



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Análisis de la actividad antioxidante de *Verbena carolina* (Verbenaceae)

T E S I S

Que para optar por el grado de:

Licenciatura en Química Farmacéutico Biológica

Presenta:

Cecilia Salgado Sánchez

Tutor:

Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Supervisor Técnico:

Omar Noel Medina Campos

FACULTAD DE QUÍMICA

Presidente: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Vocal: Dra. Rachel Mata Essayag

Secretario: Dra. Isabel Del Carmen Rivero Cruz

1er. Suplente: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

2do. Suplente: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar

Cd. Universitaria, D. F.

Febrero 2016



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.



ÍNDICE

Lista de abreviaturas	VI
Lista de imágenes	VIII
Lista de tablas	VIII
Lista de gráficas.....	VIII
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Familia Verbenaceae.....	3
1.2 Género <i>Verbena</i>	3
1.3 <i>Verbena carolina</i> L.	4
1.4 Composición química.....	6
1.5 Especies reactivas de oxígeno	7
1.6 Antioxidantes.....	9
1.7 Contenido de fenoles.....	10
1.8 Ensayos para detectar actividad antioxidante.....	10
1.8.1 Ensayo de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH·)	12
1.8.2 Ensayo de neutralización del catión radical ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS ⁺).....	13
1.8.3 Ensayo poder antioxidante/reductor de Fe ³⁺ (FRAP).....	14
1.8.4 Ensayo de capacidad antioxidante de radicales oxígeno (ORAC).....	15
1.8.5 Ensayo de capacidad atrapadora de superóxido (O ₂ ^{•-}).....	16
1.8.6 Ensayo de capacidad atrapadora de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	17
1.8.7 Ensayo de capacidad atrapadora de radical hidroxilo (OH·).....	17
1.8.8 Ensayo de atrapamiento de oxígeno singulete (¹ O ₂).....	18
1.8.9 Ensayo de atrapamiento de ácido hipocloroso (HClO)	18
1.8.10 Ensayo de atrapamiento de peroxinitrito (ONOO ⁻)	19
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo general	21
3.2. Objetivos particulares	21
4. MATERIAL	22
4.1 Material vegetal y compuestos aislados	22
4.2 Disolventes y reactivos	22



4.3 Equipo	24
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	25
5.1 Obtención de los extractos provenientes de <i>Verbena carolina</i>	25
5.1.1 Extracto acuoso	25
5.1.2 Extracto de metanol	25
5.2 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu y fórmula farmacopéica (FHEUM, 2013)	25
5.3 Ensayos de actividad antioxidante	26
5.3.1 Ensayo de neutralización del radical libre DPPH [•]	26
5.3.2 Ensayo de neutralización del catión ABTS ^{•+}	27
5.3.3 Ensayo FRAP (poder antioxidante/reductor de Fe ³⁺)	28
5.3.4 Ensayo de ORAC	28
5.3.5 Ensayo de superóxido (O ₂ ⁻)	29
5.3.6 Ensayo de capacidad atrapadora de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	29
5.3.7 Ensayo de capacidad atrapadora de radical hidroxilo (OH [•])	29
5.3.8 Ensayo de atrapamiento de oxígeno singulete (¹ O ₂)	30
5.3.9 Ensayo de atrapamiento de ácido hipocloroso (HCIO)	30
5.3.10 Ensayo de atrapamiento de peroxinitrito (ONOO ⁻)	31
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	32
6.1 Extractos	32
6.2 Contenido de fenoles totales	32
6.2.1 Cuantificación de fenoles totales por medio de la fórmula farmacopéica (FHEUM)	34
6.3 Radical libre DPPH [•]	36
6.4 Catión ABTS ^{•+}	38
6.5 FRAP	40
6.6 ORAC	42
6.7 Superóxido (O ₂ ⁻)	44
6.8 Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	45
6.9 Radical hidroxilo (OH [•])	46
7.0 Oxígeno singulete (¹ O ₂)	47
7.1 Ácido hipocloroso (HCIO)	48
7.2 Peroxinitrito (ONOO ⁻)	49
7.3 Resumen	50



7. CONCLUSIONES	51
8. PERSPECTIVAS	52
9. BIBLIOGRAFÍA	53



Lista de abreviaturas

Abs	Absorbancia
ABTS	2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
AcOEt	Acetato de etilo
Amplex Red	N-Acetil-3,7-dihidroxifenoxazina
APPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidroclorhidrato
Ca₂CO₃	Carbonato de sodio
CI₅₀	Concentración inhibitoria media
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
DCFH-DA	Diacetato de 2,7- diclorodihidrofluoresceína
DCFH	2,7- diclorodihidrofluoresceína
DPBF	1,3-difenilisobenzofurano
DCF	2,7-diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético
EA	Extracto acuoso
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EM	Extracto de metanol
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos de América
FeCl₃	Cloruro de hierro III
FRAP	Poder antioxidante/reductor de Fe ³⁺
g	Gramos
H₂O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
HClO	Ácido hipocloroso
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
HNO₃	Ácido nítrico
HRP	Peroxidasa del rábano
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
INAHM	Instituto Nacional de Antropología e Historia de Morelos
KNO₂	Nitrito de potasio
K₂S₂O₈	Persulfato de potasio
L	Litro
λ	Longitud de onda
min	Minuto
μL	Microlitro
mL	Mililitro
μmol	Micromol
μM	Micromolar
mM	Milimolar
MeOH	Metanol
MnO₂	Óxido de manganeso (IV)



Na₂CO₃	Carbonato de sodio
nm	Nanómetro
NaOCl	Hipoclorito de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NBT	Azul de nitrotetrazolio
(NH₄)₂SO₄	Sulfato de amonio
NO	Óxido nítrico
¹O₂	Oxígeno singulete
O₂	Oxígeno
O₂⁻	Superóxido
OH·	Radical hidroxilo
ONOO⁻	Peroxinitrito
ORAC	Capacidad antioxidante de radicales de oxígeno
PMS	Metosulfato de fenazina
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROO·	Radicales peroxilo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
Std	Estándar (Referencia)
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox
TAC	Capacidad antioxidante total
TPTZ	2,4,6-Tripiridil-s-Triazina
TROLOX	Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
VCEAC	Capacidad antioxidante equivalente a ácido ascórbico

**Lista de imágenes**

Imágenes 1 y 2 <i>Verbena carolina</i> L.y distribución geográfica	4
Imágenes 3 y 4 Formación de ROS y clasificación de antioxidantes	8
Imágenes 5 - 13 Reacciones involucradas en los ensayos de actividad antioxidante	12

Lista de tablas

Tabla 1. Composición química de <i>Verbena carolina</i> L.....	6
Tablas 2 – 6 Cantidad de extracto obtenido y fenoles totales.....	32
Tablas 7 – 17 Resultados de los ensayos de actividad antioxidante	37

Lista de gráficas

Gráfica 1. Curva de calibración de ácido gálico.....	32
Gráficas 2 y 3. Curva de calibración de Trolox y porcentaje de actividad antioxidante del ensayo DPPH	36
Gráficas 4 y 5. Curva de calibración de Trolox y porcentaje de actividad antioxidante del ensayo ABTS	38
Gráficas 6 y 7. Curvas de calibración de Trolox y ácido ascórbico para el ensayo de FRAP .	40
Gráfica 8. Curva de calibración de Trolox para el ensayo de ORAC	42
Gráficas 9 – 15. Porcentaje de actividad antioxidante de los ensayos ORAC, $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , 1O_2 , HClO y $ONOO^-$	43



INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional se considera como "el conocimiento, habilidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias indígenas de distintas culturas, que se utiliza en el mantenimiento de la salud y en la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales" (Engebretson, 2002). Hay muchos sistemas diferentes dentro de la medicina tradicional y la filosofía y las prácticas de cada uno están influenciadas por las condiciones imperantes, el medio ambiente, y el área geográfica en la que primeramente se desarrolló.

Las razones más comunes para el empleo de la medicina tradicional son las siguientes: es más asequible y alivia las preocupaciones acerca de los efectos adversos de los medicamentos sintéticos. Sin embargo, el uso de remedios tradicionales aumenta cuando la medicina convencional no es eficaz en el tratamiento de una enfermedad en particular, como es el caso del cáncer. Por otra parte, la medicina tradicional es percibida como natural y segura, es decir, inocua, carente de toxicidad. Esto no es necesariamente cierto, especialmente cuando se toman hierbas, aisladamente o en conjunto con medicamentos prescritos, cuya calidad no es asegurada, como es práctica muy común. Las hierbas y plantas pueden ser procesadas y se pueden comercializar de diferentes maneras y formas, que incluyen la droga cruda, tés, jarabes, aceites esenciales, pomadas, ungüentos, frotaciones, cápsulas y tabletas (Engebretson, 2002).

El estrés oxidativo se ha identificado como la causa fundamental del desarrollo y la progresión de varias enfermedades como cáncer, trastornos relacionados con la edad y enfermedades neurodegenerativas. La suplementación de antioxidantes exógenos o el aumento de las defensas antioxidantes endógenas del cuerpo son una forma "prometedora" en la lucha contra los efectos indeseables de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales inducen daño oxidativo. Las plantas tienen una capacidad innata para biosintetizar una amplia gama de antioxidantes no enzimáticos capaces de atenuar el daño oxidativo inducido por ROS (Kasote, 2013).

Los antioxidantes retrasan o previenen de manera significativa la oxidación de sustratos fácilmente oxidables cuando están presentes a concentraciones más bajas que el sustrato. Los antioxidantes pueden ser sintetizados *in vivo* (por ejemplo, glutatión reducido (GSH),



superóxido dismutasa (SOD), etc.) o administrados en forma de antioxidantes dietéticos. Las plantas han sido durante mucho tiempo una fuente de antioxidantes exógenos (es decir, la dieta). Se cree que dos tercios de las especies de plantas del mundo tienen importancia medicinal, y casi todos ellos tienen un excelente potencial antioxidante. El interés en antioxidantes exógenos en las plantas fue evocado por primera vez por el descubrimiento y el posterior aislamiento del ácido ascórbico a partir de plantas. Desde entonces, el potencial antioxidante de las plantas ha recibido una gran atención debido a que el aumento del estrés oxidativo ha sido identificado como un factor principal causante del desarrollo y la progresión de varias enfermedades mencionadas anteriormente que amenazan la vida.

Actualmente existen ensayos *in vitro* e *in vivo* de evaluación de la actividad antioxidante que se aplican a diversas muestras de plantas por ejemplo, el ensayo de neutralización del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ABTS^{•+} (2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) y ORAC (capacidad antioxidante de radicales de oxígeno). En la mayoría de estos ensayos *in vitro* estas muestras resultan con una potente actividad antioxidante. Esto es probablemente debido a su capacidad innata para sintetizar antioxidantes no enzimáticos tales como el ácido ascórbico y glutatión, así como metabolitos secundarios que incluyen a los compuestos fenólicos (Alam, 2013).



1. ANTECEDENTES

1.1 Familia Verbenaceae

La familia de plantas Verbenaceae comúnmente conocida como familia verbena o vervain comprende árboles, hierbas y arbustos. Incluye 35 géneros y alrededor de 1,200 especies que se encuentran principalmente en las regiones tropicales del mundo.

Estas plantas son conocidas por sus usos en la medicina tradicional de varios países. Algunas de ellas han sido reportadas por contener fitoquímicos bioactivos con importantes efectos farmacológicos (Rahmatullah, et al., 2011) por ejemplo, los diterpenos abietanos aislados de las raíces de *Clerodendrum eriophyllum* tienen propiedades antimicrobianas y antiparasitaria (Machumi et al., 2010).

1.2 Género *Verbena*

De acuerdo a O'Leary y colaboradores (2007) comprende 44 especies y 10 variedades agrupadas en las series *Verbena* y *Pachystachyae*. La variedad *Verbena* está integrada por tres grupos: *Verbena*, *Hastae* y *Bracteosae*; la serie *Pachystachyae* está integrada por las subseries *Pachystachyae* y *Pseudoracemosae*. Otros autores contemplan cerca de 100 especies, casi todas americanas y unas cuantas europeas.

Las características botánicas de las plantas del género *Verbena* son las siguientes: herbáceas o subarborescentes; tallos más o menos manifiestamente tetraédricos, hojas por lo general opuestas, en ocasiones verticiladas o las superiores alternas; en cuanto a sus flores éstas se encuentran agrupadas en espigas (o con frecuencia en racimos espiciformes) bracteadas, por lo general estrechas y alargadas, a veces contraídas en cabezuelas, las espigas simples o dispuestas en inflorescencias más complejas, flores subsésiles o prácticamente sésiles; cáliz tubuloso, 5-dentado o someramente 5-lobado, subactinomorfo; corola hipocraterimorfa, morada, violácea o blanquecina, tubo recto o curvado, lóbulos 5, subiguales, a veces emarginados en el ápice, estambres 4, didínamos, inclusos; ovario bicarpelar, tetralocular, con un óvulo en cada lóculo, estilo terminal o subterminal, estigma bilobado, pero uno de los lobulos estéril; fruto esquizocárpico, de cuatro mericarpios subcilíndricos que se separan en la madurez.



1.3 *Verbena carolina* L.

Verbena carolina L. (familia Verbenaceae), es comúnmente conocida como verbena, ajeno grande, hierba de San José, hierba de San Juan, nardo de campo, Santa María, verbena del perro y wahíchuri (Tarahumara) (Argueta, et al., 1994). Es una hierba de 30 a 70 cm de altura, cuyos tallos a veces son ramificados y cubiertos de pelos tiesos. Las hojas son más largas que anchas, poco onduladas y con el borde escasamente con dientes. Las flores están en espigas delgadas rosa-morado, en la parte terminal de la planta (Imagen 1). Es una planta originaria de Arizona, México y Centro América, presente en climas cálido, semicálido, semiseco y templado desde el nivel del mar hasta los 3900 msnm (UNAM, B.D. 2009). Está ampliamente distribuida en el valle de México con excepción del noreste donde llega a ser esporádica.



Imagen 1. *Verbena carolina* L.

En los estados de Aguascalientes, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Puebla y Veracruz se recomienda en padecimientos de tipo digestivo como vómito, diarrea, “calor de estómago”, disentería, granos en la boca, además de emplearse como purgante, pero es la bilis la enfermedad para la que más se menciona. La manera más común para curarla es con la infusión de la verbena administrada en forma de té, donde todas las partes de la planta son utilizadas. Se elabora una decocción agregando hojas de



nogal, fresno, menta, salvia, canela, limón, Santa María, guácima, tepoza, romero y se toma por las mañanas (UNAM, B.D. 2009).

En uso externo la verbena suele emplearse en baños de asiento, es decir, de la cintura para abajo, un manojo de la planta se hierve y con ésta decocción se efectúa el tratamiento. Con el mismo preparado, pero en forma de lavados, se emplea para aliviar las punzadas de la cabeza, evitar la caída de pelo, caspa, orzuela, salpullido, golpes, infecciones de la piel y contra los piojos. Para curar los granos y heridas se hace una infusión con la raíz y con el líquido se lava diariamente la parte afectada.

Además, se usa en diversos padecimientos renales: inflamación de los riñones, para disolver piedras en la vejiga, como diurético y cuando se tiene dificultad al orinar. También cuando hay problemas hepáticos como “secreción del hígado” y para otras enfermedades como: el chincual, dolor de muelas, paludismo, tiricia, para calmar los nervios, en baños de niños, amigdalitis, sordera, gota, reumas y para bajar la calentura (UNAM, B.D. 2009).

En la Imagen 2 se muestra la distribución geográfica de *Verbena carolina* en el Bajío y zonas adyacentes.

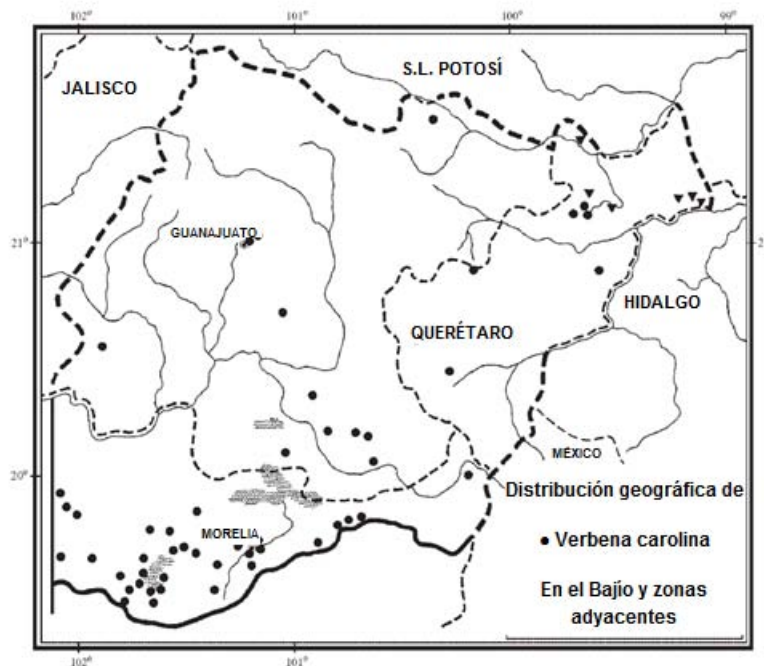


Imagen 2. Distribución geográfica de *Verbena carolina*.



1.4 Composición química

Se han identificado diversos tipos de compuestos biosintetizados por la planta *Verbena carolina* y se muestran algunos en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química de *Verbena carolina*.

Compuesto	Estructura	Porcentaje (%)
Ácido ursólico (Morales, 2009)		0.063
Verbenalina¹ (Morales, 2009)		1.629
Hastatósido² (Morales, 2009)		1.144
Hispidulina (Morales, 2009)		0.033
Verbascósido³ (Li, et al., 2001)		2.564
7-O-α-D-glucurónido de la pectinolaringenina (Bilia, et al., 2007)		1.787
7-O-β-D-glucurónido de la hispidulina⁴ (García, 2012)		1.60



1.5 Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), en ocasiones llamadas especies activas de oxígeno, son diferentes formas de oxígeno activado las cuales incluyen radicales libres como iones superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxilo (OH^{\cdot}) y especies que no son radicales libres tal como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Yildirim, et al., 2001). En altas concentraciones son mediadores importantes del daño a estructuras celulares, incluyendo lípidos, membranas, proteínas y ácidos nucleicos (denominando a este proceso como estrés oxidativo) (Poli, et al., 2004). Estas especies juegan un rol importante en los procesos degenerativos o patológicos como el envejecimiento, cáncer, enfermedades coronarias del corazón, Alzheimer, desórdenes neurodegenerativos, aterosclerosis e inflamaciones (Huang, et al., 2005).

De acuerdo a Cadenas (1989) las ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) como óxido nítrico (NO) y peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) pueden ser generadas de diferentes formas:

- Durante irradiación por luz UV (rayos solares), rayos-X (radiografías) y rayos gamma.
- Como productos de reacciones catalizadas con metales, como el caso del peróxido de hidrógeno en presencia de Fe^{2+} se rompe para formar especies reactivas de oxígeno con capacidad para dañar al ADN de forma directa o participar en las reacciones de peroxidación en cadena en los lípidos de membrana (Jonson, et al., 2001).
- Como contaminantes en la atmósfera, que es el caso del NO_2 (dióxido de nitrógeno) el cual es formado a altas temperaturas al quemar gas natural y leña (Gavidia, et al., 2009).
- Por neutrófilos y macrófagos durante la inflamación por ejemplo, la formación de oxígeno singulete es llevada a cabo por macrófagos, los cuales son células que forman parte del sistema inmunológico de los seres vivos y que son estimuladas cuando ya existe o hay posibilidad de daño a las células (como bien sería la colonización bacteriana) pues liberan enzimas tales como proteasas y ROS para combatir este daño (Eberhardt, 2001).
- Como sub-productos de las reacciones de transporte de electrones catalizadas por la mitocondria y otros mecanismos, ya que las mitocondrias consumen del 80 al 90% del oxígeno celular, el cual es reducido a agua para obtener energía en forma de ATP. Aunque la



respiración mitocondrial es altamente eficaz, aproximadamente un 2% del O_2 consumido es parcialmente reducido a $O_2^{\bullet-}$ y a H_2O_2 . Sin embargo, en determinadas circunstancias, como puede ser en el estrés metabólico, la mitocondria puede convertirse en fuente incontrolada de ROS, hecho que se ha asociado al envejecimiento y al desarrollo de diversas afecciones (Turrens, 1997).

Sin embargo, los seres vivos tienen un sistema de defensa antioxidante que los protege contra daño oxidativo eliminando o reparando a las moléculas dañadas (Sun, et al., 1998) por ejemplo, la citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial es responsable de más del 90% de la reducción del oxígeno en el organismo o la enzima llamada catalasa que se encarga de neutralizar el peróxido de hidrógeno (Left, et al, 1992).

En la Imagen 3 se muestra la generación de algunas de las ROS (Desideri, et al., 2003).

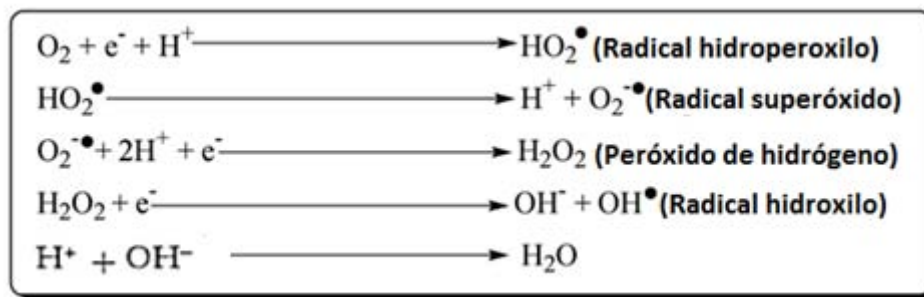
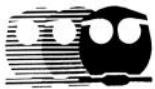


Imagen 3. Formación de ROS.



1.6 Antioxidantes

Un antioxidante es una sustancia capaz de prevenir o retrasar la oxidación de otras moléculas (Cadenas, 1989). Hay dos categorías básicas de antioxidantes: naturales y sintéticos, por lo que recientemente, la búsqueda de antioxidantes de origen natural ha aumentado con la finalidad de reemplazar a los antioxidantes sintéticos. Sin embargo, el cuerpo humano utiliza un sistema de defensa antioxidante para neutralizar los excesivos niveles de ROS. Este sistema consiste en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, como se muestra en la Imagen 4 (Shalaby & Shanab, 2013).

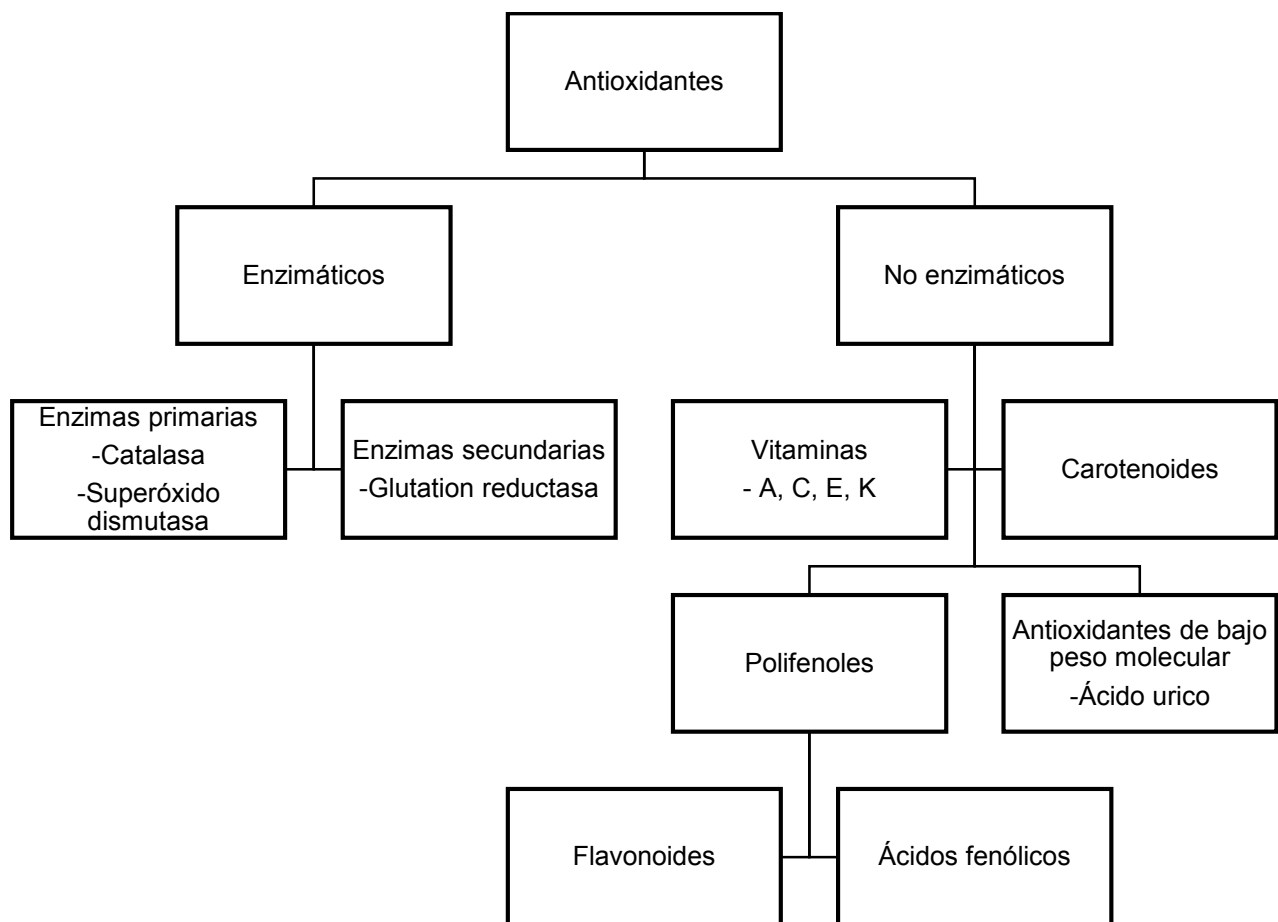


Imagen 4. Clasificación de antioxidantes.



1.7 Contenido de fenoles

Los compuestos fenólicos constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras y propiedades químicas, así como actividad biológica. Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidróxilos.

La actividad antioxidante de compuestos fenólicos es debida principalmente a sus propiedades redox, las cuales pueden jugar un rol importante en la neutralización de radicales libres (Osawa, et al., 1994).

Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales son el ensayo de la vainillina y el de Folin-Ciocalteu.

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la propiedad de los fenoles de reaccionar frente a agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico que al reaccionar con los compuestos fenólicos presentes, forman complejos fosfomolibdico - fosfotúngstico. En medio básico la transferencia de electrones reduce estos complejos a óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), cromógenos de color azul intenso, siendo proporcional este color a la cantidad de grupos fenólicos presentes en la molécula de interés. La lectura de la absorbancia del complejo se realiza a 760 nm (Gutiérrez, et al., 2008).

1.8 Ensayos para detectar actividad antioxidante

La medición de la capacidad antioxidante de diferentes productos naturales es una cuestión de creciente interés, ya que puede proporcionar una variedad de información, tal como la resistencia a la oxidación, la contribución cuantitativa de sustancias antioxidantes, o la actividad antioxidante que se puede presentar dentro del organismo cuando éstos se ingieren (Huang et al., 2005).

Numerosos estudios *in vitro* se han realizado para evaluar la capacidad antioxidante total (TAC) de productos naturales. Hasta ahora, sin embargo, no existe un método estandarizado oficial, y por lo tanto se recomienda que cada evaluación deba hacerse con varias condiciones de oxidación y diferentes métodos de medición (Frankel & Meyer, 2000).



En años recientes un amplio rango de ensayos espectrofotométricos han sido adoptados para medir la capacidad antioxidante, dentro de los más populares se encuentran ABTS y DPPH que ofrecen la primera aproximación para evaluar el potencial antioxidante de un compuesto, un extracto u otras muestras biológicas (Sagar & Singh, 2011).

Al tener una noción preliminar (realizando ensayos más sencillos como los mencionados anteriormente) de que el extracto o compuesto posee actividad antioxidante se llevan a cabo ensayos que miden ROS y RNS como capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC), ensayo de atrapamiento de radicales OH^\bullet y peroxinitrito, con la finalidad de abarcar el mayor número de especies reactivas que nos muestren un perfil antioxidante (Brand, et al., 1995).

La mayoría de los ensayos emplean el mismo principio: un radical sintético colorido o un compuesto redox activo que es generado y la habilidad de una muestra biológica para captar el radical o para reducir al compuesto redox activo el cual es monitoreado por espectrofotometría además de comparar con un estándar apropiado para cuantificar la capacidad antioxidante, por ejemplo, el ensayo de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) o capacidad antioxidante equivalente a vitamina C (VCEAC). Hay dos tipos de ensayos: uno se basa en la transferencia de electrones e involucra la reducción de un oxidante colorido, como en los ensayos de ABTS, DPPH y FRAP; el otro se enfoca en la transferencia de un átomo de hidrógeno tal como el ensayo de ORAC, en el que los antioxidantes y el sustrato compiten por radicales peroxilo generados térmicamente (Dudonné, et al., 2009).



1.8.1 Ensayo de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH·)

El método de neutralización del radical libre DPPH ofrece la primera aproximación para evaluar el potencial antioxidante de un compuesto, un extracto u otras muestras biológicas (Sagar & Singh, 2011).

Es un método rápido, simple y ampliamente utilizado para medir la habilidad que presentan los compuestos para actuar como atrapadores de radicales libres o donadores de hidrógeno (Prakash, 2001). El electrón del átomo de nitrógeno en la molécula de DPPH es reducido al recibir un átomo de hidrógeno de la especie antioxidante y da lugar a la correspondiente hidrazina (Contreras & Srong, 1982). El DPPH es caracterizado como un radical libre estable violeta con absorción en una solución de metanol alrededor de 520 nm. Al mezclar la solución de DPPH con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, el radical pasa a su forma reducida y hay una pérdida de la coloración violeta (Imagen 5) (Blois, 1958).

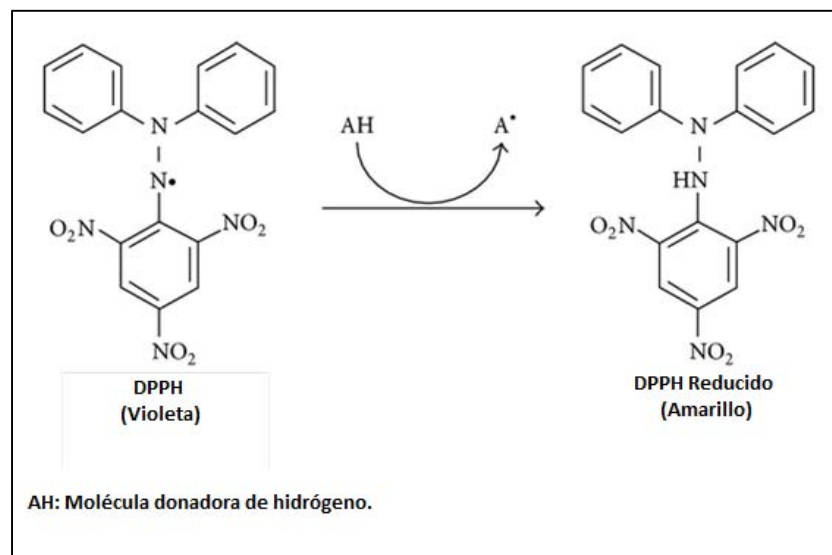


Imagen 5. Reacción del radical estable DPPH con un compuesto antioxidante.



1.8.2 Ensayo de neutralización del catión radical ácido 2,2'- azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS^{•+})

Este ensayo mide la capacidad de las especies antioxidantes para atrapar al catión radical ABTS el cual es generado en fase acuosa por medio de la oxidación de la sal de ABTS con persulfato de potasio. La actividad antioxidante de los productos naturales y compuestos es monitoreada a través de la desaparición del color azul-verde de la solución de ABTS a una longitud de onda $\lambda = 734$ nm la cual se debe a la reducción del ABTS por medio de la donación de un hidrógeno proveniente de una especie antioxidante (Imagen 6) (Miller & Rice-Evans, 1998).

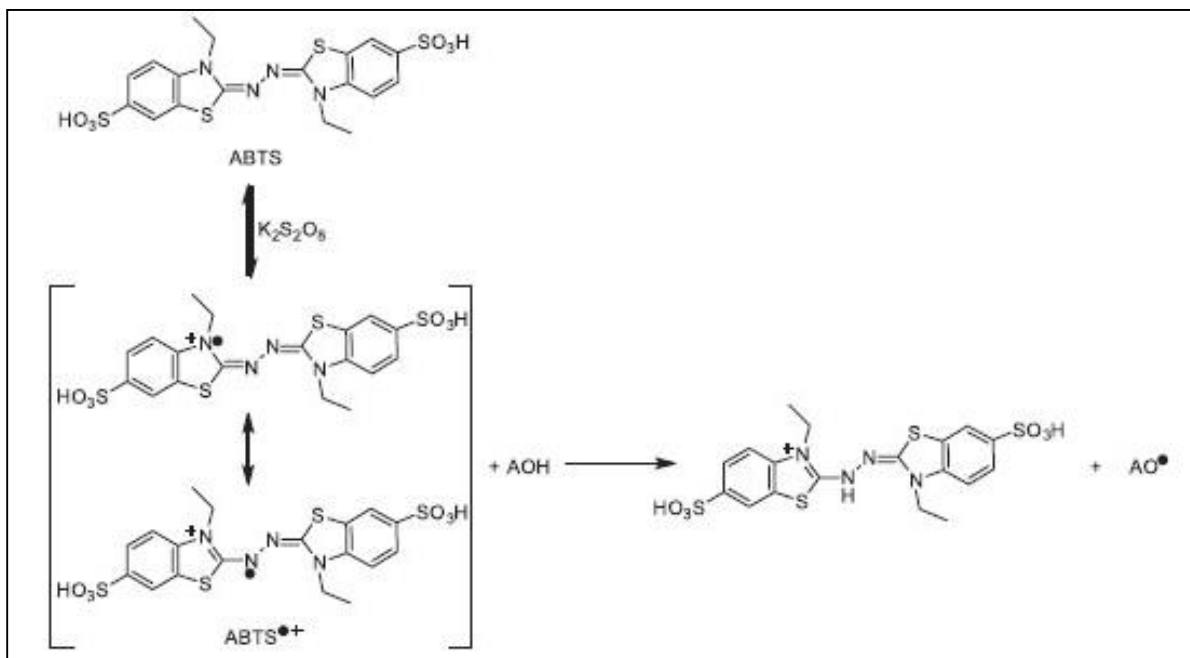


Imagen 6. Generación del catión radical ABTS^{•+} con persulfato de potasio y su reacción con compuestos antioxidantes.



1.8.3 Ensayo poder antioxidante/reductor de Fe^{3+} (FRAP)

Es un método colorimétrico que describe el poder antioxidante/reductor férrico. Esta reacción se lleva a bajo pH cuando el complejo tripiridiltriazina-férrico (Fe^{3+} -TPTZ) es reducido a la forma ferrosa (Fe^{2+}) el cual presenta un intenso color azul con absorción máxima a 593 nm. La reacción no es específica por lo que cualquier reacción intermediaria que presente un potencial redox y bajo las condiciones mencionadas anteriormente puede reducir al Fe^{3+} . Este ensayo mide directamente la capacidad reductora de una sustancia el cual es un parámetro para que un compuesto sea un buen antioxidante (Imagen 7) (Benzie & Strain, 1996).

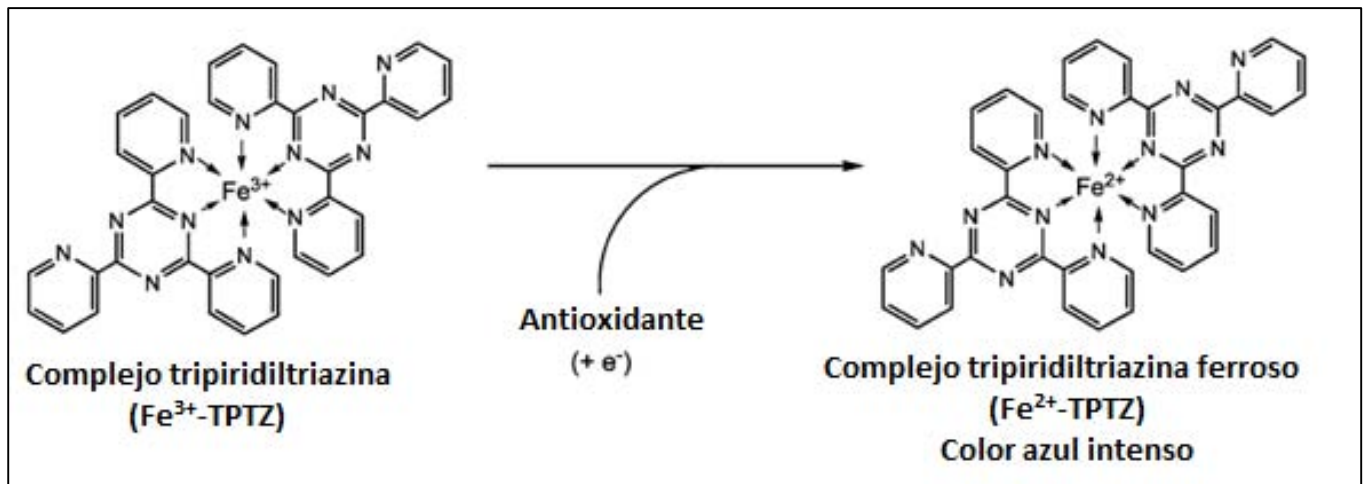


Imagen 7. Formación del complejo (Fe^{2+} -TPTZ) a partir de (Fe^{3+} -TPTZ) debido a un antioxidante.



1.8.4 Ensayo de capacidad antioxidante de radicales oxígeno (ORAC)

El método de ORAC consiste en medir el decremento en la fluorescencia de una molécula como resultado de la pérdida de su conformación al sufrir daño oxidativo el cual es causado por radicales peroxilo (ROO^\bullet) generados por descomposición térmica del reactivo dihidroclorhidrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) (Imagen 8) el cual es frecuentemente utilizado en investigaciones bioquímicas para el estudio de la peroxidación de lípidos. Los compuestos azo son utilizados exitosamente como iniciadores de radicales; alquilo, alcoxilo y alquilperoxilo y que se forman por su termólisis sin embargo, el mecanismo de descomposición no es completamente entendido. La mayoría de los estudios asume la formación de radicales peroxilo como la principal especie reactiva (Betigeri, et al., 2005). El ensayo mide la habilidad de los antioxidantes presentes en la muestra para proteger a la molécula (fluoresceína) del daño oxidativo (Cao, et al., 1993).

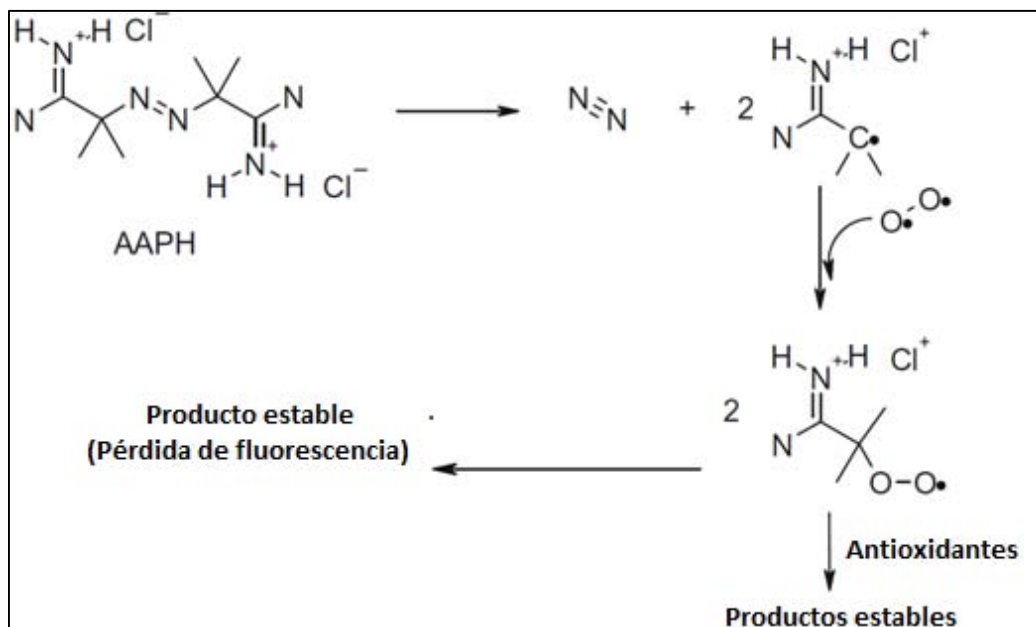


Imagen 8. Reacción de ORAC.



1.8.5 Ensayo de capacidad atrapadora de superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

El ensayo de capacidad atrapadora de superóxido se basa en la habilidad para inhibir la reducción de NBT en presencia de un sistema de generación de superóxido que involucra PMS y NADH como se muestra a continuación en la Imagen 9.

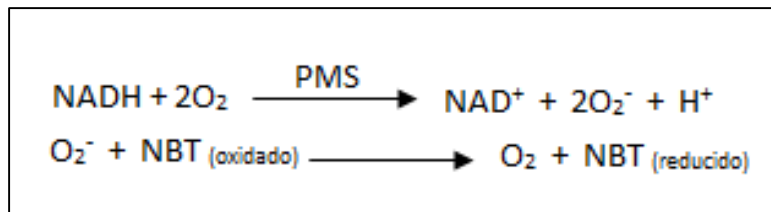


Imagen 9. Ensayo de superóxido.

La PMS oxida al NADH y subsecuentemente reduce al O_2 a la forma $O_2^{\cdot-}$ que a su vez reduce al NBT a un producto colorido (azul debido al formazán) el cual es cuantificado espectrofotométricamente a 560 nm (Vinson & Hontz, 1995). La reacción se muestra en la Imagen 10.

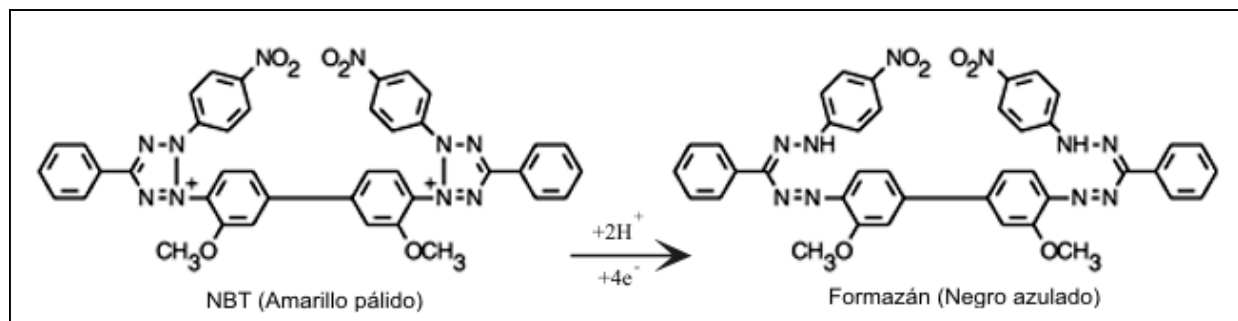


Imagen 10. Reacción de NBT.



1.8.6 Ensayo de capacidad atrapadora de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La N-acetil-3,7-dihidroxi-2-fenoxazina (Amplex Red) es una molécula no fluorescente que cuando es oxidada por H₂O₂ en presencia de HRP origina resorufina, un producto altamente fluorescente. Las ventajas de Amplex Red es que es estable y su producto oxidado presenta alta fluorescencia lo que resulta en un incremento de la sensibilidad para detectar H₂O₂ (Imagen 11). Sin embargo, la resorufina por sí misma es sustrato de HRP, además de que se oxida a resazurina (no fluorescente) y otros productos oxidados lo cual puede resultar en una pérdida de la intensidad de la fluorescencia (Mohanty, et al., 1997).

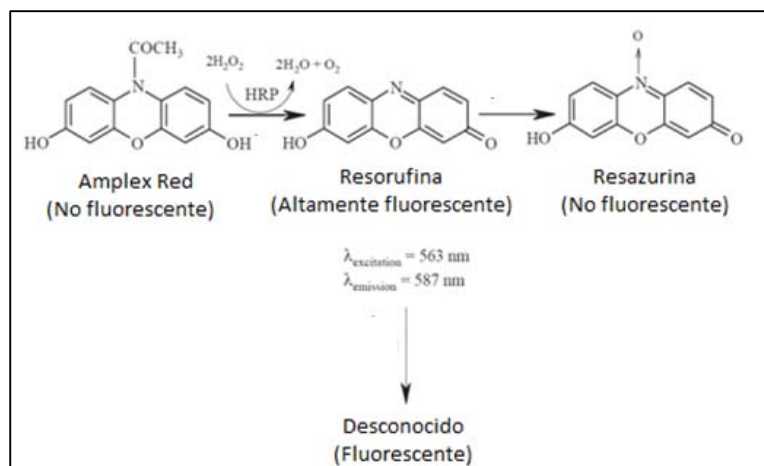


Imagen 11. Reacción del ensayo de peróxido de hidrógeno.

1.8.7 Ensayo de capacidad atrapadora de radical hidroxilo (OH•)

Entre las maneras de generar radicales hidroxilo se encuentran reacciones de tipo Fenton que utilizan para tal fin peróxido de hidrógeno y sales ferrosas (Tamimi, et al., 2008).

El tereftalato de sodio es un compuesto no fluorescente que reacciona con radicales hidroxilo y origina un producto hidroxilado aromático, 2-hidroxitereftalato de sodio, el cual presenta una fuerte fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} \approx 310 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} \approx 430 \text{ nm}$) y se muestra en la Imagen 12 (Tang, et al., 2005).

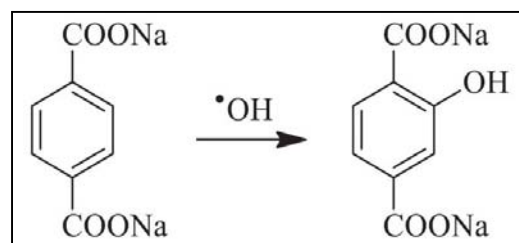


Imagen 12. Reacción de tereftalato de sodio en presencia de radical hidroxilo.



1.8.8 Ensayo de atrapamiento de oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$)

El oxígeno singulete es una forma reactiva de oxígeno. El principal método de la producción de $^1\text{O}_2$ es por reacciones fotosensibles. Esta forma de oxígeno puede reaccionar con diferentes tipos de moléculas biológicas como ADN, proteínas y lípidos (Briviba, et al., 1997).

El 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) es una molécula que bajo ciertas condiciones presenta fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 410 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 455 \text{ o } 477 \text{ nm}$). En 1999 fue demostrado por Ohyashikiy cols. (1999) el posible uso del DPBF en la detección de oxígeno singulete como se muestra en la Imagen 13.

En este ensayo el DPBF primero reacciona con oxígeno singulete para formar un trioxalano intermediario el cual es subsecuentemente hidrolizado en su correspondiente dicetona (Chung, et al., 2014).

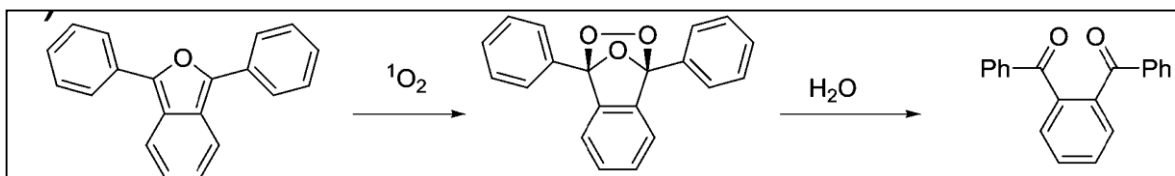


Imagen 13. Reacción de DPBF para detectar oxígeno singulete.

1.8.9 Ensayo de atrapamiento de ácido hipocloroso (HClO)

Los neutrófilos son células altamente especializadas que al ser estimuladas producen especies oxidantes reactivas que causan daño al tejido durante la inflamación. Estas células estimuladas producen superóxido (O_2^-) el cual es catalizado por la superóxido dismutasa a la forma de H_2O_2 que posteriormente es convertido a ácido hipocloroso por la acción de una enzima llamada mieloperoxidasa (Weiss, et al., 1983). Lo anterior se puede resumir en la reacción indicada en la Imagen 14.

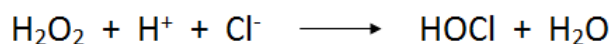


Imagen 14. Producción de ácido hipocloroso.

Este ensayo monitorea el decaimiento de la fluorescencia a lo largo del tiempo (lo cual es debido a la reacción de oxidación del ácido *p*-amino benzoico) la cual es retrasada o inhibida por la acción de antioxidantes (Magalhães, et al., 2008).



1.8.10 Ensayo de atrapamiento de peroxinitrito (ONOO^-)

El óxido nítrico (NO) se forma *in vivo* por la oxidación enzimática de L-arginina y es un mediador importante de diversos procesos bioquímicos y fisiológicos, mientras que bajo condiciones patológicas posee numerosos efectos tóxicos. La toxicidad del NO puede atribuirse en parte a la formación de peroxinitrito (ONOO^-) el cual es rápidamente formado por la combinación de NO y superóxido. El anión ONOO^- una vez protonado bajo condiciones fisiológicas forma ácido nítrico (HNO_3) el cual puede producir radicales hidroxilo, lo que resulta en un daño al tejido (Freeman, 1994).

El diacetato de 2,7- diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) ha sido usado para detectar diversas ROS y RNS, puede ser aplicado en estudios celulares debido a su habilidad para difundir a través de la membrana celular para después ser hidrolizado por esterasas intracelulares a la forma DCFH el cual es posteriormente oxidado por especies reactivas y origina 2,7-diclorofluoresceína (DCF), un compuesto fluorescente ($\lambda_{\text{excitación}} = 498 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 522 \text{ nm}$). Como se ilustra en la Imagen 15.

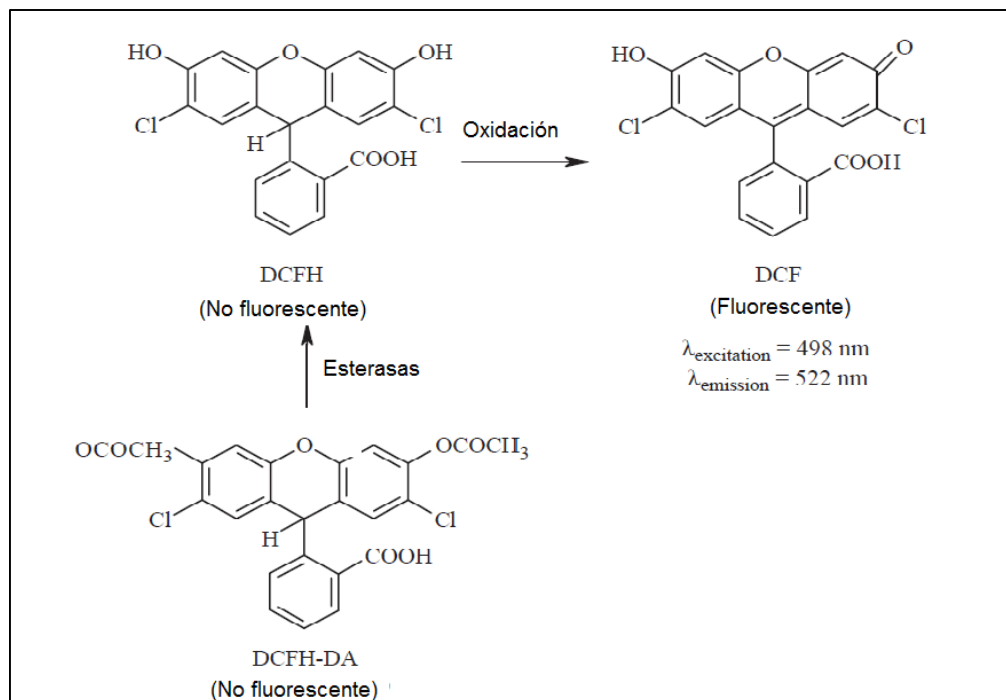


Imagen 15. Reacción de oxidación de DCFH por ONOO^- .



2. JUSTIFICACIÓN

Las plantas se han utilizado en diversos campos incluyendo la obtención de medicamentos, productos nutritivos, repelentes, perfumes y para otros propósitos industriales. También han sido la base para la terapia medicinal por cientos de años hasta que se desarrollaron los fármacos sintéticos en el siglo XIX (Dahanukar, et al., 2000). Diversas plantas y especias provenientes de ellas han sido utilizadas por cientos de años para conservar los alimentos lo cual es indicativo de la presencia de constituyentes antioxidantes y antimicrobianos en sus tejidos (Hirasa & Takemasa, 1998). Recientemente, el interés ha aumentado considerablemente en la búsqueda de antioxidantes de origen natural para su uso en alimentos o materiales medicinales con la finalidad de reemplazar a los antioxidantes sintéticos, los cuales están siendo limitados debido a su carcinogenicidad (Velioglu, et al., 1998).

Los polifenoles contenidos en las plantas medicinales actúan como antioxidantes, y juegan un papel importante en la neutralización de radicales libres estabilizando oxígeno singulete y triplete o descomponiendo peróxidos. Esto último es de importancia en la inhibición de la peroxidación de lípidos, varios de estos fitoquímicos poseen una capacidad antioxidante importante que se asocia con una menor incidencia y tasa de mortalidad de varias enfermedades humanas (Anderson, et al., 2001).

Por lo anterior, la investigación para identificar compuestos antioxidantes contenidos en plantas y la evaluación de sus actividades biológicas es de gran relevancia (Djeridane, A., 2004).

Verbena carolina L. como planta medicinal común de México, es utilizada en forma de infusión (toda las partes de la planta) para el tratamiento de diarrea y el dolor de estómago, la irritación del hígado, dolor de vesícula y en enfermedades renales. También suele emplearse en uso externo hirviendo un manojo de la planta y con la decocción se trata la parte afectada y en forma de lavados como cicatrizante de granos y heridas, como abortivo y contra la caspa, alergias y dermatitis.

Dentro de su composición química se han detectado entre otros, compuestos de tipo fenólico, por lo que se decidió llevar a cabo el análisis del perfil antioxidante de esta planta, comenzando con la cuantificación de fenoles totales a través del método de Folin-Ciocalteu y posteriormente realizando diferentes ensayos de actividad antioxidante *in vitro*.



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Dado el contenido químico de *Verbena carolina* integrado principalmente por compuestos fenólicos y de tipo terpenoide se pretende determinar el potencial antioxidante de sus extractos acuoso y de metanol, así como de algunos de sus metabolitos mayoritarios (verbascósido, 7-O- β -glucurónido de la hispidulina (7O β GH), hastatósido y verbenalina) por medio de diferentes pruebas.

3.2. Objetivos particulares

- Determinar el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu y mediante el uso de la fórmula farmacopéica.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos acuoso y de metanol así como de algunos de los metabolitos aislados de *Verbena carolina* mediante los ensayos de DPPH, ABTS, FRAP, ORAC, O₂⁻, H₂O₂, OH[•], ¹O₂, HClO y ONOO⁻.



4. MATERIAL

4.1 Material vegetal y compuestos aislados

El material vegetal empleado en el estudio consistió de la planta completa sin raíz de *Verbena carolina* L. obtenida en el Mercado de Sonora en 2012. Este material se comparó visualmente con una muestra de herbario del Instituto Nacional de Antropología e Historia de Morelos (INAHM-2018).

La planta se sometió al proceso de secado a la sombra y a temperatura ambiente; posteriormente se fragmentó con la ayuda de tijeras. Este material fue posteriormente empleado para la preparación de los extractos (5.1).

Los compuestos evaluados en este trabajo fueron obtenidos con anterioridad en el laboratorio 111 del Departamento de Farmacia en el Conjunto E, Facultad de Química y fueron los siguientes: verbenalina (1), hastatósido (2), verbascósido (3) y 7-O- β -glucurónido de la hispidulina (4). Su pureza se comprobó por medio de cromatografía en capa fina, salvo el hastatósido que fue purificado por cromatografía en columna abierta de gel de sílice (AcOEt).

4.2 Disolventes y reactivos

Disolventes

- Metanol R.A.
- Agua destilada
- Etanol

Reactivos

- Ácido 4-aminobenzoico
- Ácido ascórbico
- Ácido clorhídrico
- Ácido dietiltri Aminopentaacético (DTPA)
- Ácido etildiaminotetraacético (EDTA)
- Ácido gálico
- Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico (HEPES)



- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox)
- Ácido sulfúrico
- N-Acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazina (Amplex Red)
- 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfúrico) (ABTS)
- Dihidroclorhidrato de 2,2'-Azobis(2-amidinopropano) (AAPH)
- Carbonato de sodio
- Cloruro de hierro hexahidratado
- Cloruro de azul nitro tetrazolio (NBT)
- 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF)
- Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA)
- 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)
- Dimetilsulfóxido
- Fluoresceína
- Hidróxido de sodio
- Hipoclorito de sodio
- Metosulfato de fenazina (PMS)
- Nicotinamida adenina dinucleótido (NADH)
- Peroxidasa del rábano (HPR)
- Peróxido de hidrógeno
- Peroxinitrito
- Persulfato de potasio
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sodio
- Sulfato de amonio
- Tereftalato de sodio
- 2,4,6-Tripiridil-s-Triazina
- Solución amortiguadora de pH de fosfatos (75 mM y pH= 7.4)
- Solución amortiguadora de pH de fosfatos (50 mM y pH= 7.4)
- Solución amortiguadora de pH de acetatos (300 mM y pH= 3.6)



4.3 Equipo

Para la obtención del extracto de metanol se utilizó un sonicador marca Sonicor modelo SC-200TH (EUA).

Para concentrar al vacío los extractos obtenidos se utilizó un rotaevaporador marca BUCHI modelo B-480 (Suiza).

El peso de cada uno de los reactivos se registró en una balanza analítica marca OHAUS modelo Pioneer™ Analítica (EUA).

La lectura de las absorbancias para la cuantificación de fenoles totales y los ensayos de neutralización del radical libre DPPH·, neutralización del catión radical ABTS·⁺ y FRAP se realizó en un lector de placas de ELISA Epoch marca BioTek con el software Gen5 Data Analysis (EUA).

En cuanto a los ensayos de atrapamiento de los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peroxinitrito ($ONOO^-$), oxígeno singulete (1O_2), ácido hipocloroso (HClO), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroxilo ($OH\cdot$) y ORAC se utilizó un espectrofluorímetro Synergy HT de la marca BioTek (EUA).



5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1 Obtención de los extractos provenientes de *Verbena carolina*

5.1.1 Extracto acuoso

Se obtuvo por decocción, para lo cual se pesaron 50 g del material vegetal y se colocaron en un vaso de precipitados con 800 mL de agua destilada y se sometió a ebullición (5 min). La mezcla anterior se dejó reposar aproximadamente 30 min, se filtró la fase acuosa a un matraz bola de 1 L y se llevó a sequedad a presión reducida con ayuda de un rotaevaporador.

5.1.2 Extracto de metanol

20 g de *Verbena carolina* se colocaron en un matraz Erlenmeyer con aproximadamente 250 mL de MeOH destilado y la mezcla se sometió a sonicación durante 20 min, este procedimiento se realizó por triplicado. Se separó el extracto del material vegetal por medio de filtración, se llevó a sequedad a presión reducida haciendo uso de un rotaevaporador.

5.2 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu y fórmula farmacopéica (FHEUM, 2013)

Las soluciones de los extractos (de metanol y acuoso) a probar se prepararon a una concentración de 1 mg/mL en agua destilada. En caso de que a esa concentración los valores de absorbancia fueran demasiado altos y salieran del rango de absorbancia de la curva de calibración se procedería a realizar una dilución.

Para llevar a cabo este método descrito por Singlenton, et al. (1965), se utilizó una placa de 96 pozos y en cada uno de ellos se adicionaron: 160 μ L de agua destilada, 20 μ L de muestra (extracto o ácido gálico, según corresponda) y 20 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu 2N en agua destilada (1:1). La mezcla se homogeneizó para después dejar en reposo durante ocho minutos en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo se agregaron 10 μ L de una solución de Na_2CO_3 al 20% en todos los pozos al mismo tiempo. Con movimientos suaves y circulares se homogeneizó la placa y se dejó reaccionar en ausencia de luz durante una hora. Posteriormente se leyeron las absorbancias a 760 nm en un lector para placas de ELISA.



Siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado se realizó una curva de calibración de ácido gálico a diferentes concentraciones (1-500) µg/mL utilizando la mínima cantidad de metanol para disolver el ácido gálico y completando el aforo con agua destilada, estas soluciones se sustituyeron por la muestra dentro del protocolo.

Se hizo uso de la fórmula farmacopéica (que se muestra a continuación) para evaluar la cantidad de fenoles totales de una manera más “rápida” en comparación con el método de interpolación en una curva de calibración de ácido gálico.

$$CD \left(\frac{A_m}{A_{ref}} \right)$$

Donde:

C = Concentración

D = Factor de dilución de la muestra

A m = Absorbancia de la muestra

A ref = Absorbancia de la referencia

Se prepararon dos soluciones, una del extracto (de metanol o acuoso) y otra de referencia (ácido gálico). Se esperaba que al medir la absorbancia de ambas soluciones después de realizar el procedimiento experimental correspondiente al método de Folin-Ciocalteu ésta se encontrara cerca del centro de la curva de calibración obtenida. Lo anterior se llevó a cabo con la finalidad de que al dividir el valor de absorbancia de la muestra entre el valor de la referencia el resultado sea aproximado a la unidad.

Se observó que las concentraciones más convenientes fueron de 1 mg/mL para el extracto y de 115 µg/mL para la referencia de ácido gálico.

5.3 Ensayos de actividad antioxidante

5.3.1 Ensayo de neutralización del radical libre DPPH[•]

Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Cheng y cols. (2006) con ciertas modificaciones. Se adicionaron en cada uno de los 96 pozos de una placa de ELISA y por triplicado 100 µL de los extractos acuoso o de metanol a diferentes concentraciones (0.3, 0.15, 0.075, 0.038, 0.02 y 0.01 mg/mL) y 100 µL de una solución en MeOH de DPPH[•] (0.208 mM). Posteriormente se homogeneizó la mezcla y se mantuvo en reposo a temperatura



ambiente y en oscuridad durante 20 minutos para después proceder a obtener los valores de absorbancia en un lector de placas de ELISA a 515 nm.

Se obtuvo una curva de calibración con soluciones de Trolox a diferentes concentraciones (1.5-100 μM) que se sustituyeron por el extracto en el procedimiento mencionado anteriormente. La respuesta obtenida para cada concentración de los extractos se interpoló en la gráfica, expresando los resultados en μmoles equivalentes de Trolox ($\mu\text{M}_{\text{TROLOX}}$).

La capacidad de *V. carolina* para neutralizar al radical DPPH \cdot se comparó con la del ácido ascórbico por lo que también se probaron soluciones de este compuesto a concentraciones de 0.03, 0.025, 0.020, 0.015, 0.012, 0.0096, 0.0057, 0.0035 mg/mL. Los valores obtenidos se expresaron como porcentaje de DPPH neutralizado que se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ DPPH neutralizado} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \times 100$$

Se construyó una gráfica de porcentaje de DPPH neutralizado vs concentración de muestra (mg/mL) y a partir de ésta se obtuvieron las CI_{50} correspondientes para cada muestra.

5.3.2 Ensayo de neutralización del catión ABTS $^{+\cdot}$

Se realizó el ensayo descrito por Leong et al. (2002) con algunas modificaciones de la siguiente manera. El radical ABTS $^{+\cdot}$ se generó por la incubación de ABTS (7 mM) con K_2SO_4 (2.5 mM) en oscuridad a temperatura ambiente entre 12-16 horas. La solución ABTS $^{+\cdot}$ se diluyó con metanol a una absorbancia aproximada de 0.70 a $\lambda = 734$ nm. Posteriormente en una placa de ELISA de 96 pozos se adicionaron en cada uno de ellos 180 μL de la solución anterior y 20 μL del extracto (acuoso o de metanol) a diferentes concentraciones (0.6, 0.4, 0.3, 0.15, 0.075, 0.0375, 0.02 y 0.01 mg/mL). Se homogeneizó la mezcla y se dejó en reposo durante 6 minutos en ausencia de luz. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a leer la absorbancia a $\lambda = 734$ nm en un lector de placas de ELISA.

Simultáneamente se obtuvo una curva patrón con soluciones a diferentes concentraciones de Trolox (en un rango de 1.5-500 μM) las cuales fueron reemplazadas por los extractos dentro del procedimiento experimental anteriormente descrito. Los valores de absorbancia obtenidos



para cada una de las soluciones de los extractos fueron interpolados en la curva obteniendo así μmoles equivalentes de Trolox ($\mu\text{M}_{\text{TROLOX}}$).

La actividad antioxidante de los extractos se comparó contra el ácido ascórbico por lo que se llevó a cabo el procedimiento descrito a las concentraciones de 0.075, 0.050, 0.038, 0.030, 0.019, 0.012, 0.009 y 0.005. Se obtuvieron las Cl_{50} de la gráfica que relaciona el porcentaje de ABTS neutralizado vs concentración (mg/mL).

$$\%ABTS \text{ neutralizado} = \frac{Abs \text{ control} - Abs \text{ muestra}}{Abs \text{ control}} \times 100$$

5.3.3 Ensayo FRAP (poder antioxidante/reductor de Fe^{3+})

Este ensayo se realizó con base en lo descrito en la literatura (Benzie & Strain, 1996) con algunas modificaciones. El reactivo de FRAP se preparó justo antes de llevar a cabo el análisis mezclando 25 mL de solución amortiguadora de acetatos (300 mM y pH = 3.6), 2.5 mL de TPTZ (10 mM) en HCl (40 mM) y 2.5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM). En cada uno de los pozos de una placa de Elisa se adicionaron 180 μL del reactivo de FRAP y 20 μL del extracto (acuoso o de MeOH) a diferentes concentraciones (1.0, 0.5, 0.2, 0.04 y 0.01 mg/mL). La reacción se dejó en reposo durante 30 min y en condiciones de oscuridad. Posteriormente se midió la respuesta en un lector de placas de ELISA a 595 nm. Se utilizó como compuesto de referencia quercetina.

Para este ensayo se realizaron dos curvas de calibración una con Trolox (3-400 μM) y otra con ácido ascórbico (3-370 μM) siguiendo el protocolo antes descrito y reemplazando estas soluciones por cada extracto. Los resultados se obtuvieron interpolando las absorbancias de las muestras en las curvas de calibración y se expresan en μmoles equivalentes de Trolox ($\mu\text{M}_{\text{TROLOX}}$) y μmoles equivalentes de ácido ascórbico ($\mu\text{M}_{\text{ác. ascórbico}}$).

5.3.4 Ensayo de ORAC

Para este ensayo se hizo uso de una placa de 96 pozos para fluorescencia y se adicionaron en cada pocillo 25 μL de la muestra (extracto o compuesto) a diferentes concentraciones (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, 0.0078, 0.004 y 0.002 mg/mL en agua destilada), 25 μL de AAPH (153 mM) y 150 μL fluoresceína (0.05 μM). Cabe mencionar que



las soluciones de AAPH y fluoresceína se diluyeron con solución amortiguadora de fosfatos 75 mM y pH = 7.4. Posteriormente las lecturas se realizaron a λ de excitación de 460 nm y λ de emisión de 516 nm durante 90 min cada minuto en un espectrofluorímetro.

Simultáneamente se obtuvo una curva de calibración de Trolox (0.0, 0.5, 1.0, 2.5, 5, 7.5 y 10 μ M) siguiendo el mismo procedimiento y en la cual se interpolaron las respuestas obtenidas de cada una de las muestras. Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox por mg de muestra.

5.3.5 Ensayo de superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

Para este ensayo se colocaron en cada uno de los pozos de una placa de ELISA 3.2 μ L de DMSO, 16 μ L de PMS (0.1 mM), 16 μ L de NBT (1 mM), 32 μ L de la muestra (extracto o compuesto aislado) en un rango de concentraciones de (1- 0.0625 mg/mL), 250 μ L de HEPES (200 mM y pH = 7.2) y NADH (2.5 mM). La solución de HEPES se preparó adicionando el sólido en agua destilada y haciendo uso de ésta se prepararon el resto de las soluciones mencionadas. Se procedió a leer en un espectrofotómetro a 560 nm. Para este ensayo se utilizó Tirón como estándar (1000, 750, 500, 250, 125 y 50 mM).

5.3.6 Ensayo de capacidad atrapadora de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Se preparó una mezcla de reacción con Amplex Red (0.1 mM), HRP (0.2 U/mL) en solución amortiguadora de fosfatos (75 mM y pH = 7.4). En una placa para fluorescencia de 96 pozos se adicionaron en cada uno de ellos 25 μ L de muestra (extracto o compuesto) a las concentraciones de 5, 4, 3, 2, 1 y 0.5 mg/mL en agua y 25 μ L de H_2O_2 (200 μ M). Se dejó incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Una vez transcurrido el tiempo se agregaron 50 μ L de la mezcla de reacción. Una vez más se dejó incubar durante 30 minutos en las mismas condiciones. Posteriormente se tomó la lectura al punto final de la reacción a λ de excitación de 530 nm y λ de emisión de 590 nm en un espectrofluorímetro. Los resultados obtenidos se compararon con un estándar de piruvato de sodio a 0.0, 0.15, 0.20, 0.25 y 0.30 mg/mL en agua.

5.3.7 Ensayo de capacidad atrapadora de radical hidroxilo (OH^{\cdot})

Se preparó inicialmente una mezcla de reacción con ácido ascórbico (1 mM), $FeCl_3$ / EDTA (1 mM / 1mM) y tereftalato de sodio (7 mM) en la proporción (1:1:1). Para llevar a cabo el ensayo se hizo uso de una placa para fluorescencia de 96 pozos y se adicionaron en cada



uno 22.2 μL de la muestra (a concentraciones dentro de un rango de 5-0.5 mg/mL en agua), 200 μL de la mezcla de reacción y 20 μL de H_2O_2 (10 mM). Las soluciones para este ensayo se prepararon en solución amortiguadora de fosfatos (50 mM y pH = 7.4). Se leyeron las respuestas durante 30 min cada 2 minutos a λ de excitación de 320 nm y λ de emisión de 420 nm. Los resultados fueron comparados con los de dimetiltiourea (50, 10, 5 y 2.5 mM).

5.3.8 Ensayo de atrapamiento de oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$)

Se adicionaron en cada uno de los 96 pozos de una placa para fluorescencia 25 μL de la muestra (extracto o compuesto) a concentraciones de 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.3125 mg/mL en agua, 25 μL de H_2O_2 (10 mM), 25 μL de NaOCl (300 μM) y 25 μL de DPBF (10 μM). Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se adicionaron 150 μL de EtOH y se leyó la fluorescencia a λ de excitación de 410 nm y λ de emisión de 455 nm en un espectrofluorímetro durante 10 minutos cada minuto. Se utilizó ácido lipoico como compuesto de referencia (200, 100, 50 y 25 mM en etanol).

Para preparar las soluciones de H_2O_2 y NaOCl a esas concentraciones se partió de H_2O_2 al 30% y NaOCl al 5% y se diluyeron en H_2O destilada. Mientras que para el DPBF se utilizó etanol como vehículo.

5.3.9 Ensayo de atrapamiento de ácido hipocloroso (HClO)

En una placa de 96 pozos se adicionaron en cada uno de ellos y en el siguiente orden 25 μL de muestra (5 - 0.5 mg/mL en agua), 25 μL de HClO (0.5 mM), 25 μL de ácido aminobenzoico (3 mM) y 150 μL de solución amortiguadora de fosfatos (75 mM y pH = 7.4). Se leyó a λ de excitación de 280 nm y λ de emisión de 340 nm en un espectrofluorímetro durante 15 min en intervalos de 3 min, utilizando ácido ascórbico como estándar en un rango de concentraciones de 0.0017 – 0.00017 mg/mL en agua destilada.

La solución de ácido aminobenzoico se obtuvo utilizando una solución reguladora de pH de fosfatos (75 mM y pH = 7.4) mientras que la solución de HClO se preparó mezclando NaOCl y solución reguladora de fosfatos (75 mM y pH = 7.4), se realizó una dilución 1:25 de la mezcla anterior, se ajustó el pH a 6.38 con H_2SO_4 (0.6 M) y se leyó la densidad óptica a 235 nm. Posteriormente se preparó una solución 0.5 M de HClO.



5.3.10 Ensayo de atrapamiento de peroxinitrito (ONOO^-)

Se adicionaron en cada pozo de una placa para fluorescencia 10 μL de la muestra (5-0.5 mg/mL), 3.33 μL de DTPA (1 mM), 3.33 μL de ONOO^- (0.625 mM), 3.33 μL de DCDHF-DA (3.5 mM) y 80 μL de H_2O destilada. Posteriormente se obtuvo la fluorescencia a λ de excitación de 485 nm y λ de emisión de 528 nm en un espectrofluorímetro durante 30 minutos cada 5 minutos. Se utilizó penicilamina como compuesto de referencia a las siguientes concentraciones: 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25 y 0.1 mM. Las soluciones de DTPA y DCDHF-DA se prepararon en agua destilada, mientras que la solución de ONOO^- se preparó de la siguiente manera:

Se mezclaron durante un segundo y en un baño de hielo H_2O_2 0.7 M (en 5 mL de HCl 0.6 M) y KNO_2 0.6 M (5 mL) y se detuvo la reacción adicionando 5 mM de NaOH 1.2 M frío. Después se removió el H_2O_2 residual utilizando una columna de MnO_2 prelavada con NaOH 1.2 M. Se recolectó la mezcla a temperatura ambiente y en ausencia de luz; se dejó a $-40\text{ }^\circ\text{C}$ toda la noche y al día siguiente se descongeló en agua, posteriormente se obtuvo la capa amarilla superior de la mezcla y se conservó a $-40\text{ }^\circ\text{C}$. Finalmente se realizó una dilución 1:25 de la mezcla anterior con NaOH (100 mM) y se leyó la densidad óptica a 302 nm y se ajustó una solución de ONOO^- a 0.625 mM.



6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 Extractos

Se obtuvieron los extractos acuoso y de metanol con rendimientos del 22% y 14% por peso de planta respectivamente, como se muestra en la Tabla 2.

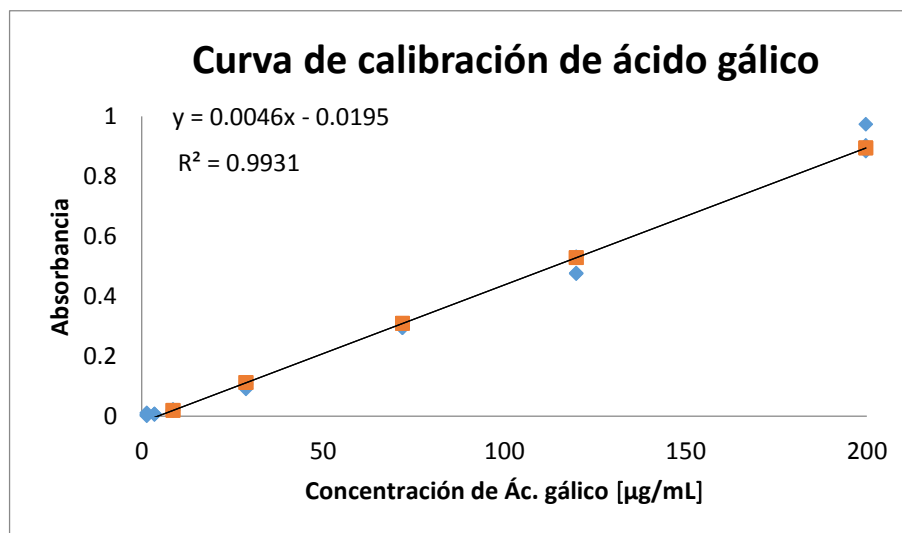
Tabla 2. Cantidad de extracto obtenido.

Cantidad de material vegetal (g)	Extracto	Cantidad de extracto obtenido (g)
50	Acuoso	11.0579
20	Metanólico	2.8519

Verbena carolina es una planta medicinal utilizada en diversos tratamientos, ya sea bajo la forma de infusión o decocción. Por esta razón, se llevó a cabo el estudio del extracto acuoso, ya que ésta es la forma como se consume la planta. Por otro lado, el extracto de metanol se preparó debido a que en este se encuentran compuestos en su mayoría polares y son los que presentan mayor efecto antioxidante.

6.2 Contenido de fenoles totales

La curva de calibración obtenida con ácido gálico mostró ser lineal y en ella se interpolaron las absorbancias correspondientes a los extractos (de metanol y acuoso) para obtener la concentración de ácido gálico presente en ellos con ayuda de la ecuación de la recta (Gráfica 1).



Gráfica 1. Curva de calibración de ácido gálico utilizada para la cuantificación de fenoles totales.



$$y = mx + b$$

Donde:

y = Absorbancia

m = pendiente de la recta

x = concentración de ácido gálico [$\mu\text{g}/\text{mL}$]

b = ordenada al origen

$$\text{Absorbancia} = 0.0046 [\text{Concentración}] - 0.0195$$

Despejando la concentración y sustituyendo los valores de absorbancia de cada extracto se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración de equivalentes de ácido gálico correspondiente a los extractos.

Concentración equivalente de ácido gálico [$\mu\text{g}/\text{mL}$] (EAG)	
Extracto acuoso	104.54 \pm 0.60
Extracto de metanol	95.25 \pm 0.21

Posteriormente se realizaron los cálculos necesarios para expresar los resultados en mgEAG/g de material vegetal. Conociendo la concentración de equivalentes de ácido gálico en cada extracto se considera el factor de dilución en caso de haberse realizado alguna. En esta determinación para ninguno de los dos extractos fue necesario y se trabajó con la concentración de 1 mg/mL.

$$C \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) (FD) \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}}$$

Considerando la cantidad de extracto y material vegetal con el que se trabajó se obtiene:

$$\text{mg EAG} - 1 \text{ mg de extracto}$$

$$X - 11057.9 \text{ mg de extracto}$$

Donde X muestra los mg EAG presentes en todo el extracto.

$$\frac{\text{mg EAG}}{\text{g de material vegetal}} = \frac{X}{50 \text{ g de } V. \text{ carolina}}$$



Expresando los resultados en la Tabla 4.

Tabla 4. Contenido de fenoles totales.

Contenido de fenoles totales [mg EAG/g de material vegetal]	
Extracto acuoso	23.12 ± 0.13
Extracto de metanol	13.58 ± 0.22

Se observa que el extracto acuoso presenta un mayor contenido de fenoles totales comparado con el extracto de metanol.

6.2.1 Cuantificación de fenoles totales por medio de la fórmula farmacopéica (FHEUM)

En la Tabla 5 se muestran los valores de absorbancia de 6 repeticiones correspondientes a la solución estándar de ácido gálico (116 µg/mL) y de los extractos (de metanol y acuoso) a 1 mg/mL.

Tabla 5. Valores de absorbancia del estándar y extractos.

Absorbancia					
Estándar		Extracto acuoso		Extracto de MeOH	
0.462		0.484		0.457	
0.465		0.471		0.459	
0.465		0.477		0.454	
0.464		0.479		0.471	
0.464		0.483		0.47	
0.465		0.482		0.467	
Promedio	0.464	Promedio	0.479	Promedio	0.463
DE	0.0012	DE	0.0048	DE	0.0072
% CV	0.25	% CV	1.01	% CV	1.56

Los valores de mg EAG se calcularon con la siguiente ecuación:

$$C_{ref}(FD) \left(\frac{Abs_m}{Abs_{ref}} \right) \left(\frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \right)$$

Donde:

C ref = Concentración de la referencia de ácido gálico

FD = Factor de dilución de la muestra

A m = Absorbancia de la muestra

A ref = Absorbancia de la referencia



En este caso no fue necesario llevar a cabo alguna dilución.

$$116 \frac{\mu g}{mL} \left(\frac{.479}{.464} \right) \left(\frac{1 mg}{1000 \mu g} \right) = 0.1198 mgEAG$$

Nuevamente se consideró la cantidad de extracto y material vegetal para expresar los resultados en mg EAG/g de planta.

$$mgEAG - 1 mg \text{ de extracto}$$

$$X - 11057.9 mg \text{ de extracto}$$

Donde X muestra los mg EAG presentes en el extracto.

$$\frac{mgEAG}{g \text{ de material vegetal}} = \frac{X}{50 \text{ gramos de } V. carolina}$$

Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Fenoles totales haciendo uso de la fórmula farmacopéica.

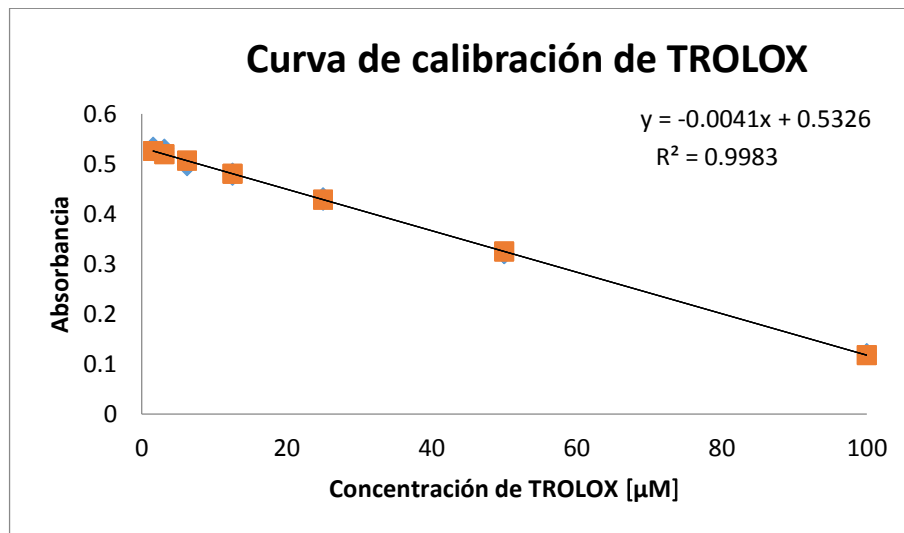
Contenido de fenoles totales [mg EAG/g de material vegetal]	
Extracto acuoso	16.74 ± 0.01
Extracto de metanol	15.07 ± 0.01

Al llevar a cabo la cuantificación de fenoles totales a través de la fórmula farmacopéica, nuevamente el extracto acuoso presenta una cantidad mayor de mg EAG/g de material vegetal. Sin embargo, al observar el valor correspondiente al extracto de metanol se observa que en menor proporción, también contiene compuestos de tipo fenólico, lo que nos provee una idea de que ambos extractos podrían presentar capacidad antioxidante.

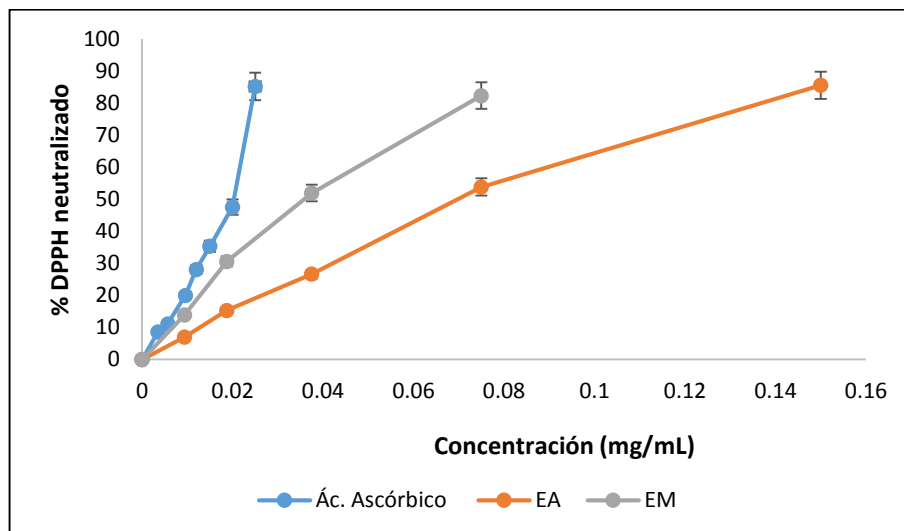


6.3 Radical libre DPPH^{*}

La Gráfica 3 correlaciona el porcentaje de actividad antioxidante vs la concentración (mg/mL) de los extractos acuoso y de MeOH con referencia al ácido ascórbico. Se obtuvo la estadística de la regresión para cada una de las muestras que se probaron y por medio de la ecuación de la recta se calculó la concentración inhibitoria media. Por otra parte, para obtener el valor de TEAC, se interpoló el valor de la absorbancia obtenida de cada una de las soluciones a 0.01 mg/mL en la curva de calibración de Trolox (Gráfica 2). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.



Gráfica 2. Curva de calibración de Trolox utilizada para el ensayo de DPPH.



Gráfica 3. Gráfica del ensayo DPPH para obtener IC_{50} .

*Tabla 7. Resultados del ensayo DPPH.*

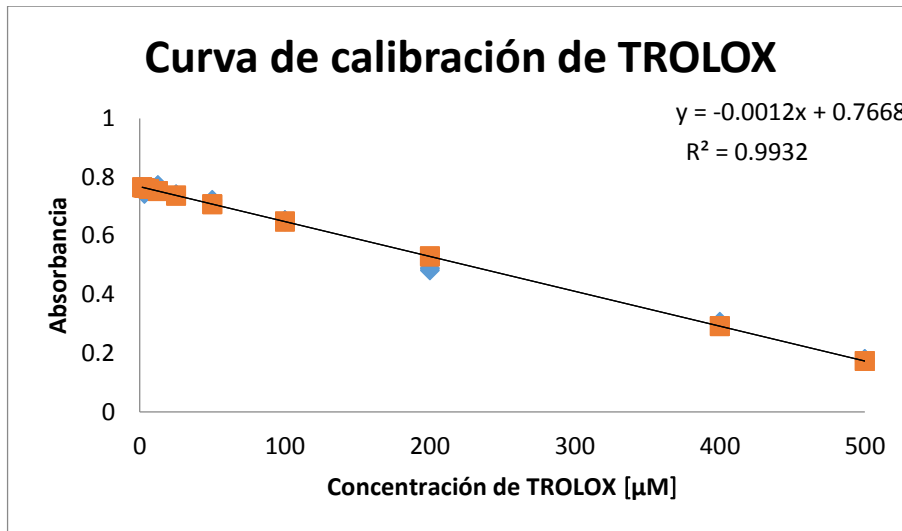
Compuesto/Extracto	Cl₅₀ (mg/mL)	Concentración (mg/mL)	TEAC
Acuoso	0.081 ± 0.0001	0.01	7.50 ± 0.06
De metanol	0.041 ± 0.00009	0.01	14.20 ± 0.20
Std (Ácido ascórbico)	0.018 ± 0.00003	0.01	23.12 ± 0.53

Al comparar los resultados de Cl₅₀ y TEAC de los extractos con los del estándar (ácido ascórbico) se observa que la concentración necesaria para obtener el 50% del efecto antioxidante es menor en el caso del estándar y que su valor de equivalentes de Trolox es mayor. Sin embargo, tanto el EA como el EM muestran capacidad para estabilizar al radical libre DPPH ya que los valores obtenidos no son cero. Por otro lado, el EM presenta una mayor actividad y el doble de equivalentes de Trolox con respecto al EA por lo que su Cl₅₀ es menor, lo que se interpreta como mejor actividad antioxidante.

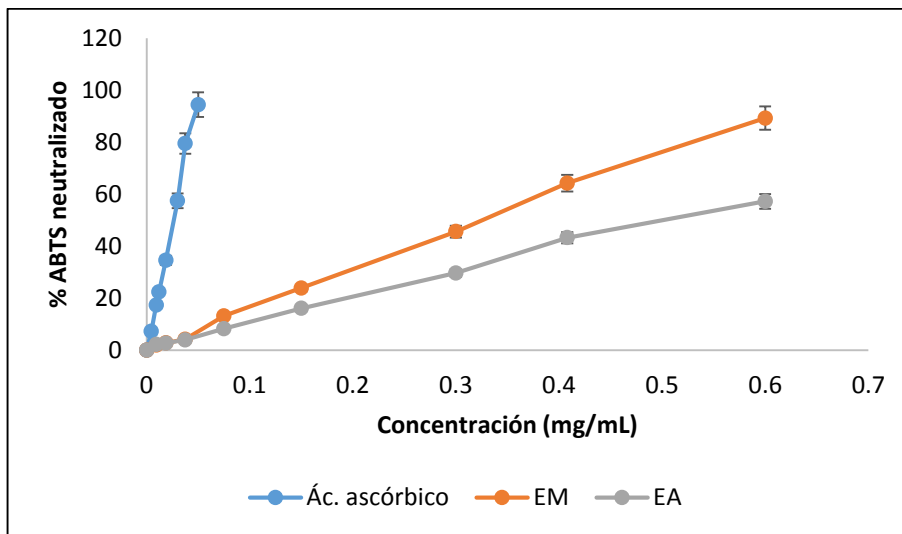


6.4 Cation ABTS^{•+}

Se obtuvo la ecuación de la recta de cada muestra probada en este ensayo y a partir de ésta se calculó la CI_{50} . Por otro lado, haciendo uso de la curva de calibración de Trolox (Gráfica 4) se interpoló la respuesta obtenida de las soluciones con concentración de 0.01 mg/mL y se obtuvo el valor de TEAC (Tabla 8).



Gráfica 4. Curva de calibración de Trolox utilizada para el ensayo de ABTS.



Gráfica 5. Gráfica del ensayo ABTS para obtener IC_{50} .

*Tabla 8. Resultados del ensayo ABTS.*

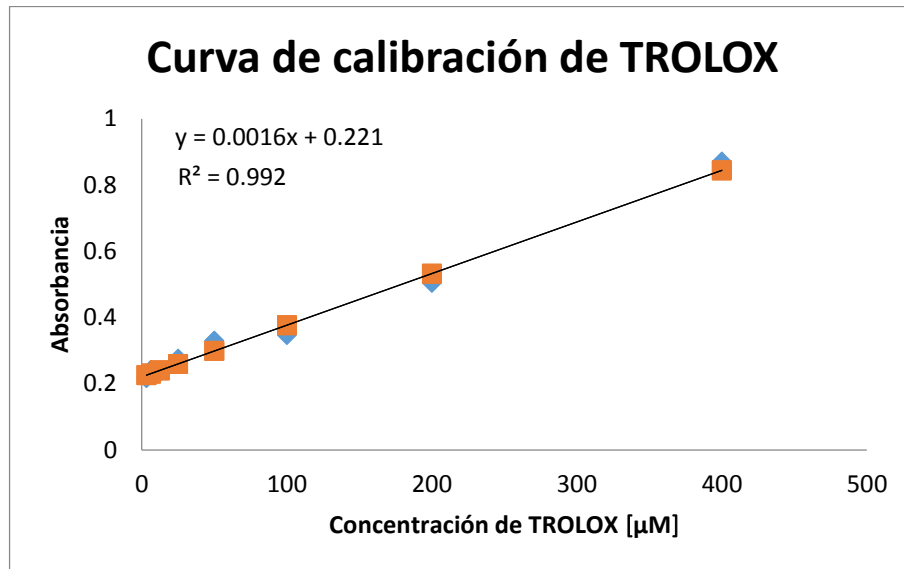
Compuesto/Extracto	Cl₅₀ (mg/mL)	Concentración (mg/mL)	TEAC
Acuoso	0.50 ± 0.007	0.01	7.10 ± 0.05
De metanol	0.32 ± 0.01	0.01	10.10 ± 0.11
(Std) Ácido ascórbico	0.026 ± 0.0001	0.01	125.13 ± 0.90

Se puede observar que los valores de TEAC correspondientes a los extractos son muy similares (presentan una diferencia de 0.3 unidades) y que las concentraciones Cl₅₀ no son tan diferentes entre sí. Al comparar los resultados de TEAC del EA y EM con los del estándar, se encuentran por debajo, así que en el caso del ácido ascórbico se necesita una concentración menor para llegar al 50% del efecto y reducir al catión radical. Sin embargo, ambos extractos contienen compuestos que presentan muy poca capacidad antioxidante.

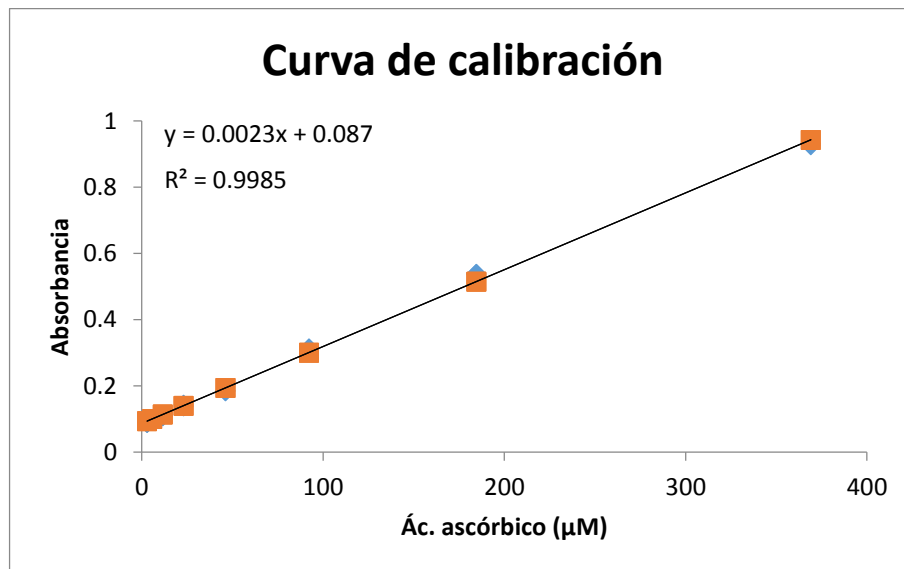


6.5 FRAP

Los resultados para este ensayo se calcularon interpolando la respuesta de los extractos acuoso y de MeOH en las curvas de calibración realizadas, una con Trolox (Gráfica 6) y otra con ácido ascórbico (Gráfica 7).



Gráfica 6. Curva de calibración de Trolox utilizada para el ensayo de FRAP.



Gráfica 7. Curva de calibración de ácido ascórbico utilizada para el ensayo de FRAP.

*Tabla 9. Resultados obtenidos del ensayo de FRAP.*

Extracto y/o referencia [0.01 mg/mL]	TEAC [μM]	VCEAC [μM]
Acuoso	3.88 \pm 0.06	5.49 \pm 0.04
De metanol	13.18 \pm 0.11	11.74 \pm 0.08
Quercetina	89.30 \pm 0.90	117.76 \pm 0.61

En la Tabla 9 se observa que el EM muestra aproximadamente el triple de equivalentes de Trolox y el doble de equivalentes de ácido ascórbico comparado con el EA. Por otro lado, ambos extractos muestran valores mucho menores de TEAC y VCEAC con respecto al compuesto de referencia (quercetina) que se considera un compuesto con elevada actividad antioxidante. A pesar de esto, ambos extractos muestran muy poca capacidad para reducir al Fe^{3+} .



6.6 ORAC

Los resultados finales del ensayo de ORAC se expresan en μmol de Trolox/g de compuesto, se obtuvieron de la siguiente manera y se muestran en la Tabla 10.

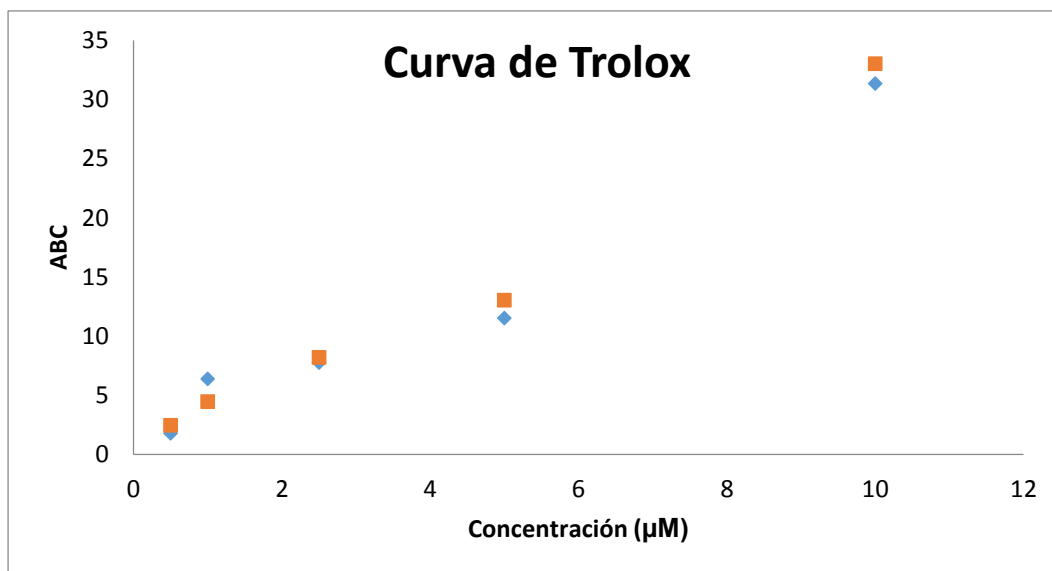
$$[\text{Trolox}] \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1\text{mL}} \times [\text{Muestra}] \times \frac{1000 \text{mg}}{1 \text{g}} = \mu\text{mol de Trolox/g de compuesto}$$

Donde:

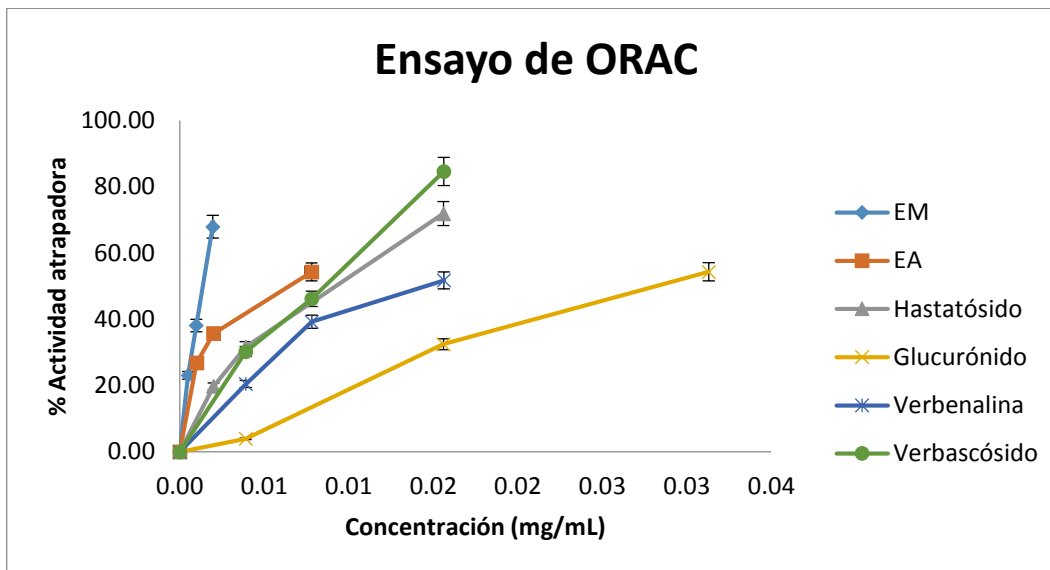
[Trolox] = Concentración de Trolox (μM) obtenida a través de la curva de calibración (Gráfica 8).

[Muestra] = concentración de la muestra (mg/mL).

Por otra parte, los resultados de CI_{50} provienen de la Gráfica 9 que considera el porcentaje de actividad antioxidante vs concentración (mg/mL).



Gráfica 8. Curva de calibración de Trolox para el ensayo de ORAC.



Gráfica 9. Porcentaje de actividad antioxidante correspondiente al ensayo de ORAC.

Tabla 10. Resultados obtenidos del ensayo de ORAC.

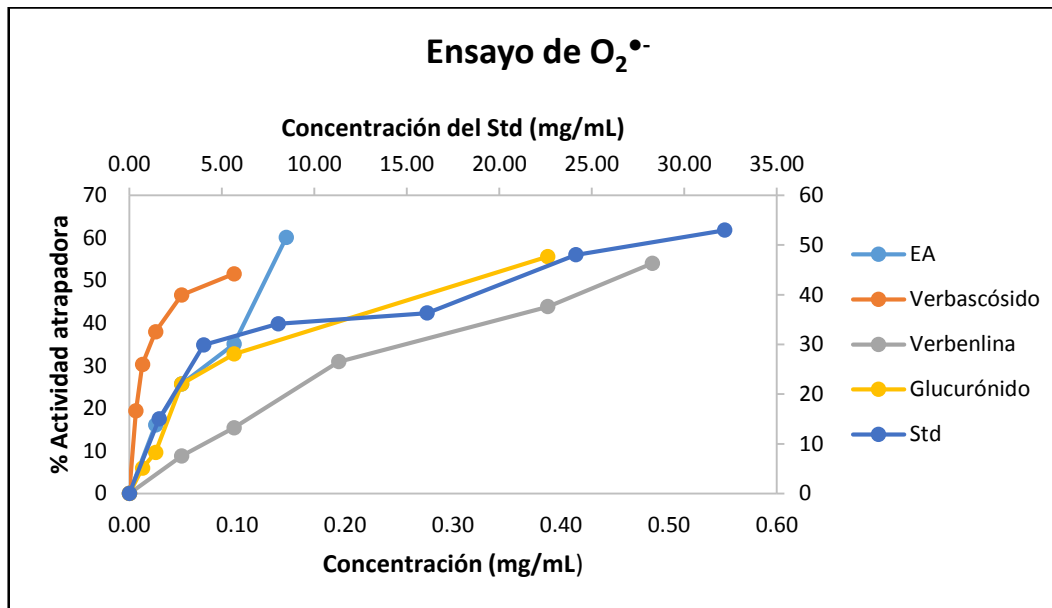
Extracto y/o compuesto	[$\mu\text{mol Trolox/g de compuesto}$]	$\text{CI}_{50}(\mu\text{g/mL})$
Acuoso	152.7 ± 0.2	5.6 ± 0.01
De metanol	512.5 ± 0.3	1.2 ± 0.02
Verbascósido	1305.6 ± 0.1	0.4 ± 0.06
Verbenalina	71.4 ± 0.7	13.8 ± 0.03
Hastatósido	95.5 ± 0.1	7.0 ± 0.01
Glucurónido (7O β GH)	32.0 ± 0.3	28.5 ± 0.02

De acuerdo a los datos de la Tabla 10 se observa que tanto los extractos como los compuestos aislados de *V. carolina* poseen actividad antioxidante. De los metabolitos probados, el verbascósido muestra el valor de equivalentes a μmol de Trolox más elevado por lo que la concentración con la que alcanza el 50% del efecto es menor comparado con los demás compuestos, mientras que el glucurónido presenta el porcentaje de actividad menor, necesitando una concentración mayor para actuar sobre los radicales peroxilo. Esto puede ser debido a que en la molécula de verbascósido es más fácil la oxidación por la presencia del grupo catecol que en el caso del glucurónido en el cual se tienen grupos hidroxilo aislados. Por otro lado, el EM resultó más activo que el EA al poseer alrededor del triple de equivalentes de Trolox con respecto a éste.



6.7 Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

La CI_{50} de la Tabla 11 se obtuvo al detectar el 50% del efecto en la gráfica 10 que relaciona el porcentaje de actividad antioxidante con relación a las concentraciones probadas (mg/mL).



Gráfica 10. Porcentaje de actividad antioxidante correspondiente al ensayo de $O_2^{\bullet-}$.

Tabla 11. Resultados obtenidos del ensayo de superóxido.

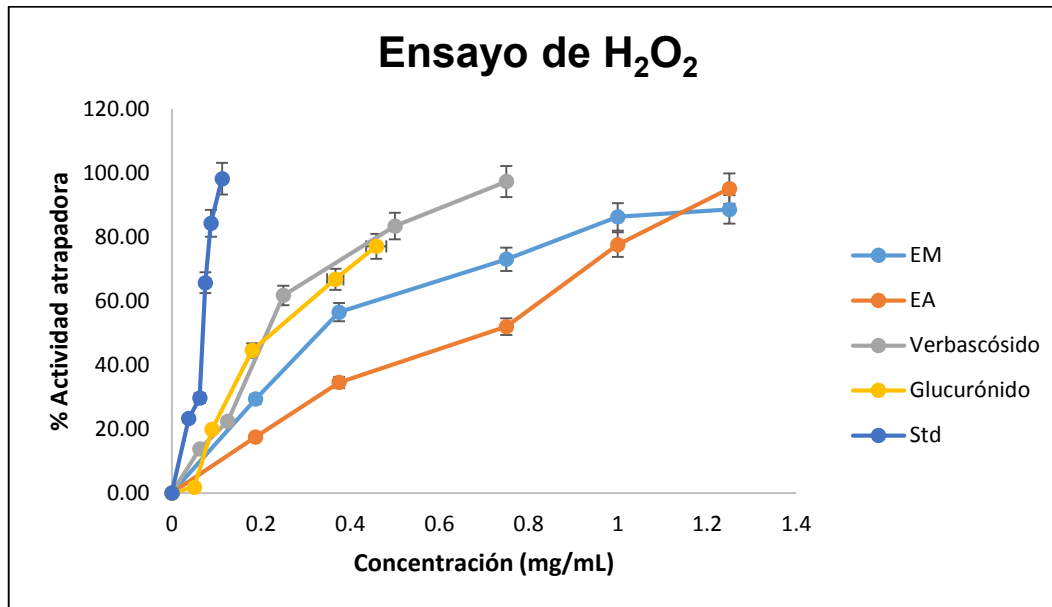
Extracto y/o compuesto	CI_{50} (mg/mL)
Acuoso	0.12 ± 0.001
De metanol	NA
Verbascosido	0.07 ± 0.01
Verbenalina	0.43 ± 0.001
Hastatósido	NA
Glucurónido (7O β GH)	0.28 ± 0.02
Std (Tirón)	31.60 ± 0.87

NA: no presentó actividad

Para este ensayo la CI_{50} de los compuestos es menor comparada con la del estándar. Por otro lado, en lo que se refiere a los extractos el EA muestra capacidad de atrapar al ion superóxido a diferencia del EM el cual no resultó activo. Además el verbascósido presentó la mayor actividad antioxidante al mostrar el menor valor de CI_{50} .



6.8 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)



Gráfica 11. Porcentaje de actividad antioxidante correspondiente al ensayo de H₂O₂.

Tabla 12. Resultados obtenidos del ensayo de H₂O₂.

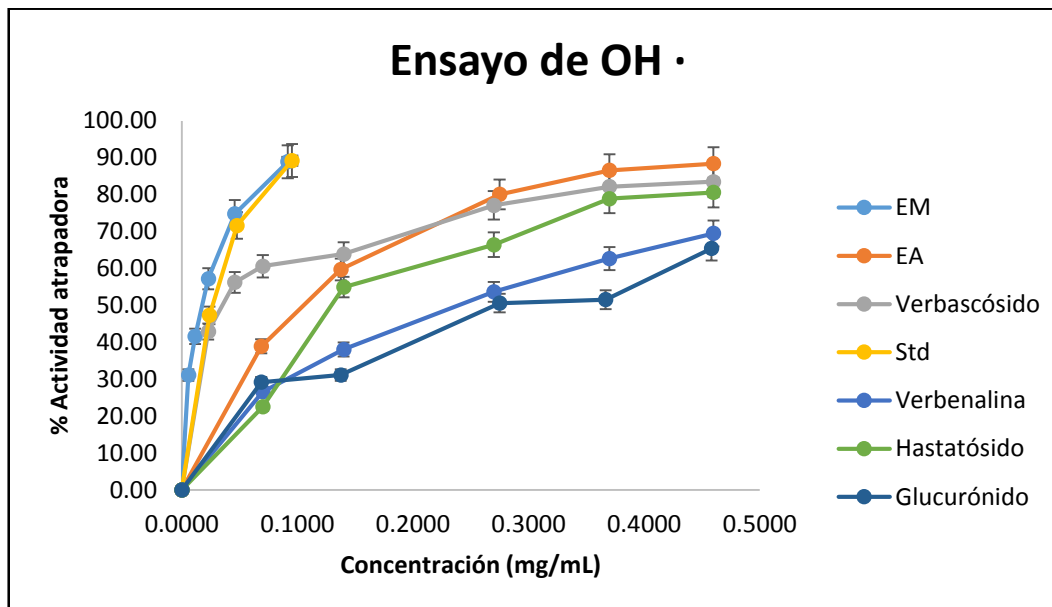
Extracto y/o compuesto	CI ₅₀ (mg/mL)
Acuoso	0.65 ± 0.003
De metanol	0.35 ± 0.007
Verbáscosido	0.20 ± 0.0004
Verbenalina	NA
Hastatósido	NA
Glucurónido (7OβGH)	0.21 ± 2 E-06
Std (Piruvato de sodio)	0.06 ± 0.0001

NA: no presentó actividad.

En este ensayo los compuestos de tipo iridoide (verbenalina y hastatósido) no mostraron actividad. En lo que se refiere al resto de los compuestos; su valor de CI₅₀ es mayor con respecto al piruvato de sodio. Por otra parte, el resto de los metabolitos muestra actividad para actuar sobre el peróxido de hidrógeno y presentar un efecto antioxidante (Tabla 12).



6.9 Radical hidroxilo (OH[·])



Gráfica 12. Porcentaje de actividad antioxidante correspondiente al ensayo de OH[·].

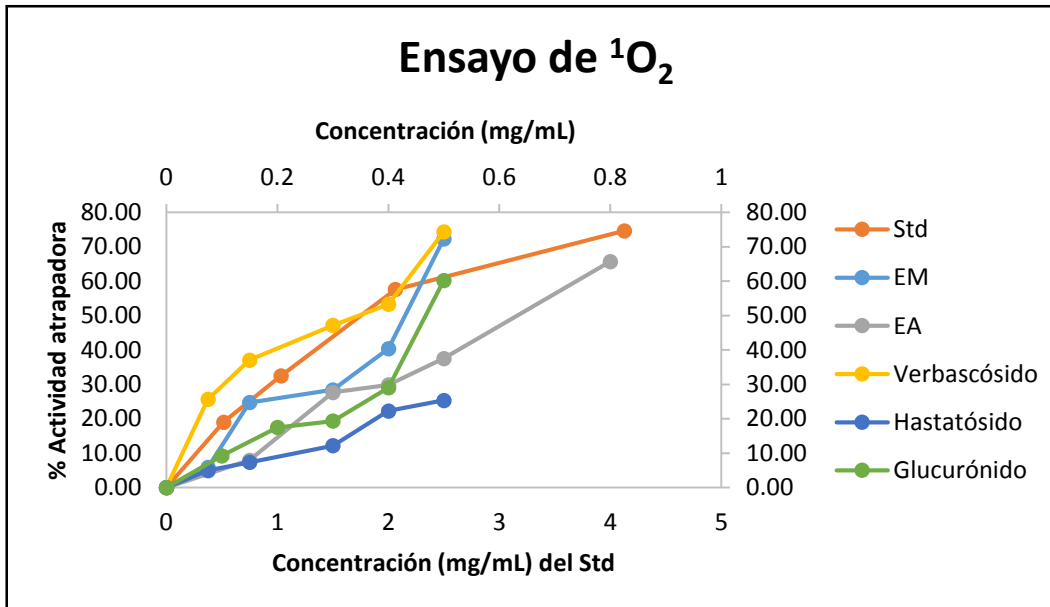
Tabla 13. Resultados obtenidos del ensayo de hidroxilo.

Extracto y/o compuesto	CI ₅₀ (mg/mL)
Acuoso	0.10 ± 0.0003
De metanol	0.015 ± 3.6E-05
Verbáscosido	0.035 ± 0.0002
Verbenalina	0.21 ± 0.003
Hastatósido	0.15 ± 0.002
Glucurónido (7OβGH)	0.27 ± 0.003
Std (Dimetiltiourea)	0.017 ± 0.0004

En este ensayo tanto los extractos como los compuestos mostraron actividad. El EM muestra una respuesta ligeramente mejor que la del compuesto de referencia que en este caso fue dimetiltiourea. Podemos observar que el verbascósido también muestra una buena capacidad para contrarrestar al radical hidroxilo ya que su valor de CI₅₀ no se encuentra tan alejado del valor del estándar. Mientras que el resto de los compuestos a pesar de necesitar una concentración mayor para llegar al 50% del efecto, presentan una actividad antioxidante importante (Tabla 13).



7.0 Oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$)



Gráfica 13. Porcentaje de actividad antioxidante correspondiente al ensayo de $^1\text{O}_2$.

Tabla 14. Resultados del ensayo de $^1\text{O}_2$.

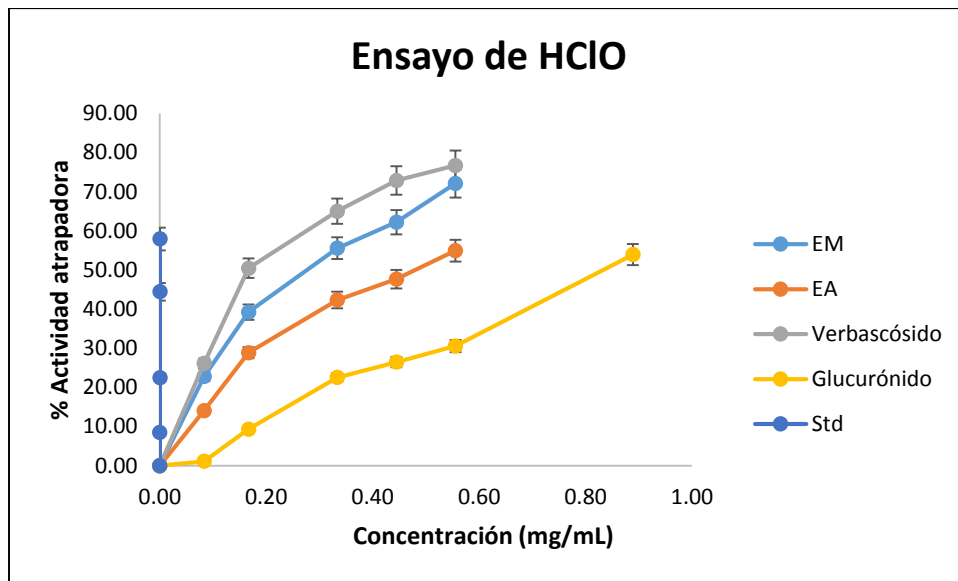
Extracto y/o compuesto	CI_{50} (mg/mL)
Acuoso	0.62 ± 0.002
De metanol	0.40 ± 0.004
Verbáscosido	0.32 ± 0.001
Verbenalina	NA
Hastatósido	$(25\% \pm 0.05)$
Glucurónido (70 β GH)	0.51 ± 0.004
Std (Ác. lipóico)	1.70 ± 0.006

NA: No presentó actividad

Se puede observar en la Tabla 14 que la verbenalina no mostró actividad para actuar sobre la especie de oxígeno singulete a diferencia del verbascósido que muestra el menor valor de CI_{50} con respecto a los demás compuestos (EA, EM y el glucurónido) que también presentan actividad antioxidante. Por otro lado, el hastatósido a una concentración de 5 mg/mL (que fue la concentración más alta que se manejó en el ensayo) únicamente alcanzó el 25% del efecto. Finalmente, todas las muestras para este ensayo presentan un efecto mayor a la del estándar por lo que podemos decir que se necesita de una cantidad menor de compuesto para alcanzar el 50% del efecto.



7.1 Ácido hipocloroso (HClO)



Gráfica 14. Porcentaje de actividad antioxidante correspondiente al ensayo de HClO.

Tabla 15. Resultados obtenidos del ensayo de HClO.

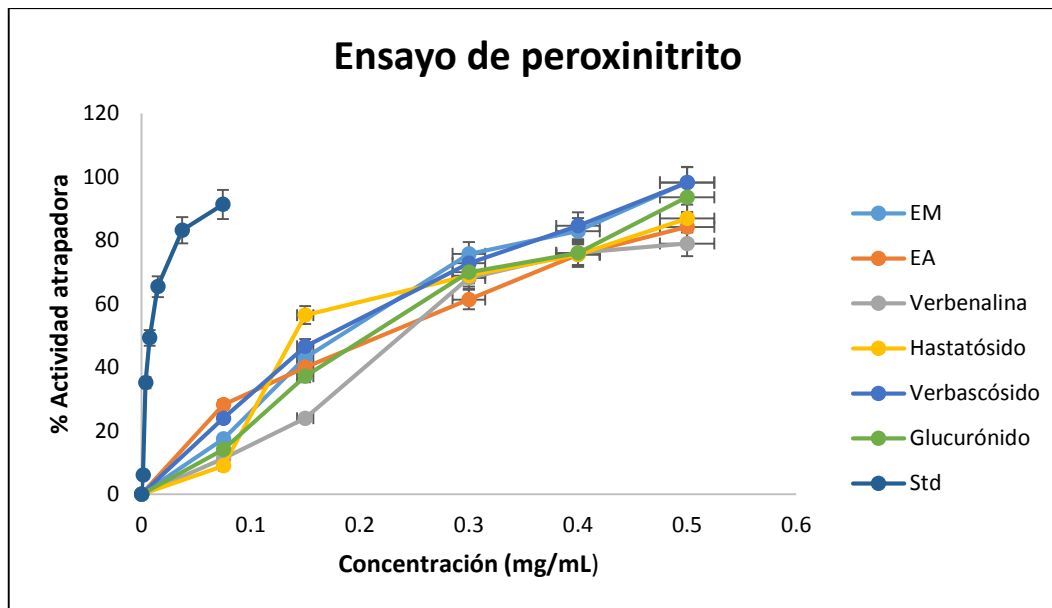
Extracto y/o compuesto	Cl ₅₀ (mg/mL)
Acuoso	0.47 ± 0.003
Metanólico	0.25 ± 0.001
Verbáscosido	0.19 ± 0.002
Verbenalina	NA
Hastatósido	NA
Glucurónido (7OβGH)	0.83 ± 0.01
Std (Ác. ascórbico)	0.00017 ± 5 E-07

NA: No presentó actividad

En esta prueba la verbenalina y el hastatósido resultaron inactivos. A pesar de que el resto de los compuestos presentan una actividad para actuar contra el ácido hipocloroso su valor de Cl₅₀ es significativamente mayor en comparación con la del estándar, siendo el verbáscosido el compuesto que a menor concentración presenta una respuesta (Tabla 15).



7.2 Peroxinitrito (ONOO^-)



Gráfica 15. Porcentaje de actividad antioxidante correspondiente al ensayo de ONOO^- .

Tabla 16. Resultados obtenidos del ensayo de peroxinitrito.

Extracto y/o compuesto	CI_{50} (mg/mL)
Acuoso	0.19 ± 0.002
De metanol	0.17 ± 0.003
Verbascósido	$0.15 \pm 1 \text{ E-}05$
Verbenalina	0.22 ± 0.002
Hastatósido	0.18 ± 0.003
Glucurónido ($7\text{O}\beta\text{GH}$)	0.19 ± 0.001
Std (Penicilamina)	0.0086 ± 0.0001

De acuerdo a la Tabla 16, tanto los compuestos como los extractos muestran capacidad de actuar sobre el anión peroxinitrito, siendo el verbascósido el compuesto que presenta la mejor actividad seguido del EM y posteriormente el hastatósido. Podemos observar que la concentración inhibitoria 50 para el glucurónido y el EA es la misma, mientras que la verbenalina necesita de una concentración mayor para alcanzar el 50% del efecto, sin embargo, los valores de CI_{50} de las muestras probadas son mayores que el valor del estándar.



7.3 Resumen

Tabla 17. Cl_{50} 's de los extractos y compuestos aislados de *Verbena carolina* ante ROS y RNS.

Ensayos	EM Cl_{50} (mg/mL)	EA Cl_{50} (mg/mL)	Verbascósido Cl_{50} (mg/mL)	Glucurónido (7O β GH) Cl_{50} (mg/mL)	Verbenalina Cl_{50} (mg/mL)	Hastatósido Cl_{50} (mg/mL)
ORAC	0.0012 \pm 0.02	0.0056 \pm 0.01	0.0004 \pm 0.06	0.0285 \pm 0.02	0.0138 \pm 0.03	0.007 \pm 0.01
O ₂ ^{•-}	NA	0.12 \pm 0.001	0.07 \pm 0.01	0.28 \pm 0.02	0.43 \pm 0.001	NA
H ₂ O ₂	0.35 \pm 0.007	0.65 \pm 0.003	0.20 \pm 0.0004	0.21 \pm 2 E-06	NA	NA
OH [•]	0.015 \pm 3.6E-05	0.10 \pm 0.0003	0.035 \pm 0.0002	0.27 \pm 0.003	0.21 \pm 0.003	0.15 \pm 0.002
¹ O ₂	0.40 \pm 0.004	0.62 \pm 0.002	0.32 \pm 0.001	0.51 \pm 0.004	NA	(25% \pm 0.05)
HClO	0.25 \pm 0.001	0.47 \pm 0.003	0.19 \pm 0.002	0.83 \pm 0.01	NA	NA
ONOO ⁻	0.17 \pm 0.003	0.19 \pm 0.002	0.15 \pm 1 E-05	0.19 \pm 0.001	0.22 \pm 0.002	0.18 \pm 0.003

En la tabla anterior se observa que el EM resultó ser más activo que el EA en la mayoría de los ensayos excepto ante la especie O₂^{•-}. Dentro de los compuestos aislados de la planta el verbascósido mostró la mejor capacidad para atrapar a las ROS y RNS. Por otro lado, la verbenalina no presentó actividad contra ¹O₂, mientras que el hastatósido no mostró la capacidad para contrarrestar a la especie O₂^{•-} y ambos compuestos resultaron inactivos en los ensayos H₂O₂ y HClO.



7. CONCLUSIONES

El extracto de metanol resultó más activo en la mayoría de los análisis comparado con el extracto acuoso.

Por lo que se refiere a los compuestos aislados de la planta, el verbáscosido presentó la mayor capacidad para estabilizar a las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, lo cual puede deberse a las funciones catecol de los dos anillos aromáticos de su molécula.

El 7-O-β-D-glucurónido de la hispidulina resultó activo aunque en menor proporción que el verbascósido, ya que el grupo catecol se encuentra bloqueado en uno de los hidroxilos por un grupo éter y un glicósido.

La verbenalina presentó actividad contra las especies reactivas de ROO^\cdot , $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^\cdot y ONOO^- , mientras que el hastatósido resultó activo ante ROO^\cdot , OH^\cdot y ONOO^- . Estos compuestos de tipo iridoide fueron menos activos comparados con el 7-O-β-D-glucurónido de la hispidulina y el verbascósido.

Algunas de las actividades biológicas de la planta como para tratamiento de problemas hepáticos o infecciosos, se pueden asociar a su actividad antioxidante mostrada.



8. PERSPECTIVAS

Realizar experimentos de actividad antioxidante en las colectas que resultaron más ricas en verbascósido de acuerdo al análisis por CLAE.



9. BIBLIOGRAFÍA

Alam, M., Bristi, N. & Rafiquzzaman M. (2013). "In vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity". Saudi Pharmaceutical Journal **21**:143-152.

Anderson, K., Teuber, S., Gobeille, A., Cremin, P., Waterhouse, A. & Steinberg, F. (2001). "Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. Biochemical and molecular action of nutrients". Journal of Nutrition **131**: 2837–2842.

Argueta V., Cano A. M.C. & Rodarte M.E. (1994). Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. 1ª. Ed., Instituto Nacional Indigenista, México.

Aruoma, O. (1997). Scavenging of hypochlorous acid by carvedilol and ebselen *invitro*. General Pharmacology **28**: 269-272.

Benzie, I. & Strain, J. (1996). "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay". Analytical Biochemistry **239**: 70 – 76

Betigeri, S., Thakur, A. & Raghavan, K. (2005). "Use of 2,2'-Azobis (2-Amidinopropane) Dihydrochloride as a Reagent Tool for Evaluation of Oxidative Stability of Drugs". Pharmaceutical Research **22**: 310-317.

Biglari, F., AlKarkhi, A. & Easa, A. (2008). "Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran". Food Chemistry **107**:1636–1641.

Bilia, A., Giomi, M., Innocenti, M., Gallori, S. & Vincieri, F. (2007). "HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity". Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **46**: 463-470.

Blois MS. (1958). "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical". Nature **181**:1199–1200.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. & Berset, C. (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity LWT". Food Science and Technology **28**: 25–30.

Briviba, K., Klotz, LO. & Sies, H. (1997). "Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems". Biological Chemistry **378**: 1259-126.

Cadenas E. (1989). "Biochemistry of oxygen toxicity". Annual Reviews Biochemistry **58**:79-110.

Cao, G., Alessio, H., & Cutler, R. (1993). "Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants". Free Radical and Biology Medicine **14**:303–311.

Cheng, Z., Moore, J. & Yu, L. (2006). "High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay". Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**:7429-7436.



- Chung, Y. Tan, S. & Zhao, Y. (2014). "Recent advances in biocompatible nanocarriers for delivery of chemotherapeutic cargoes towards cancer therapy". *Organic & Biomolecular Chemistry* **12**: 4793-4794.
- Contreras, E. & Strong F. (1982). "Determination of tocopherols (Vitamin E) by reduction of cupric ion". *Journal of AOAC* **65**:1215–1222.
- Cuvelier M., Richard H. & Berset, C. (1992). "Comparison of the antioxidative activity of some acidphenols: structure-activity relationship". *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **56**:324–325.
- Dahanukar, S., Kulkarni, R., &Rege, N. (2000). "Pharmacology of medicinal plants and natural products". *Indian Journal of Pharmacology* **32**: 81–118.
- Desideri, A. &Falconi, M. (2003). "Prokaryotic Cu, Zn superoxidase dismutase". *Biochemical Society Transactions* **6**:1322-35.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. & Vidal, N. (2006). "Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds". *Food Chemistry* **97**: 654-660.
- Dudonne', S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M. & Merillon, J. (2009). "Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 1768–1774.
- Eberhardt, M. (2001). "Reactive oxygen metabolites". *Chemistry and medical consequences*.
- Engebretson J. (2002). "Culture and complementary therapies". *Complement Ther Nurs Midwifery* **8**:177–84.
- Frankel, E. & Meyer, A. (2000). "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants". *Journal Science Food Agriculture* **80**: 1925–1941.
- Freeman, B. (1994). "Free radical chemistry of nitric oxide. Looking at the dark side". *Chest***105**: 79–84.
- García, A. (2012). "Estudio químico complementario de las partes aéreas de la planta medicinal *Verbena carolina* L. (Verbenaceae)". Tesis de licenciatura (Químico Farmacéutico Biológico) Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gavidia, T., Pronczuk, J. & Peter, D. (2009). "Impactos ambientales sobre la salud respiratoria de los niños. Carga global de las enfermedades respiratorias pediátricas ligada al ambiente". *Revista chilena de enfermedades respiratorias* **25**:99-108.
- Gutiérrez D., Ortiz C. & Mendoza C. "Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal". Simposio de Metrología. Santiago de Querétaro, México. Del 22 al 24 de octubre del 2008.



- Hirasa, K. & Takemasa, M. (1998). "Antimicrobial and antioxidant properties of spices". *Spice science and technology* 163-200.
- Huang D., Chen C., Lin C. & Lin Y. (2005). "Antioxidant and antiproliferative activities of water spinach (*Ipomoea aquatic* Forsk.) constituents". *Botanical Bulletin of Academic Science* **46**:99-106.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). "The chemistry behind antioxidant capacity assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 1841–1856.
- Hurst, J., Barrette, W., Michel, B., & Rosen, H. (1991). "Hypochlorous acid and myeloperoxidase-catalyzed oxidation of iron-sulfur clusters in bacterial respiratory dehydrogenases". *European Journal of Biochemistry* **202**: 1275-1282.
- Jonson I., Southon, S. & Faulks R. (2001). "Predicción de la biodisponibilidad de los antioxidantes de los alimentos: el caso de los carotenoides". *Aplicaciones prácticas* 119-137.
- Kasote, D., Hegde, M. & Katyare S. (2013). "Mitochondrial dysfunction in psychiatric and neurological diseases: cause(s), consequence(s), and implications of antioxidant therapy". *Biofactors* **39**:392-406.
- Leong, L., Shui G. (2002). "An investigation of antioxidants capacity of fruits in Singapore markets". *Food Chemistry*, 70.
- Li, Y., Matsunaga, K., Kato, R. & Ohizumi, Y. (2001). "Verbenachalcone, a novel dimeric dihydrochalcone with potentiating activity on nerve growth factor-action from *Verbena littoralis*". *Journal of Natural Products* **64** (6): 806-808.
- Machumi, F., Samoylenko, V., Yenesew, A., Derese, S., Midiwo, J., Wiggers, F., Jacob, M., Tekwani, B., Khan, S., Walker, L. & Muhammad, I. (2010). "Antimicrobial and antiparasitic abietane diterpenoids from the roots of *Clerodendrum eriophyllum*". *Natural Product Communications* **5**:853-858.
- Magalhães, L., Segundo, M., Salette, R. & Lima, J. (2008). "Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties". *Analytical Chemical* **613**: 1-19.
- Miller N. & Rice-Evans, A. (1997). "Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS⁺ radical cation assay". *Free Radical Research* **26**: 195-199.
- Mohanty J., Jaffe J., Shulman E. & Raible D. (1997). "A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivate". *Journal of Immunological Methods* **202**:133– 41.
- Morales, R. (2009). "Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de la planta medicinal *Verbena carolina* L. (Verbenaceae)". Tesis de licenciatura (Químico Farmacéutico Biológico) Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Morales H., Quiroz G. & Meléndez C. (2004). Evaluación del efecto diurético de *Verbena carolina* en rata. IX Reunión Nacional de Estudiantes de farmacia. Universidad Autónoma de Campeche, México.
- Natella F., Nardini M., Felice MD. & Scaccini C. (1999). "Benzoic and Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidants: Structure–Activity Relation". *Agricultural and Food Chemistry* **47**:1453–1459.



- Ohyashiki T., Nunomura M. & Katoh T. (1999). "Detection of superoxide anion radical in phospholipid liposomal membrane by fluorescence quenching method using 1,3-diphenylisobenzofuran". *Biochimica et Biophysica Acta* **1421**:131– 9.
- Osawa, T. (1994). "Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems". *Postharvest Biochemistry of plant Food-Materials in the Tropics* 241-251.
- O'Leary, N., Múlgura, M. & Morrone, O. (2007). "Filogenia del género *Verbena* (Verbenaceae) basada en caracteres morfológicos". *American Journal of Botany* **45**: 103-105.
- Pirvu L., Nichita C., Giurginca M. & Meghea A. (2006). "Correlation structure-antioxidant activity of some polyphenols of vegetal origin". *Chime* **57**:699–705.
- Poli G., Leonarduzzi F. & Biasi E. (2004). "Oxidative stress and cell signaling". *Current Medicinal Chemistry***11**:1163-1182.
- Prakash A. (2001). "Antioxidant activity". *Medallion Laboratories Analytical Progress* **19**:1–6
- Rahmatullah, M., Rownak, J., Safiul, F., Hossan, S., Mollik, M. & Rahman, T. (2011). "Folk medicinal uses of Verbenaceae family plants in Bangladesh". *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines* **8**: 53-65
- Rzedowski J. & Rzedowsky G. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2^a. Ed, Instituto de Ecología A.C., México.
- Sagar, B. & Singh, R. (2011). "Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay". *Food Science and Technology* **48**: 412-422.
- Shalaby, E. & Shanab, S. (2013). "Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action". *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **7**:528-539.
- Singlenton, V., Orthofer, R. & Lamuela-Ravéntos, R. (1999). "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent". *Methods in Enzymology* **299**:152-178.
- Sun J., Chen Y. & Li M. (1998). "Role of antioxidant enzymes on ionizing radiation resistance". *Free Radical Biology and Medicine* **42**:586-592.
- Tamimi, M., Qourzal, S., Barka, N., Assabbane, A. & Ait-Ichou Y. (2008). "Methomyl degradation in aqueous solutions by fenton's reagent and the photo-Fenton system". *Separation and Purification Technology* **61**: 103-108
- Tang B., Zhang L. & Geng Y. (2005). "Determination of the antioxidant capacity of different food natural products with a new developed flow injection spectrofluorimetry detection hydroxyl radicals". *Talanta* **65**:769– 75.



Tosaki A., Droy-Lefaix M., Pali L. & Das D. (1993). "Effects of SOD, catalase and a novel antiarrhythmic drug; EGB761 on reperfusion induced arrhythmias in isolated rat hearts". *Free Radical Biology and Medicine* **14**: 361-70.

Turrens J. (1997). "Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain". *Bioscience Report* **17**:3-8.

UNAM, B.D. (2009). Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Recuperado el 07 de Agosto de 2015, de http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Verbena_carolina&id=7509.

Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. (1998). "Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products". *Journal of Agricultural Food and Chemistry* **46**: 4113–4117.

Vinson, J. & Hontz, B. (1995). "Phenol antioxidant index: Comparative antioxidant effectiveness of red and white wines". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**: 401–403.

Weiss, S., Lampert, M., & Test, S. (1983). "Long-lived oxidants generated by human neutrophils: characterization and bioactivity". *Science* **222**: 625-628.

Yildirim A., Oktay M. & Bilaloğlu, V. (2001). "The antioxidant activity of leaves of *Cydonia vulgaris*". *Turkish Journal of Medical Science* **31**:23-27.