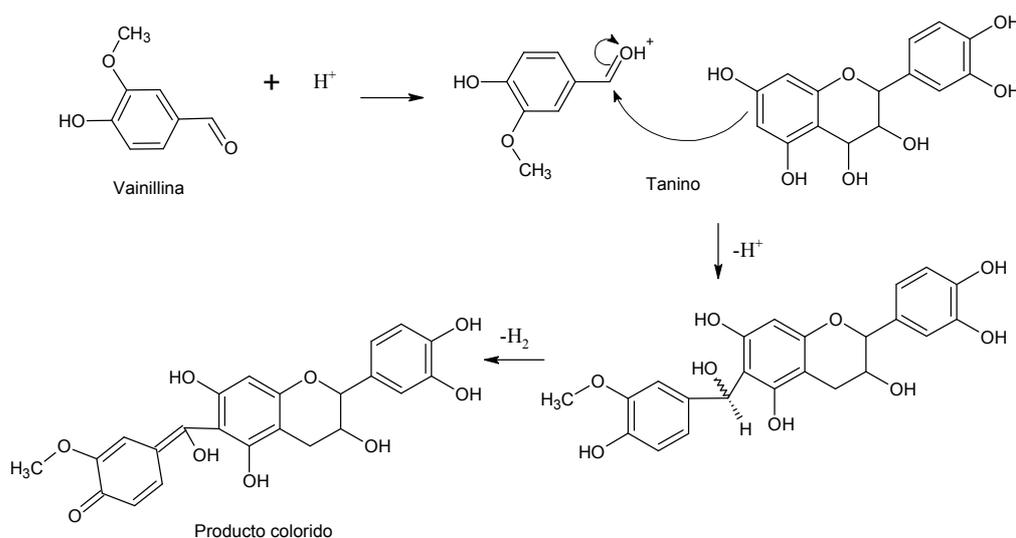
intenso, de tungsteno y molibdeno, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez-Avella *et al.*, 2008).



**Figura 14.** Reacción en el ensayo de Folin-Ciocalteu.

### 2.3.2. Ensayo de la vainillina

Es generalmente reconocido como un método útil para la detección y cuantificación de taninos condensados en plantas debido a su sensibilidad, especificidad y simplicidad. Sin embargo, puede tener interferencias debidas a dihidrochalconas y antocianinas. El método se puede usar para cuantificar taninos condensados en un intervalo de 5-500  $\mu\text{g}$  con precisión y exactitud mayor a 1  $\mu\text{g}$ . El método se basa en la condensación de la vainillina con proantocianinas en una solución acidificada. La vainillina protonada, un electrófilo débil, reacciona con el anillo del flavonoide en la posición 6 u 8. El producto de esta reacción se deshidrata fácilmente para dar un color rosa ligero a un intenso rojo cereza. La estabilidad del color del aducto vainillina-tanino puede incrementarse cuando la luz es excluida y la temperatura de reacción es controlada (Sarkar *et al.*, 1976).



**Figura 15.** Reacción de identificación de flavonoides por medio de vainillina sulfúrica. Modificado de Martínez-Vásquez, 2007.

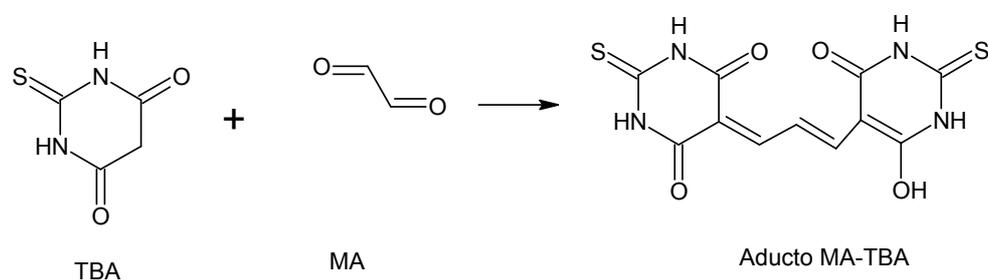
## 2.4. Medición de la capacidad antioxidante

En la literatura se han publicado varios ensayos para determinar la actividad antioxidante, así como los mecanismos de los antioxidantes sobre las EROs se encuentran bien documentados. Esencialmente hay dos tipos de pruebas antioxidantes: el método químico que involucra el uso de instrumentos analíticos (como el espectrofotómetro, CG y CLAE) y el método que implica un ensayo biológico (como ELISA) (Moon *et al.*, 2009).

### 2.4.1. Ensayos asociados con la peroxidación de lípidos

La degradación oxidativa de los lípidos ha sido estudiada desde varias perspectivas, el rol de alteración de los alimentos, oxidación térmica, auto-oxidación y oxidación con EROs. El mecanismo más conocido de lipoperoxidación es el de los ácidos grasos insaturados, como el ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquidónico y otros ácidos grasos  $\omega$ -3 (Moon *et al.*, 2009).

**2.4.1.1. Ensayo del ácido tiobarbitúrico.** El ácido tiobarbitúrico reacciona con diversos compuestos carbonílicos formados de la lipoperoxidación. Se mide la formación del aducto malonaldehído-ácido tiobarbitúrico mediante un espectrofotómetro a 532 nm. Se usa como control positivo a un antioxidante conocido como la vitamina A o la vitamina C (Moon *et al.*, 2009).



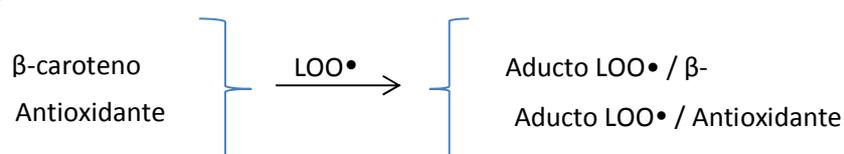
**Figura 16.** Formación del aducto MA-TBA. Reproducido de Moon *et al.*, 2009.

**2.4.1.2. Ensayo de Malonaldehído/Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (MA/CLAE).** Se usa la CLAE para determinar la cantidad exacta de MA formado de la lipoperoxidación por el método MA-TBA. Se recomienda para muestras biológicas (Moon *et al.*, 2009).

**2.4.1.3. Ensayo de Malonaldehído/Cromatografía de Gases (MA/CG).** Se derivatiza el MA por lo que el producto puede ser analizado específicamente por CG equipado con un detector de fósforo-nitrógeno (NPD) (Moon *et al.*, 2009).

**2.4.1.4. Ensayo del dieno conjugado.** Se monitorea espectrofotométricamente la formación del dieno conjugado a partir de un ácido graso poliinsaturado, con una absorción característica a 234 nm (Moon *et al.*, 2009).

**2.4.1.5. Ensayo de blanqueamiento del  $\beta$ -caroteno.** Se forma un radical peroxilo a partir de ácido linoléico, el cual reacciona con el  $\beta$ -caroteno para formar un radical estable de  $\beta$ -caroteno, reduciéndose la cantidad de  $\beta$ -caroteno en el medio y monitoreando su desaparición a 470 nm (Moon *et al.*, 2009).

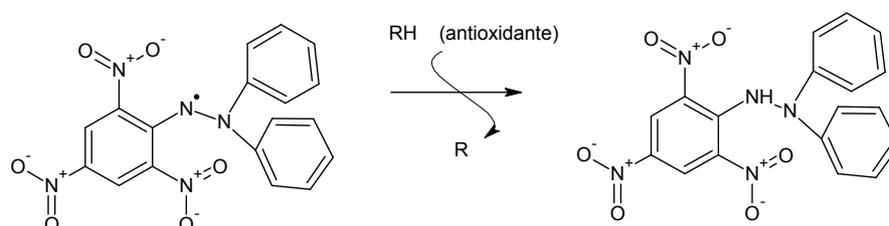


**Figura 17.** Formación de los aductos de  $\beta$ -caroteno y antioxidante con el radical peroxilo.  
Reproducido de Moon *et al.*, 2009.

## 2.4.2. Ensayos asociados con la transferencia de electrones y radicales

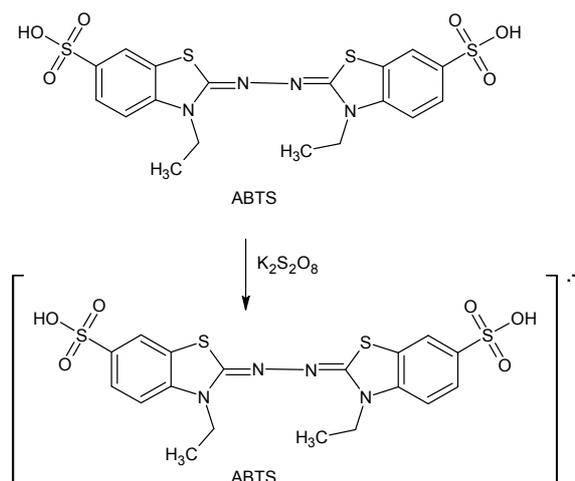
**2.4.2.1. Ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).** El DPPH $\cdot$  es uno de los pocos radicales orgánicos estables de nitrógeno que se comercializan en el mercado. El método se basa en la teoría de que un antioxidante es un donador de hidrógenos. El efecto antioxidante es proporcional a la

desaparición de DPPH<sup>•</sup> en la muestra. Se mide la desaparición del radical DPPH del medio de reacción por medio de espectroscopía de resonancia de espín electrónico (ESR), RMN y UV (Moon *et al.*, 2009).



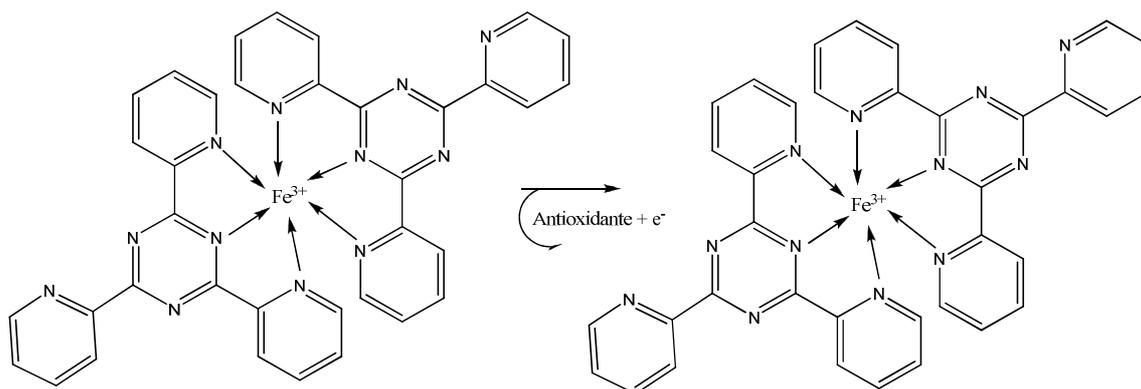
**Figura 18.** Reacción entre DPPH<sup>•</sup> y molécula antioxidante. Modificado de Moon *et al.*, 2009.

**2.4.2.2. Ensayo del 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS).** Ha sido ampliamente utilizado debido a que puede realizarse tanto en fase acuosa como en fase lipídica. Originalmente el método se basaba en la activación de la metahemoglobina por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia del ABTS. Ahora se emplea el radical catiónico de ABTS que es estable, de una coloración azul-verde, producido a partir de la oxidación de ABTS con K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. La actividad antioxidante de carotenoides, compuestos fenólicos y algunos componentes del plasma, se determina por la decoloración del ABTS<sup>•+</sup>, mediante un espectrofotómetro a 734 nm (Moon *et al.*, 2009).



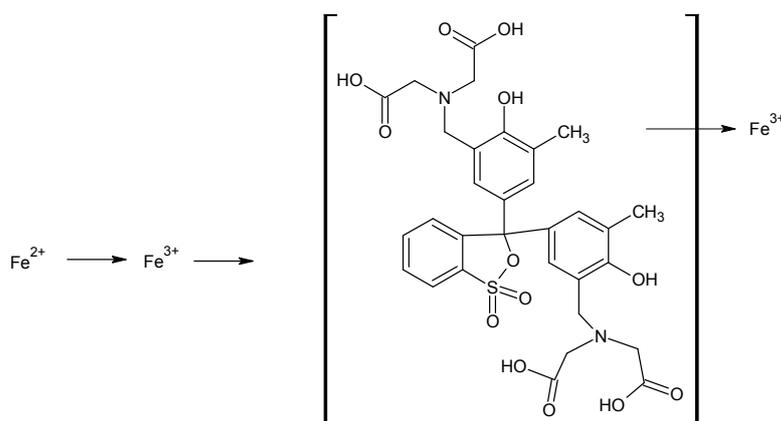
**Figura 19.** Formación del radical catiónico de ABTS con persulfato de sodio. Modificado de Moon *et al.*, 2009.

**2.4.2.3. Ensayo del Poder Antioxidante/Reductor de hierro (FRAP).** Se produce el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ - 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) que puede ser reducido a la forma  $\text{Fe}^{2+}$  por un antioxidante, bajo condiciones ácidas. Se observa la aparición de un color azul intenso cuya absorción se mide a 593nm (Moon *et al.*, 2009).



**Figura 20.** Formación del complejo ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) a partir del ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ). Reproducido de Moon *et al.*, 2009.

**2.4.2.4. Ensayo de Oxidación de hierro-Anaranjado de Xilenol (FOX).** El  $\text{Fe}^{2+}$  es oxidado por un oxidante, como los hidroperóxidos para formar el ión férrico, seguido del tratamiento con naranja de xilenol para dar el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -xilenol de color azul-púrpura, que absorbe a 550 nm (Moon *et al.*, 2009).



**Figura 21.** Formación del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -naranja de xilenol a partir de  $\text{Fe}^{2+}$  por un oxidante, seguido del tratamiento naranja de xilenol. Modificado de Moon *et al.*, 2009.

**2.4.2.5. Ensayo del tiocianato férrico (FTC).** Este ensayo es similar al FOX, con la diferencia de la formación del complejo, el cual se forma con tiocianato y se monitorea con el espectrofotómetro a 500 nm (Moon *et al.*, 2009).

**2.4.2.6. Ensayo del aldehído/ácido carboxílico.** A pesar de ser poco empleado, resulta ser muy conveniente para evaluar los efectos de los antioxidantes contra fenómenos de oxidación lentos que ocurren por periodos prolongados de tiempo. El mecanismo de reacción propone la conversión del alquilaldehído al ácido carboxílico, en presencia de radicales (Moon *et al.*, 2009).

## **2. 5. Enfermedades periodontales**

### **2.5.1. Concepto**

La enfermedad periodontal está constituida por un grupo de cuadros clínicos de etiología infecciosa que producen lesiones inflamatorias con una elevada capacidad destructiva local del tejido (Raspall, 2006).

### **2.5.2. Factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad periodontal**

Existen diversos factores que inducen y favorecen la enfermedad periodontal como los agentes irritantes, la placa dental y el sarro, los materiales de restauración, desechos de alimentos y la respiración bucal. (Raspall, 2006). De todos los factores mencionados, la placa dental es el principal agente etiológico de las caries y las enfermedades periodontales (Sepa, 2009). Siendo la placa dental una biopelícula, de la cual se describirá a continuación.

### **2.5.3. Biopelículas**

#### **2. 5. 3. 1. Concepto**

En cualquier parte de la naturaleza, una biopelícula es una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células irreversiblemente unidas a una sustancia o interfase y entre sí, embebidas en una matriz extracelular de sustancias

polimerizadas producidas por ellas y que exhiben un fenotipo alterado con respecto al grado de multiplicación celular y transcripción de genes (Negróni, 2009).

### 2. 5. 3. 2. Características

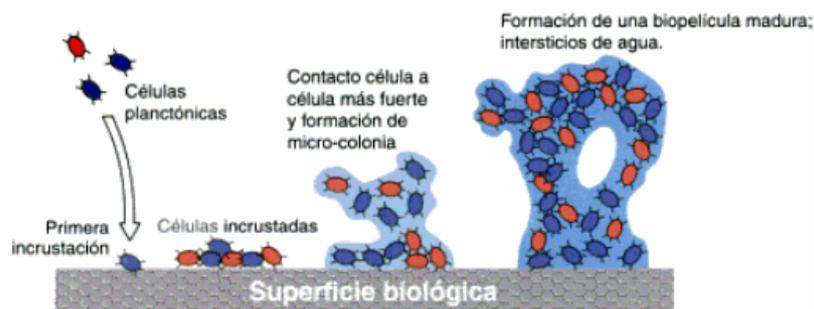
Las biopelículas presentan características relevantes, como:

- *Heterogeneidad fisiológica*. Dentro de la biopelícula se observa un amplio rango de micronichos, separados unos de otros por mínimas distancias, pero con ambientes sumamente contrastantes por ejemplo la tensión de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, pH, entre otras. Por lo tanto, células de la misma especie bacteriana pueden tener estados fisiológicos diferentes y se pueden encontrar especies bacterianas diferentes con distintas necesidades fisiológicas. Esta heterogeneidad explica, en parte, la mayor resistencia de las bacterias cuando crecen en una biopelícula (Sepa, 2009).
- *Fenotipos*. Cuando una bacteria crece siendo parte de una biopelícula (forma sésil), manifiesta un fenotipo diferente al que presentan cuando crecen suspendidas en un medio líquido (planctónica). Los fenotipos de las bacterias que crecen en la biopelícula les confieren una mayor resistencia a los antimicrobianos e incluso, la resistencia se mantiene aunque se hayan desprendido de la biopelícula, la cual se ilustra en la **Figura 22** (Sepa, 2009).
- *Capacidad adaptativa*. En condiciones desfavorables, la biopelícula puede involucionar a estadios anteriores y en cuanto se presentan las condiciones favorables, se desarrollan nuevamente (Sepa, 2009).
- *Resistencia a los antimicrobianos*. La biopelícula es más resistente a los antimicrobianos probablemente debido a que estos llegan en menores concentraciones (no efectivas para eliminar a las bacterias) a las zonas profundas de la biopelícula, a la protección de la matriz extracelular, a la producción de enzimas que inactivan los antibacterianos, entre otros (Sepa, 2009).
- *Señales en la biopelícula*. Las bacterias inmersas en la biopelícula se comunican mediante señales químicas e intercambio de material genético.

Esta comunicación tiene influencia sobre la resistencia a antibacterianos, producción de factores de virulencia y en la estructura de la propia biopelícula (Sepa, 2009).

### 2. 5. 3. 3. Estructura

Las biopelículas se organizan en forma de colonias adheridas a diferentes superficies, ya sean blandas, animadas e inanimadas. Están formadas por 15-25% de células y 75-85% de agua y matriz extracelular, generalmente contienen polisacáridos, aunque también pueden encontrarse proteínas, ácidos nucleicos, fibrina y calcio. Los microorganismos de la comunidad conviven, cooperan y se comunican por sistemas de señales denominados “*quorum sensing*”, que regulan la expresión de genes (Negroni, 2009).



**Figura 22.** Etapas de la formación de una biopelícula sobre una superficie biológica. Reproducida de Negroni, 2009.

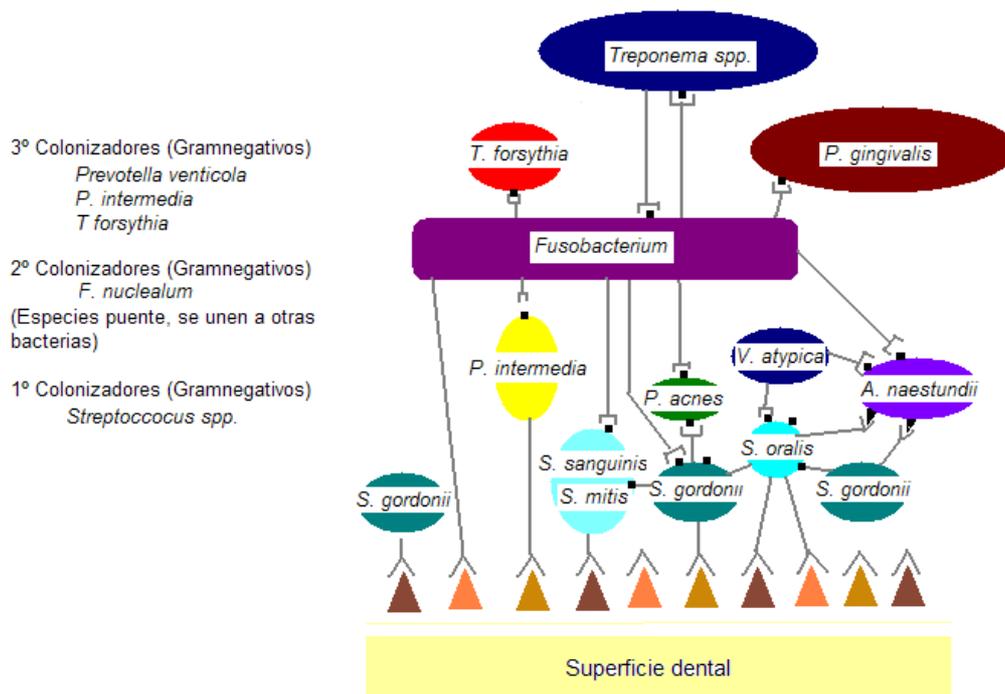
Se ha descrito que la estructura de la biopelícula está formada por dos estructuras principales:

- La capa salival o película adquirida, formada por proteínas y glucoproteínas y carece de bacterias. Tiene un grosor aproximado de 1-2  $\mu\text{m}$ .
- La capa formada por microorganismos y polímeros extracelulares. Comprende dos procesos: la colonización primaria y la colonización secundaria.

#### *Colonización primaria*

Una vez establecida la película adquirida, comienzan a depositarse las primera poblaciones bacterianas. Esta biopelícula suele estar compuesta por 20-30 especies bacterianas distintas (Ver **Figura 23**). Mientras el resto de los factores se

mantienen constantes, las bacterias se encuentran en equilibrio; en caso contrario (consumo de azúcares, bajo pH, mala higiene bucal), se produce un desequilibrio en la población y se favorece el desarrollo de especies que estaban en bajo número (*S. mutans* y lactobacilos). Los colonizadores iniciales presentes en mayores proporciones son los estreptococos y actinomicetes. *S. mitis*, *S. oralis* y *S. sanguinis* presentan adhesinas de alta afinidad con los componentes de la película salival adquirida. Además, poseen la capacidad para producir IgA-1, (proteasas no producidas por *S. mutans*), que confieren una ventaja para comportarse como pioneros en el establecimiento de la comunidad biótica que constituye la biopelícula.



**Figura 23.** Tipos de bacterias involucradas en la colonización de una superficie dental. Modificada de Negróni, 2009.

### Colonización secundaria

En ésta etapa, la biopelícula sufre modificaciones estructurales y aumenta en grosor y complejidad. Adicionalmente, se producen fenómenos de coadhesión interbacteriana intraespecífica e intergenérica. La coadhesión intraespecífica se

debe a los constituyentes de la saliva *S. sanguinis*, *S. oralis* y *A. naeslundii*, a través de los polisacáridos extracelulares (PEC) de *S. mutans* y *A. naeslundii*. La adhesión intergenérica se da a través de los constituyentes de la superficie de las bacterias de diferentes géneros y especie asociados a fimbrias, tal es el caso de la agregación entre *A. naeslundii* y estreptococos orales.

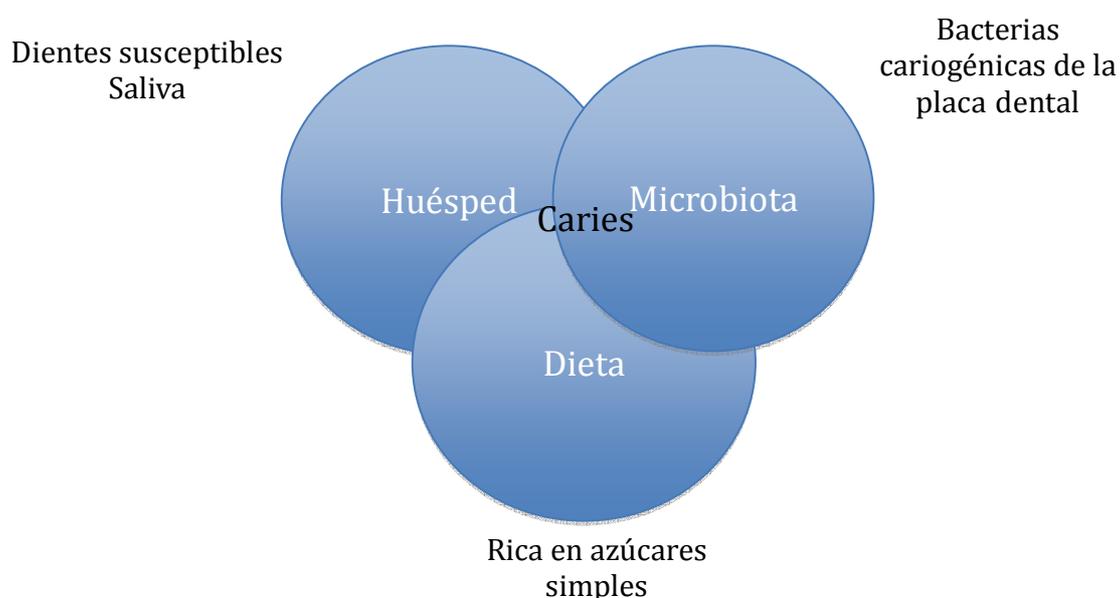
#### 2.5.4. Caries dental

##### 2.5.4.1. Concepto

La caries dental se puede definir como una enfermedad microbiológica infecciosa que resulta en la destrucción localizada de los tejidos duros calcificados dentarios (esmalte, dentina, cemento). Es causada por la producción de ácidos por las bacterias y se manifiesta por el oscurecimiento y reblandecimiento progresivo de dichos tejidos, con su posterior pérdida (Palma-Cárdenas *et al.*, 2007).

##### 2.5.4.2. Etiología

Para explicar el origen de la enfermedad de la caries y sus lesiones, se recurre al diagrama de Keyes (**Diagrama 1**), que considera a la caries como una enfermedad donde deben intervenir tres factores al mismo tiempo: huésped, microbiota y dieta.



**Diagrama 1.** Diagrama multifactorial de Keyes. Modificado de Sacyl, 2006.

### 2. 5. 4. 3. Microorganismos relacionados a la caries dental

Los principales microorganismos relacionados con la caries dental son:

- *Streptococcus mutans*, participa en el desarrollo inicial de la enfermedad ya que produce ciertas condiciones favorables para otros microorganismos. En segundo lugar se encuentra a *S. sobrinus*.
- *Lactobacillus spp.* y *Actinomyces spp.* que participan en la progresión de las lesiones establecidas.
- *Candida albicans*, es capaz de sobrevivir y proliferar en medios ácidos.
- Otros estreptococos: *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. gordonii*, *S. oralis* y *S. sanguinis*, tienen baja capacidad para descender el pH.
- *Actinomycetes*, poseen la capacidad de formar lévanos a partir de sacarosa.

### 2. 5. 4. 4. Factores de virulencia de los microorganismos relacionados con caries dental (Negroni, 2009).

- **Acidogénesis.** Los azúcares son metabolizados por la vía glicolítica y finalmente se produce ácido láctico, principalmente; es así como se alcanza un pH entre 4.5-5.5, crítico para el proceso de desmineralización.
- **Acidofilia.** Un pH ácido favorece el crecimiento de *S. mutans* e inhibe simultáneamente el de microorganismos comensales como *S. sanguinis*, *S. gordonii* y *S. oralis*.
- **Síntesis de polisacáridos extracelulares**, principalmente a través de enzimas denominadas glucosiltransferasas.
- **Síntesis de polisacáridos intracelulares**, se almacena glucógeno como fuente de glucosa ante la falta de ingreso de ésta.

- **Síntesis de proteínas que ligan glucano**, son proteínas asociadas a su pared celular y son importantes para la acumulación de *S. mutans* en presencia de sacarosa, al formar un puente que une las superficies celulares de los microorganismos a la matriz extracelular de polisacáridos.
- **Adhesinas**. *S. mutans* presenta adhesinas de superficie de la familia Spa, también llamada de antígeno I/II, participan en el proceso de adherencia a las glicoproteínas salivales y otros microorganismos.
- **Proteína asociada a la pared celular (WapA)**, permite la adhesión a las caras libres de la pieza dental.

## 2.5.5. Antimicrobianos

### 2.5.5.1. Generalidades

Una gran variedad de agentes antimicrobianos se utilizan en la clínica para el control de los microorganismos bucales relacionados con la biopelícula de la placa dental. Los más probados han sido los antibióticos, los detergentes catiónicos, las enzimas, los halógenos, los iones metálicos, los extractos vegetales y los compuestos fenólicos (Negróni, 2009).

A continuación se enumeran las características de una agente antibacteriano ideal:

- Debe eliminar rápidamente la placa organizada
- Debe inhibir la formación de nueva placa
- No debe ser tóxico
- No debe poseer efectos secundarios adversos
- Debe tener características organolépticas aceptables
- No debe ser inactivado por productos de los microorganismos o del huésped
- No debe originar resistencia bacteriana
- Debe alterar mínimamente la biota normal

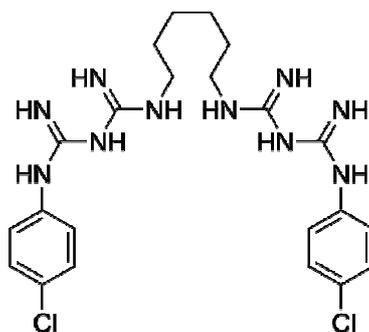
- No debe ser carcinogénico

Los antibióticos indicados con más frecuencia contra las enfermedades periodontales son los siguientes: penicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, clindamicina, metronidazol, tetraciclinas, azitromicina, eritromicina, espiramicina, claritromicina, y hasta quinolonas.

A pesar de la gran cantidad de compuestos disponibles, se tiene mayor interés en los agentes que actúan directamente contra mecanismos de adherencia específica (clorhexidina) o interfiriendo sobre el metabolismo bacteriano (fluoruros).

#### 2.5.5.2. Clorhexidina

Químicamente, es una biguanidina (**Figura 24**). Es soluble en agua y en alcohol. Se dice que es el antiséptico tópico ideal, debido a su persistente actividad sobre la piel con el uso continuo, un efecto muy rápido y una mínima absorción. A bajas concentraciones, exhibe un efecto bacteriostático, mientras que a altas concentraciones es bactericida (Tannir *et al.*, 1994).



**Figura 24.** Molécula de clorhexidina

A pH fisiológico, es una molécula dicatiónica, con la carga positiva distribuida sobre los átomos de nitrógeno, por lo tanto es capaz de adsorberse sobre superficies con cargas negativas como lo son las paredes celulares bacterianas.

Aunque también se adsorbe sobre la cavidad bucal, en dientes y mucosa, que posteriormente actúan como reservorios (VADEMECUM, 2010).

Su actividad antimicrobiana se debe a que desestabiliza y penetra las membranas de las células bacterianas. Precipita el citoplasma e interfiere con la función de la membrana, inhibiendo la utilización de oxígeno, lo que ocasiona una disminución de los niveles de ATP y la muerte. En las bacterias Gram-negativas, la clorhexidina afecta la membrana exterior permitiendo la liberación de las enzimas periplasmáticas (VADEMECUM, 2010).

En resumen, la clorhexidina previene la formación de la biopelícula de tres maneras (VADEMECUM, 2010):

- i. Interferencia en la formación de la película adquirida, al bloquear los grupos ácidos de las glicoproteínas salivales, disminuye la adsorción de éstas a la superficie del esmalte.
- ii. Alteración de la adherencia de las bacterias a la película adquirida por competencia con el ion calcio.
- iii. Precipitación de factores de aglutinación en saliva y desplazamiento del calcio de la matriz de la biopelícula.

### 2.5.6.3. Fluoruros

Actúan sobre la célula bacteriana y alteran el crecimiento por inhibición de su metabolismo energético. Su actividad se ve altamente influenciada por el pH del medio, siendo mayor cuanto más bajo sea el pH. El fluoruro de hidrógeno (HF) cruza la membrana y se introduce en el citoplasma, donde la molécula se disocia (Negroni, 2009):



**Figura 25.** Disociación del fluoruro de hidrógeno.

El fluoruro interfiere sobre la glucólisis al unirse a la enolasa, alterando el metabolismo de los carbohidratos. Otro mecanismo de acción es la inhibición de la adherencia bacteriana, la cual varía con la concentración, a una concentración de

1-30 ppm inhibe la formación de la película adquirida al modificar las cargas electrostáticas de la superficie del esmalte y altera la adsorción de aminoácidos de la saliva; mientras que a una concentración de 200-500 ppm, el F<sup>-</sup> se une al calcio de la saliva e impide que éste actúe como puente en la colonización inicial (Negroni, 2009).

## 2. 6. *Byrsonima crassifolia*

### 2.6.1. Sinonimia

*Byrsonima cumingana* Juss.; *Byrsonima fendleri* Turcz.; *Byrsonima panamensis* Beurl.; *Byrsonima pulchra* Sessé & Moc. ex DC.; *Malpighia crassifolia* L.; *Malpighia pulchra* Sessé & Moc.

“changugu”, “chi”, “nance agrio”, “nanche”, “nanchi”, “nancen”, “nanche de perro”, “nananche”, “nantzin” (OFI/CATIE, Manual de Árboles de Centroamérica, 2003).

### 2.6.2. Descripción

Es un árbol pequeño y torcido de 3 a 7 m de altura, perenne, produce flores de noviembre a junio y sus frutos maduran de julio a octubre (OFI/CATIE, Manual de Árboles de Centroamérica, 2003).



**Figura 26.** Detalle de la corteza de *B. crassifolia*.

### 2.6.3. Distribución Geográfica

Originario de Mesoamérica, en México se distribuye ampliamente en toda la zona tropical, desde el sur de Tamaulipas y este de San Luis Potosí hasta Yucatán y Quintana Roo, en la vertiente del Golfo y de Sinaloa hasta Chiapas, en el Pacífico. También se le puede encontrar por todo Centroamérica hasta Paraguay. Es muy común en la sabana venezolana y también en áreas costeras del noreste de Brasil. Se cultiva en el sur de California y la costa occidental de México (OFI/CATIE, Manual de Árboles de Centroamérica, 2003).



**Figura 27.** Distribución del nanche en América. Modificado de <http://ntsavanna.com/nance-macho/>

### 2.6.4. Usos

Las flores del nanche producen polen y un aceite que es recolectado por ciertas abejas (*Centris* spp.). La mezcla de polen y aceite es usado para alimentar la cría de las abejas. Estas mismas abejas son polinizadoras de muchas otras especies de árboles (OFI/CATIE, Manual de Árboles de Centroamérica, 2003).

Los frutos se consumen crudos, en dulces, refrescos, jaleas, confituras, almíbares, vinos y como saborizante para helados (OFI/CATIE, Manual de Arboles de Centroamérica, 2003).

La corteza tiene propiedades medicinales, y es usada para promover la menstruación, tratar resfriados, hongos en la piel, diarrea, fiebre, indigestión, tuberculosis y mordeduras de serpiente (Argueta *et al.*, 1994; Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

#### **2.6.6. Reportes sobre *B. crassifolia***

Se han realizado estudios con diversas partes del árbol. A continuación se enlistan un resumen del trabajo de cada grupo de investigadores y en la **Tabla 3**, se ilustran algunos de los compuestos aislados por los mismos.

Se ha analizado el extracto metanólico de las hojas, encontrando e identificando 22 compuestos, entre ellos triterpenos (ácido betulínico, ácido oleanólico), esteroides ( $\beta$ -sitosterol y su glucósido), seis flavonoides (catequina, hiperina, epicatequina, quercetina), un éster aromático y aminoácidos (alanina, prolina). De algunos de ellos, se probó la actividad espasmogénica en *fundus* de rata (Bejar *et al.*, 1995).

Se estudió la fracción de diclorometano derivada del extracto metanólico de la corteza, encontrando  $\beta$ -amirina, betulina, ácido betulínico, ácido oleanólico, quercetina, (-)-epicatequina, ácido gálico y  $\beta$ -sitosterol con el fin de evaluar la capacidad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* (Rivero-Cruz *et al.*, 2001).

Se probó la fracción de acetato de etilo de las raíces contra varias bacterias, encontrándolo activo en el caso de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexnari*, *Staphylococcus aureus*,

*Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Micrococcus luteus* (Martínez-Vázquez *et al.*, 2004).

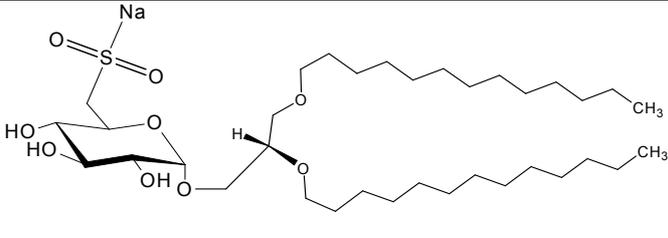
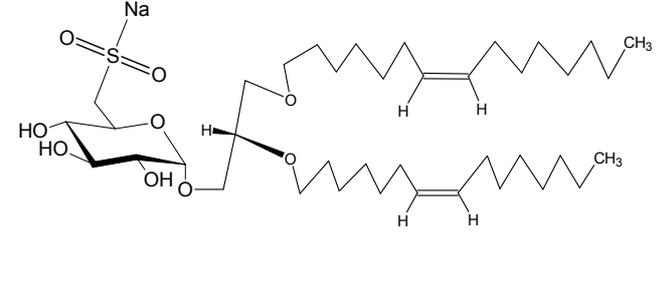
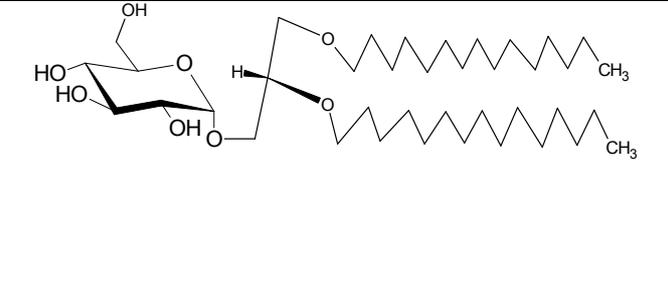
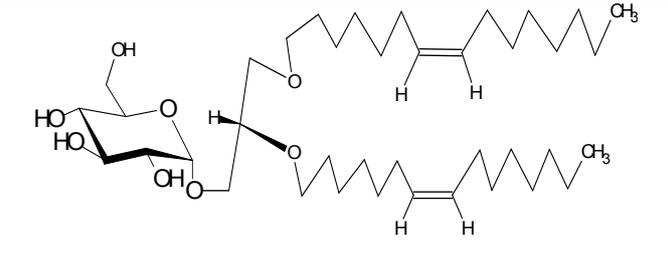
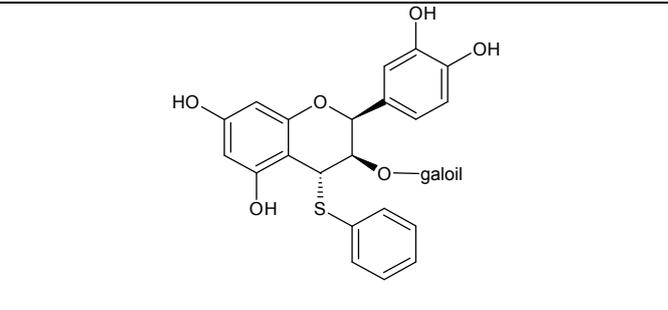
Se caracterizaron compuestos como (-)-epicatequina, quercetina, 1,2-di-O-miristoil-3-O-(6-sulfo- $\alpha$ -D-quinovopiranosil)-glicerol (**1**), (2S)-1,2-di-O-(8-hexadecenoil)-3-O-(6-sulfo- $\alpha$ -D-quinovopiranosil)-glicerol (**2**), (+)-catequina, 1,2-di-O-(8-hexadecenoil)-3-O-(6-sulfo- $\alpha$ -D-quinovopiranosil)-glicerol (**4**), entre otros, todos ellos provenientes del extracto metanólico de las hojas (Rastrelli *et al.*, 1997).

Se encontraron en las fracciones de diclorometano y acetato de etilo del extracto etanólico de la corteza, trímeros de procianidinas: 3-O-galoil-(+)-epicatequin-[4 $\alpha$ →8]-3-O-galoil-(+)-epicatequin-[4 $\alpha$ →8]-(+)-epicatequina, 3-O-galoil-(-)-epicatequin-[4 $\alpha$ →8]-3-O-galoil-(+)-epicatequin-[4 $\alpha$ →8]-(+)-epicatequina; dos dímeros: 3-O-galoil-(+)-epicatequin-[4 $\alpha$ →8]-3-O-galoil-(+)-epicatequina, 3-O-galoil-(+)-epicatequin-[4 $\alpha$ →8]-3-O-galoil-(+)-epicatequin-4 $\alpha$ -benziltioéter (**6**), (+)-epicatequin-[4 $\alpha$ →6]-(+)-epicatequina (**7**) y monómeros: (+)-epicatequina (**8**), 3-O-galoil-(+)-epicatequin-4 $\alpha$ -benziltioeter (**5**), catequina y ácido gálico (Geiss *et al.*, 1995).

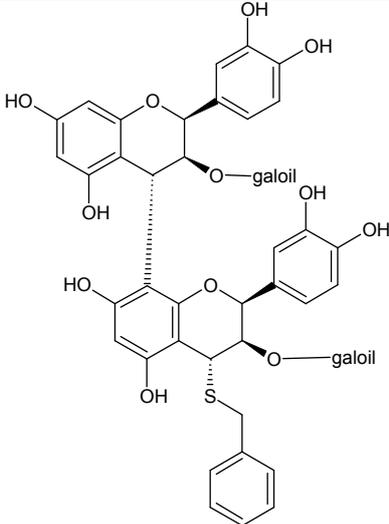
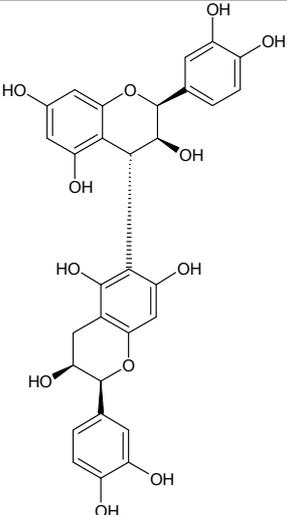
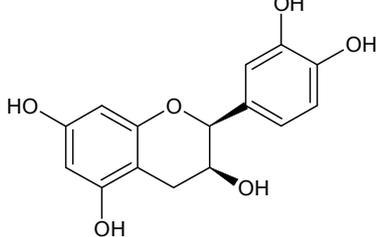
Se realizó una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de un homogenizado del fruto, del cual identificaron 46 compuestos volátiles, entre ellos: hexanoato de etilo (**9**), ácido butanoico, ácido hexanoico (**10**) y metil butirato (**11**) (Alves *et al.*, 2003).

Se evaluó la actividad del extracto metanólico de la corteza contra los promastigotes de *Leishmania mexicana* encontrando que dentro de un grupo de 18 plantas colectadas en la Península de Yucatán, el extracto de la corteza es uno de los diez más potentes con una  $CI_{50} < 50 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007).

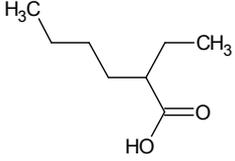
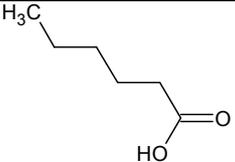
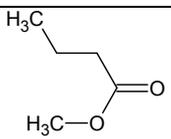
**Tabla 3.** Compuestos reportados que se han aislado de *B. crassifolia*.

|   | Nombre del compuesto  | Estructura   | Autores                        |
|---|---|--|--------------------------------|
| 1 | 1,2-di-O-miristoil-3-O-(6-sulfo- $\alpha$ -D-quinovopiranosil)-glicerol             |    | Rastrelli <i>et al.</i> , 1997 |
| 2 | (2S)-1,2-di-O-(8-hexadecenoil)-3-O-(6-sulfo- $\alpha$ -D-quinovopiranosil)-glicerol |   | Rastrelli <i>et al.</i> , 1997 |
| 3 | 1,2-di-O-palmitoil-3-O-( $\beta$ -D-glucopiranosil)-glicerol                        |  | Rastrelli <i>et al.</i> , 1997 |
| 4 | 1,2-di-O-(8-hexadecenoil)-3-O-( $\beta$ -D-glucopiranosil)-glicerol                 |  | Rastrelli <i>et al.</i> , 1997 |
| 5 | 3-O-galoil-(+)-epicatequin-4 $\alpha$ -benziltioéter                                |  | Geiss <i>et al.</i> , 1995     |

**Tabla 3.** Compuestos reportados que se han aislado de *B. crassifolia* (continuación).

|                 |  |  |                                  |
|-----------------|--|--|----------------------------------|
| <p><b>6</b></p> | <p>3-O-galoil-(+)-epicatequin-<br/>[4<math>\alpha</math>→8]-3-O-galoil-(+)-epicatequin-<br/>4<math>\alpha</math>-benziltioéter</p> |    | <p>Geiss <i>et al.</i>, 1995</p> |
| <p><b>7</b></p> | <p>(+)-epicatequin-<br/>[4<math>\alpha</math>→6]-(+)-epicatequina</p>  |   | <p>Geiss <i>et al.</i>, 1995</p> |
| <p><b>8</b></p> | <p>(+)-epicatequina</p>  |  | <p>Geiss <i>et al.</i>, 1995</p> |

**Tabla 3.** Compuestos reportados que se han aislado de *B. crassifolia* (continuación).

|    |                 |  |                            |
|----|-----------------|--|----------------------------|
| 9  | Etilhexanoato   | <br><chem>CCCCC(=O)OCC</chem> | Alves <i>et al.</i> , 2003 |
| 10 | Ácido hexanoico | <br><chem>CCCCCC(=O)O</chem>  | Alves <i>et al.</i> , 2003 |
| 11 | Metilbutirato   | <br><chem>CCCC(=O)OC</chem>   | Alves <i>et al.</i> , 2003 |

### 3. JUSTIFICACIÓN

Descubrimientos recientes en el campo de la medicina reportan numerosas enfermedades relacionadas con los radicales libres. El riesgo de enfermedades debidas al estrés oxidativo está relacionado con los estilos de vida no saludables, la contaminación, el humo del cigarro, las sustancias de abuso y el estrés. La sobreproducción de radicales libres pueden atacar y dañar irremediamente tejidos del cuerpo humano contribuyendo de manera sinérgica con diferentes enfermedades degenerativas. A pesar de que el cuerpo contiene un complejo sistema de defensa antioxidante, se ha demostrado que hay otros compuestos con una actividad antioxidante mucho más eficiente que los antioxidantes endógenos. En este contexto es necesario el análisis de los productos de origen vegetal con la finalidad de encontrar los compuestos responsables de la actividad antioxidante.

Dentro de los antioxidantes, se apunta con gran solidez a los compuestos fenólicos que solamente son encontrados en las plantas. En este sentido el nanche representa una fuente importante de compuestos con capacidad antioxidante. Estudios previos han demostrado la capacidad antioxidante del fruto del nanche *per se* y del jugo preparado a partir de este, sin embargo no existen reportes sobre la capacidad antioxidante de la corteza, que es la parte del nanche má utilizada en la medicina tradicional para preparar remedios. Por lo tanto, uno de los objetivos del presente trabajo es determinar la capacidad antioxidante del extracto de la corteza del nanche.

Por otra parte, estudios recientes han determinado una correlación positiva entre las enfermedades de la cavidad oral y el estrés oxidativo. Desafortunadamente los tratamientos existentes para erradicar los agentes etiológicos, las bacterias, no son eficaces, sin mencionar que pueden tener efectos secundarios adversos. Así pues, la búsqueda de nuevos compuestos naturales con actividad antioxidante y antibacteriana se ha incrementado notablemente en los últimos años. En este contexto se planteó el estudio de la corteza del nanche como una fuente potencial de compuestos antioxidantes y antibacterianos.

---

## 4. OBJETIVOS

### Objetivos generales

1. Determinar la actividad antioxidante del extracto metanólico total obtenido a partir de la corteza de *B. crassifolia*.
2. Determinar la actividad antimicrobiana del extracto total y de las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico total de *B. crassifolia*.

### Objetivos particulares

1a. Determinar la capacidad antioxidante del extracto metanólico por diversos métodos reportados en la literatura, con el fin de establecer su potencial antioxidante.

1b. Realizar el fraccionamiento del extracto metanólico por métodos cromatográficos convencionales.

1c. Determinar la capacidad antioxidante de las fracciones obtenidas del extracto metanólico por los métodos utilizados para el extracto.

2a. Determinar la actividad del extracto metanólico sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*.

2b. Determinar la actividad del extracto metanólico sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*.

## 5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 5.1 Métodos generales de análisis

#### 5.1.1. Análisis cromatográficos

Los análisis de cromatografía en capa fina (ccf) se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y placas de aluminio de varias dimensiones, las cuales estaban recubiertas de gel de sílice (60 F<sub>254</sub> Merck, malla 3.5-7.0 ASTM) de 0.25 mm de espesor. Las placas se visualizaron bajo luz UV (onda corta, 254 nm y onda larga, 365 nm) y posteriormente, se revelaron con un agente cromógeno (vainillina sulfúrica 1%), sometido a calentamiento hasta la completa visualización de los compuestos.

La cromatografía en columna abierta se realizó sobre resina Sephabeds (Mitsubishi®), con dimensiones 20 × 10 cm y como fase móvil metanol, etanol y etanol/agua (1:1).

#### 5.1.2. Determinación de las constantes espectroscópicas

La resonancia magnética nuclear protónica (RMN-<sup>1</sup>H) se realizó en un aparato Unity-Inova, operado a una radiofrecuencia de 400 MHz. El disolvente usado para la disolución del compuesto fue CD<sub>3</sub>OD.

### 5.2. Material vegetal

La especie vegetal objeto de este estudio (*B. crassifolia*) se obtuvo del Mercado de Sonora en la Ciudad de México. Fue autenticada por el Dr. Robert Bye del Instituto de Biología de la UNAM. Un ejemplar de referencia se depositó en el Herbario del Instituto de Biología (MEXU).

### 5.3. Tratamiento previo del material vegetal

A la corteza colectada se le retiró hojas y todo aquel material extraño. Se sometió a molienda y se pesó en balanza granataria (980 g).

## **5.4. Estudio fitoquímico de *Byrsonyma crassifolia***

### **5.4.1. Obtención del extracto hexánico**

La corteza se colocó en un recipiente de vidrio con 4 L de hexano y se maceró por un período de 24 h. El material vegetal se separó del disolvente por filtración. El extracto obtenido se concentró a presión reducida hasta obtener un sólido.

#### **5.4.1.1. Obtención e identificación de la mezcla de $\alpha$ y $\beta$ -amirina**

A partir del extracto hexánico obtenido, precipitó un sólido blanco que fue soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Este sólido se separó y se purificó por recristalización a partir de una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y MeOH (9:1). El sólido obtenido de la operación anterior, se identificó como una mezcla de  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina al compararse por ccf con estándares auténticos proporcionados por el Dr. Arturo Navarro.

#### **5.4.1.2. Detección e identificación del lupeol**

La detección e identificación del triterpeno lupeol en el extracto hexánico se realizó mediante ccf por comparación con un estándar auténtico de lupeol proporcionado por el Dr. Arturo Navarro con el sistema de elución apropiado.

### **5.4.2. Obtención del extracto metanólico**

En un recipiente de vidrio se depositó la corteza desengrasada con hexano y se adicionaron 4 L de metanol por 72h (Mac1). El material vegetal se separó del extracto por filtración. Este proceso se repitió dos veces durante 96 h.

#### **5.4.2.1 Fraccionamiento primario del extracto metanólico derivado de la corteza desengrasada de *B. crassifolia***

Se pesó 122.24 g del extracto metanólico total seco en un vaso de precipitados, al cual se le adicionaron 500 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada hasta la disolución del extracto para adsorberlo a la resina por medio de agitación. El contenido se depositó en la columna abierta, se recibió la fase acuosa (Fase acuosa) en un matraz, se concentró y se guardó. Posteriormente, se añadió 400 mL de EtOH a la columna, la fase correspondiente se colectó (Fase EtOH) y se evaporó el disolvente. Se continuó la desorción de la resina con una mezcla de 300mL de EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  1:1. Las dos fases colectadas se compararon por medio de ccf en un sistema de elución AcOEt/HCOOH/ $\text{H}_2\text{O}$  18:1:1, revelado con vainillina

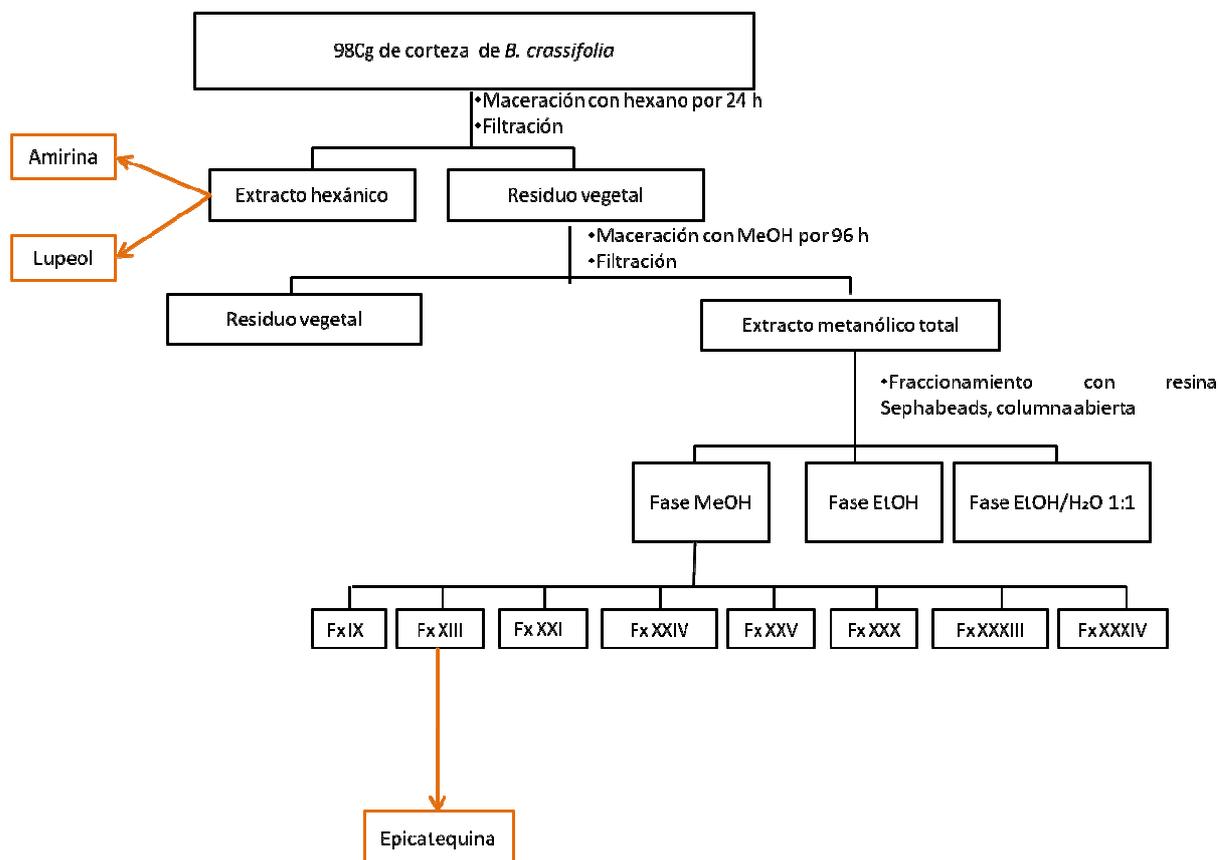
sulfúrica, encontrando que son similares y reuniéndolas para evaporar el disolvente y pesar en balanza analítica (20.1847 g).

A continuación, se eluyó la columna con MeOH, fracciones de 50 mL, obteniéndose 34 fracciones en total. De las cuales, se combinaron ocho fracciones en una sola fracción denominada FxI, por tener perfil cromatográfico similar. Después se colectaron tres fracciones de 50 mL, reunidas en FxIX; nueve fracciones de 12 a 20, en FxXII; las fracciones 21 a 23, en FxXXI; la fracción 24; las fracciones 25 a 32, en FxXXV y las fracciones 33 y 34, en FxXXXIII. A cada fracción principal se le retiró el disolvente por medio de un rotaevaporador y se pesó. Se utilizó un sistema de elución AcOEt/HCOOH/H<sub>2</sub>O 18:1:1 y se reveló con vainillina sulfúrica.

#### 5.4.2.2. Obtención e identificación de (-)-epicatequina

En FxXIII se identificó, por ccf y comparación con el estándar, a la (-)-epicatequina. Misma que se purificó y posteriormente se identificó como tal por medio de RMN-<sup>1</sup>H y por comparación de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas con las descritas en la literatura para la (-)-epicatequina (Schroeter, *et al.*, 2006). **(-)-epicatequina:**  $[\alpha]_{D-16}^{\circ}$  (MeOH), RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  6.81 (1H,d,  $J=1.8$ , 2'), 6.78 (1H, dd,  $J=6.9$ , 3.0,5'), 6.75 (1H, d,  $J=6.9,3.0,6'$ ), 5.96 (1H,d,  $J=2.4,6$ ), 5.93 (1H,d,  $J=2.4$ , 8), 4.83 (1H, s, 2), 4.21 (1H,m,3), 2.73 (1H,dd,  $J=16.5$ , 4.3, 4 $\beta$ ), 2.73 (1H, dd,  $J=16.5$ , 4.3, 4 $\alpha$ ). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_C$  158.0 (C-7), 157.9 (C-5), 157.6 (C-9), 146.0 (C-3'), 145.9 (C-4'), 132.4 (C-1'), 119.5 (C-2'), 115.9 (C-6'), 115.4 (C-5'), 110.2 (C-10), 96.5 (C-6), 96.0 (C-8), 80.0 (C-3), 67.5 (C-2), 29.5 (C-4).

En el **Diagrama 2** se muestra un resumen del proceso de la obtención del extracto y posterior fraccionamiento.



**Diagrama 2.** Proceso de la obtención y fraccionamiento del extracto metanólico de nanche.

## 5.5. Determinación del contenido de antioxidantes

### 5.5.1. Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Se utilizó la metodología descrita por Singleton y colaboradores (1965). Se agregó 800  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, 100  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin y 100  $\mu\text{L}$  de la disolución de etanol al 50% del extracto total o de la fracción, por triplicado y se reposó por 8 minutos en la oscuridad. Finalmente, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% y se guardó la mezcla de reacción en la oscuridad por 1 hora. Por

último, se realizó una lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm.

### **5.6. Ensayos de capacidad antioxidante**

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó por medio de la capacidad de neutralización del radical DPPH y del catión ABTS y el ensayo de FRAP. Con la metodología descrita por Cheng y colaboradores, se calcularon: la Concentración Inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>), el Área Bajo la Curva (ABC) y la Eficiencia Antirradical (EA) como parámetros para cuantificar dicha capacidad antioxidante. Además se calculó la Capacidad Equivalente a Trolox® (TEAC), según lo describen Silva y colaboradores (2007).

#### **5.6.1. Ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH')**

Se utilizó el método descrito por Mohamad y colaboradores (2004) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción consistió en 100 µL de una disolución 0.208 mM de DPPH y 100 µL de una disolución metanólica del extracto total metanólico y de la fracción, y una disolución metanólica de la referencia de (-)-epicatequina y del estándar de Trolox®, cada una de ellas por triplicado. Se monitoreó la reacción por medio de un espectrofotómetro a 515 nm.

#### **5.6.2. Ensayo del 2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS<sup>•+</sup>)**

Se utilizó el método descrito por Thaipong y colaboradores (2006) con modificaciones. Para producir el radical ABTS<sup>•+</sup>, se mezclaron en misma proporción de volumen las disoluciones acuosas de ABTS en concentración 7 mM y de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 2.45 mM, la mezcla de reacción se conservó en la oscuridad por 16 horas a temperatura ambiente. En una placa ELISA de 96 pozos se adicionó 180µL de la disolución del radical y 20 µL de la disolución acuosa de metanol al 50% de la prueba (extracto total metanólico, fracción, estándar o referencia). La reacción se monitoreó por medio de un espectrofotómetro a 734 nm, cada 10 segundos por 8 minutos.

### **5.6.3. Poder antioxidante/reducción de Fe<sup>3+</sup> (FRAP)**

Se utilizó el método descrito por Pérez-Jiménez y colaboradores (2008) con modificaciones. Se preparó la disolución de trabajo con solución amortiguadora de acetatos 300 mM a pH= 3.6, TPTZ 10 mM y FeCl<sub>3</sub> 20 mM, en una proporción 20:2:2 respectivamente. De la disolución anterior se tomó 180 µL y se adicionaron en una placa ELISA de 96 pozos junto con 20 µL del extracto total metanólico. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la lectura en espectrofotómetro a 593 nm.

### **5.7. Capacidad para neutralizar la lipoperoxidación por medio del ensayo de blanqueamiento de β-caroteno**

Se utilizó el método descrito por Wang y colaboradores (2008) con modificaciones. Se preparó una mezcla de reacción que consiste en una emulsión de β-caroteno de 1.0 mg/mL en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ácido linolénico, Tween 40 y H<sub>2</sub>O desionizada, a la cual se adicionó la disolución acuosa de metanol al 50% del extracto total metanólico o de la fracción. Se realizó la lectura de tiempo cero en el espectrofotómetro a 470 nm y posteriormente se sometió la mezcla de reacción a Baño María a 50°C por 1 hora, al cabo de la cual se realizó la segunda medición, utilizando como blanco una emulsión de ácido linolénico, Tween 40 y H<sub>2</sub>O desionizada. Como estándar se usó Trolox® 0.5 mg/mL.

### **5.8. Determinación del efecto de los extractos y compuestos puros sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans***

#### **5.8.1. Microorganismos de prueba**

Por ser uno de los principales patógenos de la cavidad bucal, se utilizó el microorganismo *Streptococcus mutans* (ATCC 10499). Se reactivaron 50 µL de bacteria *S. mutans* en caldo infusión de cerebro corazón (BHI) por un periodo de 24 h, a 37°C.

#### **5.8.2. Preparación de las muestras**

Se disolvieron entre 2 y 3 mg de cada fracción en 1000 µL de una mezcla de EtOH/H<sub>2</sub>O al 25%.

### 5.8.3. Procedimiento general

Se tomó 50  $\mu$ L del caldo de 24 horas y se transfirió a un tubo de ensaye con 5mL de caldo BHI fresco por duplicado (C= 1%) y se incubaron por 4 horas a 37°C. De este último medio se tomaron 480  $\mu$ L para diluirlos en 30 mL de caldo BHI, del cual se transfirió 1 mL a una celda de plástico para realizar una lectura en el espectrofotómetro a 600 nm, obteniendo %A= 0.012, de modo que cada pozo contenía aproximadamente  $5 \times 10^4$  UFC.

Se sembró la bacteria de concentración conocida en caldo BHI y glucosa al 1.0% en presencia de una disolución acuosa del extracto total metanólico o de las fracciones en una placa ELISA de 96 pozos. Cada muestra se colocó por triplicado y se realizó una dilución seriada con medio BHI.

Como control positivo se utilizó gluconato de clorhexidina al 0.012%; como control de esterilidad, caldo BHI y como control de disolvente, etanol al 25%. Se incubó a 37°C por 24 horas. Los resultados se obtuvieron al cabo de 24 horas de incubación. Se calculó a la concentración mínima inhibitoria para cada dilución de prueba.

### 5.8.4. Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Hernández y colaboradores (2012), utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos.

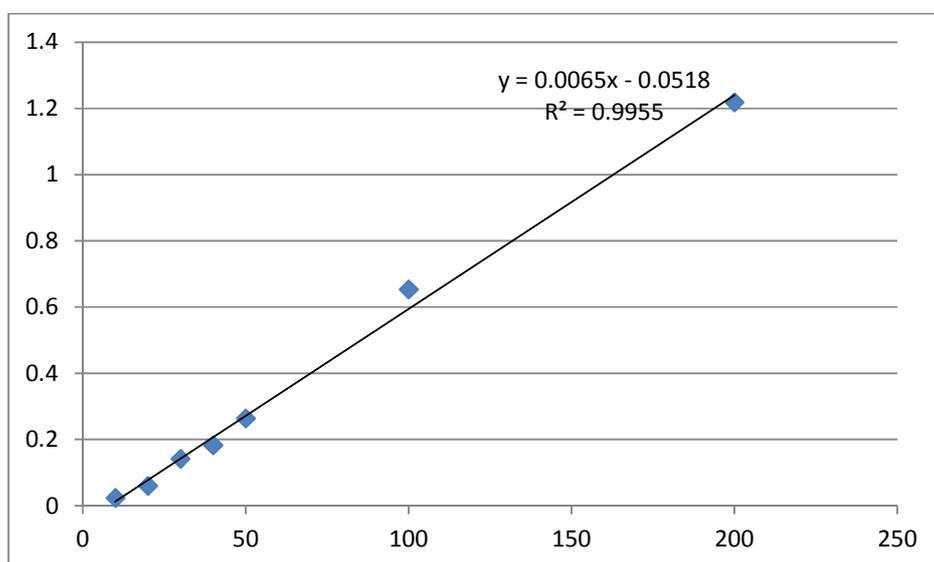
El valor de CMI fue definido como la mínima concentración del compuesto de prueba que no permitió el desarrollo de la bacteria, que visualmente se interpreta como la ausencia de turbidez en el medio.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Determinación del contenido de antioxidantes

#### 6.1.1. Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Para calcular la concentración de fenoles totales, se preparó una curva patrón de ácido gálico ( $r = 0.9955$ ), los resultados se expresan en equivalentes de ácido gálico y son presentados en la **Tabla 4**.



**Figura 28a.** Curva patrón de ácido gálico para la determinación de fenoles totales en las muestras de prueba. **Figura 28b.** Coloraciones en la determinación de fenoles totales. Tubo de ensayo de la izquierda: control negativo, tubo de ensayo de la derecha: muestra de extracto metanólico.

**Tabla 4.** Contenido de fenoles totales determinados para el extracto total metanólico y para cada fracción.

| Muestra                   | Eq. Gálico (mg Ácido gálico/g muestra) |
|---------------------------|--|
| Extracto total metanólico | 61.1                                   |
| Fracción IX               | 24.3                                   |
| Fracción XIII             | 48.8                                   |
| Fracción XXI              | 52.8                                   |
| Fracción XXIV             | 56.2                                   |
| Fracción XXV              | 56                                     |
| Fracción XXX              | 49.5                                   |
| Fracción XXXIII           | 40                                     |
| Fracción XXXIV            | 42.4                                   |

Se observa que la mayor cantidad de fenoles totales se encontró en el extracto metanólico total. Las fracciones XXI, XXIV y XXV presentan concentraciones cercanas a la encontrada en el extracto metanólico total.

## 6.2. Ensayos de capacidad antioxidante

### 6.2.1 Ensayo del DPPH

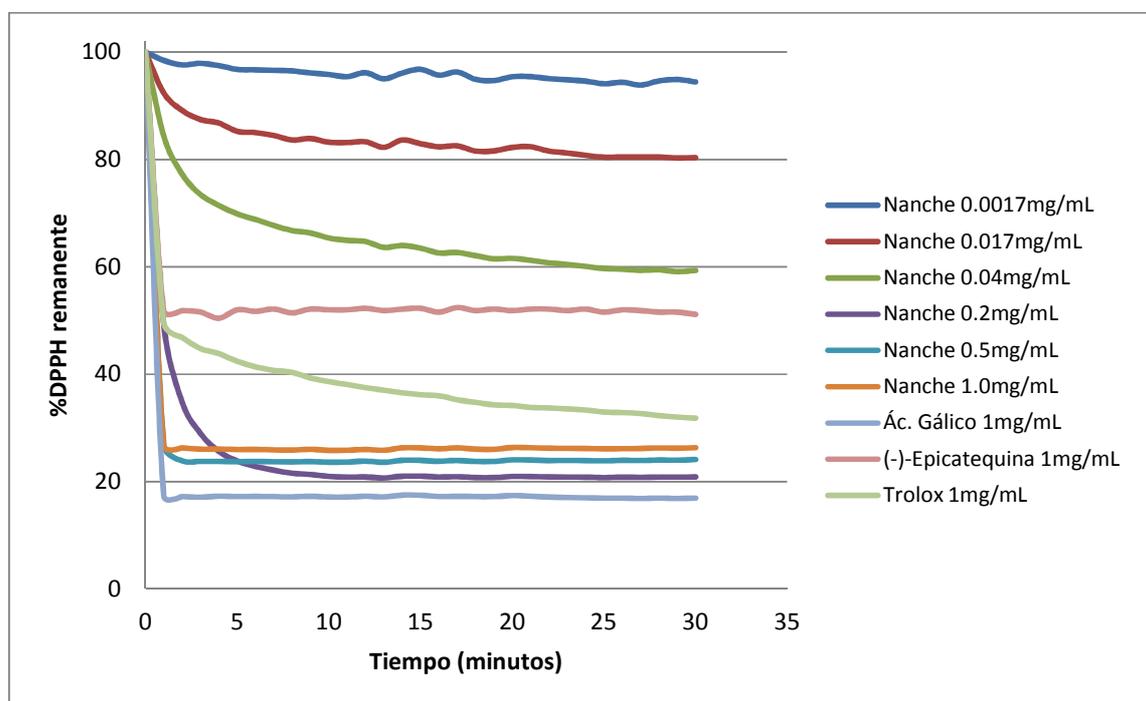
Se determinó la capacidad de atrapamiento del radical libre calculando la cantidad de DPPH remanente durante 30 minutos, mediante la siguiente fórmula:

$$\%DPPH_{\text{remanente}} = A_{\text{muestra}} / A_{DPPH} \times 100$$



**Figura 29.** Coloraciones en el ensayo de atrapamiento del radical DPPH. El color morado indica la presencia del radical estable no neutralizado, mientras que el color amarillo indica la neutralización del mismo.

En la **Figura 30** se muestra la disminución de la absorbancia en el transcurso del tiempo, para las diferentes concentraciones del extracto metanólico total, del estándar de Trolox®, (-)-epicatequina, quercetina y ácido gálico.



**Figura 30.** Curva temporal de la neutralización del radical DPPH.

Para cuantificar la capacidad atrapadora del radical se calcularon los parámetros: Área Bajo la Curva (ABC), Concentración Inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>), Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox® (TEAC) y Eficiencia Antirradical (EA), presentados en la **Tabla 5**. Destacando que el TEAC del extracto metanólico total es similar al del Trolox®.

**Tabla 5.** Resumen de los parámetros de actividad antioxidante para el extracto metanólico, el estándar Trolox y las sustancias de referencia para el ensayo de DPPH.

| Sustancia de prueba | ABC     | TEAC (mM) | CI <sub>50</sub> (mg/mL) | EA (mL/mg min) |
|---------------------|---------|-----------|--------------------------|----------------|
| Exto MeOH nanche    | 491.3   | 1.01      | 0.050                    | 20             |
| (-)-epicatequina    | 2482    | 6.97      | 0.006                    | 333.3          |
| ácido gálico        | 1623.7  | 3.34      | 0.930                    | 2.2            |
| quercetina          | 1613.8  | 3.32      | 1.49                     | 0.3            |
| Trolox®             | 884.208 | 1.00      | 0.014                    | 11.9           |

### 6.2.2 Ensayo del ABTS<sup>•+</sup>

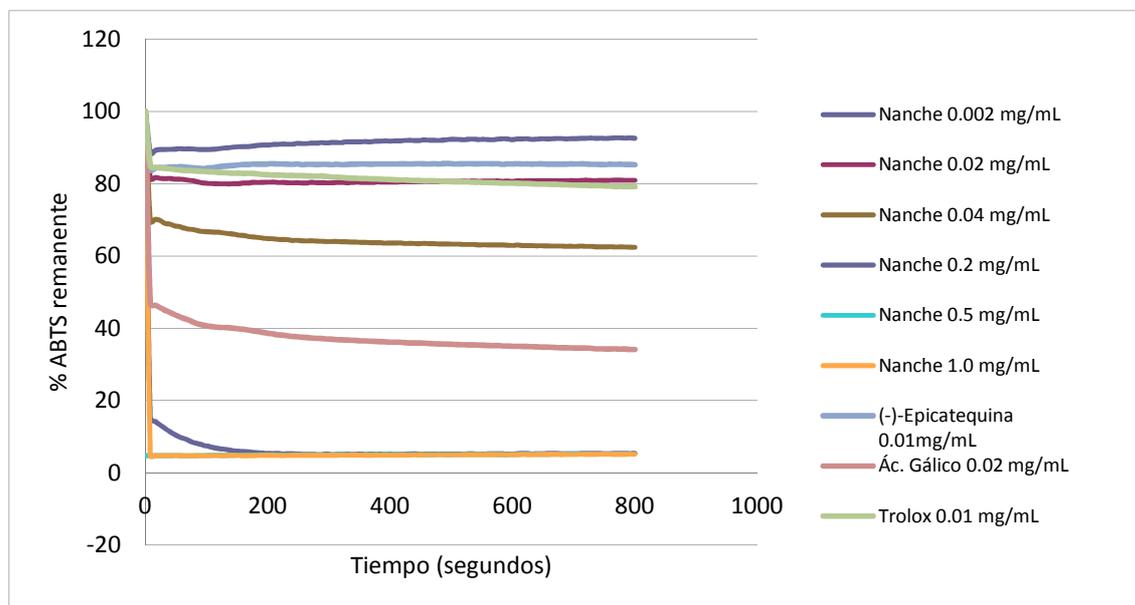
Se determinó la capacidad de atrapamiento del radical libre calculando la cantidad de ABTS<sup>•+</sup> remanente durante 10 minutos, según la siguiente fórmula:

$$\%ABTS^{•+}_{\text{remanente}} = A_{\text{muestra}} / A_{ABTS^{•+}} \times 100$$



**Figura 31.** Coloraciones en el ensayo de atrapamiento del radical ABTS<sup>•+</sup>. El color azul-verde indica la presencia del radical estable no neutralizado, mientras que la ausencia de color indica la neutralización del mismo.

En la **Figura 32** se muestra la disminución de la absorbancia respecto al tiempo, para el extracto metanólico total a diferentes concentraciones, así como del estándar de Trolox®, (-)-epicatequina, quercetina y ácido gálico.



**Figura 32.** Curva temporal de la neutralización del radical ABTS.

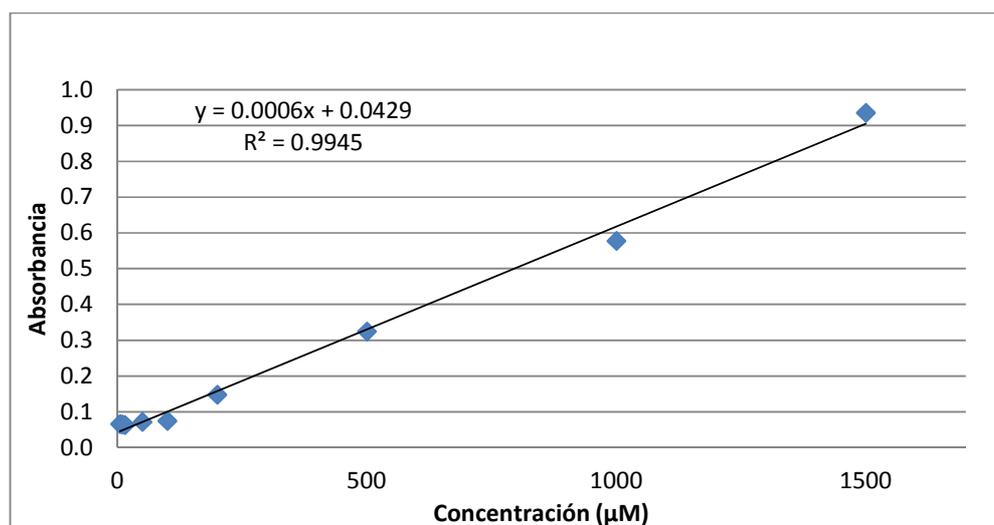
Para cuantificar la capacidad neutralizadora del radical se calcularon los parámetros: Área Bajo la Curva (ABC), Concentración Inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>), Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox® (TEAC) y Eficiencia Antirradical (EA) mostrados en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Resumen de los parámetros de actividad antioxidante para el extracto metanólico (C= 0.002 mg/mL), el estándar Trolox y las sustancias de referencia (C= 0.01 mg/mL) para el ensayo de ABTS.

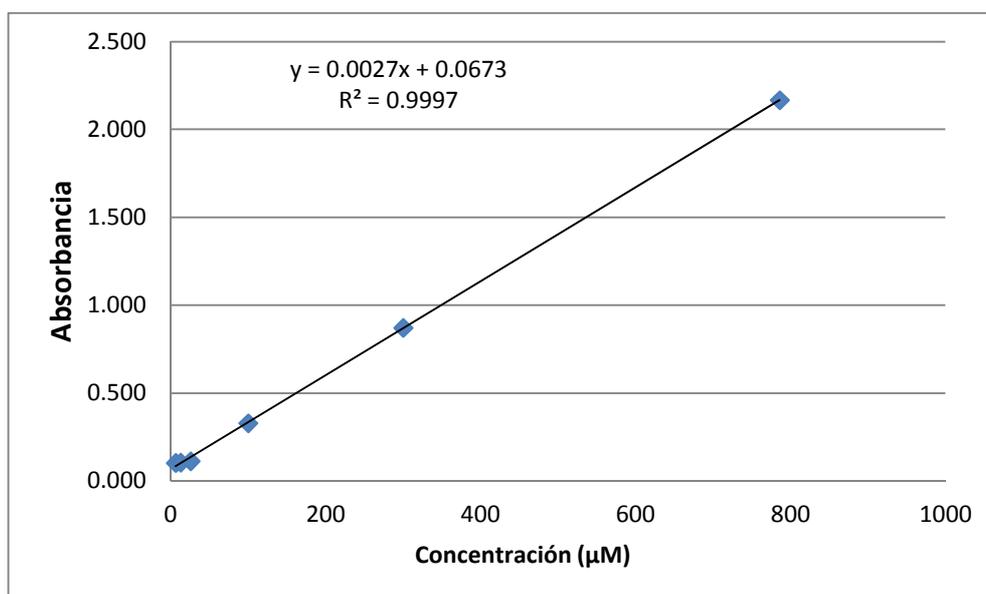
| Sustancia de prueba | ABC    | TEAC (mM) | CI <sub>50</sub> (mg/mL) | EA (mL/mg min) |
|---------------------|--------|-----------|--------------------------|----------------|
| Exto MeOH nanche    | 676.66 | 7.06      | 0.057                    | 0.022          |
| (-)-epicatequina    | 525.6  | 5.48      | 0.053                    | 0.039          |
| ácido gálico        | 1959.1 | 20.45     | 0.014                    | 0.149          |
| quercetina          | 1524.7 | 15.91     | 0.031                    | 0.058          |
| Trolox®             | 559.6  | 1.00      | 0.060                    | 0.012          |

### 6.2.3. Poder antioxidante/reducción de Fe<sup>3+</sup> (FRAP)

Para esta determinación se prepararon dos curvas patrón de los antioxidantes de referencia en medio acuoso, una de ácido ascórbico (r= 0.9945) representada en la **Figura 33** y otra de Trolox® (r= 0.9997), en la **Figura 34**.



**Figura 33.** Curva patrón de ácido ascórbico para el ensayo de FRAP.



**Figura 34.** Curva patrón de Trolox® para el ensayo de FRAP.

En la **Figura 35** se ilustran las diferentes coloraciones observadas en el ensayo; el color azul indica la formación del complejo colorido por reducción del hierro, mientras que la ausencia de color indica que éste no se formó.



**Figura 35.** Coloraciones en el ensayo de FRAP.

Para evaluar la capacidad antioxidante mediante este ensayo, se interpoló en las curvas patrón los valores de absorbancia para obtener y expresar los resultados en equivalentes de Trolox® y equivalentes de ácido ascórbico, los cuales se muestran en la **Tabla 7**. Los resultados muestran que, mediante este ensayo, todas las muestras poseen una actividad antioxidante similar.

**Tabla 7.** Resumen de los parámetros de actividad antioxidante para el extracto metanólico y las sustancias de referencia para el ensayo de FRAP (C= 0.5 mg/mL).

| Sustancia de prueba | Eq. Trolox® (µmol/L) | Eq. Ác. Ascórbico (µmol/L) |
|---------------------|----------------------|----------------------------|
| Exto MeOH nanche    | 1,176                | 5,332                      |
| (-)-Epicatequina    | 1,243                | 5,634                      |
| Acido gálico        | 1,280                | 5,801                      |
| Quercetina          | 1,235                | 5,597                      |

### 6.3. Capacidad para neutralizar la lipoperoxidación por medio del ensayo de blanqueamiento de β-caroteno

Se calculó la actividad antioxidante (%AA) respecto a un control de H<sub>2</sub>O desionizada, mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\%AA = 100 \frac{DR_c - DR_s}{DR_c}$$

Donde:

DR<sub>c</sub>= Rapidez de degradación del control

DR<sub>s</sub>=rapidez de degradación en presencia de la muestra



**Figura 36.** Coloración en el ensayo de blanqueamiento de β-caroteno. En el tubo de ensayo de la izquierda se muestra la decoloración total del β-caroteno (control negativo) y a la derecha, disminución del color del β-caroteno (extracto metanólico).

En la **Tabla 8** se muestra el %AA obtenido para el extracto metanólico total, las fracciones derivadas de éste y para el estándar Trolox®. Se muestra que se necesita 4 veces más de concentración de cualquiera de las fracciones o del extracto total para alcanzar la misma capacidad antioxidante de lípidos.

**Tabla 8.** Parámetros de capacidad antioxidante de lípidos (%AA) mediante el ensayo de blanqueamiento de  $\beta$ -caroteno.

|                                 | <b>C (mg/mL)</b> | <b>%AA</b> |
|---------------------------------|------------------|------------|
| <b>Extracto MeOH<br/>nanche</b> | 2                | 87.88      |
| <b>Fx IX</b>                    | 2                | 79.71      |
| <b>Fx XIII</b>                  | 2                | 90.47      |
| <b>Fx XXI</b>                   | 2                | 91.61      |
| <b>Fx XXIV</b>                  | 2                | 94.07      |
| <b>Fx XXV</b>                   | 2                | 96.64      |
| <b>Fx XXX</b>                   | 2                | 96.81      |
| <b>Fx XXXIII</b>                | 2                | 97.02      |
| <b>Fx XXXIV</b>                 | 2                | 85.75      |
| <b>Trolox®</b>                  | 0.5              | 90.41      |

#### **6.4. Actividad sobre del crecimiento de *Streptococcus mutans***

##### **6.4.1. Determinación de la CMI**

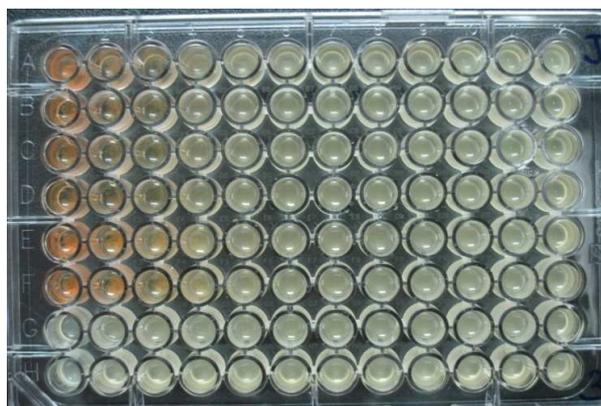
Se realizó el promedio de las tres lecturas donde se registró la inhibición como ausencia de turbidez del medio de cultivo, tal como se muestra en la placa ELISA de la Figura 37. En la **Tabla 9** se muestran los valores obtenidos para cada muestra evaluada.

**Tabla 9.** Concentraciones mínimas inhibitorias calculadas para el extracto total metanólico total, las fracciones primarias y el flavan-3-ol aislado.

| Fracción         | CMI  |
|------------------|--|
|                  | <i>Streptococcus mutans</i> ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
| Exto. total MeOH | 98.4**   |
| Fx I             | ND*  |
| Fx IX            | 725**  |
| Fx XIII          | 338**  |
| Fx XXI           | 344**  |
| Fx XXIV          | 319**  |
| Fx XXV           | 350**  |
| Fx XXX           | 356**  |
| Fx XXXIII        | 394**  |
| Fx XXXIV         | 344**  |
| (-)-epicatequina | 25.0**   |

\*ND= No se registró inhibición

\*\* Se observó precipitado en el fondo del pozo



**Figura 37.** Placa ELISA donde se muestra la inhibición del crecimiento de *S. mutans* por las fracciones del extracto metanólico en la primera hasta la tercer columna y se muestra la turbidez en los pozos G y H del control negativo.

## 7. DISCUSION DE RESULTADOS

La preselección de la especie *B. crassifolia* se realizó con base en su amplio uso en la Medicina Tradicional para el tratamiento de infecciones de la cavidad oral, resfriado, tratamiento de heridas, dolor de cintura y enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como la diabetes y afecciones renales.

### 7.1. Determinación del contenido de antioxidantes

#### 7.1.1. Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

La determinación de la cantidad de fenoles totales presentes en el extracto derivado de la corteza del nanche se realizó utilizando el método de Folin-Ciocalteu, el cual es considerado uno de los mejores y más antiguos métodos para determinar el potencial antioxidante en productos naturales (Prior *et al.*, 2005). Como resultado del proceso se encontró que tanto el extracto metanólico de nanche como las fracciones contienen compuestos fenólicos en cantidades significativas.

Al comparar el contenido de fenoles totales del extracto de la corteza del nanche (6,110 mg AG/100 g muestra) con los contenidos descritos en la literatura para bebidas y frutos con reconocida actividad antioxidante y alto contenido de fenoles totales, se encuentra que el extracto metanólico de nanche y fracciones derivadas de éste, presentan un mayor contenido de fenoles totales que la cáscara de uva roja (1,060 mg AG/100 g muestra), el té negro (194.1 mg AG/L muestra) (Chaves *et al.*, 2002) y el vino tinto (2,570 mg AG/L muestra) (Frankel *et al.*, 1995).

### 7.2. Determinación de la capacidad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante del extracto se utilizaron los ensayos de DPPH<sup>·</sup>, de ABTS<sup>·+</sup> y de FRAP. La sustancia de referencia que se utilizó para comparar y cuantificar la capacidad antioxidante de los compuestos o extractos de prueba es el ácido (+)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico (Trolox®). Con relación a éste se calculó la TEAC (Capacidad

Antioxidante Equivalente a Trolox®), la cual indica el número de radicales de DPPH· o ABTS<sup>+</sup> consumidos por una molécula de antioxidante (Roginsky *et al.*, 2005).

También se determinó la  $CI_{50}$ , que es la concentración, del antioxidante o compuesto de prueba requerido para reducir la cantidad de DPPH· o ABTS<sup>+</sup> en un 50% de su concentración original y que nos permite caracterizar el poder antioxidante de la muestra (Habsah *et al.*, 2010; Roginsky *et al.*, 2005).

Otro parámetro utilizado para describir la capacidad antioxidante fue el área bajo la curva (ABC), la cual indica la rapidez y eficiencia de la reacción de atrapamiento del radical (Apak *et al.*, 2007).

Por último, se calculó la eficiencia antirradical, como medida del atrapamiento del radical (Cheng *et al.*, 2006).

Es importante destacar, que un valor mayor de los parámetros ABC, TEAC y EA, indican la presencia de un mayor número de moléculas antioxidantes y por ende, de mayor actividad antioxidante. En el caso de la  $CI_{50}$ , se espera un menor valor ya que se requiere que una mínima concentración de muestra de prueba inhiba una mayor cantidad de radicales.

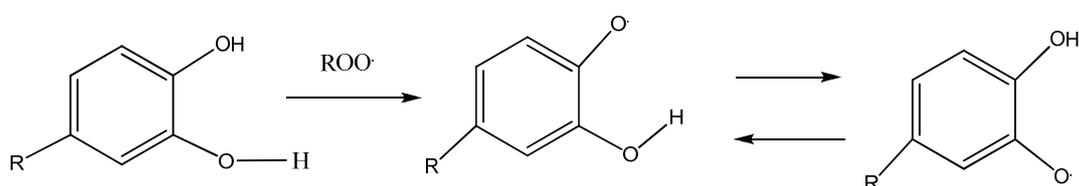
### 7.2.1. Ensayo del DPPH·

La neutralización del radical DPPH· se lleva cabo por dos mecanismos: transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT, por sus siglas en inglés *hydrogen atom transfer*) y por transferencia de un protón (ET, *electron transfer*). Sin embargo la reacción que se lleva en mayor medida es la ET (Ou *et al.*, 2005).

Los valores de TEAC reportados en la **Tabla 4** indican que el extracto metanólico de nanche captura una cantidad de radicales comparable al Trolox®. Los valores de TEAC obtenidos para los compuestos puros se encuentran en un rango de 3.32mM a 6.97mM lo cual es indicativo de una mayor actividad antioxidante relativa al Trolox®.

Por otra parte, con relación a las  $CI_{50}$ , se observa que el extracto metanólico de nanche posee capacidad antioxidante comparable a la del Trolox®, ya que se necesita una concentración similar para neutralizar la misma cantidad de

radicales. Mientras que los compuestos puros, presentes en el extracto de corteza, poseen una  $CI_{50}$  menor, destacando la (-)-epicatequina. Este compuesto, junto con la quercetina, ha sido reportado como uno de los antioxidantes más eficaces pertenecientes al grupo de los flavonoides (Kurihara *et al.*, 1995). La (-)-epicatequina, además de poseer el esqueleto básico de los flavonoides, en el anillo B presenta la función catecol, la cual de acuerdo a la literatura, es esencial para una alta actividad antioxidante. Los hidroxilos poseen la capacidad de quelar metales que desencadenan el estrés oxidativo y dan la estabilización del aroxi-radical por deslocalización electrónica (Procházková *et al.*, 2011).



**Figura 38.** Estabilización del aroxi-radical en el anillo B de los flavonoides. Reproducido de Kurihara *et al.*, 1999.

### 7.2.2. Ensayo del ABTS

Los valores de TEAC resumidos en la **Tabla 6** indican que, el extracto derivado de la corteza del nanche posee una potencia cinco veces menor a la de los compuestos puros ácido gálico y la quercetina, ya que éstos últimos consumen una mayor cantidad de radicales el extracto metanólico total. Sin embargo, su potencia es mayor que la del Trolox® y similar a la (-)-epicatequina.

Es importante destacar que la  $CI_{50}$  del extracto metanólico de nanche es similar a la del estándar de Trolox® y a la del compuesto puro (-)-epicatequina y mayor que la  $CI_{50}$  obtenida para el ácido gálico y la quercetina. Por lo que los compuestos puros ácido gálico y quercetina son capaces de neutralizar al radical ABTS de una manera más rápida que el extracto.

Por otra parte, con respecto a la eficiencia antirradical, la cual, correlaciona los valores de TEAC y de  $CI_{50}$  se puede destacar que estos valores se encuentran en congruencia con reportes previos hallados en la literatura (Cheng *et al.*, 2006). Este valor describe la relación entre ambos parámetros e indica que para que un

compuesto sea considerado como un buen atrapador debe tener valores de TEAC altos y  $Cl_{50}$  bajos (Cheng *et al.*, 2006).

### 7.2.3. Ensayo de FRAP

Con el ensayo de FRAP se evalúa uno de los mecanismos por los cuales los antioxidantes realizan su acción, este es la transferencia de un electrón. El poder de reducción parece estar relacionado con el grado de hidroxilación y medida de conjugación de los compuestos polifenólicos (Pulido *et al.*, 2000).

En la **Tabla 4** se presentan, a manera de resumen, los resultados obtenidos para el ensayo. Los valores altos de equivalentes de ácido ascórbico y de equivalentes de Trolox® indican que el extracto metanólico posee una capacidad donadora de electrones similar a las referencias puras. Por lo que el extracto metanólico actúa mediante la transferencia de átomos de hidrógeno de electrones.

### 7.3. Capacidad para neutralizar la lipoperoxidación por medio del ensayo de blanqueamiento de $\beta$ -caroteno

Una manera de evaluar la actividad antioxidante de los polifenoles es mediante la inhibición de la autooxidación de los lípidos. Este proceso se lleva a cabo mediante la donación de un átomo de hidrógeno a los radicales peroxilo para estabilizarlos (Roginsky *et al.*, 2005).

Según los resultados obtenidos, tanto el extracto como las fracciones primarias poseen la capacidad para evitar que la oxidación del  $\beta$ -caroteno, lo cual se reflejó en una disminución de la absorbancia y por lo tanto, un alto porcentaje de actividad antioxidante (% AA).

Por otra parte, es importante destacar que aún cuando el extracto y las fracciones primarias poseen una buena capacidad para retardar el proceso de lipoperoxidación, su eficacia es menor a la determinada para el control positivo Trolox®.

#### 7.4. Relación de los ensayos de capacidad antioxidante

Se observa que los valores de ABC son mayores en el ensayo de ABTS puesto que este radical reacciona indistintamente con cualquier donador de  $-H$ , que puede no estar contribuyendo a la actividad antioxidante (Roginsky *et al.*, 2005). Sin embargo, en el caso de los compuestos puros, se encuentra que los valores de ABC son muy similares, lo cual es congruente dado que siempre se tienen los mismos donadores de hidrógenos en la molécula.

Para el caso de las  $CI_{50}$ , los valores de estas en el ensayo de DPPH son mayores que en el ensayo de ABTS debido a la falta de especificidad mencionada para el último radical: neutraliza mayor cantidad de radicales, por lo que aparentemente se necesita mayor cantidad de antioxidante.

La diferencia en los parámetros calculados para los ensayos muestra que los antioxidantes reaccionan dependiendo la naturaleza radical, lo cual concuerda con lo descrito por Prior *et al.* (2005) quienes además exponen que la actividad de los compuestos fenólicos depende del medio de reacción.

#### 7.5. Determinación del efecto de los extractos y compuestos puros sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*

Por medio del ensayo biológico, se estableció que el extracto metanólico preparado a partir de la corteza de *B. crassifolia* inhibe el crecimiento de *S. mutans*, uno de los principales agentes etiológicos de la caries. La determinación del potencial antibacteriano del extracto metanólico derivado de la corteza de *B. crassifolia* se realizó utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos según la metodología descrita por Hernández y colaboradores (2012). Los resultados obtenidos indican que el extracto total posee una CMI de 98.4  $\mu\text{g/mL}$ .

En este sentido, Wu y colaboradores (2002) consideran que un extracto vegetal es activo contra *S. mutans* si la CMI es menor a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Por lo que el extracto metanólico total puede considerarse activo contra la bacteria de prueba.

Posteriormente, el extracto se sometió a un fraccionamiento y como resultado se obtuvieron nueve fracciones las cuales se evaluaron con el mismo bioensayo utilizado para determinar la actividad del extracto. El proceso permitió la detección de siete fracciones con actividad antibacteriana moderada (Fx XIII-Fx XXXIV).

Se observa que la actividad de extracto es mayor que la de sus fracciones, esto puede deberse a la existencia de una variedad de compuestos que actúan sinérgicamente para inhibir el crecimiento de *S. mutans*.

## 8. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación permitió el aislamiento de una mezcla de los triterpenos  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina y la detección mediante cromatografía en capa fina del triterpeno lupeol a partir del extracto hexánico derivado de la corteza de *Byrsonima crassifolia*. Por otra parte, el estudio químico del extracto metanólico de la corteza del nanche condujo al aislamiento del flavan-3-ol (-)-epicatequina a partir de la fracción XIII.

Se encontró que el extracto metanólico de la corteza de *B. crassifolia* posee una potente actividad antioxidante. En el caso del ensayo del DPPH, se obtuvo un TEAC de 1.01 mM,  $CI_{50}$  de 0.05 mg/mL y EA de 20 mL/mg min, que son comparables con los valores obtenidos para el Trolox® (TEAC de 1.0 mM,  $CI_{50}$  de 0.0514 mg/mL y EA de 11.9 mL/mg min). Por otra parte, en el ensayo del ABTS, se encontró el patrón similar al obtenido para el DPPH con un TEAC de 7.06 mM,  $CI_{50}$  de 0.057 mg/mL y EA de 0.022 mL/mg min y para el estándar Trolox® valores de TEAC de 1.0 mM,  $CI_{50}$  de 0.06 mg/mL y EA de 0.012 mL/mg min. En el caso de tercer ensayo realizado, FRAP, los valores de equivalentes de ácido ascórbico (5332 $\mu$ M) y de equivalentes de Trolox® (1176 $\mu$ M) concuerdan con los resultados obtenidos en los ensayos de DPPH y ABTS. Por último, se encontró que el extracto total metanólico y las fracciones poseen la capacidad para retardar la peroxidación de lípidos, con %AA que oscilan en un rango de 79.71% - %96.64, que fueron determinados mediante el ensayo de blanqueamiento del  $\beta$ -caroteno.

La presencia del flavan-3-ol (-)-epicatequina explica de manera parcial la potente actividad antioxidante observada en el extracto metanólico.

Por otra parte, se realizó el ensayo de actividad sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*, con el cual se detectó que el extracto metanólico logró inhibir el crecimiento de la bacteria con una CMI de 98.4  $\mu$ g/mL. De igual manera, se detectó que las fracciones primarias derivadas del extracto poseen la capacidad de inhibir a la bacteria con CMIs entre un rango de 319-725  $\mu$ g/mL.

## 9. PERSPECTIVAS

- Continuar con el estudio fitoquímico de corteza del árbol, con la finalidad de aislar otros componentes con capacidad antioxidante.
- Determinar el mecanismo de inhibición de radicales del extracto y compuestos puros.
- Determinar la concentración a la cual el extracto metanólico tiene ejercer efecto prooxidante.

## 10. REFERENCIAS

- Alves, G.L.; Franco, M.R.B. (2003) **Headspace gas chromatography–mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich)**, Journal of Chromatography A, 985:297–301.
- Apak, R.; Güçlü, K.; Demirata, B.; Özyürek, M.; Çelik, S. E.; Bektasoglu, B.; Berker, K.; Özyurt, D. (2007) **Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay**, Molecules, 12:1496-1547.
- Argueta A.; Cano, V. (1994) **Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana**, Instituto Nacional Indigenista, México.
- Argueta, A. (2009) **Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana**, Instituto Nacional Indigenista, México. Versión digital <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>. Consultada el 19 de enero 2012.
- Bejar, E.; Amarquaye, A.; Chec, C.; Malone, M. H.; Fong, H. S. S. (1995), **Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity**, International Journal of Pharmacognosy, 33(1): 25-32.
- Chaves, M. G.; Maiocchi, M. G.; Sgroppo, S. C.; Avanza, J. R. (2002) **Actividad antioxidante de infusiones de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**, Información tecnológica, España, 13(2):4.
- Cheng, Z.; Moore, J.; Yu, L. (2006) **High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay**, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54:7429-7436.
- Díaz-Cruz, A. (2007) **Radicales libres**, Apuntes, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, pp. 1-3.
- Drago-Serrano, M. E. (2007) **Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica**, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(4):42-47.
- Ferrer-Viant, D.; Jorge-Fonseca, C.; Cutiño-Clavel, I.; García-Rodríguez, R. E.; Arce-Gómez, L. (1999) **Radicales libres y su papel en la homeostasia neuronal**, MEDISAN, Instituto Superior de Ciencias Médicas, 3(3):5-11.

- Frankel, E. N.; Waterhouse, A.L.; Teissedre, P.L. (2005) ***Principal phenolic phytochemicals in selected Californian wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins***, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43:890-894.
- Geiss, F.; Heinrich, M.; Hunkler, D.; Rimple, H (1995) ***Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from Byrsonima crassifolia bark***, Phytochemistry, 39(3): 63-643.
- Gimeno-Creus, E. (2004) ***Compuestos Fenólicos, un análisis de los beneficios para la salud***, OFFARM (23) 6:80-84.
- Gutiérrez-Avella, D. M.; Ortiz-García, C. A.; Mendoza-Cisneros, A. (2008) ***Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal***, Simposio de Metrología 2008, Universidad Autónoma de Querétaro.
- Hernández, M. R.; Gally-Jordá, M. (1981) ***Plantas medicinales, uso y dosificación de las 184 plantas más usadas en América Latina***, Editorial árbol México, pp. 7.
- Hidalgo-Torres, J. (2003) ***Tratado de enología***, MundiPrensa Libros, pp. 888.
- Iglesias-Neira, J. (2009) ***Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca***, Tesis Doctorado, Universidad Santiago de Compostela.
- Kurihara, K. K.; Miyata, N., Suzuki, T., and Toyoda, M. (1999) ***Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation***, Archives of Biochemistry and Biophysics, 362:79-86.
- Lim-Ming Y.; O'Neale Roach, J. (2007) ***Metabolism and nutrition***, Elsevier España, pp. 53.
- Lima-Hernández, L. B. (2002) ***Estrés oxidativo y antioxidantes: Actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos***, Centro Nacional de Medicina Natural y Tradicional, La Habana, Cuba.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. (2004) ***Polyphenols: food sources and bioavailability***, American Journal for Clinical Nutrition, 79:727-47.

Martínez-Flores, S.; González-Gallego, S.; Culebras, J. M.; Tuñón, M.J. (2002) **Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes**, Nutrición Hospitalaria, 17(6):271-278.

Martínez-Vásquez, J.B. (2007) **Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Heliocharpus terebinthinaceus***, Tesis de Licenciatura, Universidad Tecnológica de la Mixteca.

Martínez-Vázquez, M.; González-Esquínca, A. R.; Cazares-Luna, L.; Moreno-Gutiérrez, M. N.; García-Argáez, A. N. (2004) **Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K.**, Journal of Ethnopharmacology, 66:79–82.

Martínez, A. (2005) **Flavonoides**, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Colombia, pp. 4-75.

Mohamad, H.; Abas, F.; Permana, D.; Lajis, N. H.; Ali, A. M.; Sukari, M. S.; Taufiq Y. Y.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N. (2004) **DPPH Free radical scavenger components from the fruits of *Alpinia rafflesiana* Wall. ex. Bak (Zingiberaceae)**, 54(20):811-815.

Molina-Úbeda, R. (2000) **Teoría de la clarificación de mostos y vinos y sus aplicaciones prácticas**, Editor Mundi-Prensa Libros, pp. 271.

Moon, J. & Shibamoto, T. (2009) **Antioxidant Assays for Plant and Food Components**, J. of Agricultural Chemistry, 57 (5):1655-1666.

Mora, R. (2002) **Soporte nutricional especial**, Ed. Médica Panamericana, pp. 124.

Nácher, M.; Serrano-Mollar, A.; Josep, M. M. (2007) **Nuevos aspectos patogénicos en el síndrome de apneas e hipopneas durante el sueño (SAHS)**, De la biología a la clínica, Archivos de bronconeumonía 43:2.

Negróni, M. (2009) **Microbiología Estomatológica**, Ed. Médica Panamericana, pp. 276.

Nevarez-Aceves, M. S. (2006) **Enfermedades crónico-degenerativas**, Revista Salud Pública y Nutrición, Edición especial no. 11.

Ochoa C. I.; Ayala A. A. (2004) **Los Flavonoides: Apuntes Generales y su Aplicación en la Industria de Alimentos**, Ingeniería y Competitividad, 6 (2): 93-104.

OFI/CATIE (2003) ***Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth**, Manual Árboles de Centroamérica, Programa de Investigación Forestal (FRP), pp. 411-414.

OMS, a través del sitio en internet <http://www.who.int>, Consultada el 19 de enero 2012.

Osorio, D.; Montoya, G.; Bastida, J. (2009) ***Caracterización fitoquímica de una fracción de biflavonoides de Garcinia madruno: Inhibición de la oxidación de LDL humana y su mecanismo de estabilización de especies radicalarias***, Redalyc, 16(3): 369-377.

Osuna-Torres, L.; Tapia-Pérez, M. (2005) ***Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales***, Ediciones Universitat Barcelona, pp. 9.

Ou, B.; Prior, R. L.; Huang, D. (2005) ***The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays***, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53:1841-1856.

Palma-Cárdenas, A. & Sánchez-Aguilera, F. (2007) ***Técnicas de ayuda odontológica y estomatológica***, Editorial Paraninfo, pp. 154.

Peraza-Sánchez, S.R.; Cen-Pacheco, F.; Noh-Chimal, A.; May-Pat, F.; Simá-Polanco, P.; Dumonteil, E.; García-Miss, M.R.; Mut-Martín, M. (2007) ***Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula***, Fitoterapia, 78:315–318.

Pérez-Trueba, G.; Martínez-Sánchez, G. (2001) ***Flavonoides como Antioxidantes Naturales***, Acta Farm. Bonaerense, 20 (4):297-306.

Procházková, D.; Bousřová, I.; Wilhelmová, N. (2011) ***Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids***, Fitoterapia, 82:513–523.

Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. (2005) ***Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements***, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53:4290-4302.

Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. (2000) ***Antioxidant capacity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay***, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48:3396-3402.

Quiñones, M.; Miguel, M.; Aleixandre, A. (2012) ***Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular***, Nutrición Hospitalaria, 27(1):76-89.

Rakel, D. (2008) ***Medicina integrativa***, ElSevier España, 2º edición, pp. 1067.

Raspall, G. (2006) ***Cirugía Oral e Implantología***, Ed. Médica Panamericana, pp. 290.

Rastrelli, L.; De Tommasi, N; Berger, I.; Caceres, A.; Saravia, A.; De Simone, F. (1997) ***Glycolipids from Byrsonima crassifolia***, *Phytochemistry*, 45(4): 647-550.

Ríos de Molina, M. C. (2003) ***El estrés oxidativo y el destino celular***, *Revista Química Viva, Argentina*, 2(1):17-28.

Rivero-Cruz, J. F.; Sánchez-Nieto, S.; Benítez, G.; Casimiro, X.; Ibarra-Alvarado, C.; Rojas-Molina, A.; Rivero-Cruz, B. (2001) ***Antibacterial compounds isolated from Byrsonima crassifolia***, *Revista Latinoamericana de Química*, 37(2):155-163.

Roginsky, V.; Lissi, E. A. (2005) ***Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food***, *Food Chemistry*, 92:235-254.

Rojas-Alba, Mario (2010) ***Herbolaria y Medicina Tradicional Mexicana***, Diplomado de Tlahui-Educa, , Xalapa, Veracruz, México, 17 de Julio del 2010.

Sacyl (2006) ***Higienistas Dentales***, Servicio de salud de Castilla y León MAD-Eduforma, pp. 20.

Sánchez, C .E. (2001) ***Alteraciones oxidativas en el pulmón***, *Acta Médica Colombiana* 26 (4):193-199.

Sarka, K.S. & Howard, R. E. (1976) ***Specificity of the vanillin test for flavanols***, *Journal of Food and Agricultural Chemistry* 24(2):317-320.

Sepa (2009) ***Manual De Higiene Bucal***, Ed. Médica Panamericana, pp. 2-5.

Tannir, M. A.; Goodman, H. S. (1994) ***A review of chlorhexidine and its use in special populations***, *Special Care Dentist*, 14 (3):116-22.

Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Byrne, D. H. (2006) ***Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts***, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19:669–675.

VADEMECUM Diccionario de Medicamentos y Principios Activos, España, 2010, a través de la versión digital <http://www.vademecum.es/> Consultada el 25 enero 2012.

---

Velázquez-Paniagua, M.; Prieto-Gómez, B.; Contreras-Pérez, R. (2004) ***El envejecimiento y los radicales libres***, Revista de Ciencias, 75: 36-43.

Venéreo-Gutiérrez, J. R. (2002) ***Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes***, Revista Cubana Medicina Militar, 31(2):126-33.

Wang, W.; Wu, N.; Fu, Y. J. (2007) ***Antioxidant activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to its main components***, Food Chemistry, 108:1019-1022.

Wu, C.D.; Wei, G. (2002) ***Tea as a functional food for oral health***, Nutrition, 18: 443-444.