



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación de la actividad antioxidante y
antiinflamatoria de extractos provenientes
de los frutos de
*Acacia farnesiana***

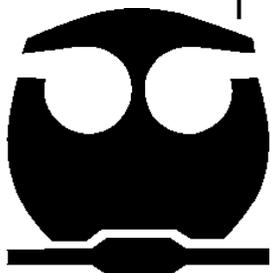
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

YESICA ROSALINA CRUZ MARTÍNEZ



México, D.F.

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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Profesor: NAVARRO OCAÑA ARTURO
VOCAL	Profesor: PEDRAZA CHAVERRI JOSÉ
SECRETARIO	Profesor: DELGADILLO PUGA CLAUDIA
1er. SUPLENTE	Profesor: MEDINA CAMPOS OMAR NOEL
2º SUPLENTE	Profesor: CARMONA SALAZAR LAURA

SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Departamento de Nutrición Animal “Dr. Fernando Pérez-Gil Romo”

Red de Apoyo a la Investigación, INCMNSZ

Laboratorio 321, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química. UNAM

Laboratorio 209, Departamento de Biología, Facultad de Química. UNAM

Laboratorio de Pruebas Biológicas, Instituto de Química. UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Claudia Delgadillo Puga

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Omar Noel Medina Campos

SUSTENTANTE:

Yesica Rosalina Cruz Martínez

ÍNDICE

i.	RESUMEN	8
I.	INTRODUCCIÓN	9
II.	ANTECEDENTES	11
	II.1 OXIDACIÓN.....	11
	II.1.1 Ambiente oxidante.....	11
	II.1.2 Radicales libres.....	12
	II.1.3 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).....	13
	II.1.3 Estrés oxidante.....	13
	II.1.4 Sistemas de defensa antioxidante.....	14
	II.1.5 Métodos para la cuantificación de actividad antioxidante.....	15
	II.2 INFLAMACIÓN.....	16
	II.2.1 Mediadores inflamatorios.....	16
	II.2.1.1 Citocinas.....	16
	II.2.1.2 Quimiocinas.....	17
	II.2.1.3 Óxido nítrico.....	18
	II.2.1.4 Derivados del ácido araquidónico (Eicosanoides).....	18
	II.2.1.4.1 Lipooxigenasas.....	19
	II.2.2 Principales células presentes en la inflamación.....	22
	II.2.2.1 Monocitos.....	23
	II.2.2.2 Linfocitos.....	23
	II.2.2.3 Mastocitos.....	23
	II.2.2.4 Leucocitos polimorfonucleares.....	24
	II.2.2.4.1 Eosinófilo.....	24
	II.2.2.4.2 Basófilo.....	25
	II.2.2.4.3 Neutrófilos.....	25
	II.2.3 Mieloperoxidasa (MPO).....	26
	II.3 COMPUESTOS BIOACTIVOS (CB).....	26

II.3.1 Compuestos fenólicos.....	27
II.3.2 Terpenos	29
II.3.3 Fitoesteroles y fitoestanoles.....	30
II.4 TECNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS.	31
II.4.1 Cromatografía en capa fina (CCF)	31
II.4.2 Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)	32
II.5 <i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd. (1806)	33
II.5.1 Características geográficas y climatológicas de la Mixteca Poblana	35
II.5.2 Fitoquímicos en las <i>Acacias</i>	35
II.5.3 Actividad biológica de las <i>Acacias</i>	42
III. OBJETIVOS	44
IV. JUSTIFICACIÓN	45
V. HIPÓTESIS	46
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	47
VI.1 Equipo	47
VI.2 Disolventes y reactivos	47
VI.4 Material vegetal.....	48
VI.5 Obtención de los extractos de los FAF	49
VI.6 Identificación de compuestos en los diferentes extractos provenientes de los FAF por CCF	49
VI.7 Determinación de la actividad antioxidante cualitativa de los extractos provenientes de los FAF por CCF.....	50
VI.8 Identificación y cuantificación de compuestos en los extractos provenientes de los FAF por HPLC.	51
VI.9 Evaluación de la capacidad protectora de los extractos provenientes de los FAF frente al daño oxidante inducido con H ₂ O ₂	52
VI.10 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos provenientes de los FAF...54	
VI.10.1 Ensayo de edema auricular en el ratón CD-1 inducido con 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA).	54
VI.10.2 Ensayo de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) por el método de 3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB).....	57

VI.11 Análisis estadístico.....	58
VII. RESULTADOS	59
VII.1 Material vegetal	59
VII.2 Obtención de los extractos de los FAF	59
VII.3 Identificación de compuestos de los extractos provenientes de los FAF por CCF	60
VII.4 Determinación de la actividad antioxidante cualitativa de los extractos provenientes de los FAF por CCF.....	64
VII.5 Identificación y cuantificación de compuestos en los extractos provenientes de los FAF por HPLC.	65
VII.6 Evaluación de la capacidad protectora de los extractos provenientes de los FAF frente al daño oxidante inducido con H ₂ O ₂ en células LLC-PK1.	67
VI.7 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos provenientes de los FAF por el ensayo de edema auricular en el ratón CD-1 inducido con TPA y el ensayo de la actividad de la enzima mieloperoxidasa por el método de 3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB).....	71
VIII. DISCUSIÓN	74
VIII.1 Material vegetal y obtención de los extractos provenientes de los FAF	74
VIII.2 Identificación y cuantificación de compuestos de los extractos provenientes de los FAF por CCF y HPLC.....	74
VIII.3 Actividad antioxidante	76
VIII.4 Actividad antiinflamatoria.....	77
IX. CONCLUSIONES	81
X. PERSPECTIVAS.....	82
XI. ANEXOS	83
XII. BIBLIOGRAFÍA	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Formación de radicales libres y su efecto en moléculas biológicas de gran importancia.....	10
Figura 2	Síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico.....	17
Figura 3	Síntesis de leucotrienos a partir del ácido araquidónico.....	18
Figura 4	Síntesis de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico.....	20
Figura 5	Ejemplos de compuestos pertenecientes al grupo de ácidos fenólicos y flavonoides.....	26
Figura 6	Estructura química del isopreno, unidad fundamental de los terpenos.....	27
Figura 7	Ejemplos de fitoesteroles y fitoestanoles.....	28
Figura 8	Sistema de cromatografía de líquidos de alta eficiencia.....	31
Figura 9	Arbusto de <i>Acacia farnesiana</i> (Acatlán de Osorio, Puebla, México, Marzo 2015).....	32
Figura 10	Ubicación de la zona de colecta del material vegetal.....	46
Figura 11	Secuencia del ensayo de edema auricular en el ratón CD-1.....	54
Figura 12	Material vegetal.....	57
Figura 13	Cromatoplasmas para la identificación de compuestos terpénicos y esteroides en los extractos hexánico y clorofórmico provenientes de los FAF.....	59
Figura 14	Cromatoplasmas para la identificación de ácidos fenólicos en los extractos clorofórmico y acetónico provenientes de los FAF.....	60
Figura 15	Cromatoplasmas para la identificación de flavonoides en los extractos metanólico y acuoso provenientes de los frutos FAF.....	61
Figura 16	Cromatoplasmas para la determinación de la actividad antioxidante cualitativa de los extractos provenientes de los FAF.....	62
Figura 17	Inhibición de la producción de especies reactivas del oxígeno en células LLC-PK1 por extractos provenientes de los frutos de <i>Acacia farnesiana</i> a tres diferentes concentraciones.	67

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Clasificación de los terpenos de acuerdo a su estructura química.....	28
Cuadro 2	Compuestos bioactivos reportados para el género <i>Acacia</i>	34
Cuadro 3	Condiciones para la identificación de compuestos en los extractos provenientes de los FAF mediante CCF.....	48
Cuadro 4	Condiciones para la identificación de compuestos en los extractos provenientes de los FAF mediante HPLC.....	49
Cuadro 5	Rendimiento obtenido de la extracción de 200 g de los FAF con solventes de diferente polaridad.....	58
Cuadro 6	Tiempos de retención obtenidos por HPLC para los estándares comerciales de diferentes compuestos.....	63
Cuadro 7	Concentración (mg/g de extracto) de compuestos en diferentes extractos provenientes de los FAF.....	64
Cuadro 8	Efecto protector de diferentes extractos provenientes de FAF y del estándar quercetina respecto al grupo control y el grupo tratado con H ₂ O ₂ en el ensayo de producción de ERO.....	66
Cuadro 9	Efecto antiinflamatorio de diferentes extractos provenientes de los FAF y compuestos de referencia.....	70

i. RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se determinó la actividad antioxidante y antiinflamatoria de diferentes extractos provenientes de los frutos de *Acacia farnesiana* (FAF). Los frutos se recolectaron en el mes de marzo del 2015 en Acatlán de Osorio, Puebla; se acondicionaron para ser sometidos a una extracción consecutiva utilizando solventes de diferente polaridad, además de una mezcla metanol: agua (80:20, v/v). Para lograr la identificación y cuantificación de algunos compuestos como terpenos, esteroides, ácidos fenólicos y flavonoides se utilizó como herramienta la cromatografía en capa fina (CCF) y la cromatografía líquida de alta eficiencia por sus siglas en inglés HPLC. Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizaron concentraciones de 50, 100 y 200 ppm de diferentes extractos provenientes de los FAF así como del estándar antioxidante quercetina, en un ensayo de protección al daño oxidante inducido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre el cultivo celular Lilly Laboratory Cell Porcine Kidney (LLC-PK-1). La actividad antiinflamatoria se valoró al utilizar concentraciones de 1 y 3 mg de extracto o estándares/oreja del ratón CD-1 en el ensayo de inducción de edema con el agente 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) además de un ensayo complementario de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO). Dentro de los compuestos presentes en los diferentes extractos se lograron identificar y cuantificar catequina, epicatequina, α y β -amirina, lupeol, campesterol, stigmasterol, ácidos gálico, cafeico, cinámico y clorogénico. Respecto a la actividad antioxidante se observó una mayor capacidad protectora por parte de los extractos acetónico, metanólico, acuoso, metanólico: acuoso dependiente de la concentración utilizada al evitar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). La actividad antiinflamatoria, se favoreció por el aumento en la dosis utilizada de los extractos o estándares en las orejas de los animales tratados, los mejores resultados se encontraron para los extractos clorofórmico y metanólico, así como para los estándares α -amirina, β -amirina e indometacina, además de ello, la disminución del edema se relacionó en la mayoría de los tratamientos, con la disminución en la actividad de la enzima MPO.

Los FAF tienen una gama de compuestos que pueden ser extraídos y que en conjunto están contribuyendo a la actividad antioxidante y antiinflamatoria probados en este trabajo de investigación, para ambos casos, la actividad está dada por la concentración de extracto utilizado.

I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a Bernhoft (2010) los compuestos bioactivos en las plantas se definen como metabolitos secundarios que pueden provocar efectos farmacológicos y toxicológicos en el hombre y los animales; estos metabolitos son productos asociados a las rutas metabólicas durante su crecimiento y desarrollo. Aunque sus funciones no se conocen completamente, se dice que protegen a la planta contra insectos, hongos, bacterias y radiaciones UV. Se han identificado más de 5,000 compuestos, que se clasifican en: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos, curcuminoides, saponinas y terpenos; algunos de ellos con propiedades antibacteriales, antivirales, fungicidas, antioxidantes y antiinflamatorias principalmente (Manach *et al.*, 2004; Valares, 2011).

El género *Acacia* es el segundo más grande de la familia de las leguminosas, cuenta con aproximadamente 1,200 especies ampliamente distribuidas en los trópicos del mundo, en Australia están presentes 890 especies mientras que en América están aproximadamente 200 (Rico, 2001). Las especies de este género son ampliamente utilizados en preparaciones tradicionales como decocciones e infusiones de hojas, raíces, cortezas o sus mezclas. Sus propiedades biológicas y los usos descritos en la literatura hacen que dentro de éste género, *Acacia farnesiana* (AF) sea una especie de gran interés para su estudio científico (Muthaura *et al.*, 2007). Por otra parte en AF se ha descrito la presencia de quercetina, ácido gálico, glucósidos de flavonoides, metil galato, catequina y epicatequina (Seigler, 2003; Manríquez *et al.*, 2007; Cuchillo *et al.*, 2010; Hannachi, *et al.*, 2011; Maldini *et al.*, 2011; RamLi *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2013). Estos compuestos, por su estructura química pueden actuar como antioxidantes modulando el estrés oxidante en las células así como ser capaces de participar en la modulación de la respuesta inflamatoria.

Además se sabe que el proceso inflamatorio se encuentra vinculado al estado oxidante, ya que durante la inflamación hay una importante presencia de especies reactivas del oxígeno (ERO), acompañado de una baja capacidad del organismo para contrarrestar dicho fenómeno (Alemán *et al.*, 2004; Siriwardhana *et al.*, 2013). La finalidad del presente trabajo de investigación fue conocer el efecto antioxidante y antiinflamatorio de diferentes extractos provenientes de los FAF, además de brindar un acercamiento a los posibles compuestos responsables de dichas actividades.

Para identificar y cuantificar algunos de los compuestos presentes en cada uno de los extractos provenientes de los FAF, fueron expuestos a diferentes reveladores sobre cromatografía en capa fina (CCF) además de ser analizados por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). Por otra parte, la valoración antioxidante se realizó a través de la cuantificación de ERO's debido al daño oxidante inducido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre el cultivo de células Lilly Laboratory Cell Porcine Kidney (LLC-PK1) empleando como sonda fluorescente la 6-carboxy-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (Carboxy-DCFDA). En relación a la actividad antiinflamatoria, ésta se valoró midiendo la inhibición de edema auricular inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) en la oreja de ratones CD-1. De manera complementaria se cuantificó la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) como marcador indirecto de la infiltración de neutrófilos en el proceso inflamatorio (Del-Ángel *et al.*, 2015).

II. ANTECEDENTES

II.1 OXIDACIÓN

Químicamente la oxidación de un compuesto es la pérdida de electrones o de hidrógenos así como la ganancia de oxígeno en una molécula. La reducción de un compuesto es exactamente lo contrario; es decir, la ganancia de electrones o hidrógenos así como la pérdida de oxígeno. Este par oxido-reductor es necesario químicamente y esencial para entender la biología de las reacciones de óxido-reducción en el organismo. Los oxidantes tienen afinidad para reaccionar con macromoléculas nucleofílicas, muchas de ellas de gran importancia biológica tales como proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y lípidos (Halliwell, 2007).

II.1.1 Ambiente oxidante

En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno (O_2) con la formación de agua sin formación de intermediarios tóxicos, mientras que un pequeño porcentaje (en torno al 5%) forman tres intermediarios altamente tóxicos, dos de los cuales son radicales libres (el anión superóxido e hidroxilo). En situaciones donde existe una mayor actividad metabólica, por ejemplo: etapas de crecimiento, desarrollo o procesos inflamatorios, ocurre una mayor demanda tisular de O_2 y parte de él se metaboliza, generándose un alto número de sustancias oxidantes. Por su parte, las células defensivas tales como los polimorfonucleares, los monocitos sensibilizados, los macrófagos y los eosinófilos; para poder cumplir su función, están integradas por diversas proteínas así como vías metabólicas que generan especies químicamente agresivas como peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo, cuyo fin es lesionar y destruir elementos extraños. En condiciones normales estas especies reactivas son producidas y utilizadas en compartimentos celulares como los lisosomas que no deben dañar a las células siempre y cuando los mecanismos antioxidantes funcionen adecuadamente. Sin embargo, un ambiente oxidante no solamente tiene un origen endógeno; la existencia de factores exógenos, como la radiación solar, toxinas fúngicas, pesticidas o xenobióticos, contribuyen a dicho fenómeno (Avello y Suwalsky, 2006).

II.1.2 Radicales libres

La mayor parte de los compuestos químicos de importancia biológica están formados por átomos unidos por enlaces covalentes. En estos enlaces, dos átomos comparten un par de electrones en un orbital molecular y cada electrón presenta una rotación o giro opuesto a su par. En las células se llevan a cabo reacciones químicas que rompen estos enlaces de manera heterolítica, haciendo que una de las partes conserve dos electrones y la otra tenga deficiencia de dos electrones, lo cual genera compuestos estables nucleofílicos o electrofílicos, respectivamente, que son conocidos como aniones y cationes. Sin embargo, algunas reacciones químicas, como las radiaciones electromagnéticas y otros factores, pueden romper estos enlaces de forma homolítica, proceso del cual cada parte conserva un solo electrón que estará desapareado, generándose así las especies químicas llamadas radicales libres (Quintanar y Calderón, 2009).

Los radicales libres son moléculas extremadamente inestables, que por su configuración electrónica de capas abiertas cuentan con, al menos, un electrón desapareado susceptible de crear un enlace con otro átomo o molécula con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido el electrón que necesita para aparear a su electrón libre, la molécula estable que pierde el electrón se oxida y deja a otro electrón desapareado, lo que la convierte a su vez en un radical libre, iniciándose y después propagándose de la misma manera, generando así una reacción en cadena (Avello y Suwalsky, 2006; Hansberg, 2008), la cual puede provocar una serie de daños a moléculas de gran importancia biológica tal como se presenta en la Figura 1.

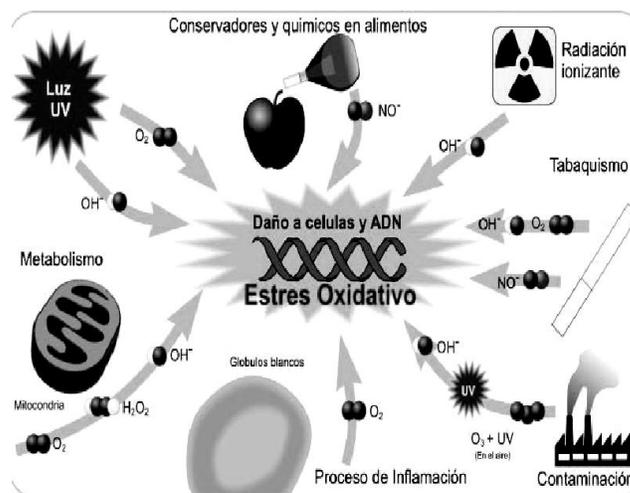


Figura 1. Formación de radicales libres y su efecto en moléculas biológicas de gran importancia.

Fuente: http://www.narvalpharma.com/pdf/radicales_libres.pdf

La vida media biológica del radical libre es de no más de microsegundos, ya que puede reaccionar rápidamente con todo lo que esté a su alrededor, pudiendo dañar macromoléculas y estructuras supramoleculares como las membranas (Quintanar y Calderón, 2009; Rendón *et al.*, 2007).

II.1.3 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Se consideran ERO al oxígeno atómico (O_2) y al ozono (O_3) que se genera con la unión del O_2 al oxígeno singlete (1O_2) que se produce con la excitación de uno de los electrones desapareados del O_2 , al superóxido ($O_2^{\cdot-}$), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al radical hidroxilo ($\cdot OH$) que son especies parcialmente reducidas. También el oxígeno forma compuestos con el nitrógeno y éstos pueden ser más reactivos que el O_2 en su estado basal de energía. Estas especies son el monóxido de nitrógeno u óxido nítrico ($NO\cdot$), el dióxido de nitrógeno ($NO_2\cdot$) y el peroxinitrito ($ONOO\cdot$), los cuales se reconocen como especies reactivas de nitrógeno (ERN).

La toxicidad de estas ERO depende de su concentración y del contexto en el que se producen, bajas concentraciones de ERO estimulan el crecimiento de las células, incluso bacterias y otros microorganismos. Finalmente, estas especies son indispensables para la diferenciación celular y la muerte celular programada (Hansberg, 2008).

II.1.3 Estrés oxidante

En las células y en los organismos en condiciones normales se mantiene un balance entre la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno con los sistemas antioxidantes; de tal manera que la toxicidad por oxidación es limitada, aún este limitado daño es parcialmente responsable del envejecimiento natural de las células y los organismos. Sin embargo, se considera que el estrés oxidante alcanza niveles patológicos cuando se rompe el balance entre ella y la eficiencia de los sistemas amortiguadores antioxidantes; lo cual se puede producir por un déficit de antioxidantes o por un incremento en la producción de las especies reactivas (Quintanar y Calderón, 2009). Algunas enfermedades inflamatorias y psicológicas, además del envejecimiento están relacionadas con este fenómeno (Gilbert y Colton, 1999).

II.1.4 Sistemas de defensa antioxidante

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de compuestos que al estar presentes en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de éste; como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas e inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar o interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes o por absorción de la radiación UV (Shahidi, 1996).

Su clasificación puede estar dada de la siguiente manera:

a) Antioxidantes exógenos

Son aquellos que provienen de la dieta, actúan neutralizando directamente a los radicales libres, por lo que su reposición debe ser continua, mediante la ingestión de los alimentos que los contienen, algunos ejemplos son la vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), β -caroteno (provitamina A), licopenos, ácidos egálicos, flavonoides (polifenoles), oligoelementos como el cobre, selenio, zinc o manganeso (Dragsted, 2008; Rendón *et al.*, 2007).

b) Antioxidantes endógenos

Son los que se encuentran dentro del organismo, entre los cuales se ubican a las enzimas con gran afinidad para catalizar con altas velocidades la reacción de reducción parcial de una especie reactiva, por ejemplo: la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 ; la glutatión peroxidasa (GPx) que es una enzima dependiente de selenio y cataliza la reducción del H_2O_2 o lipoperóxidos (L-OOH); la glutatión transferasa (GST) que cataliza el ataque nucleofílico del cosustrato glutatión reducido (GSH) sobre el centro electrófilo de un gran número de oxidantes y la catalasa (CAT) que reduce el H_2O_2 a H_2O (Blokhina *et al.*, 2003).

II.1.5 Métodos para la cuantificación de actividad antioxidante

La actividad antioxidante se puede evaluar por diversos métodos ya sea *in vitro* o *in vivo*, las principales estrategias consisten en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical en donde la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración de los compuestos antioxidantes en la muestra, además se conoce que la capacidad antioxidante depende del microambiente en que se encuentra el compuesto así como la interacción de los mismos, produciéndose efectos sinérgicos o inhibitorios (Arena *et al.*, 2001).

Con base a las reacciones químicas, la gran mayoría de los ensayos para determinar la capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías: aquellos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno y aquellos basados en la reacción por transferencia de electrones. La mayoría de los ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno se aplica en un sistema de competencia de reacción en la cual el antioxidante y el sustrato compiten por los radicales peroxilo generados térmicamente a través de la descomposición de compuestos azoicos. Estos incluyen la inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), inhibición de la oxidación del ácido linoleico y blanqueo de crocina (TEAC-crocina). Por su parte, los ensayos basados en la transferencia de electrones constan en medir la capacidad de un compuesto en reducir un agente oxidante, que cambia de color cuando lo hace, el cambio de color se correlaciona con las concentraciones de antioxidantes presentes en la muestra. Como parte de estos se incluye el contenido total de fenoles por Folin-Ciocalteu, poder de reducción del ion férrico (FRAP), atrapamiento del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), decoloración del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS^{•+}) y capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC), entre otros (Huang *et al.*, 2005). Sin embargo, los métodos más aplicados son ABTS y DPPH debido a que presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también presentan algunas diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato de potasio), enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o electroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico (Huang *et al.*, 2005).

II.2 INFLAMACIÓN

La inflamación es la respuesta biológica del cuerpo a estímulos nocivos pudiendo ser de naturaleza biológica, química, física o mecánica y en última instancia conduce a la restauración de la estructura de los tejidos y sus funciones (Girón *et al.*, 2010). La inflamación se encuentra relacionada en múltiples patologías tales como artritis, asma, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, aterosclerosis y obesidad (Morley, 2006; Raghav *et al.*, 2006; Saleem *et al.*, 2006).

Los modelos experimentales de inflamación inducida por compuestos químicos sobre la piel sirven para evaluar la actividad antiinflamatoria local de diversos compuestos sintéticos, extractos vegetales, entre otros. Estos métodos tienen la cualidad de ser rápidos, requieren pequeñas cantidades de sustancias, los resultados son reproducibles y poseen bajas posibilidades de error (Gabór, 2003). El edema como respuesta a un proceso inflamatorio inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) sobre la oreja de roedores es un modelo de inflamación local que permite evaluar sustancias con actividad antiinflamatoria. El TPA induce la respuesta inflamatoria mediante la activación de la proteína cinasa C y la consecuente estimulación de la fosfolipasa A₂, la hidrólisis del ácido araquidónico y la biosíntesis de prostaglandinas y los leucotrienos (Ouviña *et al.*, 2009). En trabajos recientes se ha demostrado que el factor de necrosis tumoral (TNF- α) también participa en el desarrollo de dicha respuesta; además de la inducción de la producción de eicosanoides. Se conoce que el TPA induce la expresión de citocinas como: interleucina 1 (IL-1), TNF- α , quimiotaxina, factor estimulante de granulocitos en los macrófagos e interleucina 6 (IL-6) en queratinocitos (Ouviña *et al.*, 2009).

II.2.1 Mediadores inflamatorios

II.2.1.1 Citocinas

Las citocinas son polipéptidos o glucoproteínas extracelulares no preformados, que se generan por medio de diversos tipos de células en la región de la lesión y por células del sistema inmunológico a través de la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos. Estos

polipéptidos influyen en la actividad, diferenciación, proliferación y supervivencia de la célula inmunológica, también regulan la producción y actividad de otras citocinas que pueden aumentar (proinflamatorias) o atenuar (antiinflamatorias) la respuesta inflamatoria.

Algunas citocinas pueden tener acciones proinflamatorias (Th1) o citocinas antiinflamatorias (Th2), de acuerdo con el microambiente en que se encuentren. Entre las consideradas proinflamatorias se ubican a las interleucinas (IL) 1, IL-2, IL-6, IL-7 y TNF- α mientras que en las antiinflamatorias se encuentran las IL-4, IL-10, IL-13 y el factor transformador de crecimiento β (Barros de Oliveira *et al.*, 2011).

II.2.1.2 Quimiocinas

Las quimiocinas son un grupo de citocinas con acción quimiotáctica y estimulación funcional sobre diversas células inflamatorias, son de naturaleza peptídica de bajo peso molecular (8.14 kDa) que se caracterizan por tener una región conservada de 4 cisteínas en grupos de dos, por ello se clasifican en subfamilias α y β . Las quimiocinas de la familia alfa tienen actividad quimiotáctica preferencial sobre granulocitos y activación selectiva de neutrófilos; en esta subfamilia se ubican la interleucina 8 (IL-8), el oncogén regulador del crecimiento (GRO/MGSA), el péptido 2 activador de neutrófilos (NAP-2), el péptido activador de neutrófilos derivados de células epiteliales (ENA-78), la proteína quimiotáctica de granulocitos-2 (GCP-2) la proteína 10 inducida por interferón (IP-10) y los factores de células estromales-1 (SDF-1); donde se ubican dos variantes SDF-1 α y SDF-1 β ; también se han demostrado que actúan sobre células T, melanocitos, células de músculo liso y macrófagos. Mientras que la subfamilia beta atrae y activa a monocitos, macrófagos y células T, pero tienen pocos efectos sobre neutrófilos. En esta subfamilia β , se ubica la proteína quimiotáctica macrofágica (MCP-1), el factor de regulación activación expresado y secretado por las células T normales (RANTES), la proteína quimiotáctica para monocitos-2 (MCP-2) y las proteínas inflamatorias macrofágica 1 alfa (MIP1- α) y 1 beta (MIP 1- β), además de la eotaxina-1, 2 y 3 (Martínez y Hernández, 1999; Sallusto y Lanzavecchia, 2000).

II.2.1.3 Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un radical libre con múltiples funciones biológicas, en cantidades fisiológicas, el NO regula el tono vascular, inhibe la agregación/adhesión plaquetaria y regula intracelularmente los efectos de aminoácidos excitatorios como el glutamato y aspartato (Kendall *et al.*, 2011). Algunos estudios indican que el NO posee efectos importantes en la función ósea celular y la presencia de inhibidores de la enzima óxido nítrico sintasa (por sus siglas en inglés NOS) actúa como regulador de la reconstrucción ósea en procesos fisiológicos o patológicos. La activación de NOS ha demostrado ser relevante en la patogénesis de enfermedades inflamatorias, dada por la ocurrencia de la activación de citocinas proinflamatorias, que ocasionan un incremento directo en la producción de NO (Moncada y Higgs, 1993; Vant Hof y Ralston, 2001).

II.2.1.4 Derivados del ácido araquidónico (Eicosanoides)

Los eicosanoides son lípidos insaturados que derivan del ácido araquidónico (AA). Dentro de los eicosanoides se incluyen prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), tromboxanos (TXs), lipoxinas (LXs) y distintos hidroxi- e hidroperoxiácidos grasos (Slater y McDonald- Gibson, 1987). Los eicosanoides participan en la regulación de diferentes procesos fisiológicos, pero también causan dolor, inflamación e hipersensibilidad. Por lo que el descubrimiento de compuestos bioactivos que puedan inhibir la síntesis de estos eicosanoides puede resultar un paso clave en la clínica de enfermedades relacionadas con la inflamación. El AA es liberado de la posición sn-2 de los fosfolípidos de membrana por acción de la fosfolipasa A2 (PLA2) activada por estímulos mecánicos, químicos, físicos o por otros mediadores.

El AA puede ser metabolizado a través de dos vías diferentes, la vía ciclooxigenasa (COX) o la vía lipoxigenasa (LOX) para dar lugar a mediadores lipídicos de la inflamación tal como se observa en la Figura 2.

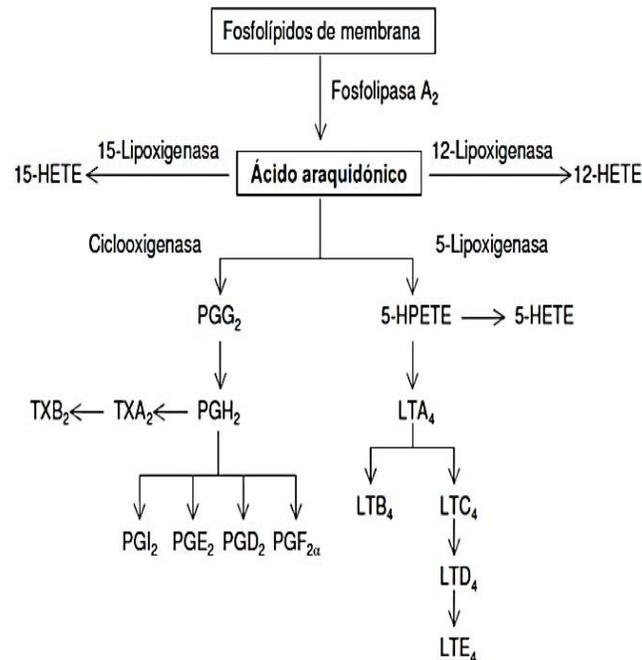


Figura 2. Síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico. Donde 15-HETE: 15-hidroxiieicosatetraenoico, 12-HETE: 12-hidroxiieicosatetraenoico, PGG₂: prostaglandina G₂, 5-HPETE: 5-hidroperoxieicosatetraenoico, 5-HETE: 5-hidroxiieicosatetraenoico, TXB₂: tromboxano B₂, TXA₂: tromboxano A₂, PGH₂: prostaglandina H₂, PGI₁: prostaglandina I₁, PGE₂: prostaglandina E₂, PGD₃: prostaglandina D₃, PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}, LTA₄: leucotrieno A₄, LTB₄: leucotrieno B₄, LTC₄: leucotrieno C₄, LTD₄: leucotrieno D₄.

Fuente: Pérez *et al.*, 1998

II.2.1.4.1 Lipooxigenasas

Las lipooxigenasas (LOX) son una familia de enzimas, entre las que se encuentra la 5-, 12- y 15-LOX, que catalizan la oxidación del AA a sus correspondientes hidroperóxidos. La 5-LOX convierte el AA en ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE), el cual se puede transformar en 5-hidroxiieicosatetraenoico (5-HETE) o en leucotrieno A₄ (LTA₄), que es el primer paso en la síntesis del resto de leucotrienos (LTs). El LTA₄ puede ser convertido en leucotrieno B₄ (LTB₄) por la enzima LTA₄-hidrolasa, o bien puede conjugarse con una molécula de glutatión (GSH) para dar leucotrieno C₄ (LTC₄) por acción de la LTC₄-hidrolasa. El LTC₄ puede sufrir modificaciones para dar lugar a los peptidil-leucotrienos: leucotrieno D₄ (LTD₄), leucotrieno E₄ (LTE₄) y leucotrieno F₄ ó sus siglas LTF₄ (Steinhilber, 1994). En la Figura 3 se puede observar la ruta descrita.

El LTB₄ es un potente estimulador de la quimiotaxis, adhesión celular, producción de anión superóxido, translocación de calcio y liberación de enzimas hidrolíticas por los leucocitos (Henderson, 1994). Los granulocitos monocitos/macrófagos, mastocitos y linfocitos B expresan la 5-LOX, mientras que plaquetas, células endoteliales, células T y eritrocitos carecen de 5-LOX (Steinhilber, 1994).

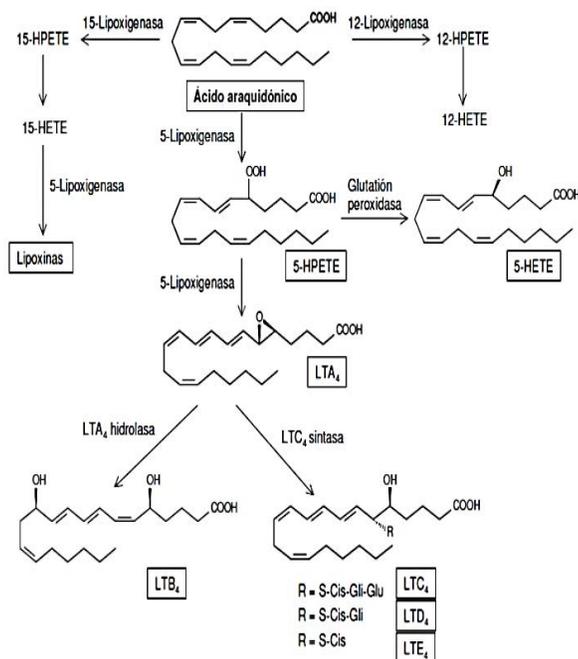


Figura 3. Síntesis de leucotrienos a partir del ácido araquidónico. Donde: 15-HPETE: 15-hidroperoxieicosatetraenoico, 15-HETE: 15-hidroxeicosatetraenoico, 12-HPETE: 12-hidroxiperoxeicosatetraenoico, 12-HETE: 12-hidroxieicosatetraenoico, 5-HETE: 5-hidroxeicosatetraenoico, 5-HPETE: 5-hidroperoxieicosatetraenoico, LTA₄: leucotrieno A₄, LTB₄: leucotrieno B₄, LTC₄: leucotrieno C₄, LTD₄: leucotrieno D₄, LTE₄: leucotrieno E₄.

Fuente: Pérez *et al.*, 1998

II.2.1.4.2 Ciclooxygenasas

Las ciclooxigenasas (COX) son un grupo de enzimas responsables de la síntesis de PGs y TXs a partir de AA. Se conoce, que los metabolitos de la COX tienen una amplia variedad de efectos fisiológicos y fisiopatológicos; existen dos formas de la COX, la isoforma constitutiva o COX-1

y la isoforma inducible o COX-2. Aunque la COX-1 se expresa en la mayoría de las células de los mamíferos bajo condiciones fisiológicas, son las células endoteliales, las plaquetas y las células tubulares del riñón las que expresan mayores cantidades de dicha isoforma en la generación de PGs (Mitchell y Warner, 1999).

La isoforma inducible o COX-2 se expresa en grandes cantidades en estados de inflamación aguda y artritis, dando lugar a la síntesis de PGs proinflamatorias. Durante la reacción inflamatoria la actividad de la COX-1 se puede incrementar de 2 a 3 veces, mientras que la actividad de la COX-2 aumenta hasta 20 veces (Frölich, 1997).

Se ha demostrado que las acciones farmacológicas de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) se deben a la inhibición de la COX-2, mientras que los efectos adversos (toxicidad gastrointestinal y nefrotoxicidad) se deben a la inhibición de la COX-1 (Needleman y Isakson, 1997; Mitchell y Warner, 1999). La COX actúa sobre el AA, transformándolo en un derivado endoperóxido (PGG₂) que a su vez se convierte en prostaglandina H₂ (PGH₂) por peroxidación. A partir de PGH₂ por acción de la tromboxano sintasa se sintetiza el TXA₂, que actúa como agregante plaquetario y vasoconstrictor, y el ácido hidroxihexadecatrienoico (HHTrE), un potente inductor endógeno de la producción de PGI₂ endotelial (Mezei *et al.*, 2000).

De la PGH₂ y por acción de varias enzimas se sintetiza PGI₂, inhibidor de la agregación plaquetaria y vasodilatador, y las PGs entre las que destaca la PGE₂ que media la producción del edema y dolor en el área inflamada, la PGF_{2a} responsable de la vaso y broncoconstricción y la PGE₁ que produce fiebre y dolor (Ammon *et al.*, 1991). Estas reacciones enzimáticas y productos secundarios se ilustran en la Figura 4.

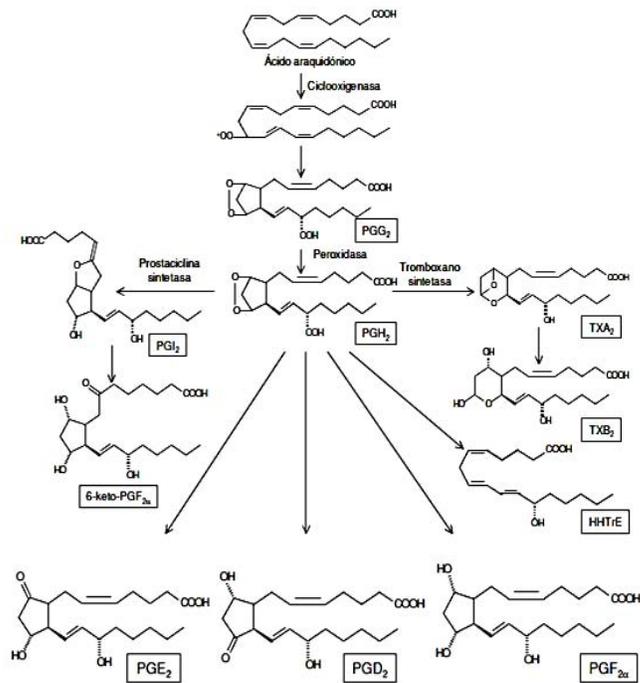


Figura 4. Síntesis de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico. Donde: PPG₂: metil ester acetato, PGI₂: prostaglandina I₂, PGH₂: prostaglandina H₂, 6 CETO PGF_{2α}: 6-ceto prostaglandina F_{2α}, TXA₂: tromboxano A₂, TXB₂: tromboxano B₂, HHTrE: 12S - hidroxí - 5Z,8E,10E-ácido heptadecatrienoico, PGE₂: prostaglandina E₂, PGD₂: prostaglandina D₂, PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}.

Fuente: Pérez *et al.*, 1998

II.2.2 Principales células presentes en la inflamación

Las células participantes en el proceso inflamatorio pueden considerarse de dos tipos; las primeras se encuentran permanentemente en los tejidos endoteliales vasculares y perivasculares, siendo los mastocitos, macrófagos, eosinófilos y fibroblastos; el segundo grupo de células son las que acceden al foco inflamatorio desde el torrente sanguíneo ubicándose a las plaquetas, neutrófilos y monocitos (Ospina, 2000).

II.2.2.1 Monocitos

Los monocitos son un tipo de leucocitos o glóbulos blancos mononucleados que se producen en la médula ósea a partir de monoblastos, circulan en el torrente sanguíneo durante tres días aproximadamente y luego se almacenan en los tejidos de todo el cuerpo; éstas células al madurar se convierten en macrófagos, los cuales participan en el control de agentes biológicos o restos celulares a través del proceso de fagocitosis (Franco, 2006).

II.2.2.2 Linfocitos

Los linfocitos son un tipo de glóbulos blancos que tienen un papel muy importante en la defensa inmunológica del organismo contra la agresión por agentes externos, se producen en la médula ósea y circulan por la sangre y los vasos linfáticos. Se dividen en dos grupos importantes, los linfocitos B (maduran en la médula ósea) y los linfocitos T (maduran en el timo); además participan en el proceso inflamatorio por medio de las moléculas que producen, entre las que ubican anticuerpos específicos para cada agente extraño y citocinas como las linfoquinas (Franco, 2006).

II.2.2.3 Mastocitos

Los mastocitos son células que se encuentran normalmente en los tejidos conectivos, derivan de las células mieloides y poseen numerosos gránulos en su interior con sustancias como histamina y heparina (Kalesnikoff y Galli, 2008; Rao y Brown, 2008). Al estar concentrados en tejidos que se encuentran en contacto con el medio externo (piel, tracto respiratorio, tubo digestivo, vías genitourinarias), son los primeros en detectar un daño tisular, lo que provoca la liberación de mediadores responsables de reclutar a los leucocitos polimorfonucleares e iniciar las respuestas características de la inflamación aguda (Kubes y Granger, 1996; Rao y Brown, 2008).

Los mastocitos pueden inducir de ésta manera la activación de células del sistema inmune como granulocitos, monocitos/macrófagos, células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK (Ferrándiz, 2003).

II.2.2.4 Leucocitos polimorfonucleares

Son las células leucocitarias más abundantes en la inflamación aguda y son las primeras células móviles en llegar al área afectada, se adhieren a las células epiteliales y atraviesan la pared de los vasos sanguíneos atraídos por el proceso de quimiotaxis (Freitas *et al.*, 2007). Existen tres tipos de leucocitos polimorfonucleares: neutrófilos, basófilos y eosinófilos; los cuales contienen lisosomas ricos de enzimas hidrolíticas muy agresivas capaces de generar una importante cantidad del anión superóxido y si su acción no se limita, estos radicales no solo son capaces de destruir el agente agresor sino también a las células normales del tejido inflamado (Franco, 2006).

II.2.2.4.1 Eosinófilo

Es un leucocito de tipo granulocito pequeño derivado de la médula ósea, se caracteriza por su núcleo bilobulado, al igual que sus distintivos gránulos citoplásmicos, son células que abundan en los tejidos epiteliales, tienen una vida media en la circulación sanguínea de 3 a 4 días antes de migrar a los tejidos en donde permanecen durante varios días. Su desarrollo en la médula ósea es estimulado por la IL-5, IL-3 y el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF). La patogénesis de la inflamación alérgica humana (en piel, ojos, nariz y pulmones) se asocia frecuentemente con la mayor presencia de eosinófilos e histamina (Goldsby *et al.*, 2004).

II.2.2.4.2 Basófilo

Los basófilos son células de 10 μm de diámetro con un núcleo en forma de “S”, se originan en la médula ósea y son los menos numerosos ya que constituyen sólo el 0.5% del total de leucocitos; al activarse y pasar a los tejidos se les llaman células cebadas o mastocitos. Además tienen una activa participación en la respuesta inmunitaria, a través de la liberación de histamina, serotonina en bajas concentraciones, proteoglicanos (heparina y condroitina) y algunas enzimas proteolíticas como la elastasa y las fosfolipasas (Goldsby, 2004).

II.2.2.4.3 Neutrófilos

Los neutrófilos son glóbulos blancos de tipo granulocito, miden de 12 a 18 μm y es el leucocito más abundante en la sangre humana (60 a 75%), se denominan neutrófilos debido a que no se tiñen con colorantes ácidos ni básicos (Costa *et al.*, 2005), son un componente central del proceso inflamatorio teniendo la habilidad para migrar hacia el sitio de la inflamación para liberar productos tóxicos tales como enzimas proteolíticas, ERO's y proteínas catiónicas capaces de destruir los patógenos invasores (Daniel y Van Dyke, 1996). Los blancos del neutrófilo incluyen bacterias, hongos, virus, células infectadas por virus y células tumorales (Erzsébet y Mócsai, 1999). Los neutrófilos son la primera línea de defensa entre todos los elementos celulares implicados en la reacción inflamatoria frente al ataque por microorganismos a los cuales fagocitan, destruyen y digieren, también son capaces de destruir células tisulares y organismos mayores convenientemente opsonizados (Ospina, 2000).

Aunque la respuesta del neutrófilo para estimular diferentes condiciones y agentes patógenos es generalmente beneficiosa para la defensa del huésped, pueden ser perjudiciales para el organismo si estas células son inadecuadamente activadas. En este sentido, la sobreproducción de radicales libres y enzimas proteolíticas usadas como defensa contra bacterias y microorganismos pueden ser altamente tóxicos para células y tejidos (Pelletier *et al.*, 2001).

II.2.3 Mieloperoxidasa (MPO)

La MPO es una enzima ampliamente distribuida en el organismo y sus fuentes fundamentales las constituyen los leucocitos (neutrófilos y monocitos) y los macrófagos, no obstante las fuentes más empleadas son los neutrófilos, donde la enzima se encuentra localizada a nivel lisosomal, en los gránulos azurófilos. Constituye del 2-5% del total de las proteínas del neutrófilo, con una concentración en la sangre humana normal aproximadamente de 1nM (Svensson y Linduall, 1988). La MPO es sintetizada como un precursor durante la diferenciación mieloide en la médula ósea y su proceso se completa antes de que los polimorfonucleares se incorporen a la circulación, durante la activación y desgranulación celular, es liberada tanto en vacuolas fagocíticas como directamente al espacio extracelular; el papel esencial de la enzima es actuar como componente de la respuesta inmune innata a la invasión de agentes extraños (Daugherty *et al.*, 1994).

Se acepta que el nivel de actividad de la MPO está directamente relacionado con la concentración de neutrófilos en el tejido inflamado; por lo que la medición de esta actividad enzimática se ha considerado un sensible marcador cuantitativo de la quimiotaxis e infiltración de neutrófilos en el proceso inflamatorio y también se considera como un indicativo de estrés oxidante (Moutaery, 2005; Cheng *et al.*, 2006; Koxsel *et al.*, 2006).

Cabe mencionar que esta enzima utiliza el H_2O_2 generado tras la activación del neutrófilo para oxidar los iones Cl^- presentes en el medio y dar lugar al ácido hipocloroso (HOCl), un potente agente oxidante al cual se le atribuye la capacidad bactericida del neutrófilo, ya que es capaz de dañar estructuras proteicas y de reaccionar con los ácidos grasos insaturados originando la desestabilización de las membranas celulares (Ospina, 2000).

II.3 COMPUESTOS BIOACTIVOS (CB)

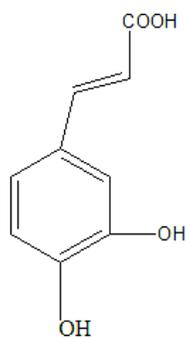
De acuerdo a Bernhoft (2010) los compuestos bioactivos o fitoquímicos en las plantas se definen como metabolitos secundarios que pueden provocar ciertos efectos farmacológicos y toxicológicos en el hombre y los animales. Son productos asociados a las rutas metabólicas de su

crecimiento y desarrollo; aunque sus funciones no se conocen completamente, se dice que la mayoría cumplen funciones de defensa contra depredadores y patógenos. Estas moléculas inhiben el desarrollo de insectos (Stamp *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999), nemátodos (Blum, 1996), hongos (Oliva *et al.*, 1999) y bacterias (Grayer y Harborne, 1994), mejorando el crecimiento de la planta, también actúan como protectores de radiaciones UV. De los compuestos distribuidos en las plantas; los fenoles y los terpenos son los más abundantes, solo una tercera parte de las especies contienen metabolitos basados en el nitrógeno como los alcaloides (Harborne, 1991). Los CB pueden clasificarse en: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos, curcuminoides, saponinas y terpenos; algunos de ellos con propiedades antibacteriales, antivirales, fungicidas, antioxidantes y antiinflamatorias, entre otras (Manach *et al.*, 2004; Valares, 2011).

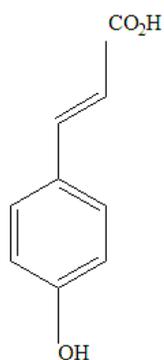
II.3.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles están ampliamente distribuidos en las plantas, su importancia radica en que producen soporte y contribuyen a las propiedades organolépticas de frutas y hortalizas, tales como el color, astringencia, sabor y aroma (Strack, 1997). Las propiedades biológicas de los polifenoles son diversas, presentan actividad como antibacterianos, antiinflamatorios, antialérgicos, hepatoprotectores, antivirales, anticarcinogénicos y vasodilatadores (Middleton *et al.*, 2000), las cuales están atribuidas a su capacidad de secuestrar radicales libres y de manera indirecta como quelantes de iones metálicos pro-oxidantes. La capacidad antioxidante de los polifenoles depende de su estructura, principalmente del grado de hidroxilación de los anillos aromáticos y de la posición de los grupos hidroxilo (Mattila y Kumpulainen, 2002).

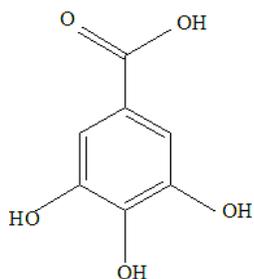
Las diferentes clases y subclases de este tipo de compuestos se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales unidos a estos anillos, los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos y flavonoides (Blasa *et al.*, 2010)



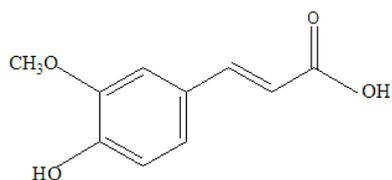
Ácido cafeico



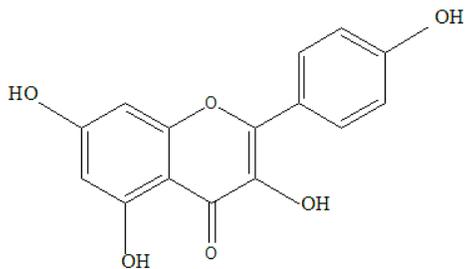
Ácido p-cumárico



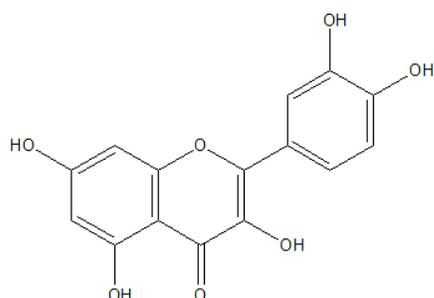
Ácido gálico



Ácido ferúlico



Kaempferol



Quercetina

Figura 5. Ejemplos de compuestos pertenecientes al grupo de ácidos fenólicos y flavonoides
Fuente: Imágenes generadas por el autor (ChemDraw)

II.3.2 Terpenos

Los terpenos son de los grupos más extensos y químicamente diversos de productos naturales, principalmente se encuentran en aceites esenciales, resinas y oleorresinas, se originan por la polimerización enzimática de dos o más unidades de isopreno, ensambladas y modificadas de muchas maneras diferentes, por oxidación o reorganización del esqueleto hidrocarbonado, suelen denominarse terpenoides (como la vitamina A o retinol, que contiene un átomo de oxígeno), su nomenclatura refleja el número de unidades de isopreno presentes en su estructura, algunos ejemplos se presenta en el Cuadro 1, dentro de sus funciones en las plantas destaca la parte hormonal, además pueden actuar como pigmentos fotosintéticos o como componentes de la pared celular (Mc Garvey y Croteau, 1995), además algunos terpenos actúan como atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas (Harborne, 1991).

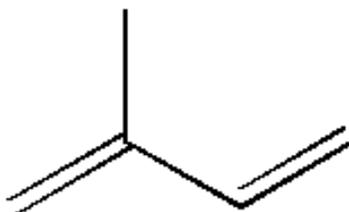


Figura 6. Estructura química del isopreno, unidad fundamental de los terpenos.
Fuente: Imagen generada por el autor (ChemDraw)

Algunos de los principales ejemplos de monoterpenos son el terpinen-4-ol, tuyona, alcanfor, eucalipto y mentol, para los diterpenos se consideran las resinas y el taxol, los triterpenos incluyen esteroides, esterol y glucósidos con actividad antiinflamatoria, sedante, insecticida o citotóxica, los más comunes son las amirinas y el ácido usólico, finalmente los sesquiterpenos actúan como irritantes cuando se aplica externamente (Firm, 2010).

Cuadro 1. Clasificación de los terpenos de acuerdo a su estructura química
(Hernández *et al.*, 2012).

Tipo de terpenoide	Número de átomos de carbono	Número de unidades de isopreno	Ejemplo
Monoterpeno	10	2	Limoneno
Sesquiterpeno	15	3	Artemisinina
Diterpeno	20	4	Coleonol
Triterpeno	30	6	α -amirina
Tetraterpeno	40	8	β -caroteno

II.3.3 Fitoesteroles y fitoestanoles

Los fitoesteroles y los fitoestanoles (formas reducidas de los fitoesteroles) son esteroides de origen vegetal cuya estructura química es muy similar a la del colesterol. Sin embargo, los fitoesteroles difieren estructuralmente del colesterol (que posee 27 carbonos, C₂₇) por la presencia de sustituyentes de tipo metilo o etilo en la cadena lateral de la molécula (Salen *et al.*, 1979). Los fitoesteroles son particularmente abundantes en el reino vegetal, están presentes en los frutos, semillas, hojas y tallos de prácticamente todos los vegetales conocidos, si bien los fitoesteroles químicamente identificados suman más de 25 estructuras diferentes, son tres los más abundantes [α -sitosterol (C₂₉), campesterol (C₂₈) y stigmasterol (C₂₉)], quienes en su conjunto constituyen el 95-98% de los fitoesteroles identificables en extractos vegetales (Ling y Jones, 1995).

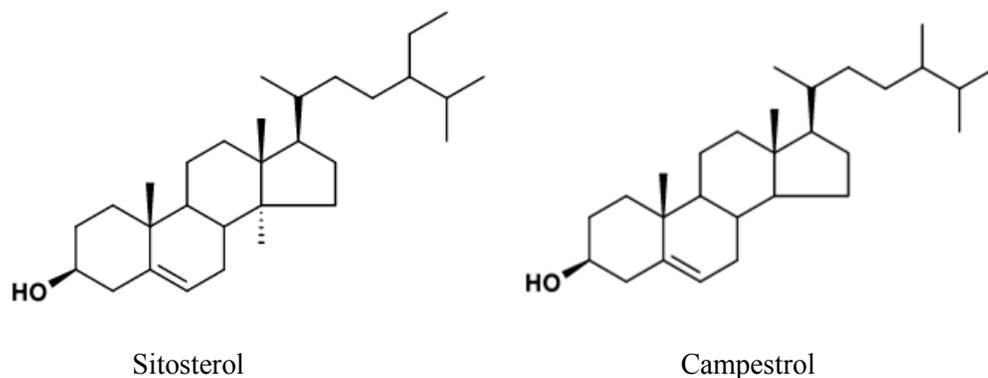


Figura 7. Ejemplos de fitoesteroles y fitoestanoles.
Fuente: Imágenes generadas por el autor (ChemDraw)

II.4 TECNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS.

El proceso cromatográfico consiste en la separación de los componentes de una mezcla, la cual, es disuelta en una fase móvil; ésta es impulsada a través de una fase inmóvil o fase estacionaria, que puede ser sólida o líquida (cromatografía líquido-sólido o cromatografía líquido-líquido). Las fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra presenten diferencias en sus propiedades físico-químicas (solubilidad, tamaño, fuerza iónica, polaridad y afinidad) para cada fase. Las interacciones químicas entre la fase móvil y la muestra, y entre la muestra y la fase estacionaria, determinan el grado de migración y separación de los compuestos. Un componente que interactúe más con la fase estacionaria realizará una elución más larga a través de ella que otro componente que tenga más interacción con la fase móvil; como resultado de estas diferencias en la movilidad de los componentes de una muestra estos se separarán uno de otro (Hernández, 2005).

II.4.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina (TLC del inglés thin layer chromatography) es una técnica analítica rápida y sencilla, muy utilizada en los laboratorios de Química Orgánica, la cual permite determinar el grado de pureza de un compuesto, comparar muestras o realizar el seguimiento de una reacción. La muestra a analizar se deposita cerca de un extremo de una lámina de plástico o aluminio que previamente ha sido recubierta de una fina capa de adsorbente (fase estacionaria) pudiendo ser gel de sílice (SiO_2) o la alúmina (Al_2O_3), dicha lamina se coloca dentro de una cámara de elución que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil, la cual puede variar de polaridad dependiendo de los compuestos que se deseen separar). A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente.

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como R_f , y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones

cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.). Para calcular el Rf se aplica la siguiente expresión:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el eluyente}}$$

Finalmente, las placas deben ser reveladas, aunque la mayoría de ellas llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm) puede requerirse de un agente revelador, el cual tiene que reaccionar con los productos adsorbidos proporcionando compuestos coloreados (Angurell *et al.*, 2015).

II.4.2 Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)

En la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) la muestra es inyectada junto con la fase móvil y es transportada a través de una columna por el flujo continuo de fase móvil a alta presión. La fase estacionaria está formada por partículas de pequeño diámetro contenidas en la columna; la velocidad a la que un analito se mueve a través de la columna, con respecto a los demás presentes en la mezcla, está determinada por el tiempo que permanece en la fase móvil.

El HPLC se puede utilizar como técnica preparativa y técnica analítica, permitiendo la purificación, identificación y cuantificación de un analito. La elección de la fase estacionaria y la fase móvil, el flujo al que se va a impulsar la fase móvil a través de la fase estacionaria e incluso la temperatura a la que se va a realizar la cromatografía, permitirán una correcta separación del analito de otros compuestos. Para identificar compuestos se debe seleccionar un sistema de detección que determine las diferentes propiedades físico-químicas de la molécula; es importante el tipo de separación y la naturaleza de la detección, la cual puede ser absorbancia, conductividad, fluorescencia, relación masa/carga, etc (Hernández, 2005). En la HPLC, la fase móvil eluye de la columna durante un tiempo determinado conteniendo cantidades muy diferentes de solutos que pasan a través de un sistema de detección, el instrumento detecta la presencia del soluto que es convertida en una señal eléctrica y ésta puede ser tratada por un procesador de datos. Se representa la señal obtenida frente al tiempo o al volumen de elución, y al

gráfico obtenido se le conoce como cromatograma. Los solutos se representan gráficamente como una serie de picos que pueden identificarse por su anchura, altura o área. Para la cuantificación de compuestos se utiliza la señal del detector haciendo que sea proporcional a la cantidad o a la concentración inyectada de analito. Es preciso realizar previamente una curva de calibración para establecer el factor de respuesta como la pendiente de la medida del detector frente a las concentraciones de los calibradores. Para ello se realiza la inyección de una serie de soluciones del compuesto con concentraciones conocidas para su detección, los cromatogramas obtenidos muestran una serie de picos cuyas áreas se correlacionan con la concentración del compuesto inyectado (Hernández, 2005).



Figura 8. Sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
Fuente: Fotografía generada por el autor

II.5 *Acacia farnesiana* (L.) Willd. (1806)

El género *Acacia* es el segundo más grande de la familia de las leguminosas, cuenta con aproximadamente 1350 especies ampliamente distribuidas en el mundo, la mayor abundancia de éste género se encuentra en Australia con 957 especies, seguida de América con 185, África con 144 y Asia con 89 (Maslin *et al.*, 2003).

La especie *Acacia farnesiana* o comúnmente conocida como Huizache, Aromo, Espino o Espino blanco se presenta como un arbusto espinoso de 1 a 2 m de altura con hojas bipinadas, alternas y frecuentemente aglomeradas en las axilas de cada par de espinas, las cuales tienen 4.5 cm de largo y son muy aguzadas, los tallos rígidos y fuertes, la corteza es lisa de color castaño oscuro con un marcado olor azufrado, las flores se presentan en cabezuelas de color amarillo, originadas en las axilas de las espinas, solitarias o en grupos de 2 a 3; con un aroma agradable; por lo general se desarrolla a orillas de caminos, arroyos, parcelas abandonadas, terrenos con disturbio o sitios ruderales; prospera en una gran variedad de suelos desde muy arcilloso hasta muy arenoso. En América, esta especie se encuentra distribuida desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina (Gómez *et al.*, 1970; Rojas-Rodríguez y Torres- Córdoba, 2012).

En México se distribuye en la vertiente del pacífico, desde el sur de Sonora hasta Chiapas, y de forma discontinua en la vertiente atlántica, principalmente en el bosque tropical caducifolio, en climas cálidos y semicálidos; el follaje y las vainas se aprovechan como alimento para ganado caprino en las regiones áridas de México así como en la medicina popular para el tratamiento de diferentes enfermedades como: hipoglucémicante, cestocida, antibacterial, antioxidante, antiinflamatorio, antihipertensivo, antiviral y antiespasmódico, además son utilizadas como adhesivo, aromatizante, leña, sombra, cercos vivos, etc (Rzedowski, 1988).



Figura 9. Arbusto de *Acacia farnesiana* (Acatlán de Osorio, Puebla, México, Marzo 2015).
Fuente: Fotografía generada por el autor

II.5.1 Características geográficas y climatológicas de la Mixteca Poblana

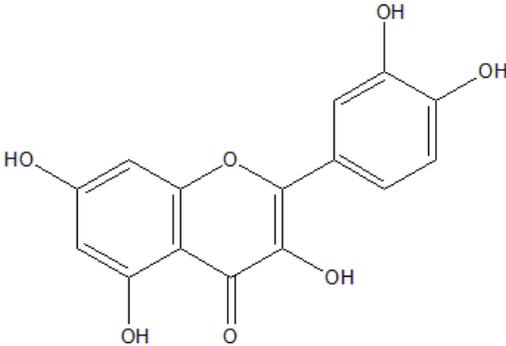
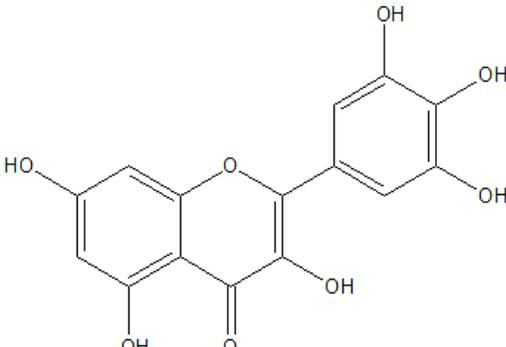
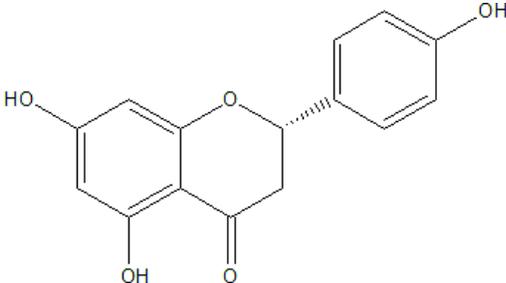
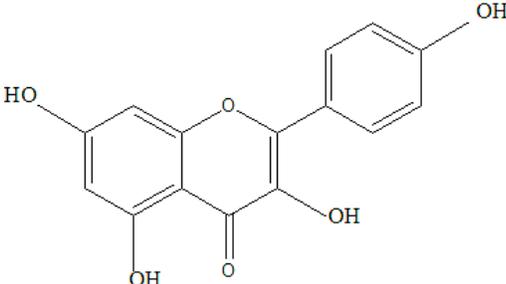
La región Mixteca abarca una superficie de 34 869 km², incluye parte de los estados de Guerrero, Oaxaca y Puebla, situados al sur del país. Del total de la superficie, la Mixteca Poblana abarca 11 025 km² lo cual representa 32.5% de la superficie total del estado, presenta terrenos accidentados y altitudes variadas que van de los 700 a los 2000 msnm (Gómez *et al.*, 1996). La hidrografía está abastecida por la cuenca del río Atoyac. El suelo está integrado por fluvisoles, vertisoles, rendzinas, litosoles y luvisoles; el clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano y semiseco muy cálido, con precipitaciones pluviales que oscilan de los 350 a los 800 mm, con una temperatura promedio de 23°C. La flora dominante la constituye la selva baja caducifolia; selva baja caducifolia espinosa; vegetación xerófila; matorral con izotes; vegetación secundaria en transición y pequeñas áreas de bosque de encino y pastizales. La fauna se integra por venado, coyote, zorrillo, armadillo, iguanas, camaleón y serpiente de cascabel entre las principales especies (Guizar y Sánchez, 1991; INEGI, 2000).

Actividades como la producción vegetal, el tejido de palma, la ganadería y actualmente el cultivo del agave mezcalero, son los recursos con alto potencial económico para las familias de la región Mixteca (Mora, 1987; INEGI, 2000; Ibarra, 2002).

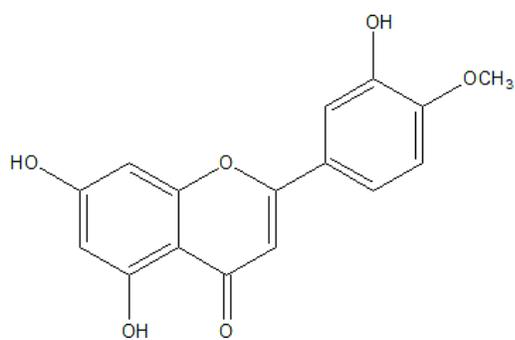
II.5.2 Fitoquímicos en las *Acacias*

En la literatura se han descrito varios grupos de metabolitos secundarios obtenidos del género *Acacia* como aminos, alcaloides, aceites esenciales, aminoácidos no protéicos, cumarinas, diterpenos, ácidos grasos (palmítico, linoleico, oleico, esteárico escualeno, mirístico), triterpenos, fitoesteroles, saponinas, flavonoides, gomas, taninos hidrolizables y condensados (Seigler, 2003). En el Cuadro 2, se presentan algunos de los compuestos identificados para ésta especie.

Cuadro 2. Compuestos bioactivos reportados para el género *Acacia*

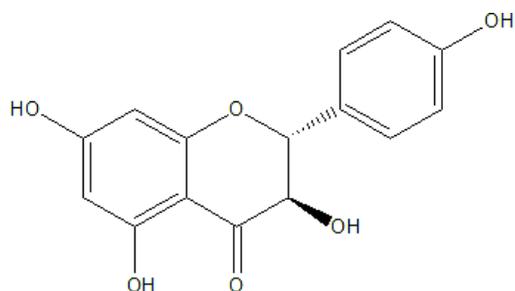
Nombre del compuesto	Estructura química	Referencia
Quercetina		Barakat et al., 1999
Miricetina		
Naringenina		
Kaempferol		

Diosmetina



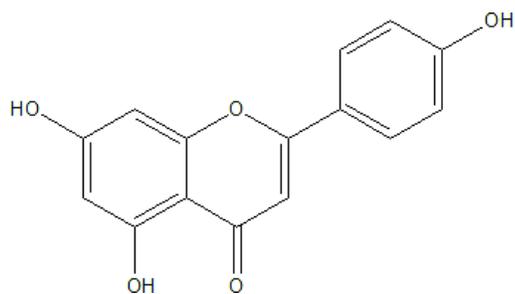
Sahu *et al.*, 1998

Aromadendrina



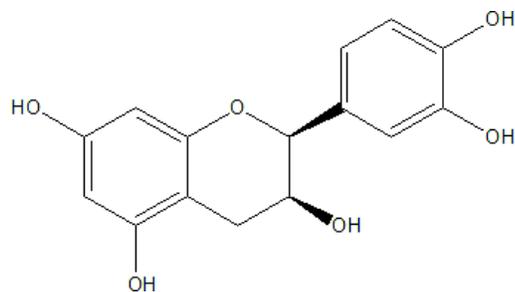
El Sissi *et al.*, 1973

Apigenina



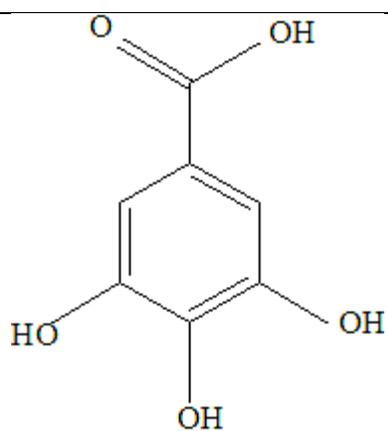
Thieme y Khogali,
1974

Catequina



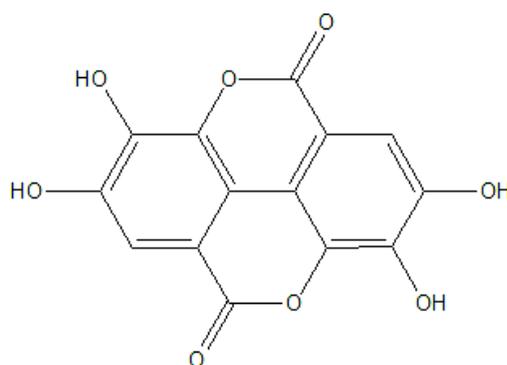
Hussein *et al.*, 2002

Acido gálico

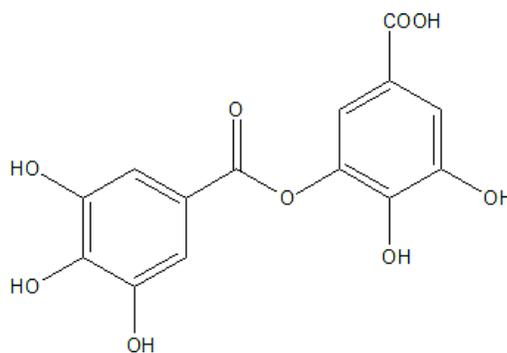


El Sissi *et al.*, 1973

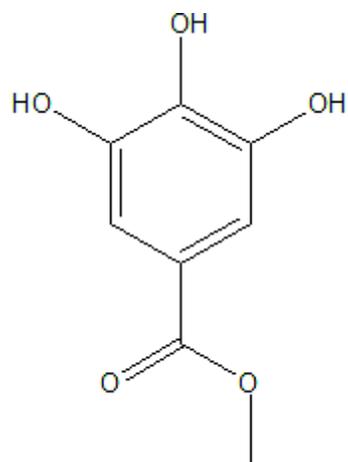
Acido elágico



Acido m-digálico

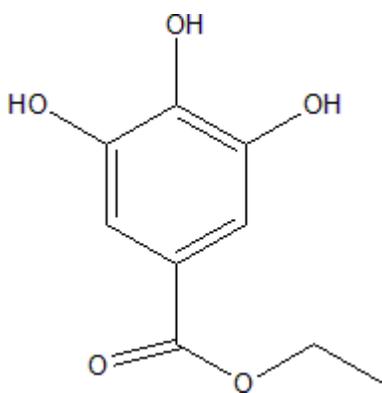


Metil -galato



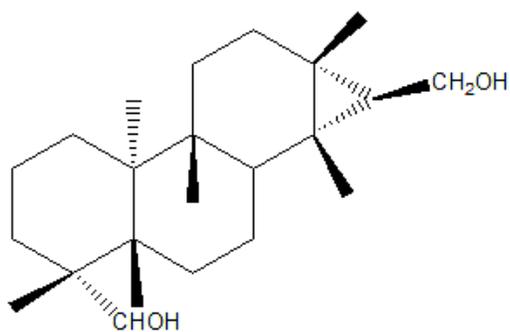
Sánchez *et al.*, 2013

Etil- galato



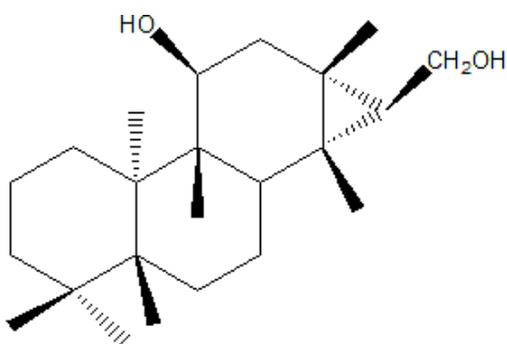
Wassel *et al.*, 1990

Acasiane A

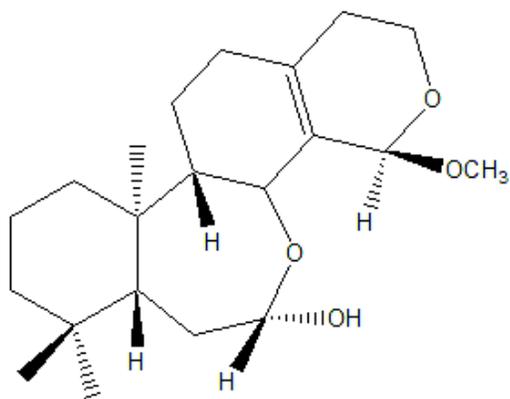


Lin *et al.*, 2009

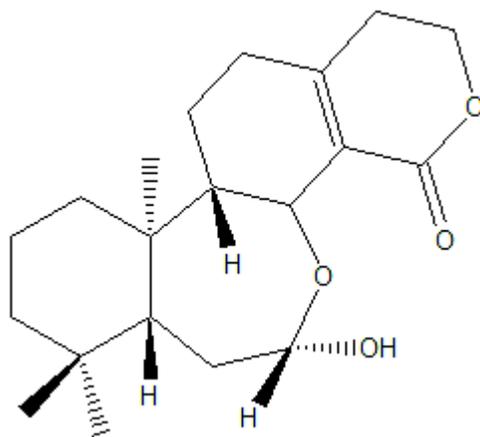
Acasiane B



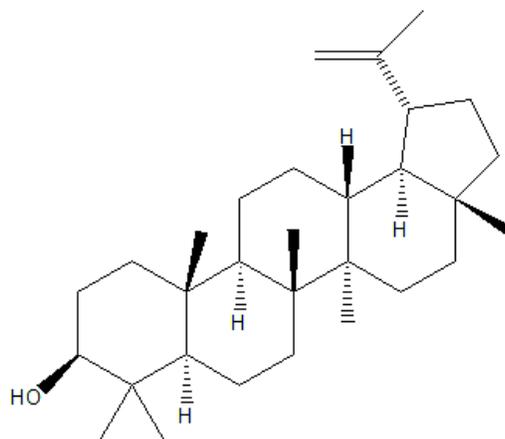
Farnesirane A



Farnesirane B

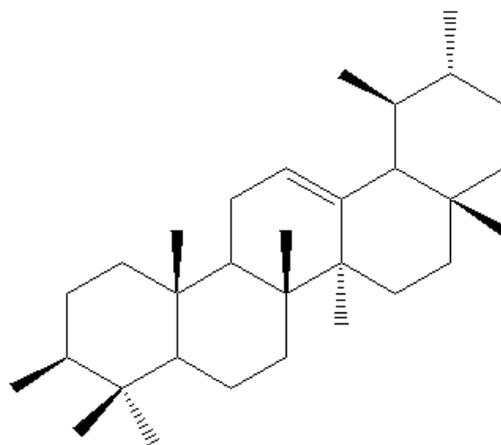


Lupeol

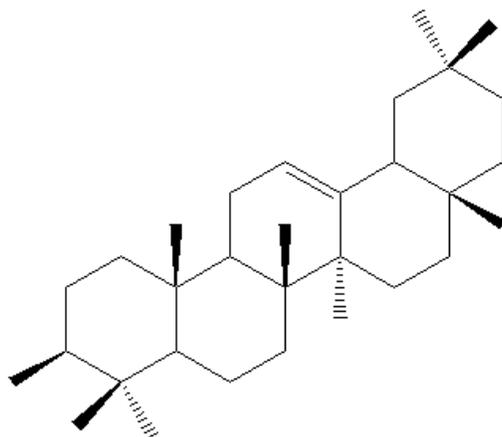


Pedernera *et al.*, 2010

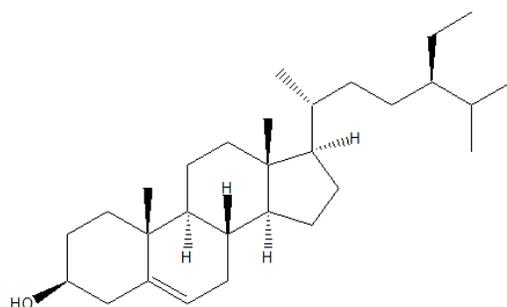
α -amirina



β -amirina

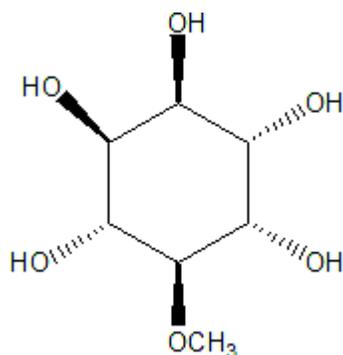


β -sitosterol



Dominguez, y Farias,
1967

Pinitol



Abrantes *et al.*, 2013

En estudios previos realizados en una regi3n del semi3rido Mexicano se identificaron y evaluaron 25 especies vegetales consumidas por caprinos en pastoreo, encontr3ndose concentraciones significativas de compuestos bioactivos en algunos g3neros, destac3ndose los frutos de *Acacia farnesiana* (frutos) y *Acacia schaffneri* (hojas, tallos, flores y frutos) los cuales presentaron una

actividad antioxidante cualitativa y cuantitativa muy alta; con un contenido de polifenoles totales de 38.2 y 2.7 g de equivalentes de ácido gálico/kg materia seca, respectivamente (Cuchillo *et al.*, 2013). Por su parte, Barranco (2010) encontró ácidos hidroxicinámicos (93.6 mg/100g de muestra) y flavonoides (207.1 mg/100 g de muestra) en los frutos de AF. Dentro de los ácidos hidroxicinámicos se encontró como mayoritario al ácido gálico y dentro de los flavonoides a la quercetina. Ramli *et al.* (2011) realizaron una evaluación de la raíz de AF, logrando el aislamiento de diterpenos y flavonoides como: galoil glucósido, glucósidos de flavonoides, quercetina, miricetina y kaempferol. Por otra parte, en *Acacia karroo* se ubicaron compuestos fenólicos como proantocianidinas y algunos flavonoides (Adedapo *et al.*, 2008).

II.5.3 Actividad biológica de las Acacias

El género *Acacia* ha sido reportado como un recurso para el tratamiento de diversas enfermedades, entre las que se encuentran: efecto hipoglucemiante (Wadud *et al.*, 1989), actividad antiinflamatoria (Dafallah y Al-Mustafa, 1996), efectos antibacteriales (Sotohy *et al.*, 1997), acciones espasmogénicas y vasoconstrictoras (Amos *et al.*, 1999), actividad antioxidante (Chang *et al.*, 2001), entre otros. Feregrino-Pérez *et al.*, (2011) obtuvieron un extracto metanólico de las vainas de *Acacia pennatula*, el cual presentó capacidad antioxidante significativa por ensayos de DPPH, ABTS y método FRAP, atribuyéndole la actividad biológica a compuestos como ácido gálico y catequina los cuales fueron identificados y cuantificados previamente, concluyeron que los compuestos fenólicos contenidos en dicho extracto mostraron actividad biológica con un potencial de aplicación muy alta.

Por su parte, Singh *et al.*, (2008) identificaron kaempferol por espectroscopía de resonancia magnética nuclear y masas de un extracto de *Acacia nilotica*, demostraron que dicho compuesto tenía potencial antioxidante mediante ensayos *in vitro* de DPPH, degradación de desoxirribosa y actividad quelante de metales, concluyeron que el efecto del compuesto era dependiente de la concentración en un rango de 1–50 µg/ml en ensayos de DPPH y 1–100 µg/ml en ensayos de degradación de desoxirribosa. En otro estudio realizado por Pedernera *et al.*, (2010) los extractos acuosos y orgánicos de las hojas de *Acacia visco* revelaron tener efectos antiinflamatorios contra

el edema inducido por carragenina, los compuestos caracterizados de los extractos fueron lupeol, α -amirina y β -amirina, los cuales pudieron ser los principales responsables de la actividad farmacológica.

Dongmo y su grupo de colaboradores (2005) realizaron ensayos para determinar la actividad analgésicas y antiinflamatoria de la fracción butanólica de hojas secas de *Acacia pennata* en modelos animales, se mostraron efectos protectores significativos frente a estímulos químicos como ácido acético y formalina en el ratón, se produjo un aumento significativo del umbral de sensibilidad al dolor inducida por la presión y un efecto inhibitorio al edema inducido por carragenina en las ratas, entre los compuestos caracterizados en esta fracción destacaron los flavonoides, pudiendo ser principalmente los responsables de sus resultados. En otro estudio, se identificó y aisló a metil galato de la corteza de AF, reportándose una potente actividad antimicrobiana frente a *Vibrio cholera* (Sánchez *et al.*, 2013).

Por otra parte, *Acacia karroo* es rica en compuestos fenólicos como proantocianidinas y flavonoides, un extracto de ésta *Acacia* en concentraciones de 100 y 200 mg/kg redujo la formación de edema inducido por carragenina e histamina. La inflamación aguda, como el edema inducido por carragenina, implica la síntesis o liberación de mediadores en el sitio de la lesión (prostaglandinas, especialmente de la serie E, histamina, leucotrienos, bradiquininas y serotonina), causantes de dolor y fiebre (Adedapo, 2007). Manríquez-Torres *et al.* (2012) por su parte, reportaron la presencia de importantes compuestos bioactivos: β -sitosterol, estigmasterol, 3-O- β -D-glucósido de β -sitosterol, 3-O- β -D-glucósido de estigmasterol, lupenona, taraxerona, apigenina, luteolina, quercetina, ácido gálico, galato de metilo y ácido salicílico, además de aislar proacacipetalin, escualeno, (+)-pinitol y los ácidos palmítico, linoleico, oleico, esteárico y mirístico de las hojas de *Acacia cochliacantha*.

Finalmente Tung y colaboradores (2009) evaluaron la actividad antioxidante de la corteza de *Acacia confusa* y algunos compuestos aislados en diferentes extractos, los resultados obtenidos mostraron que el extracto etilacetato y fotoquímicos derivados de la corteza de ésta especie tienen una gran capacidad de atrapamiento del radical superóxido pudiendo actuar con un agente antioxidante natural.

III. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de diferentes extractos provenientes de los frutos de *Acacia farnesiana* (FAF).

PARTICULARES

1. Identificar y cuantificar los posibles compuestos presentes en los extractos: hexánico, clorofórmico, acetónico, metanólico, metanólico: acuoso (80:20) y acuoso, provenientes de los FAF por CCF y HPLC.
2. Determinar la actividad antioxidante de los extractos: hexánico, clorofórmico, acetónico, metanólico, metanólico:acuoso (80:20) y acuoso, provenientes de los FAF por la cuantificación de la inhibición de ERO's en células LLC-PK1 debido a la inducción de estrés oxidante con H₂O₂.
3. Determinar la actividad antiinflamatoria de los extractos: hexánico, clorofórmico, acetónico, metanólico, metanólico: acuoso (80:20) y acuoso, provenientes de los FAF en el ratón CD-1 por la inducción del edema auricular con TPA.
4. Determinar la actividad de la enzima MPO en el edema auricular del ratón CD-1 inducido con TPA.

IV. JUSTIFICACIÓN

El género *Acacia* es el segundo más grande de la familia de las leguminosas, cuenta con aproximadamente 1200 especies, entre las cuales destaca *Acacia farnesiana*, ésta especie se encuentra ampliamente distribuida en los trópicos del mundo y es utilizada en la medicina tradicional, además, en poblaciones rurales se considera como un importante recurso forrajero para el ganado caprino principalmente. En la actualidad, el interés por sustancias de origen natural ha incrementado de manera exponencial; en diferentes estudios se ha descrito la presencia de compuestos en las plantas que están relacionados con la actividad antioxidante y antiinflamatoria. Es por ello, que se ha considerado aprovechar el recurso vegetal para profundizar en su estudio y así, contribuir con información acerca de los compuestos presentes en los frutos y mayores evidencias científicas sobre las propiedades biológicas antioxidantes y antiinflamatorias. Además, se sabe que muchas de las enfermedades que se presentan en la población mexicana están relacionadas directamente con el proceso de oxidación celular y el proceso inflamatorio, por lo cual ésta investigación es una opción viable para la búsqueda de nuevas alternativas naturales que puedan participar en la modulación de ambos procesos, cabe mencionar que se hace un enfoque en la utilización de líneas celulares y modelos animales.

V. HIPÓTESIS

La inhibición de especies reactivas de oxígeno así como la inhibición de edema por los extractos provenientes de los frutos de *Acacia farnesiana* dependerá del tipo de compuestos presentes y la respuesta será proporcional a la concentración utilizada.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Equipo

Se utilizó una estufa de flujo atmosférico (Apex, A39092), molino de cuchillas (Thomas Scientific, 174931), sonicador (Branson, 3510-DTH), rotavapor Büchi (Büchi Helating Bath, B490), HPLC 1260 Infinity integrado con un automuestreador 1200 (Cat. G1329B), bomba cuaternaria de fase reversa (Qual Pump 1260, G1311B), detector de absorbancia (Dione array detector 1260, G4212B), columna (Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm, 5 μ m, Cat. B14011), software (Chem Station Edition 1.06, 2001-2014) de Agilent Technologies®, incubadora (NT-AIRE-5820), microscopio de epifluorescencia (Nikon Ds-Fi1), centrífuga (Eppendorf, 5415R) y un lector de placas (BioTek, Synergy-HT).

VI.2 Disolventes y reactivos

Los siguientes compuestos se obtuvieron de Sigma Aldrich Co. (St Louis, MO, EUA): 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Cat. T2885), ácido acético (Cat. 320099), ácido cafeico (Cat. 0625), ácido cinámico (Cat. 128708), ácido gálico (Cat. G7384), bromuro de hexadeciltrimetil amonio (Cat. H-6269), campesterol (Cat. C5157), catequina (Cat. C1251), cloroformo (Cat. 288306), dimetilsulfóxido (Cat. D5879), epicatequina (Cat. E1753), peróxido de hidrógeno (Cat. H-1009), ácido sulfúrico (Cat. 320501), indometacina (Cat. I8280), kaempferol (Cat. Q01333), N, N-dimetilformamida (Cat. 154814), quercetina (Cat. Q0125), stigmasterol (Cat. 52425), 12-O-tetradecanoilforbol acetato (Cat. P8139), β -sitosterol (Cat. S1270), sulfato cérico de amonio (Cat. C9651) y lupeol (Cat. L5632). Los estándares α y β -amirina se aislaron en el laboratorio 321 del Conjunto E (UNAM, México). La acetona (Cat. 9006-03), etanol (Cat. 9000-03) y metanol (Cat. 9049-03) se obtuvieron de J.T.Baker (St Louis, MO, EUA). El agua destilada (Cat. 0345), cloroformo (Cat. 1480), diclorometano (Cat. 1725), hexano, (Cat. 1480) y metanol (Cat. 0410) se obtuvieron de Reactivos Química Meyer® (Ciudad de México, México). El acetato de etilo (Cat. 141-78-6) se obtuvo de Distribuidora Química Alvi (Ciudad de México, México), la mezcla comercial de esteroides (Cat. A313) se compró de Nature Made® (EUA), el pentobarbital sódico

se compró de PiSA agropecuaria® (Hidalgo, México) y finalmente la 6-carboxy-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (Cat. C-400) se obtuvo de Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, EUA).

VI.4 Material vegetal

Los FAF que se utilizaron para el presente trabajo de investigación se recolectaron manualmente durante el mes de marzo del 2015 (época de estiaje) dentro del agostadero del rancho “Las Espinas”, situado en Acatlán de Osorio, Puebla, México, ubicado entre los paralelos 18° 04' 24" y 18° 21' 30" de latitud norte y los meridianos 97° 55' 18" y 98° 11' 24" de longitud occidental tal como se observa en la Figura 10. Los frutos se almacenaron en bolsas de papel protegiéndose de la luz y permitiendo su aireación durante el traslado al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ); una vez llegada la muestra a la institución, se sometió a un proceso de secado durante 48 horas a una temperatura controlada de 45°C utilizando una estufa de flujo atmosférico. Una vez secos los frutos, fueron molidos empleando un molino de cuchillas y tamizados a un tamaño de partícula de 1 mm. Finalmente se almacenaron en bolsas de papel en un lugar seco resguardándose de la luz.



Figura 10. Ubicación de la zona de colecta del material vegetal
Fuente: www.inafed.gob.mx

VI.5 Obtención de los extractos de los FAF

Para la obtención de los extractos, los frutos secos y molidos de AF se trataron consecutivamente con solventes que formaran un gradiente de polaridad creciente tales como: hexano, cloroformo, acetona, metanol y agua destilada, además de una extracción con una mezcla metanol:agua (80:20 v/v). En un matraz Erlenmeyer se pesaron 200 g de la muestra y se adicionaron 500 mL del solvente o mezcla de solventes mencionados anteriormente, dicha mezcla se sonicó durante 30 minutos, la luz y temperatura fueron ambientales. Transcurrido este periodo las muestras se filtraron empleando papel filtro grado 40, y se concentraron en un Rotavapor Büchi, el baño de agua utilizado se mantuvo a diferentes temperaturas, para concentrar los extractos hexánico, clorofórmico, acetónico, metanólico y metanólico: acuoso la temperatura máxima fue de 40°C mientras que para el extracto acuoso la temperatura máxima fue de 60°C. El extracto seco de cada fracción se colocó en viales ámbar para evitar el contacto con la luz, el matraz bola para rotavapor se lavó con el mismo solvente (s) utilizando 10 mL como máximo, finalmente se dejaron en un desecador con salida al vacío durante una semana para posteriormente ser almacenados a temperatura de refrigeración (4°C) hasta su análisis.

VI.6 Identificación de compuestos en los diferentes extractos provenientes de los FAF por CCF

Una vez eliminados los solventes, a los extractos hexánico, clorofórmico, acetónico, metanólico, acuoso y metanólico: acuoso provenientes de los FAF, se les realizaron perfiles cromatográficos en capa fina. Como estándares se emplearon: α y β -amirina, lupeol, ácido cafeico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido clorogénico, catequina, epicatequina, quercetina, kaempferol y una mezcla comercial de esteroides, todos a una concentración de 1 mg/mL; como fase estacionaria se utilizó sílica gel 60 F254 (Merck®) en soporte de aluminio con espesor de 0.25 mm, la aplicación de la muestra sobre la placa fue de 3 μ L utilizando una jeringa microliter 700, terminación N (Hamilton, Cat. 80300). Las condiciones de elución para cada uno de los extractos se presentan en el Cuadro 3, la preparación de los reveladores químicos utilizados se muestran en el Anexo 3 de este trabajo.

Cuadro 3. Condiciones para la identificación de compuestos en los extractos provenientes de los FAF mediante CCF.

Extracto analizado	Compuestos identificados	Mezcla de eluyentes	Revelador
Hexánico	Amirina (α y β)	Hexano: acetato de etilo:	UV 280 – 100 nm
Clorofórmico	Lupeol	cloruro de metileno	Anisaldehído
	Mezcla de Esteroles	(9:0.5:0.5)	(100°C, 5 minutos)
Acetónico	Ácido cafeico	Hexano: diclorometano:	UV 280 – 100 nm
Metanólico:acuoso	Ácido ferúlico	acetato de etilo (3:4:4+ 1 gota de ácido acético)	DPPH Sulfato cérico (100°C, 5 minutos)
Acetónico	Ácido gálico	Cloroformo: metanol (6:4)	UV 280 – 100 nm
Metanólico:acuoso	Ácido clorogénico		DPPH Sulfato cérico (100°C, 5 minutos)
Metanólico	Catequina	Acetato de etilo: cloroformo:	UV 280 – 100 nm
Acuoso	Epicatequina	metanol (6:3:1)	DPPH
Metanólico:acuoso	Quercetina		Sulfato cérico
	Kaempferol		(100°C, 5 minutos)

UV: luz ultravioleta

DPPH: solución del reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

VI.7 Determinación de la actividad antioxidante cualitativa de los extractos provenientes de los FAF por CCF.

De igual manera que para la identificación de compuestos, los extractos clorofórmico, acetónico, metanólico, acuoso y metanólico:acuoso provenientes de los FAF así como los estándares: α y β -amirina, lupeol, ácido cafeico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido clorogénico, catequina, epicatequina, quercetina, kaempferol a una concentración de 1 mg/mL se aplicaron utilizando una jeringa microliter 700, terminación N (Hamilton, Cat. 80300) sobre sílica gel 60 F254 (Merck®) en soporte de aluminio con espesor de 0.25 mm y eluidos a las condiciones descritas en el Cuadro

3. Finalizada la elución de las placas, se prosiguió a revelar con una solución de radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) a una concentración de 2 mg/mL.

VI.8 Identificación y cuantificación de compuestos en los extractos provenientes de los FAF por HPLC.

El equipo HPLC 1260 Infinity, Agilent Technologies® utilizado para este trabajo de investigación se conformó por un automuestreador 1200, una bomba cuaternaria de fase reversa, un detector de absorbancia y una columna de 4.6 x 150 mm, 5 µm, dotado además del Software Chem Station Edition 1.06. Las condiciones de HPLC para cada uno de los extractos provenientes de los FAF se presentan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Condiciones para la identificación de compuestos en los extractos provenientes de los FAF mediante HPLC

Compuestos a identificar					
Fuente de la metodología	Hernández-Vázquez <i>et al.</i> ,(2010)	Sriraman <i>et al.</i> ,(2015)	Cuchillo <i>et al.</i> , (2010)	Cuchillo <i>et al.</i> , (2010)	
Condiciones	Terpenos	Esteroles	Ácidos fenolicos	Flavonoides	
Temperatura de la columna (°C)	25	25	25	25	
Fase móvil	Metanol	Metanol:acetonitrilo (90:10)	Metanol: ácido fosfórico 0.001 M (23:77)	Agua desionizada: acetoniitrilo:metanol: acetato de etilo:ácido acético glacial (89:6:1:3:1)	
Volumen de inyección (µL)	20	20	20	30	
Flujo de la fase móvil (mL/min)	0.9	1	1	1	
Absorbancia de la lámpara UV	210	210	280	280	
Tiempo de corrida (min)	20	25	25	15	

a) Curvas patrón

Se realizaron las curvas patrón de cada uno de los estándares comerciales como α -amirina, β -amirina, lupeol, stigmasterol, β -sitosterol, campesterol, ácido cafeico, ácido cinámico, ácido clorogénico, ácido gálico, quercetina, catequina, epicatequina y kaempferol. Para lo anterior se pesó 1 mg de cada compuesto y por separado se colocaron en matraces color ámbar de 10 mL, se llevaron al aforo con la fase móvil correspondiente teniendo así una concentración de 100 ppm. Además se realizaron las diluciones necesarias para obtener concentraciones de 50, 25 y 12.5 ppm, las curvas se corrieron en las mismas condiciones que los extractos, tal como están descritas en el Cuadro 4.

b) Preparación de las muestras

Para el análisis de cada uno de los extractos se preparó una solución stock de 3 mg/mL (3 mg del extracto se disolvieron en 1 mL de la fase móvil correspondiente), esta solución se filtró empleando un filtro pirinola (Nylon 0.45 μ m, Millipore Millex-HN) adaptado a una jeringa de 3 mL (0.80 mm, Becton Dickinson Plastipak, Cat. 302549), el filtrado se colocó en un vial para cromatografía y posteriormente fue inyectado en el equipo de HPLC.

c) Cuantificación de compuestos de los extractos provenientes de los FAF

Para determinar la concentración de los compuestos del grupo de los terpenos, esteroides, ácidos fenólicos y flavonoides, las áreas bajo la curva obtenidas por HPLC para cada muestra se interpolaron en la ecuación de las curvas patrón de los estándares según fuera el caso, obteniéndose así la concentración del compuesto (μ g/mL de fase móvil), se hizo un segundo cálculo para obtener la concentración en mg/g de extracto.

VI.9 Evaluación de la capacidad protectora de los extractos provenientes de los FAF frente al daño oxidante inducido con H₂O₂.

a) Preparación de la muestra y estándar de referencia

En tubos Eppendorf se prepararon soluciones stock para cada uno de los extractos a una concentración de 3 mg/mL (3 mg del extracto se disolvieron en 1 mL del vehículo correspondiente, para el extracto hexánico y clorofórmico se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) mientras que para el extracto acetónico, metanólico, acuoso, metanólico: acuoso y el estándar de quercetina se utilizó agua destilada), una vez añadido el vehículo los tubos se colocaron en un vórtex para homogeneizar adecuadamente.

b) Ensayo de producción de ERO

Para evaluar la capacidad protectora de los diferentes extractos obtenidos de los frutos de AF frente al daño oxidante causado por H_2O_2 , se utilizaron células epiteliales del riñón de cerdo LLC- PK1 (Lilly Laboratory Cell Porcine Kidney) obtenidas de la American Type Culture Collection (Rockville, MD, EUA), las cuales se incubaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) utilizando placas de 48 pozos (Costar, Corning Incorporated, EUA) durante 24 horas a $37^\circ C$, con 5% de CO_2 y 95% de aire atmosférico. Transcurrido el tiempo de incubación el medio se reemplazó con 250 μl de DMEM y antibiótico, incubándose durante 30 minutos más a las mismas condiciones. Una vez listas las placas, las células se pre-trataron durante 30 minutos en las mismas condiciones de incubación con 300 μl de cada uno de los extractos en estudio a concentraciones de 50, 100 y 200 ppm en DMEM. Transcurrido el tiempo, en el mismo pozo se adicionó una solución de H_2O_2 para lograr una concentración final 1mM del agente oxidante, posteriormente las placas se incubaron durante 2 horas más a las condiciones ya mencionadas. Finalizado el tiempo, las células se lavaron con 250 μl de PBS y se les añadieron 300 μl de una solución 60 μM de 6-carboxy-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA) en amortiguador fosfato salino (PBS) para ser incubadas durante 20 minutos más bajo las mismas condiciones.

Las células se examinaron bajo un microscopio de epifluorescencia utilizando un filtro de excitación de 450 a 490 nm, para observar la intensidad de la fluorescencia en cada pozo fue expuesto durante 90 segundos a la longitud de onda mencionada en condiciones mínimas de

iluminación. Dicha intensidad se midió en tres pozos diferentes para cada tratamiento, la toma de fotografías y la cuantificación de los campos de emisión fluorescente se realizaron con el software NIS-Elements versión 2.3 y 3.0 respectivamente. Para obtener el porcentaje de ERO's el software NIS-Elements versión 3.0 cuantificó el área fluorescente respecto al tamaño total de la imagen, proporcionando directamente los porcentajes de ERO's.

VI.10 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos provenientes de los FAF.

VI.10.1 Ensayo de edema auricular en el ratón CD-1 inducido con 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA).

a) Preparación de la muestra y estándares de referencia

En tubos Eppendorf se prepararon soluciones de los extractos y estándares a una concentración de 1 y 3 mg/20 μ l (1 y 3 mg del extracto o estándar se disolvieron en 20 μ l del vehículo correspondiente, para el extracto hexánico, clorofórmico, α -amirina, β -amirina y lupeol se utilizó cloroformo, para el extracto acetónico, metanólico, acuoso y metanólico:acuoso se utilizó metanol y para el antiinflamatorio de referencia indometacina se utilizó una mezcla acetona: metanol 1:1), una vez añadido el vehículo los tubos se homogeneizaron adecuadamente.

b) Ensayo

Se utilizaron 60 ratones macho de la cepa CD-1 (*Mus musculus*) con un peso de 25-30 g, obtenidos de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Los animales se resguardaron en el bioterio del Instituto de Química, UNAM (lugar donde se llevó a cabo el ensayo) a una temperatura de 22 ± 4 °C, ciclos de luz-oscuridad 12:12 y una humedad relativa de 40 a 70%, esto de acuerdo con las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio publicadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-199, el agua y alimento se proporcionaron *ad libitum*. La distribución de los ratones se realizó aleatoriamente en diez grupos

experimentales, a cada grupo se le asignaron tres animales (n=3); seis grupos correspondieron a cada uno de los extractos de AF (hexánico, clorofórmico, acetónico, metanólico, acuoso y metanólico:acuoso 80:20 v/v), tres grupos correspondieron a compuestos bioactivos antiinflamatorios descritos en la literatura: α -amirina, β -amirina y un grupo correspondiente al antiinflamatorio de excelencia indometacina.

Para facilitar el manejo de los animales y reducir el estrés se administró pentobarbital sódico al 6.3% como agente anestésico en una dosis de 63 mg/kg de peso vía intraperitoneal utilizando agujas de calibre 27G. Una vez garantizado la condición anestésica a través de la reducción del reflejo patelar, ocular y palpebral para los animales de los grupos experimentales se procedió a la aplicación tópica de 10 μ l de una solución etanólica de TPA (250 μ g/mL) sobre la oreja derecha del ratón, diez minutos después, en la misma oreja se aplicaron 20 μ L de los extractos o en su caso las soluciones de estándares de referencia. En la oreja izquierda (testigo) solamente se aplicó tópicamente 10 μ l de etanol más 20 μ l del vehículo en el que se disolvió el extracto o estándar (cloroformo, metanol o metanol: acetona). Transcurridas cuatro horas de la aplicación del TPA los animales se sacrificaron introduciéndose en una cámara de CO₂; una vez terminado el sacrificio a cada ratón se le tomaron biopsias de 7 mm de diámetro de ambas orejas utilizando un sacabocado recto moleteado con un diámetro comprobado de 7 mm (mismo que se utilizó para todos los experimentos), las biopsias se pesaron empleando una balanza analítica para el cálculo correspondiente, la diferencia en peso entre la biopsia derecha con respecto a la izquierda representó el edema. En la Figura 11 se describe el procedimiento para poder comprender de mejor manera el ensayo. Para determinar el % de inhibición del edema se utilizó la siguiente fórmula descrita por Del-Ángel *et al.*, (2015):

$$\% \text{ de inhibición del edema} = \frac{C - E}{C} \times 100$$

Dónde:

C= Edema del grupo testigo (tratado con etanol y vehículo del extracto o estándar)

E= Edema del grupo experimental (TPA más extracto o estándar).

Finalmente de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, los animales se colocaron en bolsas especiales de color amarillo y se desecharon como residuos biológicos al bioterio de la institución para su cremación.



Figura 11. Secuencia del ensayo de edema auricular en el ratón CD-1. a) administración del agente anestésico vía intraperitoneal, b) ratones en plano anestésico, c) aplicación del agente inflamatorio, extractos o estándares de referencia, d) área de recuperación de los animales, e) ratón con oreja inflamada después de 4 horas de la aplicación del agente inflamatorio, extractos o estándares de referencia, f) sacrificio de los animales en cámara de CO₂, g) ratones sacrificados para un tratamiento, h) orejas del ratón después de tomar las biopsias correspondientes, i) organización de biopsias para ser pesadas.

Fuente: Imágenes fotográficas generadas por el autor

VI.10.2 Ensayo de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) por el método de 3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB)

La metodología empleada para este ensayo de llevó a cabo de acuerdo a los reportes de Kazuo *et al.*, 1983; Bradley *et al.*, 1982. Las biopsias de las orejas se colocaron en viales de vidrio junto con 1 mL de bromuro de hexadeciltrimetil amonio (HTAB) al 0.5% a una temperatura de 4°C, posteriormente las muestras se homogeneizaron durante 30 segundos y se decantaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, todas las muestras se congelaron y descongelaron tres veces, en el último proceso de descongelación los tubos se sonicaron durante 20 segundos. Finalizada dicha etapa, los tubos se sometieron a centrifugación durante 15 minutos a una velocidad de 12 000g y temperatura de 4°C.

Para el ensayo se utilizaron placas de 96 pozos (Costar, Corning Incorporated, EUA) en los cuales se añadieron por triplicado 10 µL del sobrenadante de cada tubo junto con 180 µL de PBS 80 mM, pH= 5.4 sin de bromuro de hexadeciltrimetil amonio (HTAB), las placas se calentaron hasta llegar a una temperatura de 37°C y se mantuvieron así durante todo el ensayo, posteriormente se adicionaron 20 µL de una solución de H₂O₂ al 0.017%. Para dar inicio a la reacción se adicionaron 20 µL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) 18.4 mM disuelto en N, N-dimetilformamida al 50% (DMF) permitiendo un tiempo de reacción de 5 minutos, para detenerla se adicionaron a los pozos 20 µL de H₂SO₄ 2M, finalmente la actividad enzimática se cuantificó con las densidades ópticas medidas a una absorbancia de 450 nm en un lector de placas acondicionado a un software Gen 5.1.

Para determinar el % de inhibición de la actividad de la enzima MPO se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición de MPO} = \frac{DO_C - DO_E}{DO_C} \times 100$$

Dónde:

DO_C= Densidad óptica a 450 nm del grupo testigo (etanol y vehículo del extracto o estándar)

DO_E= Densidad óptica a 450 nm del grupo experimental (TPA más el extracto o estándar).

VI.11 Análisis estadístico

Los resultados de este trabajo de investigación se expresan como la media \pm desviación estándar. Para todos los casos se realizó el test de Kruskal-Wallis para $P < 0.05$ y las medias se compararon mediante las pruebas: U de Mann-Whitney, utilizando el paquete estadístico SPSS (18th versión, IBM Corporation, New York, EUA).

VII. RESULTADOS

VII.1 Material vegetal

Al recolectar los FAF se comprobó que esta especie vegetal se encuentra como arbustos con grandes espinas aguzadas y frutos de aproximadamente 5 cm de largo, tal como se presenta en la Figura 12. De acuerdo a lo que señala la literatura, esta especie se desarrolla principalmente en lugares de climas cálidos a semicálidos, con temperaturas que llegan hasta los 30°C, el día de colecta la temperatura en Acatlán de Osorio, Puebla registró un valor máximo de 27°C. Para facilitar el trabajo de campo la recolección se llevó a cabo durante las mañanas. Respecto al secado de los frutos frescos, se determinó un 57.4% de materia seca y 42.6% de humedad (Anexo 1). Es importante destacar el buen crecimiento de esta especie a pesar de las condiciones climáticas y del estiaje en la zona de recolección.



Figura 12. Material vegetal. a) Arbustos de *Acacia farnesiana* en el municipio de Acatlán de Osorio, Puebla, b) frutos frescos de *Acacia farnesiana* recolectados en el mes de Marzo de 2015 en el rancho “Las espinas”.

Fuente: Imágenes fotográficas generadas por el autor

VII.2 Obtención de los extractos de los FAF

Como ya se mencionó anteriormente, los diferentes extractos de los FAF se obtuvieron luego de evaporar el solvente proveniente de la extracción y dejar al vacío los viales contenedores durante una semana, para ello, la muestra se sometió a tratamientos consecutivos con diferentes solventes orgánicos (hexano, cloroformo, acetona, metanol), un tratamiento acuoso y un tratamiento

utilizando una mezcla metanol:agua en proporción 80:20 v/v, dando lugar al extracto hexánico (EH), extracto clorofórmico (EC), extracto acetónico (EA), extracto metanólico (EM), extracto acuoso (EH₂O) y por último el extracto metanólico:acuoso (EMH); el peso seco de los extractos y el rendimiento se presentan en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Rendimiento obtenido de la extracción de 200 g de los FAF con solventes de diferente polaridad

Extracto obtenido	Peso seco (g)	Rendimiento (%)
EH	0.29	0.15
EC	1.53	0.77
EA	1.21	0.61
EM	17.85	8.93
EH ₂ O	24.52	12.26
EMH	30.38	15.19

Los resultados nos muestran que los rendimientos obtenidos para el EH, EC y EA son realmente diferentes a los obtenidos para el EM, EH₂O y EMH, lo cual podría dar indicios de que en los frutos se encuentra una mayor cantidad de compuestos polares, lo cual no puede afirmarse ya que la densidad de cada uno de los extractos fue diferente. No está demás mencionar que los extractos poco polares EH y EC físicamente fueron aceitosos y polvosos respectivamente, mientras que los EA, EM, EH₂O y EMH mostraron aspecto gomoso-chicloso de coloración café y aroma frutal.

VII.3 Identificación de compuestos de los extractos provenientes de los FAF por CCF

Cada uno de los extractos obtenidos de los FAF se sometieron a un estudio cromatográfico en capa fina, con la intención de identificar compuestos terpénicos y esteroides, los extractos hexánico y clorofórmico así como los estándares de referencia: escualeno, amirina (α y β) así como una mezcla esteroides comercial, se colocaron sobre una placa para cromatografía y fueron eluidas con los disolventes mencionados en el Cuadro 3, las placas reveladas se presentan en la Figura 13.

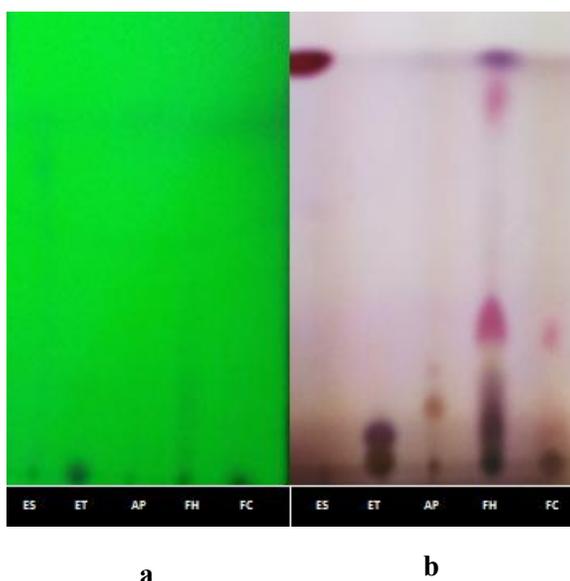


Figura 13. Cromatoplas para la identificación de compuestos terpenicos y esteroides en los extractos hexánico y clorofórmico provenientes de los FAF. a) placa revelada con luz UV y b) placa revelada con anisaldehído, donde ES: Escualeno, ET: mezcla comercial de esteroides, AP: mezcla de α y β -amirina, FH: extracto hexánico y FC: extracto clorofórmico.

Fuente: Imágenes fotográficas generadas por el autor

En la Figura 13a se presenta la placa revelada con luz UV a 254 nm, donde no se hizo evidente algún compuesto de ésta clasificación por lo cual se utilizó anisaldehído como revelador químico apreciándose así tonalidades cafés y rosas tal como se presenta en la Figura 13b, algunas de las señales observadas en los extractos coinciden con los estándares utilizados, probablemente los compuestos se encuentren en mayor concentración en el extracto hexánico respecto a lo observado en el extracto clorofórmico.

Por otra parte, con la intención de identificar ácidos fenólicos, los extractos clorofórmico y acetónico provenientes de los FAF además de los estándares: ácidos gálico, caféico, ferúlico y clorogénico se colocaron en placas para cromatografía y eluidos a las condiciones mencionadas en el Cuadro 3. La Figura 14a y 14c corresponden a las placas obtenidas al revelar con luz UV a 254 nm, en la cual algunas de las señales en los extractos coinciden con las señales de los estándares, la Figura 14b y 14d corresponden a las placas reveladas con sulfato cérico, en las

cuales se observan señales de tonalidades grisáceas y cafés que de igual manera coincidieron con los estándares utilizados. De acuerdo a esto, se observa una mayor presencia de este tipo de compuestos en el extracto acetónico respecto al extracto clorofórmico.

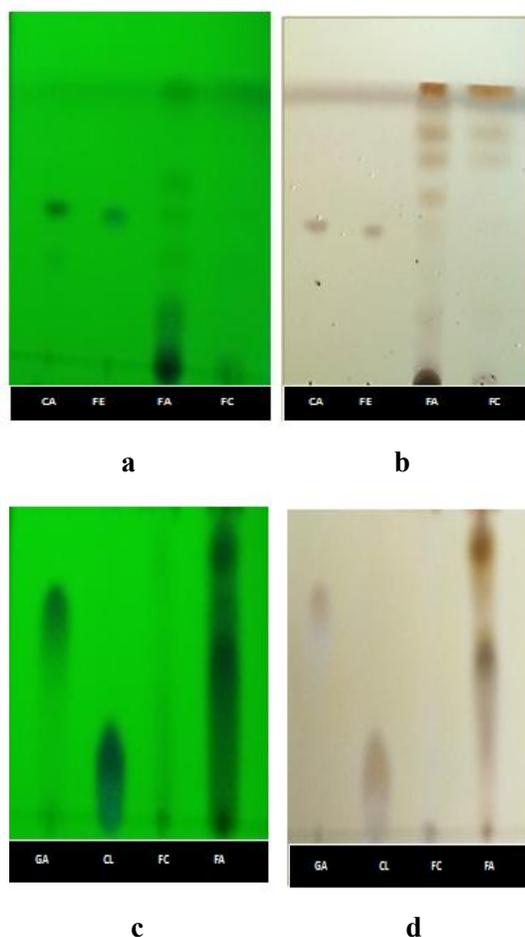
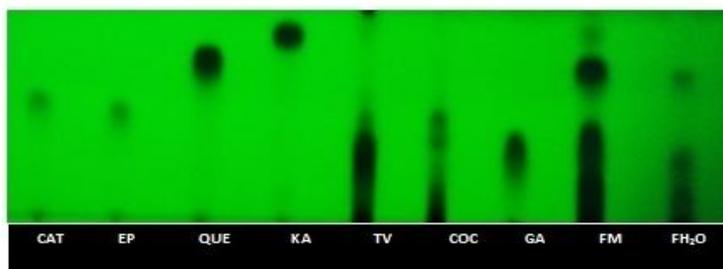


Figura 14. Cromatoplasmas para la identificación de ácidos fenólicos en los extractos clorofórmico y acetónico provenientes de los FAF. a y c) placas reveladas con luz UV, b y d) placas reveladas con sulfato cérico, donde CA: ácido cafeico, FE: ácido ferúlico, GA: ácido gálico, CL: ácido clorogénico, FA: extracto acetónico y FC: extracto clorofórmico.

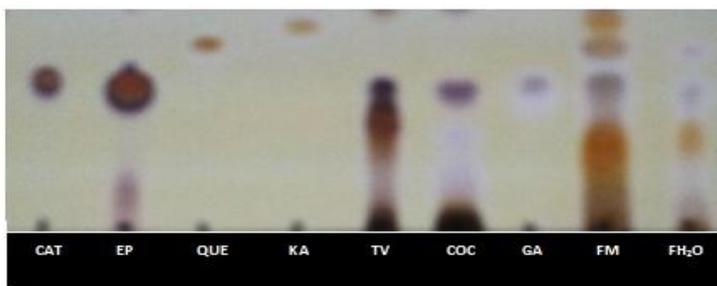
Fuente: Imágenes fotográficas generadas por el autor

Finalmente, con el propósito de identificar flavonoides, los extractos metanólico y acuoso, así como los estándares catequina, epicatequina, quercetina y kaempferol, fueron eluidos en placas cromatográficas a las condiciones mencionadas en el Cuadro 3. En la Figura 15 se presentan los resultados obtenidos. Como se puede observar la Figura 15a corresponde a la placa revelada con luz UV, en la cual se hacen presentes en los extractos señales semejantes a las de los estándares.

En la Figura 15b se presenta la placa revelada con sulfato cérico, mostrándose señales de tonalidades grisáceas y cafés, de igual manera se hacen visibles los compuestos, probablemente en mayor concentración en el extracto metanólico respecto a lo observado en el extracto acuoso.



a



b

Figura 15. Cromatoplasmas para la identificación de flavonoides en los extractos metanólico y acuoso provenientes de los FAF. Donde CAT: catequina, EP: epicatequina, QUE: quercetina, KA: kaempferol, TV: extracto de té verde, COC: extracto de cocoa, FM: extracto metanólico, FH₂O: extracto acuoso.

Fuente: Imágenes fotográficas generadas por el autor

Cabe mencionar que en ambas placas se encuentran muestras de té verde y cocoa con la finalidad de tener alguna referencia del compuesto epigallocatequina, así como el estándar de ácido gálico para una posible referencia del compuesto galato de metilo.

Para confirmar lo antes mencionado se realizó un análisis de HPLC para cada uno de los extractos.

VII.4 Determinación de la actividad antioxidante cualitativa de los extractos provenientes de los FAF por CCF

Con la finalidad de conocer de una forma rápida la capacidad antioxidante de los extractos provenientes de los frutos de AF, los extractos acetónico, metanólico, acuoso y metanólico: acuoso fueron sometidos a análisis cromatográfico en las condiciones de elución mencionadas en el Cuadro 3, como relevador químico se utilizó una solución del radical DPPH, los resultados se presentan en la Figura 16.

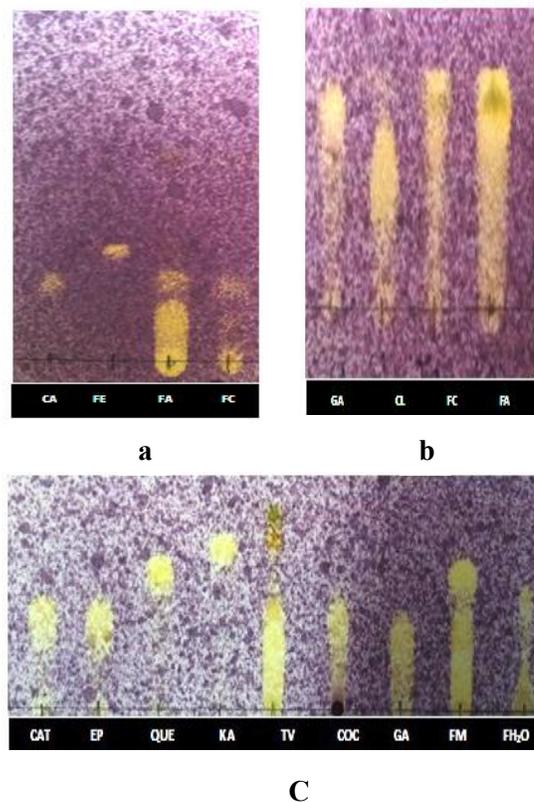


Figura 16. Cromatoplasmas para la determinación de la actividad antioxidante cualitativa de los extractos provenientes de los FAF. Donde CA: ácido cafeico, FE: ácido ferúlico, GA: ácido gálico, CL: ácido clorogénico, CAT: catequina, EP: epicatequina, QUE: quercetina, KA: kaempferol, TV: extracto de té verde, COC: extracto de cocoa, FA: extracto acetónico, FC: extracto clorofórmico, FM: extracto metanólico, FH₂O: extracto acuoso.

Fuente: Imágenes fotográficas generadas por el autor

En las placas a, b y c de la Figura 16, las áreas en color blanco representan la neutralización del radical por compuestos con actividad antioxidante presentes en los extractos, de igual manera en que lo hacen los estándares utilizados.

VII.5 Identificación y cuantificación de compuestos en los extractos provenientes de los FAF por HPLC.

A partir de cada uno de los extractos secos obtenidos de AF se determinó la presencia de diferentes compuestos pertenecientes a cuatro grupos, tales como: terpenos, esteroides, ácidos fenólicos y flavonoides. Para cada uno de ellos se realizaron las curvas de calibración correspondiente (Anexo 6, 7, 8 y 9) partiendo de una solución stock a una concentración de 0.1 mg/mL. Los tiempos de retención (T.R.) obtenidos para cada uno se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Tiempos de retención obtenidos por HPLC para los estándares comerciales de diferentes compuestos

	Estándar	T.R.
Terpenos	Lupeol	10.83
	α -amirina	14.15
	β -amirina	12.73
Esteroides	Campesterol	13.57
	β -sitosterol	15.29
	Stigmasterol	13.38
	Ácido cafeico	8.09
Ácidos fenólicos	Ácido cinámico	22.25
	Ácido clorogénico	5.56
	Ácido ferúlico	21.66
	Acido gálico	2.12
Flavonoides	Catequina	7.15
	Epicatequina	5.39
	Quercetina	4.30
	Kaempferol	7.79

Como se puede observar el T.R. máximo fue de 14.15, 15.29, 22.25 y 7.79 min para el grupo de terpenos, esteroides, ácidos fenólicos y flavonoides respectivamente, tomando en cuenta dichos valores, se determinó el tiempo de corrida en el equipo HPLC para cada uno de los extractos a analizar.

De acuerdo a los resultados previos obtenidos por CCF, los extractos hexánico y clorofórmico se analizaron con la metodología de terpenos y esteroides mientras que el extracto acetónico, metanólico, acuoso y metanólico:acuoso se analizaron con la metodología para ácidos fenólicos y flavonoides. Comparando los tiempos de retención de los picos en la muestra obtenidos en el cromatograma correspondiente (Anexo 10, 11, 12 y 13) e interpolando las áreas obtenidas en las curvas de calibración de los estándares, se obtuvieron las concentraciones (Cuadro 7) de estos compuestos en cada extracto analizado, cabe aclarar que este análisis solamente es un acercamiento al perfil fitoquímico de los frutos de AF y habría que profundizar en su estudio.

Cuadro 7. Concentración (mg/g de extracto) de compuestos en diferentes extractos provenientes de los FAF

Compuesto	Extracto					
	EH	EC	EA	EM	EH ₂ O	EMH
Lupeol	18.32	3.64	-	-	-	-
α -amirina	1.90	2.33	-	-	-	-
β -amirina	4.10	5.90	-	-	-	-
Campesterol	0.60	-	-	-	-	-
β -sitosterol	0.19	-	-	-	-	-
Stigmasterol	-	-	-	-	-	-
Ác. Cafeico	-	-	0.65	0.16	-	0.32
Ác. Cinámico	-	-	2.83	-	-	-
Ác. Clorogénico	-	-	17.49	14.27	3.16	9.83
Ác. Ferúlico	-	-	-	-	-	-
Ác. Gálico	-	-	43.14	6.41	8.17	8.02
Catequina	-	-	-	13.13	-	0.07
Epicatequina	-	-	3.34	2.27	-	1.01
Quercetina	-	-	NC	NC	NC	NC
Kaempferol	-	-	NC	NC	NC	NC

EH: extracto hexánico, EC: extracto clorofórmico, EA: extracto acetónico, EM: extracto metanólico, EH₂O: extracto acuoso y EMH: extracto metanólico: acuoso.
NC: No cuantificado

En relación a la identificación de compuestos terpénicos, el más abundante en el extracto hexánico fue lupeol con una concentración de 18.32 mg/g extracto mientras que para el extracto clorofórmico la β -amirina se detectó en una concentración de 5.59 mg/g extracto. Respecto a los esteroides, solamente en el extracto hexánico se detectaron 0.60 y 0.19 mg/g extracto de campesterol y β -sitosterol, respectivamente. Por otra parte, en el extracto acetónico se registraron las concentraciones más altas de ácidos fenólicos con 0.65, 2.83, 17.49 y 43.14 mg/g extracto de ácidos cafeico, cinámico, clorogénico y gálico, respectivamente. Finalmente para los flavonoides, el compuesto más abundante cuantificable fue catequina con 13.13 mg/g de extracto metanólico. Los compuestos marcados como NC para los extractos acetónico, metanólico, acuoso y metanólico:acuoso, no pudieron ser cuantificados debido a que las áreas de sus picos no se ajustaron a la curva de calibración para los estándares correspondientes.

VII.6 Evaluación de la capacidad protectora de los extractos provenientes de los FAF frente al daño oxidante inducido con H_2O_2 en células LLC-PK1.

La actividad antioxidante de los extractos provenientes de los frutos FAF se evaluó por su habilidad para el abatimiento de la producción de ERO debido a la inducción del daño oxidante sobre células LLC-PK1 causado por H_2O_2 , teniéndose valores para un control negativo (células sin agente oxidante), un control positivo (células con agente oxidante), una referencia de compuesto antioxidante (quercetina) así como para células pretratadas con seis extractos provenientes de los FAF a tres diferentes concentraciones (Cuadro 8), los porcentajes presentados se obtuvieron directamente por la cuantificación del área fluorescente respecto al tamaño total de cada fotografía tomada en cada pozo.

El rango de porcentaje de producción de ERO's está dado en 0.22 a 23.63% (control negativo y positivo, respectivamente), en general, para la producción de ERO's se observó una tendencia negativa dependiendo de la concentración utilizada de los extractos o del estándar en el pretratamiento del cultivo celular, a excepción del extracto metanólico y acuoso, en los cuales hay un aumento en el porcentaje de ERO's a 100 ppm, pudiendo ser explicada por los campos observados en los pozos y al número de células presentes en ellos. De acuerdo a esto, los

extractos de mayor polaridad como el metanólico, acuoso, metanólico: acuoso y el estándar quercetina presentaron los porcentajes más bajos de ERO's a comparación de los valores dados para los extractos hexánico, clorofórmico y acetónico ($P < 0.05$). En general se observó que a 200 ppm hay una mayor respuesta antioxidante por parte de los extractos y el estándar de referencia debido a la protección que tienen sobre la producción de estas especies reactivas. A pesar de ello, solamente para los extractos acetónico, metanólico: acuoso y el estándar quercetina se presentaron diferencias ($P < 0.05$) al utilizar concentraciones de 50, 100 o 200 ppm.

Cuadro 8. Efecto protector de diferentes extractos provenientes de FAF y del estándar quercetina respecto al grupo control y el grupo tratado con H₂O₂ en el ensayo de producción de ERO

		Producción de especies reactivas de oxígeno (%)						
Control		0.22 ± 0.07						
H ₂ O ₂		23.63 ± 6.60						
Concentración (ppm)	Extractos							
	EH	EC	EA	EM	EH ₂ O	EMH	Quercetina	
50	2.41 ^{Aab} ±	3.68 ^{Aa} ±	3.56 ^{Aa} ±	1.77 ^{Aab} ±	1.51 ^{Ab} ±	2.35 ^{Aab} ±	1.03 ^{Ab} ±	
	1.92	0.93	1.74	0.64	0.84	0.37	0.13	
100	2.39 ^{Aa} ±	2.82 ^{Aa} ±	2.85 ^{Aa} ±	2.12 ^{Aa} ±	1.62 ^{Aab} ±	1.61 ^{Bab} ±	0.62 ^{Bb} ±	
	1.14	0.92	0.46	0.83	0.59	0.37	0.07	
200	1.24 ^{Ab} ±	2.91 ^{Aa} ±	1.73 ^{Bb} ±	1.85 ^{Ab} ±	1.20 ^{Abc} ±	0.66 ^{Cbd} ±	0.27 ^{Cc} ±	
	0.64	0.58	0.51	0.53	0.38	0.19	0.16	

EH: extracto hexánico, EC: extracto clorofórmico, EA: extracto acetónico, EM: extracto metanólico, EH₂O: extracto acuoso y EMH: extracto metanólico:acuoso.

^{a,b,c,d,e} Literales diferentes en minúscula indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los extractos y estándar a la misma concentración. ^{A,B,C} Literales diferentes en mayúsculas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre las muestras y estándar a diferentes concentraciones.

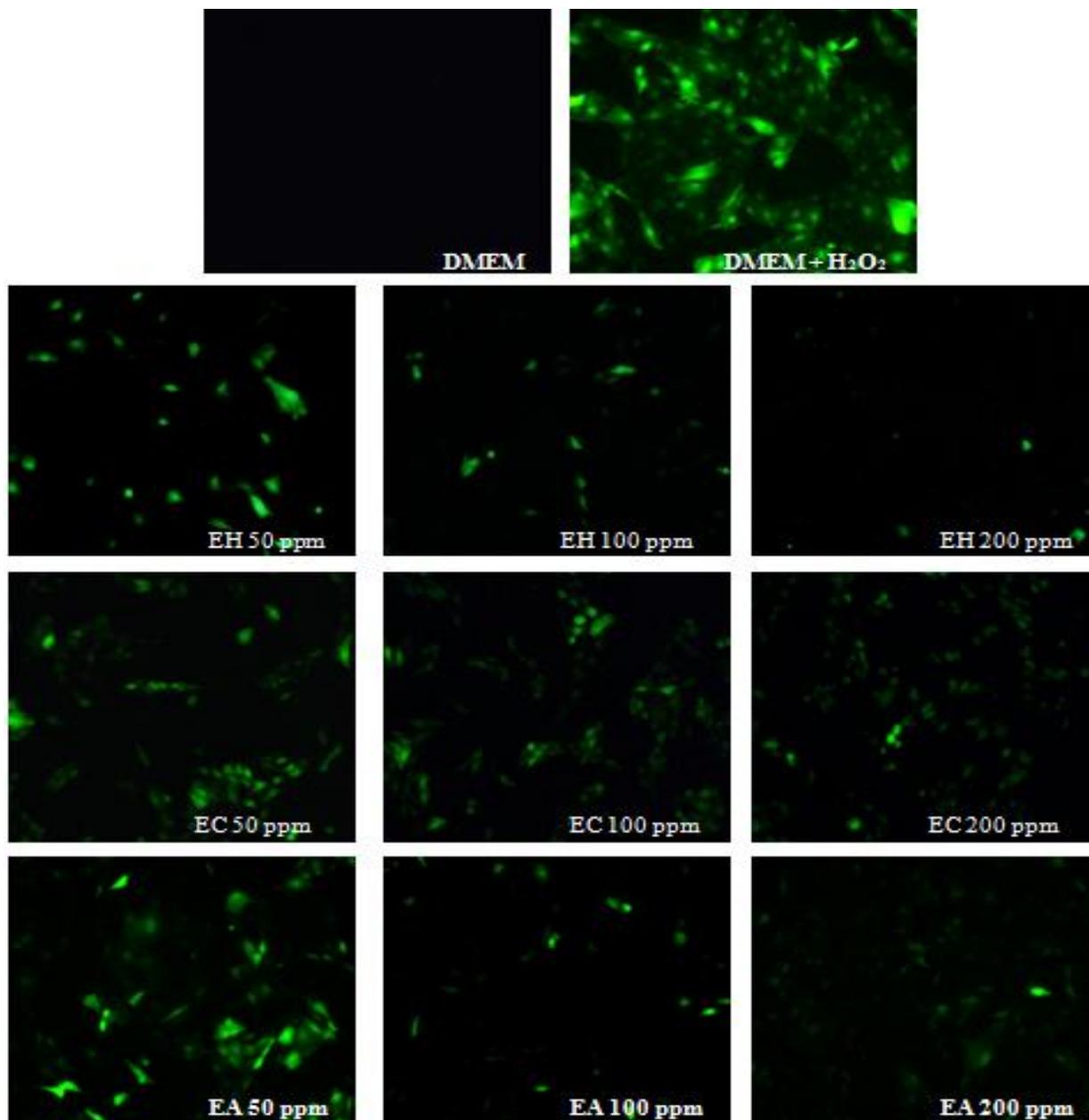


Figura 17. Inhibición de la producción de especies reactivas del oxígeno en células LLC-PK1 por extractos provenientes de los frutos de *Acacia farnesiana* a tres diferentes concentraciones. EH: extracto hexánico, EC: extracto clorofórmico, EA: extracto acetónico, EM: extracto metanólico, EH2O: extracto acuoso y EMH: extracto metanólico:acuoso.

Fuente: Imágenes fotográficas generadas por el autor

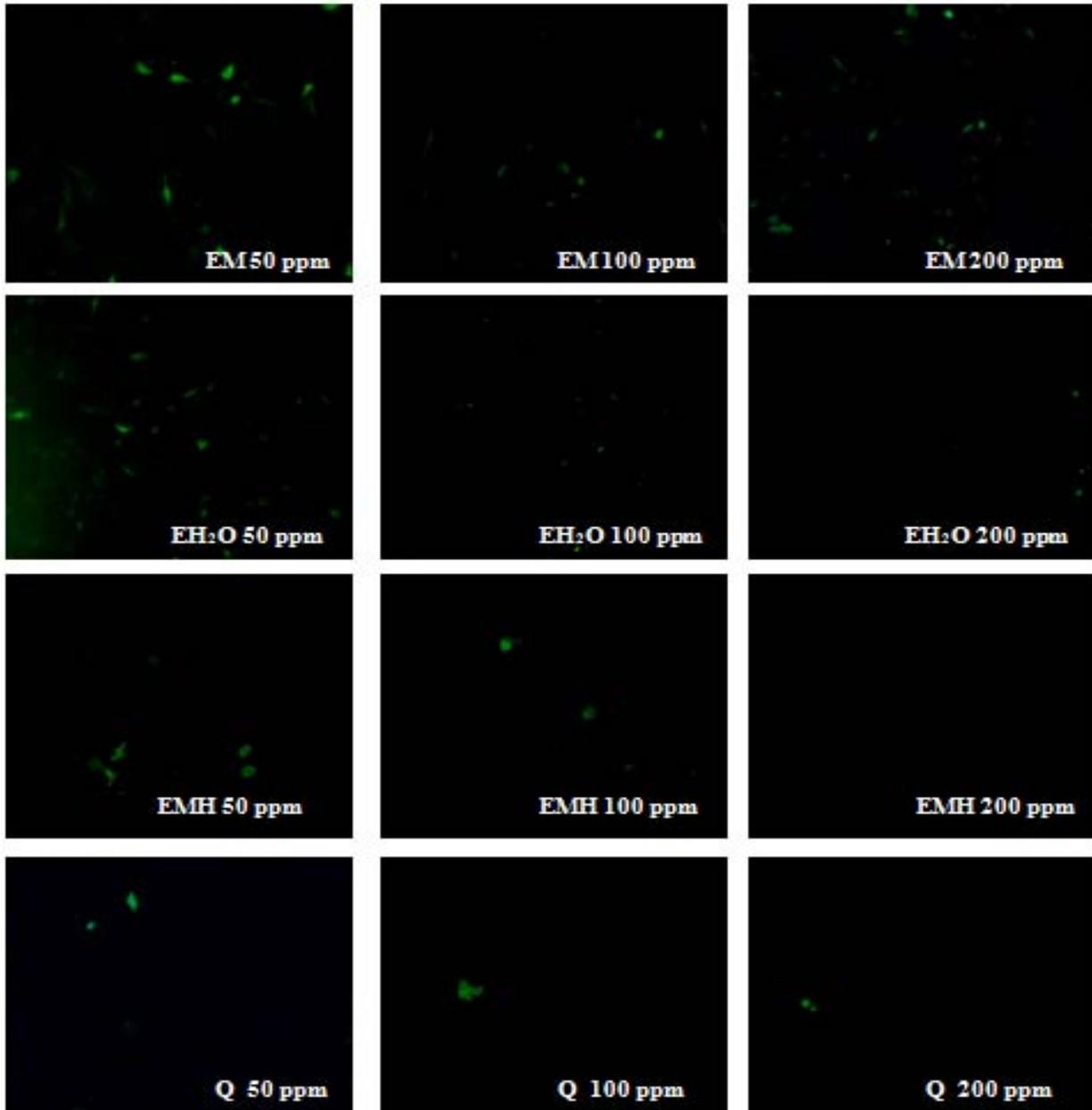


Figura 17 continuación. Inhibición de la producción de especies reactivas del oxígeno en células LLC-PK1 por extractos provenientes de los frutos de *Acacia farnesiana* a tres diferentes concentraciones. EH: extracto hexánico, EC: extracto clorofórmico, EA: extracto acetónico, EM: extracto metanólico, EH₂O: extracto acuoso y EMH: extracto metanólico:acuoso.

Fuente: Imágenes fotográficas generadas por el autor

VI.7 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos provenientes de los FAF por el ensayo de edema auricular en el ratón CD-1 inducido con TPA y el ensayo de la actividad de la enzima mieloperoxidasa por el método de 3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB).

La actividad antiinflamatoria de los extractos y los estándares pertenecientes al grupo de los terpenos fue determinada mediante el ensayo de edema auricular inducido con TPA y la determinación de la actividad de la enzima MPO. El porcentaje de inhibición del edema se cuantificó por la diferencia de peso entre la oreja inflamada y la oreja testigo en cada uno de los animales empleados. En una segunda parte del experimento, las biopsias de las orejas fueron homogeneizadas para la extracción de la enzima, la cual se utilizó para realizar un ensayo enzimático, el porcentaje de inhibición de la actividad de la MPO se obtuvo por la diferencia de densidades ópticas de la reacción enzimática de los sobrenadantes de las orejas tratadas y de las orejas testigo.

En el Cuadro 9 se presentan los resultados de los ensayos de TPA y del ensayo de actividad de la enzima MPO para los diferentes extractos provenientes de los FAF, dos estándares de referencia para el grupo de compuestos terpenicos α y β - amirina y el antiinflamatorio de excelencia indometacina, en el caso de éste último solo se trabajó a una dosis de 1 mg y para el extracto metanólico:acuoso de los FAF solo se trabajó con una dosis de 3 mg.

La indometacina utilizada como antiinflamatorio de excelencia mostró 79.6 % de inhibición de edema a una concentración de 1 mg/oreja en las orejas, como era de esperarse debido a que es un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas (Katzung, 1995). Los estándares α y β -amirina presentaron valores de inhibición de edema de 69.8 y 45.6 %, respectivamente a una dosis de 1 mg/oreja; así como 79.8 y 68.7 %, respectivamente al elevar la dosis a 3 mg/oreja. Respecto a los extractos podemos observar que los mayores porcentajes de inhibición se presentaron para la fracción cloroformica y metanolica al utilizar las dos dosis mencionadas anteriormente, siendo los valores de 20.6 y 31.7% de inhibición de edema al utilizar 1 y 3 mg respectivamente mientras que para la fracción metanolica se observaron 21.5 y 31.0% de inhibición al utilizar 1 y 3 mg respectivamente, cabe señalar que los extractos no registraron porcentajes mayores al 50%.

Es importante señalar que el efecto del incremento en la dosis de los extractos, así como los compuestos de referencia, registraron un comportamiento positivo al disminuir el edema auricular en un rango de entre 1.6 y 23.1 % de actividad desinflamatoria, a pesar de ello, no se registró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) al utilizar ambas dosis.

Por otra parte, como ya se mencionó, se determinó la actividad de la enzima MPO para saber cómo los extractos, estándares de terpenos e indometacina afectaron la infiltración de neutrófilos en las biopsias tomadas de las orejas del ratón. La indometacina produjo una inhibición de la MPO de 91.4% confirmando así su uso como patrón de inhibición de migración leucocitaria. Para los grupos tratados con el estándar de α -amirina se observó una inhibición de 29.6% y 77.9% al utilizar 1 y 3 mg/oreja respectivamente. Una inhibición de -11.7 y 72.0% al utilizar 1 y 3 mg del estándar β -amirina; el valor negativo observado para α -amirina puede estar relacionado con una reducción del edema pero no con la inhibición de la migración de neutrófilos a la zona afectada. En relación a los extractos se puede observar una inhibición de la actividad de MPO dependiente de la concentración, mostrándose valores de 31.9% y 34.9 % para el extracto clorofórmico así como 57.9% y 81.4% para el extracto metanólico con las dosis de 1 y 3 mg/oreja del extracto, respectivamente.

En general todos los tratamientos siguieron un patrón de comportamiento dado por la inhibición de edema y la consecuente inhibición de la actividad de la enzima MPO.

Cuadro 9. Efecto antiinflamatorio de los extractos provenientes de FAF y compuestos de referencia.

Extractos y compuestos de referencia	Dosis (mg/oreja)	Modelo TPA		Modelo MPO	
		Edema (mg)	Inhibición de edema (%)	Densidad Óptica 450 nm	Inhibición MPO (%)
Extracto Hexánico	1	15.0 ± 0.5	-2.3 ^c ± 3.4	0.167 ± 0.05	-51.3 ± 45.1
	3	11.9 ± 1.1	21.1 ^{bc} ± 7.4	0.254 ± 0.05	28.57 ^{bc} ± 25.2
Extracto Clorofórmico	1	11.7 ± 1.7	20.6 ^b ± 11.6	0.075 ± 0.05	31.9 ^{bc} ± 43.3
	3	10.3 ± 2.3	31.7 ^b ± 15.5	0.140 ± 0.02	34.9 ^b ± 10.2

Extracto Acetónico	1	14.2 ± 0.8	12.5 ^b ± 4.8	0.127 ± 0.02	50.9 ^b ± 7.5
	3	12.4 ± 1.4	24.6 ^b ± 8.3	0.137 ± 0.07	65.9 ^a ± 17.9
Extracto Metanólico	1	12.8 ± 1.7	21.5 ^b ± 10.5	0.108 ± 0.05	57.9 ^b ± 21.1
	3	11.3 ± 0.9	31.0 ^b ± 5.7	0.074 ± 0.03	81.4 ^a ± 8.3
Extracto Acuoso	1	14.5 ± 0.2	10.7 ^b ± 1.3	0.171 ± 0.01	33.7 ^c ± 0.6
	3	14.4 ± 1.2	12.3 ^c ± 7.1	0.252 ± 0.06	37.1 ^b ± 15.5
Extracto Metanólico:Acuoso	1	ND	-	ND	-
	3	13.4 ± 0.5	18.6 ^{bc} ± 3.3	0.107 ± 0.04	73.3 ^a ± 9.6
α-amirina	1	4.4 ± 3.9	69.8 ^a ± 26.9	0.077 ± 0.09	29.6 ^{bc} ± 82.6
	3	3.1 ± 2.1	79.8 ^a ± 14.0	0.048 ± 0.03	77.9 ^a ± 14.1
β-amirina	1	8.0 ± 1.3	45.6 ^a ± 8.7	0.123 ± 0.04	-11.7 ± 34.2
	3	4.7 ± 1.1	68.7 ^a ± 7.1	0.060 ± 0.04	72.0 ^a ± 19.9
Indometacina	1	2.9 ± 3.1	79.6 ^a ± 21.8	0.019 ± 0.01	91.4 ^a ± 5.2
	3	ND	-	ND	-

Grupo tratado con TPA (Edema: 1mg/oreja= 14.7±1.3, 3 mg/oreja= 15.1±0.7; DO: 1mg/oreja= 0.110±0.04 3mg/oreja= 0.350 ± 0.40).
 Los datos representan el promedio (n=3) ± desviación estándar. ^{a,b,c} Literales diferentes en minúscula indican diferencia estadística significativa (P<0.05) entre reglones a la concentración de 1 y 3 mg extracto/oreja.
 ND = no determinado.

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1 Material vegetal y obtención de los extractos provenientes de los FAF

Seguida de la recolección de la muestra se realizó una segunda etapa que consistió en el acondicionamiento de la misma para su posterior análisis, esto se logró por secado en estufa con condiciones de temperatura controlada (45°C) durante un tiempo aproximado de 48 horas, se ha visto que los métodos de desecación influyen en la composición química de algunas plantas medicinales, ya que algunos compuestos son termolábiles y pueden llegar a descomponerse o pueden ser arrastrados por el agua que se evapora, algunos ejemplos de estos compuestos son los aceites esenciales (Rocha *et al.*, 2011).

Por otra parte, se sabe que existen muchas técnicas que pueden ser aplicadas a la extracción de compuestos bioactivos, los cuales están basados en una buena elección de los solventes a utilizar para la extracción, la agitación e incluso, algunas metodologías utilizan calor (Ruiz-Montañez *et al.*, 2014). En este sentido se optó por emplear un método emergente como lo es la sonicación debido a que reduce el tiempo de tratamiento y además se sabe que podría ofrecer mejores rendimientos en la extracción, a comparación de la maceración, que requiere tiempos más largos de tratamiento y agitación constante, como bien sabemos, la extracción es el primer paso de cualquier estudio de plantas medicinales siendo determinante en los resultados finales. Aunque el objetivo de este trabajo no fue comparar métodos de extracción y rendimientos, es importante tomar en cuenta este proceso ya que podría ser uno de los factores para la obtención de una mayor o menor cantidad de compuestos y que además podrían causar posibles efectos negativos en la actividad de los mismos (Dorta *et al.*, 2012), lo cual pudiera reflejarse en los ensayos de actividad biológica propuestos para este estudio.

VIII.2 Identificación y cuantificación de compuestos de los extractos provenientes de los FAF por CCF y HPLC.

En la naturaleza existe una gran cantidad de compuestos ya sea de origen terpénico o esteroideo así como compuestos fenólicos, por ello, es imposible tener una gama tan grande de estándares

para realizar este tipo de técnicas cromatográficas. Debido a que los extractos obtenidos de las plantas tienen una combinación de muchos tipos de compuestos con diferentes polaridades, su separación es un gran reto para el proceso de identificación y caracterización; como se puede observar en los cromatogramas obtenidos (Anexo 9), los diferentes extractos de los frutos de AF presentaron una gran complejidad en su composición química.

El Rf de CCF reveló la presencia de escualeno, amirinas, esteroides totales, ácido caféico, clorogénico y gálico, catequina, epicatequina, quercetina y kaempferol, es importante mencionar que para el extracto hexánico y clorofórmico destacó una señal de color rosa. A pesar de no contar con su posible estándar, su Rf de 0.45 se comparó con el estándar utilizado por Sarpate y Tupkari (2012) de 0.48, probándose la posible presencia de lupeol. El HPLC por sus tiempos de retención, reveló y confirmó que los principales constituyentes del extracto hexánico fueron lupeol, α y β -amirina, capestrol y β -sitosterol, para el extracto clorofórmico fueron compuestos terpénicos como α -amirina, β -amirina y lupeol. Es importante mencionar que no se pudo comprobar la presencia de escualeno revelado por CCF debido a la falta del estándar; por su parte, de los muchos constituyentes de las fracciones acetónica, metanólica, acuosa y metanólica: acuosa provenientes de los FAF destacaron la presencia de ácidos cafeico, ferúlico, clorogénico, gálico, cinámico, catequina, epicatequina, quercetina y kaempferol a las concentraciones presentadas en el Cuadro 7.

Escribano (2013) reportó valores de 0.32, 0.49, 0.12, 0.15 y 0.18 mg/g extracto de epicatequina, quercetina, ácido gálico, ácido caféico y ácido clorogénico en un extracto metanólico:acuoso 80:20 v/v de los FAF sometido a maceración, las cuales se colectaron en San Juan del Río Querétaro en el mes de agosto de 2012. Para la identificación y cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides se utilizó la técnica HPLC con las mismas fases móviles que en el presente estudio, los valores que reportó para sus compuestos son menores a los obtenidos en este trabajo de investigación, lo cual sugiere que la síntesis de compuestos, puede variar dependiendo de las condiciones climáticas a las que se encuentra la especie vegetativa así como a las diferentes etapas de desarrollo, un claro ejemplo está en la síntesis de fenoles, la cual varía y está inducida por factores ecológicos como la radiación UV, estrés hídrico u ozono (Chaves y Escudero, 1999). En diversos estudios se ha demostrado que algunos compuestos fenólicos tienen actividades anticancerígenas o antimutagénicas, las cuales están relacionadas con sus propiedades

antioxidantes (Behera *et al.*, 2008; Papetti *et al.*, 2006), por otra parte, los terpenos son bien conocidos por sus propiedades antiinflamatorias (Ikeda *et al.*, 2008).

VIII.3 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos de *Acacia farnesiana* fueron evaluados por un ensayo de protección frente al daño oxidante causado por H₂O₂, se sabe que este agente a concentraciones intracelulares por arriba de 1 μM puede formar el radical superóxido y el radical hidroxilo (Hansberg, 2008); al emplear la sonda fluorescente como la H₂DCFDA se pudo observar y cuantificar la fluorescencia verde dentro de las células debido a la oxidación del compuesto por la actividad de diferentes ERO's.

Los resultados de este estudio revelaron que los extractos metanólico, metanólico: acuoso y el estándar quercetina, tuvieron la mejor actividad antioxidante al inhibir la producción de ERO's, en contraste con los extractos no polares, dicha actividad se debe quizá a la gama de compuestos fenólicos presentes en ellos, específicamente ácidos fenólicos y flavonoides, además de la sinergia de los mismos; se conoce que los compuestos fenólicos son capaces de inhibir la actividad de enzimas pro-oxidantes involucradas en la generación de especies reactivas, tales como la NADPH-oxidasa (NOX), la xantina-oxidasa (XO), la mieloperoxidasa (MPO) y la óxido nítrico sintasa (NOS). Por otra parte también se ha reportado que los fenoles y algunos curcuminoides pueden inducir la expresión de genes que codifican para la síntesis de algunas enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSpx) y glutatión-S-transferasa (GST), la acción antioxidante de éstas enzimas se traduce en una disminución del estado redox celular (Bouhleb *et al.*, 2008).

Delgadillo *et al* (2015) demostraron una importante actividad de atrapamiento de los radicales ABTS y DPPH para el extracto metanólico: acuoso de los FAF y los frutos de *Acacia shaffneri* además de su capacidad protectora frente al daño oxidante inducido por H₂O₂ en la línea celular LLC-PK1. Sus resultados revelaron diferencias significativas en la producción de ERO's al utilizar 50 y 200 ppm del extracto, con esta información y los resultados obtenidos por el mismo equipo de trabajo se puede comprobar que AF es un recurso vegetal que a diferentes concentraciones de un extracto metanólico:acuoso o como alternativa, un extracto acetónico es

capaz de amortiguar el daño oxidante. Otra evidencia para este género está dada por Guleria *et al* (2011), los cuales realizaron un ensayo detallado de la actividad antioxidante y la habilidad de protección de DNA de los extractos obtenidos con metanol, acetona y acetato de etilo del tronco, corteza y hojas de *Acacia catechu* donde mostraron que el extracto metanólico exhibió una potente actividad para ambos ensayos, resultados parecidos a los obtenidos para este trabajo de investigación. La generación de ERO's pueden causar daño a moléculas de importancia biológica como proteínas (Gracy *et al.*, 1991), lípidos (Fraga *et al.*, 1987) y ácidos nucleicos (Richter *et al.*, 1988), sin embargo la defensa celular contra el estrés oxidante podrían fortalecerse mediante el uso de antioxidantes naturales y antimutágenos extraídos de las plantas, con ello contribuir a la prevención y evitar la progresión de distintas enfermedades.

VIII.4 Actividad antiinflamatoria

La aplicación tópica de TPA en las orejas de ratones proporciona un modelo de inflamación aguda adecuado para la evaluación de agentes antiinflamatorios, y así mismo, para la evaluación de mediadores de la inflamación tales como leucotrienos, prostaglandinas, enzimas lisosomales y migración-desgranulación leucocitaria evaluada a través de la liberación de las enzimas elastasa y MPO (Ospina, 2000). El TPA ha sido asociado con la infiltración de neutrofilos y células mononucleares acompañado por la inducción de la ciclooxigenasa 2 o COX-2 (Lee *et al.*, 2003).

Uno de los propósitos del trabajo fue probar la actividad antiinflamatoria de seis extractos provenientes de los frutos de AF así como tres estándares comerciales utilizando ratones de la cepa CD-1 los cuales se trataron con TPA con la finalidad de inducir una respuesta inflamatoria que se reflejó en el aumento en el edema de la oreja así como un aumento de la actividad de la enzima MPO, los resultados obtenidos revelaron que la mayor actividad inhibitoria de edema y actividad enzimática la presentaron los extractos clorofórmico y metanólico dependiendo de la concentración utilizada, a pesar de que ambos no lograron la inhibición por un valor mayor al 50%, su actividad es importante debido a que ambos extractos provienen de un recurso natural que no solamente es importante en México, si no en el mundo, además de que esta especie vegetativa es utilizada como tratamiento tradicional en regiones de bajos recursos y a su vez, es una importante fuente de forraje para los animales de las zonas.

Para la fracción hexánica y clorofórmica dicha actividad puede atribuirse a compuestos como α -amirina, β -amirina y lupeol, los cuales han sido descritos en estudios anteriores con esta propiedad biológica, por ejemplo, Pedernera *et al* (2010) trabajaron con extractos acuosos y orgánicos obtenidos de las hojas de *Acacia visco* para probar la actividad antiinflamatoria en ratas, dichos extractos revelaron efectos antiinflamatorios contra el edema inducido por carragenina y gracias a un estudio fitoquímico realizado a las hojas, se encontraron compuestos triterpenoides como lupeol, α -amirina y β -amirina, a los cuales les atribuyeron ser los principales responsables de la actividad farmacológica, en el estudio se sugirió que los extractos estudiados poseen actividad antiinflamatoria debido a la inhibición de la liberación o síntesis de diversos mediadores de la inflamación como histamina, serotonina, bradiquinina y prostaglandinas.

La biosíntesis de prostaglandinas y óxido nítrico están relacionados con el proceso inflamatorio, las isoformas inducibles del óxido nítrico sintasa (iNOS) y ciclooxigenasa (COX) son responsables de la producción de un gran número de mediadores proinflamatorios (Raso *et al.*, 2001). El NO juega un papel importante en la replicación de antivirus y otras enfermedades (Schmidt y Walter., 1994), su sobreproducción es perjudicial para el organismo inflamado. Por su parte la prostaglandina E2 (PGE₂) es sintetizada a partir del ácido araquidónico a través de la enzima COX-2 la cual cataliza la reacción, se considera que es uno de los mediadores inflamatorios más potentes en la respuesta inflamatoria y en la patogénesis de diversas enfermedades como edema, angiogénesis y crecimiento tumoral, en los últimos años se ha registrado un interés por el uso de inhibidores de dicha enzima (Claria, 2003; Hu *et al.*, 2008).

Así mismo, existe la producción de citocinas pro-inflamatorias tales como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) las cuales participan en la regulación de la inflamación. El TNF- α ha sido considerado como un mediador clave para la inducción de la apoptosis. La IL-6 juega un papel esencial en la defensa del huésped en la respuesta inmune y en las funciones de las células nerviosas (Hirano *et al.*, 1994; Hibi *et al.*, 1996; Taga y Kishimoto, 1997), la IL-1 β se produce principalmente por los macrófagos, monocitos y células T, estas últimas implicadas en la defensa inmune contra la infección.

Diferentes estudios sustentan la propiedad antiinflamatoria de los compuestos encontrados en los extractos acetónico, metanólico, acuoso y metanólico:acuoso de AF, por ejemplo, Dongmo *et al.* (2005) trabajaron con una fracción butanólica de hojas secas de *Acacia pennata*, en ese estudio

realizaron ensayos para determinar las actividades analgésicas y anti-inflamatorias en modelos animales, donde se mostraron efectos protectores significativos frente a estímulos químicos como ácido acético y formalina en el ratón, los resultados sugirieron que un mecanismo periférico está involucrado en el efecto analgésico, asociado a efectos antiinflamatorios debido a flavonoides presentes en esta especie. Los estudios mostraron que la actividad antiinflamatoria de los flavonoides es mediada por la inhibición de enzimas en el metabolismo del ácido araquidónico, la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa, así como por sus propiedades antioxidantes. Los flavonoles como kaempferol, morina y quercetina son inhibidores de 5-Lipooxigenasa (Welton *et al.*, 1986), mientras que la mayoría son COX-1 inhibidores en la ruta del ácido araquidónico para la síntesis de leucotrienos y prostaglandinas, respectivamente (Ferrándiz *et al.*, 1990).

También existe más información acerca del tema en donde se evidencian las propiedades del género; por su parte *Acacia nilotica* ha demostrado actividad antiinflamatoria (Dafallah y al-Mustafa, 1996), *Acacia victoriae* produjo inhibición de la activación del factor nuclear NF-kappa B el cual regula la expresión de distintos genes y es de vital importancia en la respuesta inflamatoria (Haridas *et al.*, 2001); además en *Acacia ancistrocarpa* y *Acacia adsurgens* se registró un potente efecto inhibidor de la COX-1 en la ruta del ácido araquidónico (Li *et al.*, 2003). Por su parte Chaubal *et al.*, (2003) aislaron y analizaron por un estudio de rayos X al esteroide 3β -acetoxi- 17β -hidroxi-androst-5-eno de *Acacia nilotica*; este esteroide presentó actividad antiinflamatoria dependiente de la dosis contra el edema del ratón inducido por TPA en donde la mayoría de sus actividades parecieron implicar o depender de la liberación de ácido araquidónico así como el metabolismo y la interacción del TPA con los receptores de la proteína cinasa C.

Otras evidencias fueron aportadas por Hanausek *et al.* (2001) quienes probaron la capacidad de las avicinas, una familia de saponinas triterpenoides obtenidos de *Acacia victoriae*, al inhibir la carcinogénesis de piel de ratón inducidos químicamente con TPA, los resultados se atribuyeron a la propiedad proapoptóticas de estos compuestos y a su capacidad para inhibir la generación de peróxido de hidrógeno y la activación del factor nuclear-kB.

Así bien, Monga *et al.*, (2014) desarrollaron y probaron un gel emulsificado de (+) – catequina, el cual mostró la supresión de la actividad de citocinas pro-inflamatorias tales como el TNF- α ,

interleucina 1 beta (IL-1 β) y la interleucina-6 (IL-6) en el carcinoma de células escamosas inducida por TPA de la piel de ratones BALB/c. También en 2011 Monga y colaboradores evaluaron la citotoxicidad diferentes extractos de *A. catechu* el cual es rico en compuestos polifenólicos, a través de una línea celular de carcinoma epitelial humano (A431) así como su actividad antitumoral contra TPA/7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA). Los resultados revelaron que la administración del extracto acuoso de dicha especie inhibió el crecimiento del carcinoma dependientemente de la dosis, obteniéndose así un valor IC₅₀ de 78.56 μ g/mL.

Aunque en este estudio no se utilizó el modelo de inflamación por carragenina, existe evidencia de Bukhari *et al.* (2010) los cuales evaluaron un extracto metanólico de *Acacia modesta*, que a una concentración de 50 a 200 mg/kg produjo un marcado efecto antiinflamatorio en el edema inducido por carragenina en la pata de rata, comportamiento similar al observado con el diclofenaco de referencia, lo importante a destacar en este estudio es que realizaron una evaluación cualitativa de los compuestos fitoquímicos de *Acacia modesta* y encontraron alcaloides, terpenoides, flavonoides, saponinas y taninos, en específico: quercetina, kaempherol, β -sitosterol, triterpenos, y esteroides (Joshi *et al.* 1975), compuestos que inhibieron el edema por la efectiva inhibición de las ciclooxigenasas (Selvam y Jachak 2004), además, otra evidencia aportada por Adedapo *et al.* (2008), quienes trabajaron con el extracto acuoso de la corteza del tallo de *Acacia karroo*, recurso rico en compuestos fenólicos, tales como proantocianidinas y flavonoles, a concentraciones de 100 y 200 mg/kg lograron reducir significativamente la formación del edema inducida por carragenina en ratas.

En general, los resultados obtenidos demostraron que los extractos provenientes de los FAF exhiben una acción antiinflamatoria eficaz en el edema de la oreja del ratón inducida con TPA a través de la inhibición del tamaño de edema y la actividad de la enzima MPO. El efecto antiinflamatorio puede estar relacionado por la regulación de la expresión de algunos mediadores mencionados anteriormente o por un mecanismo de inhibición de la migración y desgranulación leucocitaria. Estos resultados indican que los extractos pueden ser relevantes para el desarrollo de algún agente tópico para la modulación de algunas enfermedades relacionadas al proceso inflamatorio, aunque es necesario realizar una investigación más profunda para conocer el mecanismo de acción de los compuestos presentes en los extractos.

IX. CONCLUSIONES

Los frutos de *Acacia farnesiana* (FAF) tienen compuestos como terpenos, algunos esteroides, ácidos fenólicos y flavonoides.

La actividad antioxidante de los extractos provenientes de los FAF es dependiente de la concentración, a 200 ppm se presentan los mejores resultados por los extractos obtenidos con acetona, metanol y la mezcla metanol:agua probablemente por la presencia de ácidos fenólicos (ácido gálico, caféico, clorogénico y cinámico) así como algunos flavonoides (catequina, epicatequina, quercetina y kaempferol).

La actividad antiinflamatoria de los extractos provenientes de los FAF es dependiente de la concentración, se presentan los mejores resultados por el extracto clorofórmico y metanólico a una concentración de 3 mg de extracto/oreja, probablemente por la presencia de terpenos (α -amirina, β -amirina, lupeol) y flavonoides (catequina, epicatequina, quercetina y kaempferol), respectivamente.

La inhibición de la actividad de la enzima MPO, se mostró favorecida por el extracto clorofórmico y metanólico al utilizar 3 mg/oreja, en el mayor de los casos, la inhibición de edema está vinculada con la inhibición enzimática.

X. PERSPECTIVAS

Realizar un estudio completo sobre el perfil fitoquímico de los FAF por la técnica de HPLC utilizando estándares internos para cada uno de los extractos con la finalidad de comprobar la presencia y conocer la concentración de los compuestos a identificar.

Realizar un ensayo alternativo para la cuantificación de la actividad antiinflamatoria.

Realizar ensayos para conocer la actividad enzimática en el proceso inflamatorio.

Realizar el aislamiento de un compuesto antiinflamatorio (amirinas o lupeol) del extracto hexánico o clorofórmico para utilizarlo en un modelo biológico.

Realizar estudios de actividad biológica con hojas, corteza o raíz de la especie *Acacia farnesiana* con la finalidad de encontrar una mejor respuesta a los resultados presentados en este trabajo de investigación.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Datos obtenidos durante el secado de los frutos de *Acacia farnesiana*.

Vaina húmeda (g)	Vaina seca y molida (g)	Humedad (%)	Materia seca (%)
1000	426.05	42.60	57.4

Anexo 2. Datos obtenidos para la extracción de 200 g de los frutos de *Acacia farnesiana* utilizando solventes de distinta polaridad.

Extracto	Peso vial vacío (g)	Peso vial con extracto (g)	Extracto (g)	Rendimiento (%)
Hexánico	29.79	30.08	0.29	0.145
Clorofórmico	29.86	31.39	1.53	0.765
Acetónico	29.76	30.97	1.21	0.605
Metanólico	27.65	45.50	17.85	8.925
Acuoso	29.71	54.23	24.52	12.26
Metanólico:acuoso	29.76	60.14	30.38	15.19

Anexo 3. Preparación de reveladores químicos para cromatografía en capa fina (CCF).

3.1 Anisaldehído (p-anisaldehído)

En un frasco ámbar se colocaron 85 mL de metanol, 10 mL de ácido acético, 5 mL de ácido sulfúrico y 0.5 mL de p-anisaldehído, posteriormente el frasco se agitó suavemente para incorporar todos los reactivos.

3.2 DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

Se pesaron 0.10 g de DPPH y se disolvieron en 50 mL de metanol.

3.3 Sulfato Cérico

En un matraz Erlenmeyer se pesaron 350 g de hielo y se agregaron 22.1 mL de ácido sulfúrico concentrado, se agitó suavemente y posteriormente se agregaron 12.5 g de sulfato cérico, el matraz se colocó en una parrilla de calentamiento con agitación constante hasta la disolución completa del reactivo.

Anexo 4. Preparación de curvas patrón de estándares de esteroides, terpenos, ácidos fenólicos y flavonoides para análisis de HPLC.

Solución stock: se pesó 1 mg de cada estándar y en un matraz se llevó al aforo con 10 mL de la fase móvil correspondiente, a partir de dicha solución se hicieron las diluciones de acuerdo a la siguiente tabla:

Volumen final de solución (mL)	Volumen de estándar (mL)	Volumen de fase móvil (mL)	Concentración final de estándar en fase móvil (mg/mL)	Concentración final de estándar en fase móvil (ppm)
1	1	0	0.1	100
1	0.5	0.5	0.05	50
1	0.5	0.5	0.025	25
1	0.5	0.5	0.0125	12.5
1	0	1	0	0

Anexo 5. Curvas de calibración de compuestos terpénicos

5.1 Curva de calibración de α -amirina como estándar de referencia en la determinación de terpenos.

Percent report based on Area

Name	RT [min]	Area	Height	RF	Amount [ug/ul]
alfa amirina	14.151	57.0838	2.5787	0.20953	11.961

Calibration Curves:

Compound: alfa amirina

Signal: DAD1B

Exp. RT: 14.151

Corr. Coeff.: 0.999966

Residual: 1.83490

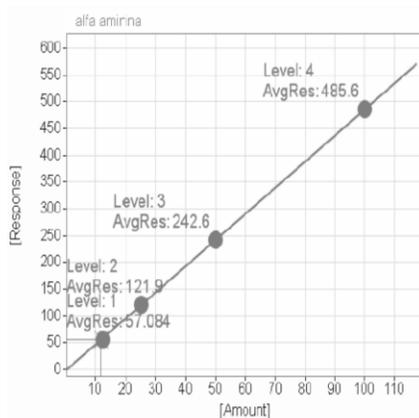
Formula: $y = ax + b$

a: 4.86906

b: -1.15316

c: 0.00000

d: 0.00000



5.2 Curva de calibración de β-amirina como estándar de referencia en la determinación de terpenos.

Percent report based on Area

Name	RT [min]	Area	Height	RF	Amount [ug/ul]
beta amirina	12.736	108.2802	5.0923	0.11367	12.308

Calibration Curves:

Compound: beta amirina

Signal: DAD1B

Exp. RT: 12.708

Corr. Coeff.: 0.999651

Residual: 9.85198

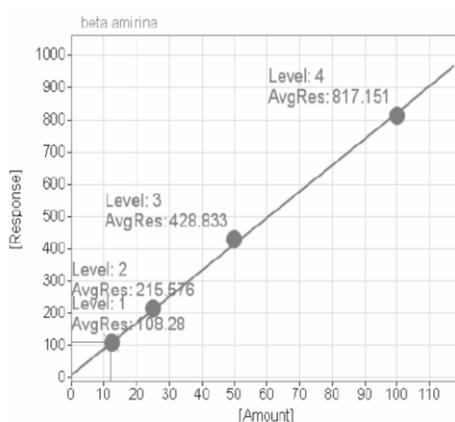
Formula: $y = ax + b$

a: 8.16491

b: 7.78421

c: 0.00000

d: 0.00000



5.3 Curva de calibración de lupeol como estándar de referencia en la determinación de terpenos.

Percent report based on Area

Name	RT [min]	Area	Height	RF	Amount [ug/ul]
lupeol	10.831	940.6074	51.7428	0.10522	98.972

Calibration Curves:

Compound: lupeol

Signal: DAD1B

Exp. RT: 10.831

Corr. Coeff.: 0.999434

Residual: 14.44275

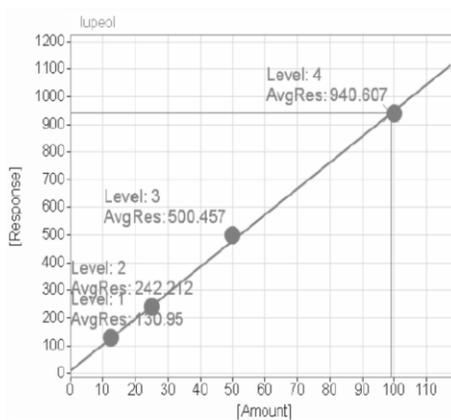
Formula: $y = ax + b$

a: 9.39877

b: 10.39141

c: 0.00000

d: 0.00000



Anexo 6. Curvas de calibración de compuestos esteroides

6.1 Curva de calibración de stigmasterol como estándar de referencia en la determinación de esteroides.

Percent report based on Area

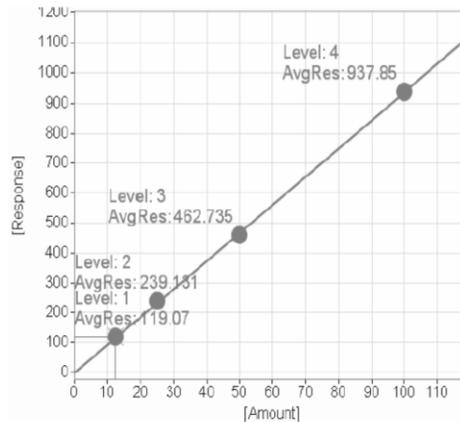
Name	RT [min]	Area	Height	RF	Amount [ug/ul]
	13.383	119.0698	5.5986	0.10592	12.612

Calibration Curves:

Compound:

Signal: DAD1B
Exp. RT: 13.397
Corr. Coeff.: 0.999947
Residual: 4.40407

Formula: $y = ax + b$
a: 9.34943
b: 1.15347
c: 0.00000
d: 0.00000



6.2 Curva de calibración de campesterol como estándar de referencia en la determinación de esteroides.

Percent report based on Area

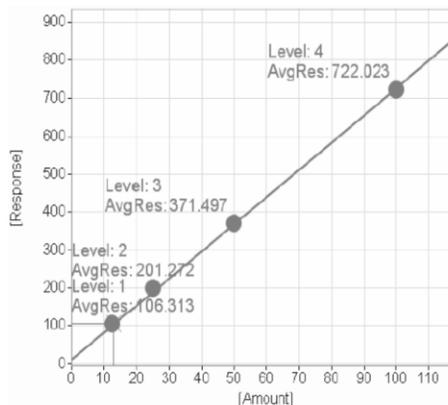
Name	RT [min]	Area	Height	RF	Amount [ug/ul]
	13.574	106.3134	4.4803	0.12348	13.128

Calibration Curves:

Compound:

Signal: DAD1B
Exp. RT: 13.584
Corr. Coeff.: 0.999519
Residual: 10.10751

Formula: $y = ax + b$
a: 7.13543
b: 12.64261
c: 0.00000
d: 0.00000



6.3 Curva de calibración de β -sitosterol como estándar de referencia en la determinación de esteroides.

Percent report based on Area

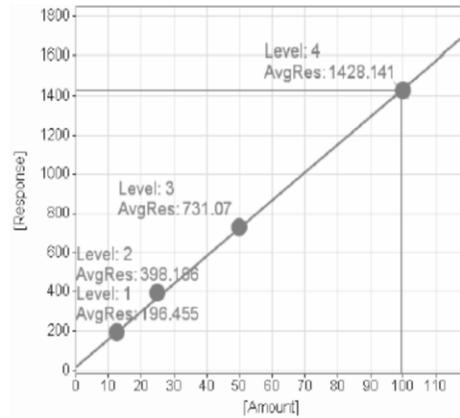
Name	RT [min]	Area	Height	RF	Amount [ug/ul]
	15.298	1428.1405	57.8883	0.06964	99.455

Calibration Curves:

Compound:

Signal: DAD1B
 Exp. RT: 15.298
 Corr. Coeff.: 0.999579
 Residual: 18.76771

Formula: $y = ax + b$
 a: 14.16133
 b: 19.72237
 c: 0.00000
 d: 0.00000



Anexo 7. Curvas de calibración de ácidos fenólicos

7.1 Curva de calibración de ácido cafeico como estándar de referencia en la determinación de ácidos fenólicos.

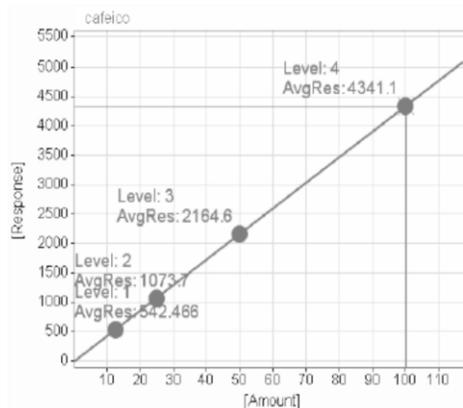
Percent report based on Area

Name	RT [min]	Area	Height	RF	Amount [ug/ul]
cafeico	8.031	4341.0674	277.5788	0.02305	100.064

Calibration Curves:

Compound: cafeico
 Signal: DAD1A
 Exp. RT: 8.095
 Corr. Coeff.: 0.999996
 Residual: 5.94111

Formula: $y = ax + b$
 a: 43.42294
 b: -3.98683
 c: 0.00000
 d: 0.00000



7.2 Curva de calibración de ácido cinámico como estándar de referencia en la determinación de ácidos fenólicos.

Percent report based on Area

Name	RT [min]	Area	Height	RF	Amount [ug/ul]
cinamico	22.251	752.4447	21.7537	0.03437	25.861

Calibration Curves:

Compound: cinamico

Signal: DAD1A

Exp. RT: 22.405

Corr. Coeff.: 0.999118

Residual: 59.54608

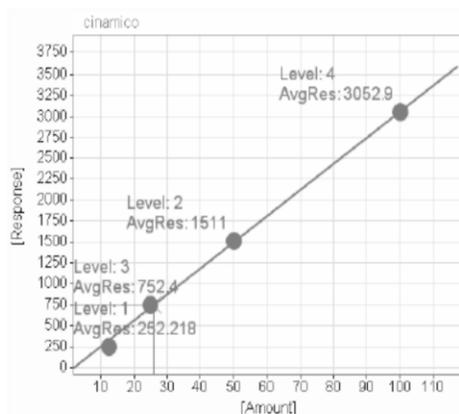
Formula: $y = ax + b$

a: 31.03733

b: -50.19614

c: 0.00000

d: 0.00000



7.3 Curva de calibración de ácido clorogénico como estándar de referencia en la determinación de ácidos fenólicos.

Percent report based on Area

Name	RT [min]	Area	Height	RF	Amount [ug/ul]
clorogenico	5.562	588.0950	46.1639	0.17141	100.807

Calibration Curves:

Compound: clorogenico

Signal: DAD1A

Exp. RT: 5.560

Corr. Coeff.: 0.999591

Residual: 7.70699

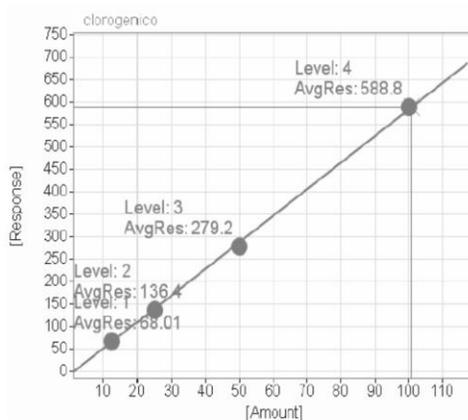
Formula: $y = ax + b$

a: 5.90156

b: -6.82650

c: 0.00000

d: 0.00000



7.4 Curva de calibración de ácido gálico como estándar de referencia en la determinación de ácidos fenólicos.

Percent report based on Area

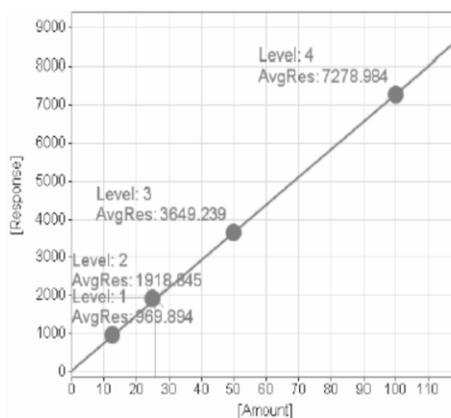
Name	RT [min]	Area	Height	RF	Amount [ug/ul]
	2.124	1918.8446	373.6037	0.01346	25.830

Calibration Curves:

Compound:

Signal: DAD1A
 Exp. RT: 2.123
 Corr. Coeff.: 0.999897
 Residual: 47.32421

Formula: $y = ax + b$
 a: 72.37105
 b: 49.47798
 c: 0.00000
 d: 0.00000



7.5 Curva de calibración de ácido ferúlico como estándar de referencia en la determinación de ácidos fenólicos.

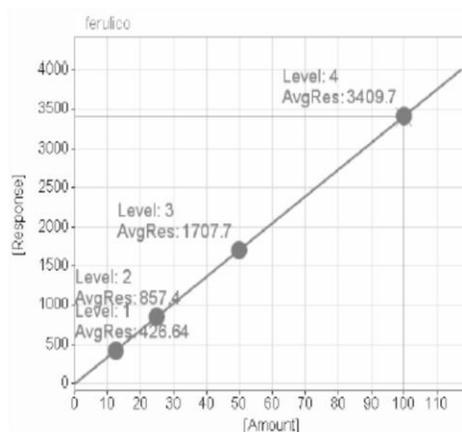
Percent report based on Area

Name	RT [min]	Area	Height	RF	Amount [ug/ul]
ferulico	21.668	3405.0212	104.1800	0.02932	99.825

Calibration Curves:

Compound: ferulico
 Signal: DAD1A
 Exp. RT: 21.720
 Corr. Coeff.: 0.999999
 Residual: 2.53075

Formula: $y = ax + b$
 a: 34.09104
 b: 1.87388
 c: 0.00000
 d: 0.00000



Anexo 8. Curvas de calibración de compuestos flavonoides

8.1 Curva de calibración de catequina como estándar de referencia en la determinación de flavonoides.

Percent report based on Area

Name	RT [min]	Area	Height	RF	Amount [ug/ul]
catequina	7.156	2528.4712	188.1063	0.03952	99.935

Calibration Curves:

Compound: catequina

Signal: DAD1G

Exp. RT: 7.188

Corr. Coeff.: 0.999982

Residual: 6.81864

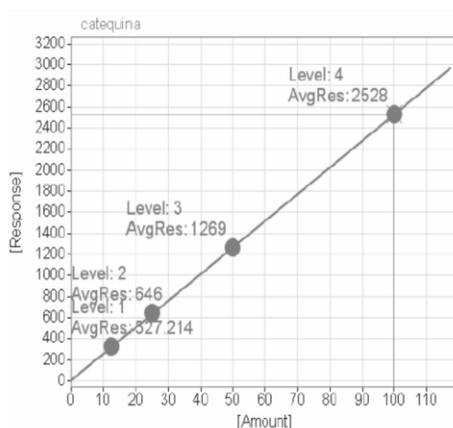
Formula: $y = ax + b$

a: 25.21715

b: 8.39979

c: 0.00000

d: 0.00000



8.2 Curva de calibración de epicatequina como estándar de referencia en la determinación de flavonoides.

Percent report based on Area

Name	RT [min]	Area	Height	RF	Amount [ug/ul]
epicatequina	5.386	261.0970	9.6513	0.09258	24.171

Calibration Curves:

Compound: epicatequina

Signal: DAD1G

Exp. RT: 5.386

Corr. Coeff.: 0.999865

Residual: 9.37608

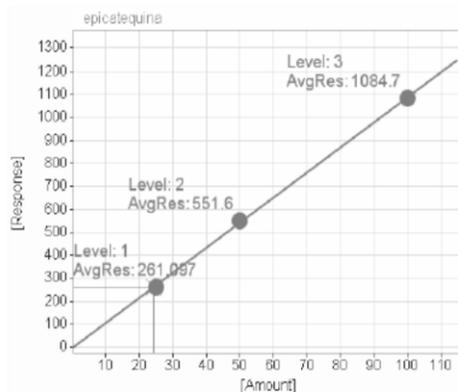
Formula: $y = ax + b$

a: 10.89212

b: -2.18121

c: 0.00000

d: 0.00000



8.3 Curva de calibración de kaempferol como estándar de referencia en la determinación de flavonoides.

Percent report based on Area

Name	RT [min]	Area	Height	RF	Amount [ug/ul]
kaempferol	7.794	0.2552	0.0219	50.70593	12.941

Calibration Curves:

Compound: kaempferol

Signal: DAD1G

Exp. RT: 7.794

Corr. Coeff.: 0.997818

Residual: 0.06270

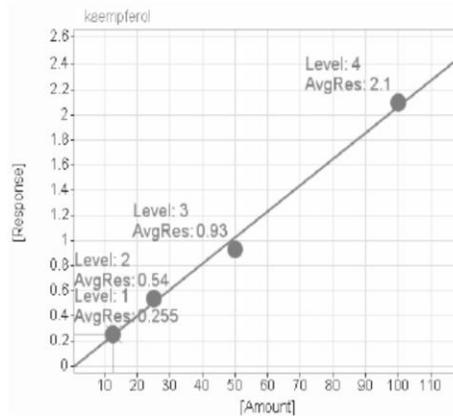
Formula: $y = ax + b$

a: 0.02076

b: -0.01343

c: 0.00000

d: 0.00000



8.4 Curva de calibración de quercetina como estándar de referencia en la determinación de flavonoides.

Percent report based on Area

Name	RT [min]	Area	Height	RF	Amount [ug/ul]
quercetina	4.308	0.1846	0.0233	72.16032	13.321

Calibration Curves:

Compound: quercetina

Signal: DAD1G

Exp. RT: 4.308

Corr. Coeff.: 0.999229

Residual: 0.02123

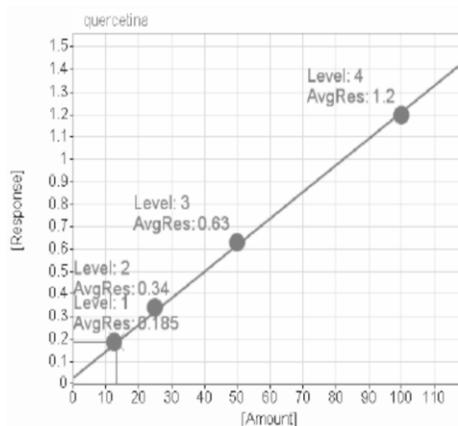
Formula: $y = ax + b$

a: 0.01184

b: 0.02686

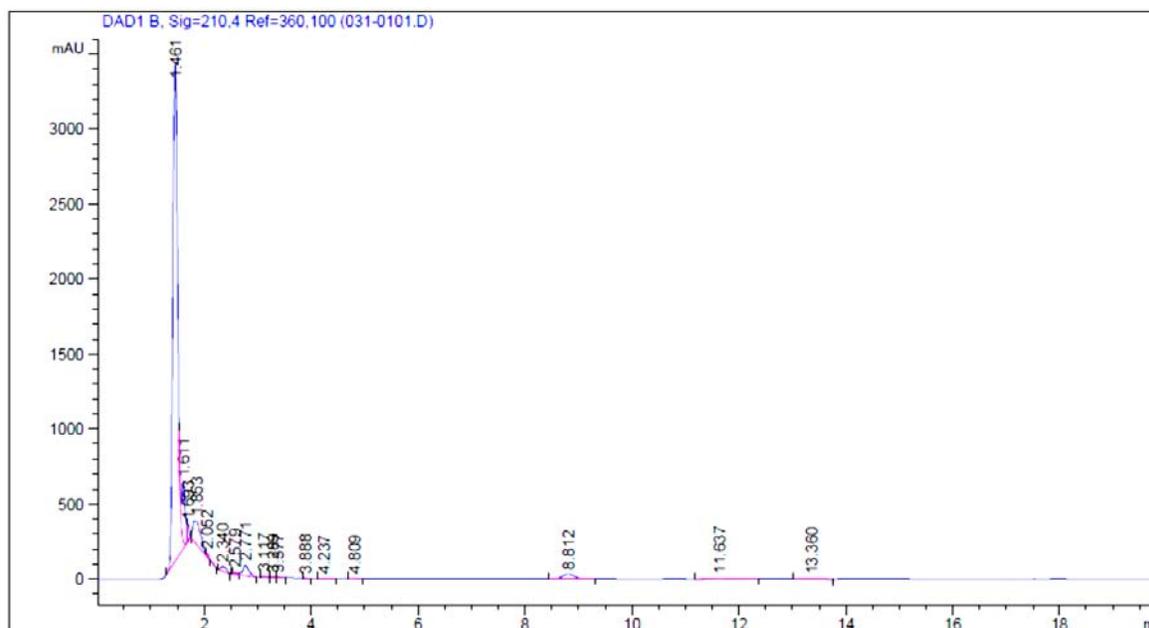
c: 0.00000

d: 0.00000

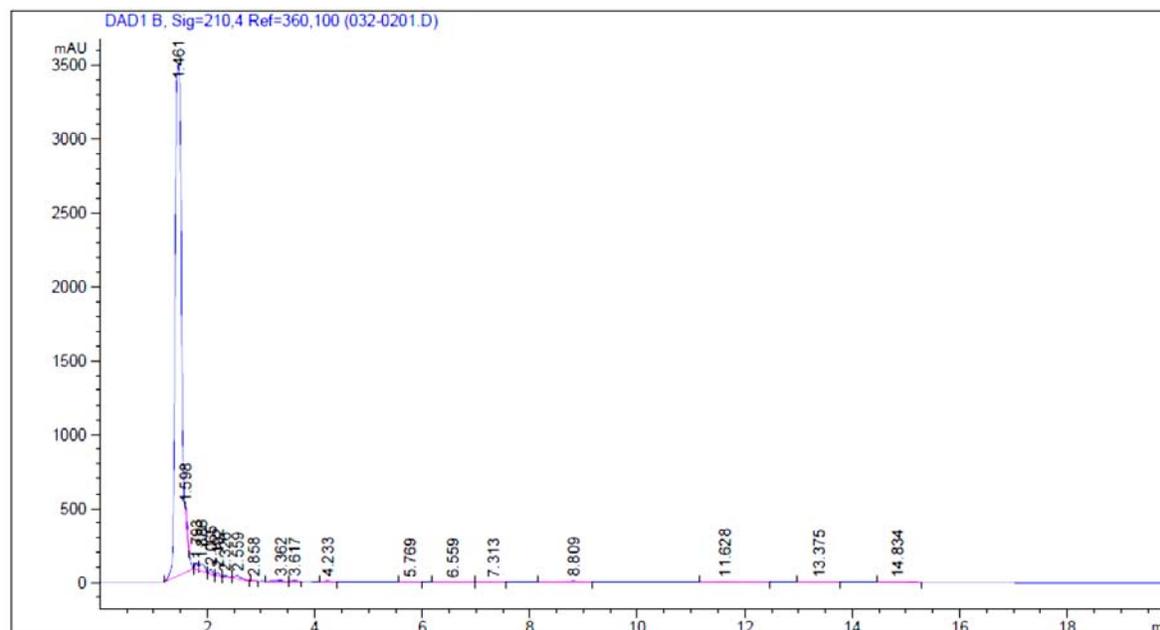


Anexo 9. Cromatogramas del equipo HPLC para las muestras analizadas

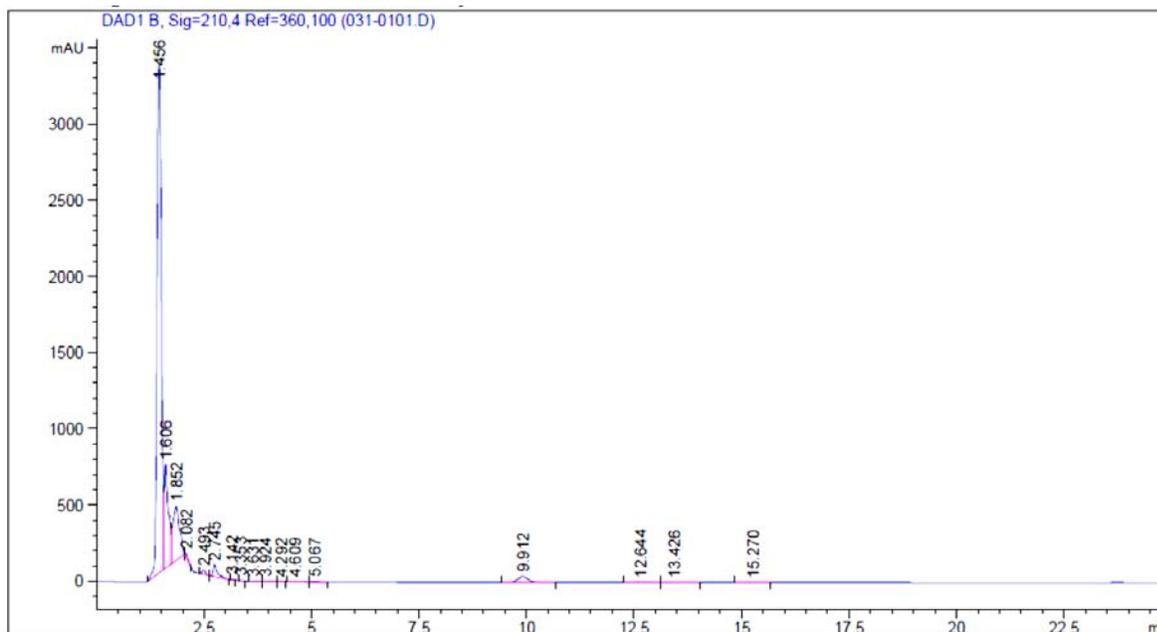
9.1 Cromatograma para la fracción hexánica por la metodología de terpenos



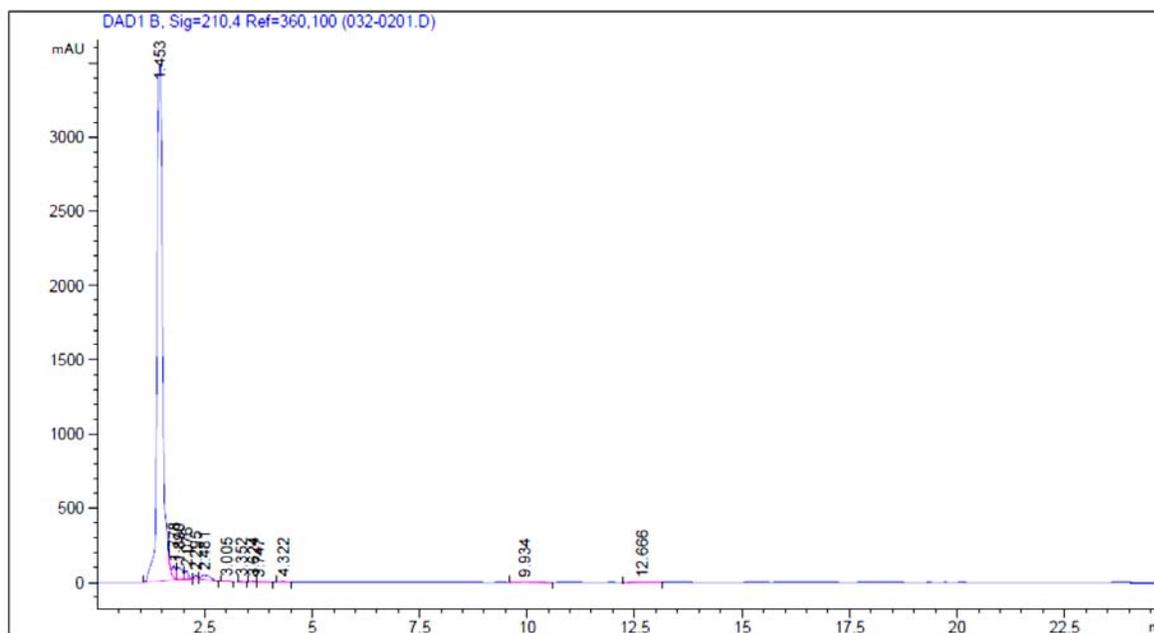
9.2 Cromatograma para la fracción clorofórmica por la metodología de terpenos



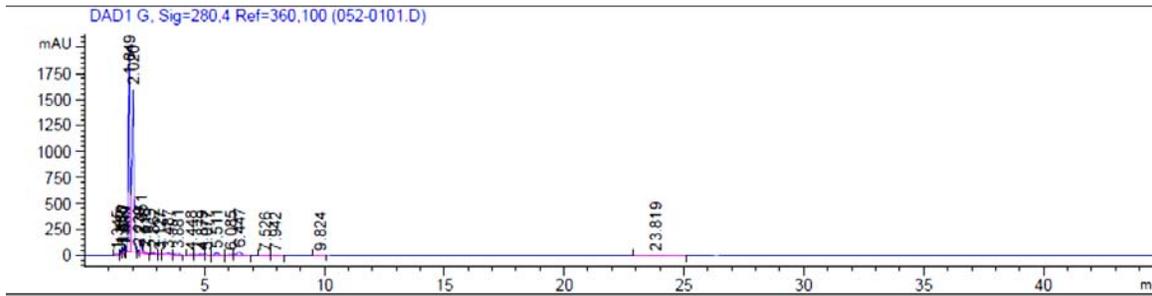
9.3 Cromatograma para la fracción hexánica por la metodología de esteroides



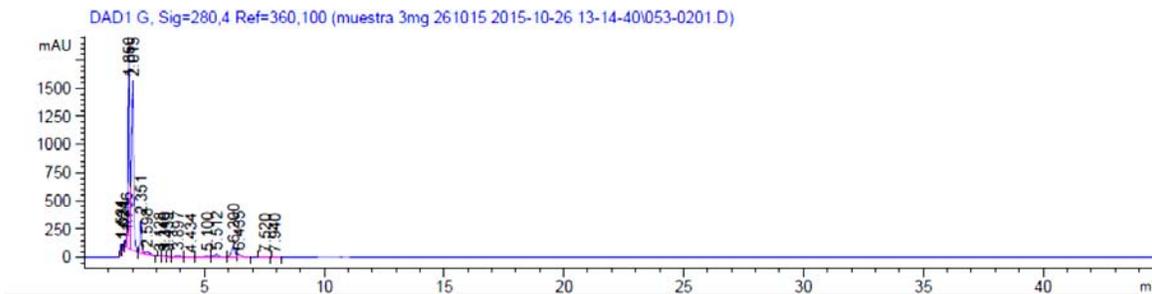
9.4 Cromatograma para la fracción clorofórmica por la metodología de esteroides



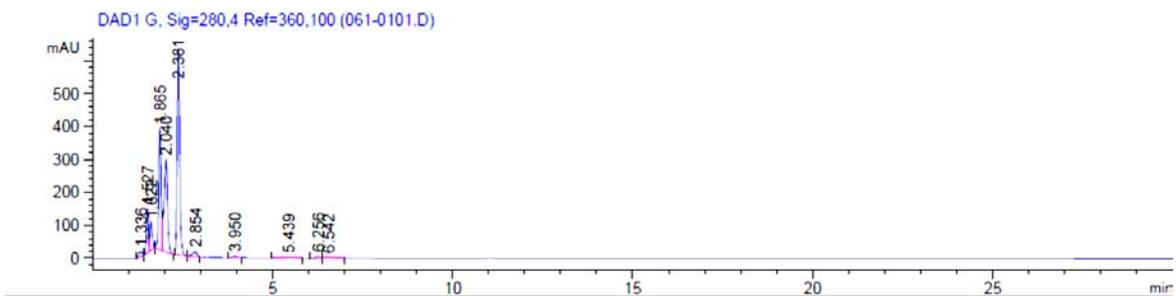
9.5 Cromatograma para la fracción acetónica por la metodología de ácidos fenólicos



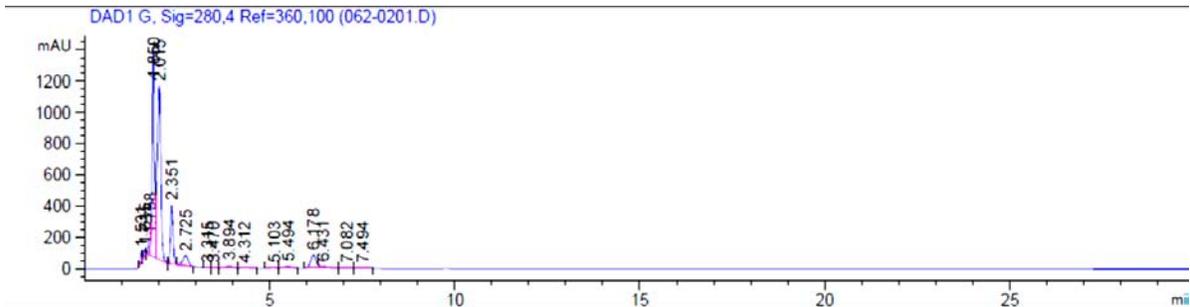
9.6 Cromatograma para la fracción metanólica por la metodología de ácidos fenólicos



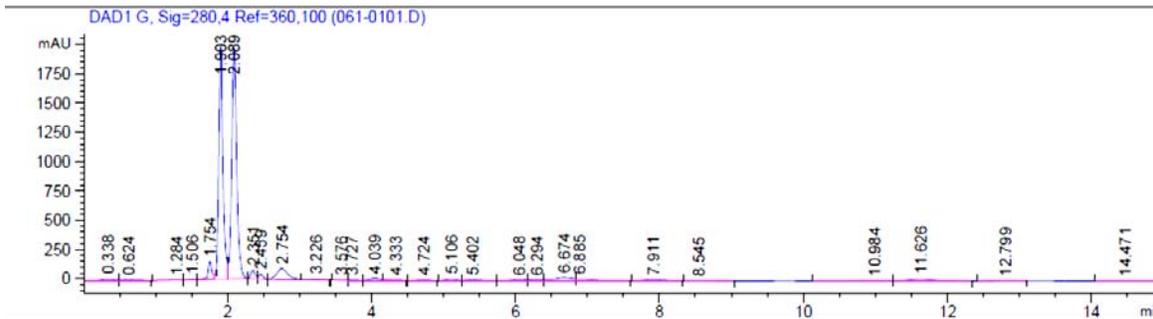
9.7 Cromatograma para la fracción acuosa por la metodología de ácidos fenólicos



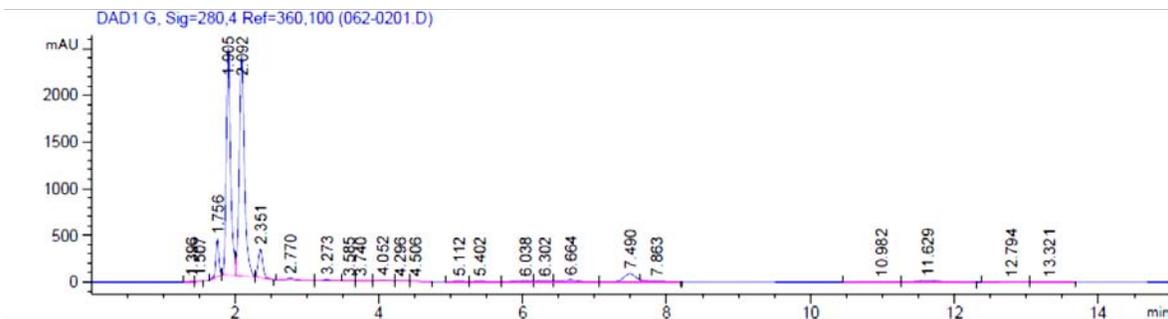
9.8 Cromatograma para la el extracto metanólico:acuoso por la metodología de ácidos fenólicos



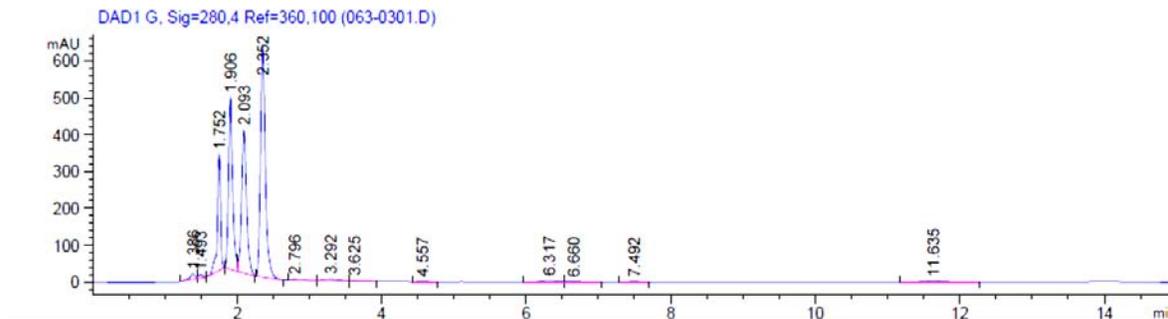
9.9 Cromatograma para la fracción acetónica por la metodología de flavonoides



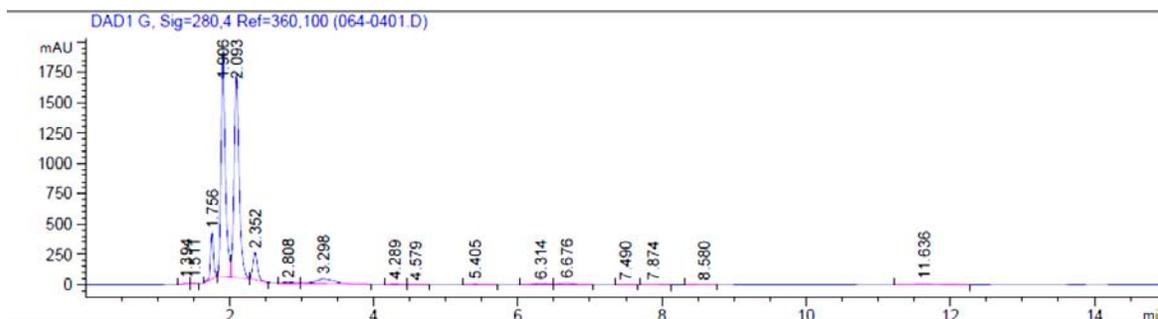
9.10 Cromatograma para la fracción metanólica por la metodología de flavonoides



9.11 Cromatograma para la fracción acuosa por la metodología de flavonoides



9.12 Cromatograma para el extracto metanólico:acuoso por la metodología de flavonoides



Anexo 10. Preparación de soluciones de los extractos de *Acacia farnesiana* utilizadas para el ensayo de capacidad protectora frente a peróxido de hidrógeno.

Solución stock: se pesaron 3 mg del extracto y se adicionó 1 mL del vehículo correspondiente, se disolvió perfectamente, a partir de la solución se realizaron las diluciones de acuerdo a la siguiente tabla:

Factor de dilución	Volumen final de solución (mL)	Volumen de extracto (mL)	Volumen de medio DMEM (mL)	Concentración final de extracto en medio DMEM (ppm)
1:5	2	0.40 (Stock)	1.60	600
1:3	2	0.66 (1:5)	1.33	300
1:6	2	0.33 (1:5)	1.66	200
1:12	2	0.16 (1:5)	1.83	100

DMEM: medio Dulbecco's Modified Eagle Medium

Anexo 11. Preparación de las soluciones y reactivos requeridos para el ensayo de actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) por el método de TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina).

11.1 Buffer de fosfatos (PBS) 80 mM, pH= 5.4

Se pesaron 100 mg de KCl, 5.24 g de KH₂PO₄, 4, 000 mg de NaCl y 0.524 g de Na₂HPO₄ . 12 H₂O y se aforó a 500 mL con agua destilada.

11.2 HTAB (Bromuro de hexadeciltrimetil amonio) 0.5 %

Se pesaron 0.5 g de HTAB y se aforó a 100 mL con PBS 80 mM, pH= 5.4

11.3 TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) 18.4 mM

El reactivo se preparó en una solución de dimetilformamida (DMF) al 50 % en agua, el TMB se disolvió primero en DMF y después se agregó la misma cantidad de H₂O desionizada para completar el volumen final usando la siguiente relación:

$$18.4 \text{ mM} = 4.42 \text{ mg/mL}$$

11.4 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 0.017 %

Se preparó una solución concentrada al 1.7% para la cual se tomaron 170 μL de peróxido de hidrógeno al 30 % y se aforó a 10 mL con agua desionizada. Seguido de esto se tomaron los volúmenes señalados en la siguiente tabla de acuerdo al volumen de trabajo que se requiriera.

Volumen de solución de trabajo a preparar (mL)	Alícuota solución A (μL)	Agua desionizada (mL)
10	100	9.9
20	200	19.8
30	300	29.7

11.5 Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 M

Se tomaron 10.66 mL de H_2SO_4 y se aforó a 100 mL con agua desionizada. Precaución: el matraz se colocó aproximadamente 50 mL de agua fría y se agregó lentamente el H_2SO_4 para evitar proyecciones de la solución.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Adedapo, A.A., Sofidiya, M.O., Masika, P.J., Afolayan, A.J. (2008). Anti-inflammatory and analgesic activities of the aqueous extract of *Acacia karroo* stem bark in experimental animals. *Nordic Pharmacological Society. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*.103:397–400.
- Alemán, E.G., Torres, T.N., Tovar, A.R. (2004). Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) en el desarrollo de la obesidad y resistencia a la insulín. *Revista de Investigación Clínica*. 56(3): 351-367.
- Ammon, H.P., Mack, T., Singh, G.B., Safayhi, H. (1991). Inhibition of leukotriene B4 formation in rat peritoneal neutrophils by an ethanolic extract of the gum resin exudate of *Boswellia serrata*. *Planta Medica*. 57: 203-207.
- Amos, S., Akah, P.A., Odukwe, C.J., Gamaniel, K.S., Wambede, C. (1999). The pharmacological effects of an aqueous extract from *Acacia nilotica* seeds. *Phytotherapy Research*. 13:683–685.
- Angurell, I., Casamitjana, N., Caubet, A., Dinarès, I., Llor, N., Muñoz-Torrero, D., Nicolás, E., Pérez-García, M.L., Dolors, M., Rosell, G., Seco, M., Velasco, D. (2015). Operaciones básicas en el laboratorio de Química. Barcelona, España. Recuperado de <http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/index1.html#>.
- Arena, E., Fallico, B., Maccaro, E.E. (2001). Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chemistry*. 74:423-427.
- Avello, M., Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*. 994:161-172.
- Barranco, P.K. (2010). Componentes bioactivos en recursos alimenticios y forrajeros tropicales no convencionales. (Estancia estudiantil). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México D.F. 10-13.
- Barros de Oliveira, C.M., Sakata, R.K., Machado, A., Gerola, L.R., Salomão, R. (2011). Citocinas y Dolor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 61(2): 137-142.
- Behera, B.C., Verma, N., Sonone, A., Makhija, U. (2008). Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. *Bioresource Technology*. 99:776-784.

- Bernhoft, A. (2010). A brief review on bioactive compounds in plants. Capítulo 1:11-17. En: Bernhoft, A. (2010). Bioactive compounds in plants – benefits and risks for man and animals. Ed. The Norwegian Academy of Science and Letters, Noruega, Oslo. 255 pp.
- Blasa, M., Gennari, L., Angelino, D., Ninfali, P. (2010). Fruit and vegetable antioxidants in health. Capítulo 3: 37-58. En W. Ronald Ross y R.P. Victor (2010). Bioactive Foods in Promoting Health. Academic Press. San Diego, CA. Pp. 729
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*. 91: 179-194.
- Blum, U. (1996). Allelopathic interactions involving phenolic acids. *Journal of Nematology*. 28:259-267.
- Bouhrel, I., Valenti, K., Kilani, S., Skandrani, I., Ben Sghaier, M., Mariotte, A., Genevieve, Dijoux, M., Ghedira, K., Hininger, I., Laporte, F., Chekir, L. (2008). Antimutagenic, antigenotoxic and antioxidant activities of *Acacia salicina* extracts (ASE) and modulation of cell gene expression by H₂O₂ and ASE treatment. *Toxicology in Vitro*. 22:1264-1272.
- Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*. 78(3):206-209.
- Bukhari, I.A., Khan, R.A., Gilani, A.H., Ahmed, S., Saeed, S.A. (2010). Analgesic, anti-inflammatory and anti-platelet activities of the methanolic extract of *Acacia modesta* leaves. *Inflammopharmacology*. 18:187–196.
- Chang, S.T., Wu, J.H., Wang, S.Y., Kang, P.L., Yang, N.S., Yur, L.F. (2001). Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:3420–3424.
- Chaubal, R., Mujumdar, A.M., Puranik, V., Deshpande, V.H., Deshpande, N.R. (2003). Isolation and X-ray study of an anti-inflammatory active androstene steroid from *Acacia nilotica*. *Planta Médica*. 69(3): 287-288.
- Chaves, N., Escudero, J.C. (1999). Allelochemicals Interactions. Capítulo 1:4-8. En: Dakshini, K.M., Chester, F.L., Inderjit (1999). Variation of flavonoid synthesis induced by ecological factors. Principles and practices in plant ecology. CRC Press. Boca Raton, Florida. 551 pp.
- Cheng, H., Xia B., Zhang, L., Zhou, F., Zhang, Y.X., Ye, M., Hu, Z.G., Li, J., Wang, Z.L., Li, C., Guo, Q.S. (2006). Matrine improves 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Pharmacological Research*. 53:202-208.

- Claria, J., 2003. Cyclooxygenase-2 biology. *Current Pharmaceutical Design*. 9:2177–2190.
- Costa, D., Marques, A., Reis, R., Lima, J.L., Fernandes, E. (2005). Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivates. *Free Radical Biology and Medicine*. 40: 632-640.
- Cuchillo, M., Delgadillo, C., Navarro, A., Pérez-Gil, F. (2010). Antioxidant activity, bioactive polyphenols in Mexican goats' milk cheeses on summer grazing. *Journal of Dairy Research*. 77(1):20-26.
- Cuchillo, M., Delgadillo, C., Navarro, A., Pérez-Gil, F. (2013). Chemical composition, antioxidant activity and bioactive compounds of vegetation species ingested by goats on semiarid rangelands. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 22(2):106-115.
- Dafallah, A.A., Al-Mustafa, Z. (1996). Investigation of the antiinflammatory activity of *Acacia nilotica* and *Hibiscus sabdariffa*. *American Journal of Chinese Medicine*. 24: 263–269.
- Daniel, M.A y Van Dyke, T. (1996). Alterations in phagocyte function and periodontal infection. *Journal of Periodontology*. 67:1070-1079.
- Daugherty, A., Dunn, J., Rateri, D., Hienecke, W. (1994). Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *Journal of Clinical Investigation*. 94: 437-444.
- Del-Ángel, M., Nieto, A., Ramírez, T., Delgado, G. (2015). Anti-inflammatory effect of natural and semi-synthetic phthalides. *European Journal of Pharmacology*. 752:40-48.
- Delgadillo, C., Cuchillo, M., Espinosa, J.G., Medina, O.N., Molina, E., Díaz, M., Álvarez, M.A., Ledesma, J.A., Pedraza, J. (2015). Antioxidant activity and protection against oxidative-induced damage of *Acacia shaffneri* and *Acacia farnesiana* pods extracts: in vitro and in vivo assays. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15:435.
- Dongmo, A.B., Nguielefack, T., Lacaille-Dubois, M.A. (2005). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Acacia pennata* wild (Mimosaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 98:201–206.
- Dorta, E., Gloria Lobo, M., Gonzalez, M. (2012). Reutilization of mango byproducts: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *Journal of Food Science*. 77(1):C80-C88.
- Dragsted, L.O. (2008). Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers. *European Journal of Nutrition*. 47(2):3-18.

- Erzsébet, L., Mócsai, A. (1999). Exocytosis of neutrophil granulocytes. *Biochemical Pharmacology*. 57 (11): 1209-1214.
- Escribano, M.R. (2013). Efecto antioxidante de las vainas de *Acacia farnesiana* en plasma del jerboa (*Meriones unguiculatus*). Tesis de Licenciatura. UNAM. México D.F. 102 pp.
- Feregrino-Pérez, A.A., Torres, I., Vargas, M., Munguia, P.V., Loarca, G.F., Mendoza, S., Ocampo, R.V., Rico, E., Guevara, R. (2011). Antioxidant and antimutagenic activities of *Acacia pennatula* pods. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 70: 859-864.
- Ferrándiz, M.L. (2003). Subprograma X (Química fina farmacéutica). Programa X.6 (PIBARTRI). En: Alcaraz, M.J., Calixto, J.B., Delgado, R. (2003). “Técnicas *in vitro* para el estudio de fármacos antiinflamatorios”. Collado Oliver. Barcelona, España. 198 pp.
- Firm, R. (2010). The Main Classes of NPs—Only a Few Pathways Lead to the Majority of NPs. Capítulo 3: 74-75. En: Jackson, M.B. (2010). *Nature’s Chemicals. The natural products that shaped our world*. Oxford University Press, Oxford. 264 pp.
- Fraga, C.G., Arias, R.F., Ilesuy, S.F., Koch, O.R., Boveris, A. (1987). Effect of vitamin E and selenium-deficiency on rat liver chemiluminescence. *Biochemical Journal* 2:383-386.
- Franco, L.A. (2006). Estudio de la actividad antiinflamatoria de los principios activos de los cálices de *Physalis peruviana*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. 115 pp.
- Freitas, M., Porto, G., Lima, J., Fernandes, E. (2007). Isolation and activation of human neutrophils *in vitro*. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clinical Biochemistry*. 41: 570-575.
- Frölich, J.C. (1997). A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends in Pharmacological Science*. 18:30-34.
- Gábor, M. (2003). Inflammation Protocols. *Methods in Molecular Biology*. 225:129-137.
- Gilbert, D.L., Colton, C.A. (1999). Antioxidant protection and oxygen radical signaling. Capítulo 8: 189-218. En: Gutteridge, J., Halliwell, B. (1999). *Reactive oxygen species in biological systems*. Kluwer Academic/ Plenum Publishers. New York, USA. 695 pp.
- Girón, M., Fernández-Yañez, A., Mañá-Alvarenga, S., Molina-Habas, A., Nolasco, A., Gómez-Beneyto, M. (2010). Efficacy and effectiveness of individual family intervention on social and clinical functioning and family burden in severe schizophrenia: A 2-year randomized controlled study. *Psychological Medicine*. 40(1):73–84.

- Goldsby, R.A., Kindt, T., Osborne, B., Kudy, J. (2004). Leukocyte migration and inflammation. Capítulo 15: 324. En: *Inmunology*. 5ta edición. Mc Graw Hill. New York. 368 pp.
- Gómez, L.F., Signoret, J., Abuín, M.C. (1970). Mezquites y huizaches: algunos aspectos de la economía, ecología y taxonomía de los géneros *Prosopis* y *Acacia* en México. Ediciones del Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, A.C. México, D.F. 192 pp.
- Gómez, Q.J., Amaro, G.R., Preciado de la T., J.F. y Martínez, R.L. (1996). Marco de referencia para la caprinocultura de la Mixteca Poblana. Memorias. XI Reunión Nacional sobre Caprinocultura. UACH. Chapingo. México. pp. 192-197.
- Gracy, R.W., Talent, J.M., Kong, Y., Conard, C.C. (1999). Reactive oxygen species the unavoidable environmental insult. *Mutation Research*. 2:17–22.
- Grayer, R.J., Harborne, J.B. (1994). A survey of antifungal compound from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry*. 37:19-31.
- Guizar, E. y Sánchez, A. (1991). Guía para el reconocimiento de los principales árboles del alto Balsas. Universidad Autónoma de Chapingo. Dirección de Difusión Cultural. División de Ciencias Forestales. Montecillo. Estado de México. pp. 15-28.
- Guleria, R.S., Choudhary, R., Tanaka, T., Baker, K.M., Pan, J. (2011). Retinoic acid receptor-mediated signaling protects cardiomyocytes from hyperglycemia induced apoptosis: Role of the rennin-angiotensin system. *Journal of Cellular Physiology*. 226(5):1292-1307.
- Halliwell, B. (2007). Measurement of reactive species. Capítulo 5:309-336. En: Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, UK. 777 pp.
- Hanausek, M., Ganesh, P., Walaszek, Z., Arntzen, C.J., Slaga, T.J., Gutterman, J.U. (2001). Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth), suppress H-ras mutations and aneuploidy in a murine skin carcinogenesis model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98:11551–11556.
- Hannachi, H., Elfalleh, W., Ennajeh, I., Laajel, M., Khouja, M., Ferchichi, A., Nasri, N. (2011). Chemicals profiling and antioxidants activities of *Acacia* seeds. *Journal of Medicinal Plants*. 5 (31): 6869-6875.
- Hansberg, T.W. (2008). El dioxígeno y sus especies reactivas. Capítulo 2: 25-48. En: Konigsberg, F.M. (2008). Radicales libres y estrés oxidante. Aplicaciones médicas. Ed: El Manual Moderno S.A de C.V. México D.F. 623 pp.

- Harborne, J.B. (1991). Biochemical plant ecology. Capítulo 14: 503-516. En: Dey, P. M., Harborne, J. B. (1991). Plant Biochemistry. Academic Press. Londres. 529 pp.
- Haridas, V, Arutzen, C.J., Gutterman, J.U. (2001). Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Bentham), inhibit activation of nuclear factor-kappaB by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(20):11557.
- Henderson, W.R. (1994). The role of leukotrienes in inflammation. *Annals of International Medicine*. 2:684-697.
- Hernández, J.M. (2005). Cromatografía líquida de alta eficacia. *Educación Continuada del Laboratorio Clínico*. 8:49-62.
- Hernández, L., Palazon, J., Navarro, A. (2012). The Pentacyclic Triterpenes, α and β -amyryns: A Review of Sources and Biological Activities. Capítulo 23: 487-502. En: Rao, V. (2012). Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health. Ed: InTech. 548 pp.
- Hernández-Vázquez, L., Mangas, S., Palazón, J., Navarro-Ocaña, A. (2010). Valuable medicinal plants and resins: Commercial phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products*. 31(3):476–480.
- Hibi, M., Nakajima, K., Hirano, T. (1996). IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *Journal of Molecular Medicine*. 74:1–12.
- Hirano, T., Matsuda, T., Nakajima, K. (1994). Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily. *Stem Cells*. 12: 262–277.
- Hu, X.D., Yang, Y., Zhong, X.G., Zhang, X.H., Zhang, Y.N., Zheng, Z.P., Zhou, Y., Tang, W., Wang, Y.F., Hu, L.H., Zuo, J.P. (2008). Anti-inflammatory effects of Z23 on LPS-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 120: 447–451.
- Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:1841–1856.
- Ibarra, M.M. (2002). De New York a la Mixteca. Proyecto. CONACYT. México.
- Ikeda, Y., Murakami, A., Ohigashi, H. (2008). Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory triterpenoid. *Molecular Nutrition Food Research*. 52:26-52.

- INEGI. (2000). Síntesis geográfica del estado de Puebla. Libro electrónico. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México.
- Joshi, K.C., Tholia, M.K., Sharma, T. (1975). Chemical examination of *Acacia modesta*. *Planta Medica*. 27(3): 281–283.
- Kalesnikoff, J., Galli, S.J. (2008). New developments in mast cell biology. *Nature Immunology*. 9:1215-1223.
- Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A.J. (1995). Basic and clinical pharmacology. Mc Graw Hill. 6ta Ed. San Francisco, California. 1245 pp.
- Kazuo, S., Hiromi, O., Sumiko, S., Tatsuichiro, S., Toshio, F. (1983). Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical Biochemistry*. 132: 345-352.
- Kendall, H.K., Marshall, R.I., Bartold, P.M. (2011). Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Diseases*. 7 (1): 2-10.
- Koksel, O., Ozdulger, A., Tamer, L., Cinel, L., Ercil, M., Degirmenci, U., Unlu, S., Kanik, A. (2006). Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 19: 90-95.
- Kubes, P., Granger, D.N. (1996). Leukocyte-endothelial cell interactions evoked by mast cells. *Cardiovascular Research*. 32:699-708.
- Lee, J.I., Mukhtar, H., Bickers, D.B., Kopelovich, L., Athar, M. (2003). Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 192: 294-306.
- Li, R.W., Myers, S.P., Leach, D.N. (2003). A cross-cultural study antiinflammatory activity of Australian and Chinese plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 85(1):25–32.
- Ling, W.H., Jones, P.J. (1995). Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sciences*. 57:195-206.
- Maldini, M., Montoro, P., Hamed, A.I., Mahalel, A., Oleszek, W., Stochmal, A., Piacente, S. (2011). Strong antioxidant phenolics from *Acacia nilotica*: Profiling by ESI-MS and qualitative-quantitative determination by LC-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 56: 228-239.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79:727-747.

- Manríquez, J.J., Zúñiga, A., González, M., Torres, J. M. (2007). The antibacterial metabolites and proacacipetalin from *Acacia cochliacantha*. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 51 (4): 228-231.
- Martínez, C.M., Hernández, R. (1999). Las quimiocinas, una nueva familia de citosinas en el reclutamiento de células inflamatorias. *Revista de Investigación Clínica*. 51: 233-268.
- Maslin, B.R., Orchard, A.E., West, J.G. (2003). Nomenclatural and classification history of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae) and the implications of generic subdivision. Disponible en: <http://worldwidewattle.com/infogallery/taxonomy/nomen-class.pdf>.
- Mattila P., Kumpulainen J. (2002). Determination of free and total phenolic acids in plant-derived food by HPLC with diode-array detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50(13):3660-3667.
- Mc Garvey y Croteau. (1995). Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*. 7(7): 1015–1026.
- Mezei, Z., Kis, B., Gecse, A., Tajti, J., Boda, B., Telegdy, G., Vecsei, L. (2000). Platelet arachidonate cascade of migraineurs in the icteric phase. *Platelets*. 11: 222-225.
- Middleton, E., Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 52(4):673-751.
- Mitchell, J.A., Warner, T.D. (1999). Cyclooxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *British Journal of Pharmacology*. 128: 1121-1132.
- Moncada, S., Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England Journal of Medicine*. 329 (27): 2002- 2012.
- Monga, J., Aggarwal, V., Suthar, M., Monika., Nongalleima, K., Sharma, M. (2014). Topical (+)-catechin emulsified gel prevents DMBA/TPA-induced squamous cell carcinoma of the skin by modulating antioxidants and inflammatory biomarkers in BALB/c mice. *Food and Function*. 5: 3197-3207.
- Mora, P.M. (1987). Características de las explotaciones caprinas en la Mixteca poblana. Primer curso de producción caprina en el estado de Puebla. Memorias. EMVZ-UAP. Puebla. México.
- Morley, J. (2006). Inflammation and asthma therapy: a false dawn. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 19: 200-204.
- Moutaery, A.A. (2005). Proglumide attenuates experimental colitis in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 56: 369-379.

- Muthaura, C.N., Rukunga, G.M., Chhabra, S.C., Mungai, G.M., Njagi, E.N.M. (2007). Traditional antimalarial phytotherapy remedies used by the Kwale community of the Kenyan Coast. *Journal of Ethnopharmacology*. 114:377–386.
- Needleman, P., Isakson, P.C. (1997). The discovery and function of COX-2. *The Journal of Rheumatology*. 24(49): 6-8.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Oliva, A., Lahoz, E., Contillo, R., Aliota, G. (1999). Fungistatic activity of *Ruta graveolens* extract and its allelochemicals. *Journal of Chemical Ecology*. 25:519-526.
- Ospina, L.F. (2000). Estudio de la actividad antiinflamatoria de una benzoquinona de origen natural: Rapanona. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, Valencia, España. 143 pp.
- Ouviña A, Gorzalczany S, Acevedo C, Ferraro G. (2009). Actividad antiinflamatoria tópica de extractos de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (*Apiaceae*). *Latin American Journal of Pharmacy*. 6: 941-944.
- Papetti, A., Daglia, M., Aceti, C., Quaglia, M., Gregotti, C., Gazzani, G. (2006). Isolation of an in vitro and ex vivo antiradical melanoidin from roasted barley. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. 54:1209-1216.
- Pedernera, A.M., Guardia, T., Guardia, C. E., Rotelli, A. E., De La Rocha, N. E., Saad, J. R., López, M.A., Garcia, S., Pelzer, L. E. (2010). Anti-inflammatory effect of *Acacia visco* extracts in animal models. *Inflammopharmacology*. 18:253–260.
- Pelletier, M., Roberge, C.J., Gauthier, M., Vandal, K., Tessier, P.A., Girard, D. (2001). Activation of human neutrophils *in vitro* and dieldrin-induced neutrophilic inflammation *in vivo*. *Journal of Leukocyte Biology*. 70: 367-373.
- Pérez, A.O., Cartaya, L., Valencia, V., Sanjurjo, V., Ilisástigui, T. (1998). Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Revista Cubana de Estomatología*. 35(2):56-61.
- Quintanar, M.A., Calderón, J.V. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*. 28(3): 89-101.
- Raghav, S.K., Gupta, B., Agrawal, C., Goswami, K., Das, H.R. (2006). Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 104: 234-239.

- RamLi, S., Harada, K., Ruangrunsi, N. (2011). Actividad antioxidante, antimicrobiana y citotóxica del extracto etanólico de *Acacia farnesiana*. *Farmacognosia Diario*. 3(23):50-58.
- Rao, K.N., Brown, M.A. (2008). Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1143:83-104.
- Raso, G.M., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M., Di Carlo, R. (2001). Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sciences*. 68:921–931.
- Rendón, A., Cerbón, J., Maldonado, M., Quintanar, M.A., Calderón, J.V. (2007). Vitamin-E reduces the oxidative damage on delta-aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. *Toxicology in Vitro*. 21: 1121-1126.
- Richter, C., Park, J.W., Ames, B.N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 17:6465–6467.
- Rico, M.L. (2001). El género *Acacia* (*Leguminosae*, *Mimosoideae*) en el estado de Oaxaca, México. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 58(2): 251 -302.
- Rocha, R. P., Melo, E.C., Radünz, L.L. (2011). Influence of drying process on the quality of medicinal plants: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(33): 7076-7084.
- Rojas-Rodríguez, F., Torres-Córdoba, G. (2012). Árboles del valle central de Costa Rica: reproducción, Aromo (*Acacia farnesiana*). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* (Costa Rica). 9(22):66-67.
- Ruiz-Montañez, G., Ragazzo-Sánchez, J.A., Calderón-Santoyo, M., Velázquez-de la Cruz, G., Ramírez de León, J.A., Navarro-Ocaña, A. (2014). Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry*. 159(2014):267–272.
- Rzedowski, J. (1988). Análisis de la distribución geográfica del complejo *Prosopis* (*Leguminosae*, *Mimosoideae*) en Norteamérica. *Acta Botánica Mexicana*. 3:7-19.
- Saleem, B., Cox, S., Emery, P. (2006). Biomarkers: strategies to predict outcome of rheumatoid arthritis. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*. 3: 11-16.
- Salen, G., Ahrens, E.H. and Grundy, S. (1979). Metabolism of β -sitosterol in man. *Journal of Cinical Investigation*. 49:952-967.

- Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (2000). From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. Review Article. *Current Opinion in Immunology*.12: 92-98.
- Sánchez, E., Heredia, N., Camacho-Corona, M. del R., García, S. (2013). Isolation, characterization and mode of antimicrobial action against *Vibrio cholera* of methyl gallate isolated from *Acacia farnesiana*. *Journal of Applied Microbiology*.115: 1307-1316.
- Sarpate R. V., Tupkari, S. V.(2012). Quantification Of Lupeol Isolated From *Strobilanthus callosus* Nees using Validated High Performance Thin Layer Chromatography Method. *International Journal of PharmTech Research*. 4(3): 963-969.
- Schmidt, H.H., Walter, U. (1994). NO at work. *Cell*. 78:919–925.
- Seigler, D.S. (2003). Phytochemistry of *Acacia-sensu lat*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 31:845–873.
- Selvam, C., Jachak, S.M. (2004). A cyclooxygenase (COX) inhibitory flavonoids from the seeds of *Semecarpus anacardium*. *Journal of Ethnopharmacology*. 95:209–212.
- Shahidi, F. (1996). Natural antioxidants. Chemistry, health effects and applications. *AOCS Press*, Champaign, Illinois: 1-6, 9, 18, 19pp.
- Singh, R., Singh, B., Singh, S., Kumar, N., Kumar, S., Arora, S. (2008). Anti-free radical activities of kaempferol isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd. *Toxicology in Vitro*. 22: 1965–1970.
- Siriwardhana, N., Kalupahana, N., Cekanova, M., LeMieux, M., Greer, B., Moustaid-Moussa, N. (2013). Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *The Journal of Nutritional Biochemistry*.24(4): 613–623.
- Slater, T.F., McDonald-Gibson, R.G. (1987).Introduction to the eicosanoids.Prostaglandins and related substances, a practical approach.*Clinical Biochemistry*. 23:455–458.
- Sotohy, S.A., Sayed, A.N., Ahmed, M.M. (1997). Effect of tannin-rich plant (*Acacia nilotica*) on some nutritional and bacteriological parameters in goats. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrifte*. 104:432–435.
- Sriraman, S., Ramanujam, G. M., Ramasamy, M., Dubey, G. P. (2015).Identification of beta-sitosterol and stigmasterol in *Bambusa bambos* (L.) Voss leaf extract using (HPLC) and its estrogenic effect *in vitro*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.115, 55–61.
- Stamp, N.E., Yang, Y., Osier, T.P. (1997). Respose of an insect top rey fed multiple allelochemicals under representative termal regimes. *Ecology*. 78:203-214.

- Steinhilber, D. (1994) 5-Lipoxygenase enzyme expression and regulation of activity. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 69:3-14.
- Strack, D. (1997). Phenolic metabolism. *Plant Biochemistry*. 10:388-416.
- Svensson, B.E., Lindvall, S. (1988). Myeloperoxidase function. *The Journal of Biological Chemistry*. 265 (10): 5666-5670.
- Taga, T., Kishimoto, T. (1997). Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annual Review of Immunology*. 15:797-819.
- Tung, Y.T., Wub, J.H., Huang, C.Y., Kuo, Y.H., Chang, S.T. (2009). Antioxidant activities and phytochemical characteristics of extracts from *Acacia confusa* bark. *Bioresource Technology*. 100:509-514.
- Valares C. (2011). Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Tesis de Doctorado. Universidad de Extremadura. España.
- Van't Hof, R.J., Ralston, S.H. (2001). Nitric oxide and bone. *Immunology*. 103(3): 255-261.
- Wadood, A., Wadood, N., Wahid, N., Shah, S.A. (1989). Effects of *Acacia arabica* and *Caralluma edulis* on blood glucose levels of normal and alloxan diabetic rabbits. *Journal of Pakistan Medical Association*. 39:208-212.
- Welton, A.T., Tobias, L.D., Fiedler-Nagy, C., Anderson, W., Hope, W., Meyers, K., Coffey, J.W. (1986). The effect of flavonoids on arachidonic acid metabolism. 231-242. En: Cody, V., Middleton, E., Harborne, J.B. (1986). *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*. Alan R. Liss, New York.
- Zhang, G., Zhang, W., Lian, B., Gu, L. (1999). Insecticidal effects of extracts from two rice varieties to brown plant Hopper. *Nilaparvata Ingens*. *Journal of Chemical Ecology*. 25:1843-1853.