



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Evaluación de la actividad antioxidante de la Coatlina B aislada a partir de la
madera de *Eysenhardtia polystachya*”**

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

PRESENTA

BLANCA ANGÉLICA VEGA ALANIS



México D.F

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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: **José Pedraza Chaverri**
Vocal: **José Fausto Rivero Cruz**
Secretario: **Perla Deyanira Maldonado Jiménez**
1er. Suplente: **Abraham Madariaga Mazón**
2do. Suplente: **José Alberto Rivera Chávez**

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio de Bioquímica y Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

Laboratorio 209, Edificio F, Facultad de Química, UNAM

Asesor

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Blanca Angélica Vega Alanis

Agradecimientos:

A la Facultad de Química por brindarme la formación académica que recibí de parte de los profesores que la forman y por brindarme los conocimientos suficientes para desempeñarme profesionalmente en diversas áreas. Más allá de lo académico, fue el mejor segundo hogar que pude haber tenido y me siento sumamente honrada de egresar de esta institución.

Al Dr. José Fausto Rivero por su apoyo durante la realización de este proyecto, y sus enseñanzas dentro y fuera del aula.

Al Dr. José Pedraza Chaverri por permitir la realización de una parte fundamental de este trabajo en su laboratorio, por sus amables atenciones durante mi estadía en su laboratorio, y por todas sus sugerencias durante la revisión del presente.

A la Dra. Perla Maldonado, por sus enseñanzas, consejos, por darse el espacio para la revisión de este trabajo y por aportar muy valiosas críticas, observaciones y sugerencias al mismo.

Al M. en C. Omar Medina Campos, por brindarme en todo momento su asesoría técnica para realizar una parte fundamental del trabajo experimental presentado en esta tesis, por tomarse la molestia de revisar este trabajo y aportar sus correcciones y observaciones para el enriquecimiento del mismo.

A la Dra. Blanca Rivero por brindarme numerosas veces su ayuda en el laboratorio y responder todas y cada una de las dudas que le he consultado.

A mis compañeros tanto del lab 111 (Gaby, Verónica, Marlen, Sarafí) como del lab 209 (Alejandra, Mario, Ramsés, Adver, Azalia) por su compañía y asesoría.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a las siguientes personas:

- A mis padres

Por haberme educado y formado; sin ustedes yo no sería quien soy el día de hoy. En cuanto a ti, papá, agradezco que me hayas enseñado la disciplina de estudiar, el ser constante y el siempre hacer todas las cosas de manera correcta. Y en cuanto a ti, mamá, agradezco como no tienes idea que hayas estado ahí para ofrecerme un café y mi desayuno todas las mañanas durante 4 años y medio, hubiera sido imposible levantarme cada día de la semana sin tí.

- A Iván

Fuiste con quien más de cerca viví esta maravillosa experiencia que es la universidad. Te dedico este trabajo por estar conmigo tanto en mis momentos de triunfo como de fracaso, dentro y fuera del aula. Por apoyarme siempre que lo he necesitado, en las buenas y en las malas. Por echarme porras cuando flaqueaba. Por todas las risas, tonterías y por todas las buenas cosas que has hecho por mí. Gracias por haber sido el mejor compañero, novio y amigo que alguien pudiera tener.

- A mi familia

No nombraré porque son muchos, pero ustedes saben quiénes estuvieron conmigo, me hicieron reír, se burlaron de mí según por ñoña y me dieron todos sus consejos, apoyo y todos sus buenos deseos. Sé que en el fondo, ustedes están muy orgullosos de mí. Los quiero mucho a todos.

- A Sara

Por haber sido mi segunda madre y consejera oficial, por apoyarme y brindarme tu amistad en numerosas veces. También mis triunfos son tuyos.

- A todos mis amigos

Gingen, Izas, Ro Cortés, Andrea, Oscar, Ro Vargas y Fer: gracias por todos esos momentos de millones risas que pasé con ustedes.

A Martha, Paulina, el bobo de Chucho, Quique, David, Guillermo y demás compañeros Q.F.B.s por haberme acompañado en esta trayectoria de aprendizaje, exámenes, tareas, prácticas, estrés y demás cosas.

Y por último, pero no por eso menos importante, a Viri y a Ángela, que aunque ya no tengo mucho contacto con ustedes, durante muchos años fueron mis mejores amigas, y fueron personas muy importantes en mi vida. Sé que a ustedes les dará gusto saber que ya pronto obtendré mi título, así como a mí me dará mucho gusto oír lo mismo de ustedes.

Lista de abreviaturas	vi
Lista de tablas	viii
Lista de gráficas	viii
Lista de figuras	viii
Resumen del proyecto	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
2.1 Estrés oxidante	5
2.1.1 Definición	5
2.1.2 Radicales libres y especies reactivas	5
2.1.2.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	6
2.1.2.2 Especies reactivas de nitrógeno (ERN).....	8
2.1.2.3 Otras especies reactivas	9
2.1.3 Sistemas endógenos de defensa antioxidante	9
2.1.3.1 Antioxidantes enzimáticos	10
2.1.3.2 Antioxidantes no enzimáticos	11
2.1.4 Homeostasis y señalización redox.....	11
2.1.5 Daño por estrés oxidante	12
2.2 Compuestos polifenólicos	15
2.2.1 Flavonoides	15
2.2.1.1 Chalconas	17

2.3 <i>E. polystachya</i>	18
2.3.1 Generalidades	18
2.3.2 Nombres comunes.....	20
2.3.3 Distribución geográfica	20
2.3.4 Usos.....	21
2.3.5 Composición química.....	22
2.3.5.1 Descomposición de Coatlina B a Matlalina.	22
3. Justificación	24
4. Objetivos.....	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos particulares.....	26
5. Procedimiento Experimental.....	28
5.1 Procedimientos generales.....	28
5.1.1 Análisis cromatográficos	28
5.1.1.1 Análisis por CCF	28
5.1.1.2 Análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE)	28
5.2 Material vegetal.....	29
5.3 Aislamiento de la Coatlina B a partir de <i>E. polystachya</i>	29
5.3.1 Obtención del extracto acuoso	29
5.3.2 Fraccionamiento primario del extracto	29

5.3.3 Fraccionamiento secundario	29
5.3.4 Obtención, purificación y caracterización de la Coatlina B	30
5.4 Evaluación de la actividad antioxidante	30
5.4.1 Generalidades	30
5.4.2 Capacidad de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH [•]).....	31
5.4.2.1 Fundamento	31
5.4.2.2 Metodología.....	31
5.4.3 Actividad inhibidora del radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS ^{•+}).....	32
5.4.3.1 Fundamento	32
5.4.3.2 Metodología.....	33
5.4.4 Ensayo de atrapamiento del O ₂ ⁻	33
5.4.4.1 Fundamento	33
5.4.4.2 Metodología.....	34
5.4.5 Ensayo de capacidad de degradación del H ₂ O ₂	35
5.4.5.1 Fundamento	35
5.4.5.2 Metodología.....	36
5.4.6 Ensayo de atrapamiento del OH [•]	36
5.4.6.1 Fundamento	36
5.4.6.2 Metodología.....	37
5.4.7 Ensayo de atrapamiento del ¹ O ₂	37
5.4.7.1 Fundamento	37
5.4.7.2 Metodología.....	38
5.4.8 Ensayo de neutralización del HOCl	38

5.4.8.1 Fundamento	38
5.4.8.2 Metodología.....	39
5.4.9 Ensayo de atrapamiento del ONOO ⁻	40
5.4.9.1 Fundamento	40
5.4.9.2 Metodología.....	41
5.4.10 Ensayo de capacidad de absorción de radicales de O ₂ (ORAC)	41
5.4.10.1 Fundamento	41
5.4.10.2 Metodología.....	42
5.5 Análisis estadístico.....	42
6. Resultados y Discusión de Resultados	43
6.1 Aislamiento y purificación de la coatlina B	43
6.1.1 Rendimiento.....	43
6.1.2 Identificación de la coatlina B	43
6.2 Evaluación de la actividad antioxidante	43
6.2.1 Actividad inhibidora del radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH [•])...43	
6.2.2 Actividad inhibidora del radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS ^{•+}).....	46
6.2.3 Ensayo de atrapamiento del O ₂ ⁻	49
6.2.4 Ensayo de capacidad de degradación del H ₂ O ₂	50
6.2.5 Ensayo de capacidad de atrapamiento del OH [•]	51
6.2.6 Ensayo de capacidad de atrapamiento del HOCl	52
6.2.7 Ensayo de capacidad de atrapamiento del ¹ O ₂	53
6.2.8 Ensayo de capacidad de atrapamiento del ONOO ⁻	54

6.2.9 Ensayo de capacidad de absorción de radicales de O₂ (ORAC)55

6.3 Resumen de resultados57

7. Conclusiones58

8. Perspectivas58

9. Referencias.....60

Lista de abreviaturas

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
AAPH	2,2'-Azinobis(2-amidinopropano)dichlorhidrato
ABTS ⁺⁺	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio
ASB	Albúmina de suero bovino
BHT	Hidroxitolueno butilado
CAT	Catalasa
CCF	Cromatografía en capa fina
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
Cu ⁺	Ión cobre (I)
Cu ²⁺	Ión cobre (II)
DMNA	Dimetilnitrosoanilina
DMTU	Dimetiltiourea
DPPH [*]	Radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DTNB	Ácido ditionitrobenzoico
DTPA	Ácido dietilentriaminpentaacético
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
E.E.M.	Error estándar de la media.
<i>E. polystachya</i>	<i>Eysenhardtia polystachya</i>
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Fe ²⁺	Ión hierro (II)
Fe ³⁺	Ión hierro (III)
FeCl ₃	Cloruro férrico
GPx	Glutati3n peroxidasa
GSH/GSSG	Glutati3n reducido/oxidado
H ₂ O ₂	Per3xido de hidr3geno
HOCl	Ácido hipocloroso
IC ₅₀	Concentraci3n inhibitoria 50
KNO ₂	Nitrito de potasio

Lista de abreviaturas (Continuación)

Abreviatura	Significado
L [•]	Radical lípido
LOO [•]	Radical lipídico
LOOH	Peróxido lipídico
mbar	miliBar
MgO ₂	Óxido de magnesio
NaBH ₄	Borohidruro de sodio
NaOCl	Hipoclorito de sodio
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
NO [•]	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido de nitrógeno
O ₂ ^{-•}	Radical anión superóxido
¹ O ₂	Singulete de oxígeno
O ₃	Ozono
OH [•]	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO ⁻	Anión peroxinitrito
SO ₂	Dióxido de azufre
SOD	Superóxido dismutasa
SSA	Secretaría de Salud
TEAC	Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox®
Trolox®	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
TNB	Ácido tionitrobenzoico
URF	Unidades relativas de fluorescencia
X.O.	Xantina oxidasa

Lista de Tablas, Gráficas y Figuras.

Lista de tablas.

- Tabla 1.** Condiciones clínicas asociadas con el estrés oxidante.
- Tabla 2.** Rendimiento obtenido en el proceso de extracción.
- Tabla 3.** Valores TEAC para las muestras analizadas para la capacidad de neutralización del radical DPPH[•].
- Tabla 4.** Valores TEAC para las muestras analizadas para la capacidad de neutralización del catión radical ABTS^{•+}.
- Tabla 5.** Valores TEAC para las muestras analizadas para el ensayo de ORAC.
- Tabla 6.** Resumen de resultados.

Lista de gráficas.

- Gráfica 1.** Curva estándar de Trolox® para ensayo de atrapamiento de DPPH[•].
- Gráfica 2.** Curva estándar de Trolox® para ensayo de atrapamiento de ABTS^{•+}.
- Gráfica 3.** Curva estándar de Trolox® para ensayo de ORAC.

Lista de figuras

- Figura 1.** Metabolismo del O₂ hasta H₂O.
- Figura 2.** Reacción de Haber-Weiss.
- Figura 3.** Generación de HOCl a partir de H₂O₂.
- Figura 4.** Formación del OONO⁻ y su degradación.
- Figura 5.** Mecanismo de peroxidación de lípidos.
- Figura 6.** Núcleo estructural de un flavonoide.
- Figura 7.** Estructura común de los flavonoides y clasificación.
- Figura 8.** Clasificación de chalconas.
- Figura 9.** Fotografía de árbol completo de *E. polystachya*.
- Figura 10.** Hojas provenientes del árbol de *E. polystachya*.
- Figura 11.** Flores de *E. polystachya*.

Lista de Tablas, Gráficas y Figuras.

- Figura 12.** Frutos de *E.polystachya*.
- Figura 13.** Corteza de *E.polystachya*.
- Figura 14.** Distribución de *E.polystachya* en la República Mexicana.
- Figura 15.** Conversión de Coatlina B a Matlalina.
- Figura 16.** Neutralización del radical DPPH[•] por efecto de un antioxidante.
- Figura 17.** Estructura del radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio.
- Figura 18.** Fundamento del método para evaluar la capacidad de atrapamiento del O₂^{•-}.
- Figura 19.** Fundamento del método de cuantificación de H₂O₂.
- Figura 20.** Fundamento del método de cuantificación del OH[•].
- Figura 21.** Fundamento del método de cuantificación del ¹O₂.
- Figura 22.** Fundamento del método de cuantificación para el HOCl.
- Figura 23.** Fundamento del método de cuantificación de ONOO^{•-}.
- Figura 24.** Actividad inhibitoria del DPPH[•].
- Figura 25.** Actividad inhibitoria del catión radical ABTS^{•+}.
- Figura 26.** Actividad enzimática de la X.O.
- Figura 27.** Inhibición de la producción del O₂^{•-}.
- Figura 28.** Degradación del H₂O₂.
- Figura 29.** Atrapamiento del OH[•].
- Figura 30.** Atrapamiento del HOCl.
- Figura 31.** Atrapamiento del ¹O₂.
- Figura 32.** Atrapamiento del ONOO^{•-}.
- Figura 33.** Ensayo de ORAC.

RESUMEN DEL PROYECTO.

Diversas organizaciones han señalado que la presencia de enfermedades crónico-degenerativas aumentará conforme lo haga la esperanza de vida. Muchas de estas enfermedades están asociadas con el desarrollo de estrés oxidante, el cual puede ser propiciado por la exposición a los rayos UV, a diversos contaminantes y un estilo de vida poco saludable.

Por ello, es importante la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antioxidante. En este contexto, *E. polystachya* es una especie que se encuentra diversamente distribuida en México, y que desde épocas prehispánicas se ha utilizado para el tratamiento de enfermedades urinarias. Sin embargo, no se cuenta con otro estudio que describa si tiene capacidad antioxidante alguna, razón por la cual se seleccionó esta especie para su estudio.

Algunos compuestos encontrados en diversos productos naturales pueden funcionar como antioxidantes al interactuar directamente con alguna especie reactiva y neutralizarlas. En este trabajo se evaluó la capacidad antioxidante *in vitro* de un extracto acuoso de *E. polystachya*, la fracción primaria obtenida del mismo y el flavonoide coatlina B, uno los principales componentes de dicho extracto.

Todas las muestras evaluadas lograron neutralizar las siguientes especies reactivas: radical DPPH[•], radical ABTS^{•+}, radical peroxilo, anión peroxinitrito, radical hidroxilo y anión superóxido. El extracto fue el mejor atrapador del radical peroxilo, anión superóxido, radical DPPH[•] y radical ABTS^{•+}, mientras que la coatlina B fue el mejor atrapador para el anión peroxinitrito y el radical hidroxilo, las dos especies reactivas más tóxicas que se conocen. Por otra parte, el extracto fue el único que atrapó el ácido hipocloroso y el singulete de oxígeno (aunque este último fue un atrapamiento muy débil). Ninguna de las muestras evaluadas atrapó peróxido de hidrógeno. Por último, para los ensayos de DPPH[•], ABTS^{•+} y radical

peroxilo se hizo una comparación adicional contra el Trolox®, un análogo soluble de la vitamina E y se encontró que en todos los ensayos, las muestras evaluadas fueron mejores antioxidantes que el Trolox®.

Se puede concluir que tanto el extracto como la fracción primaria y la coatlina B presentan actividad antioxidante, digna de ser evaluada en modelos *in vivo* de enfermedades relacionadas con el estrés oxidante. Dado que el extracto fue el mejor antioxidante en general, es necesario purificar otros compuestos del mismo y evaluar su potencial antioxidante.

1. INTRODUCCIÓN.

Durante el proceso evolutivo, con la aparición de organismos fotosintéticos, se dio un aumento en los niveles de O₂ en la atmósfera. Esto permitió a su vez a otros organismos desarrollar los mecanismos necesarios para utilizar el O₂ como aceptor final de electrones, lo que permitió desarrollar sistemas de producción de energía altamente eficientes a través de la oxidación de la glucosa. Esta ventaja evolutiva de los organismos aerobios trajo como efecto colateral un aumento en la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO) por la reducción parcial del O₂ (Dorado *et al.*, 2003).

La generación de especies reactivas en células normales, incluyendo las neuronas, se encuentra bajo un estricto control homeostático. Sin embargo, cuando los niveles de ERO exceden la capacidad de la célula para controlarlas, se llega a un estado denominado como estrés oxidante. Esto puede provocar la destrucción de diferentes componentes celulares como son los lípidos, las proteínas y el ADN, y pueden inducir la muerte celular ya sea vía apoptosis o necrosis (Klein y Ackerman, 2003).

Actualmente, se ha encontrado una alta correlación entre un aumento prolongado del estrés oxidante y distintas condiciones patológicas agudas y crónicas como la inflamación aguda, la sepsis, el choque séptico, la aterosclerosis, la isquemia, la diabetes mellitus, las enfermedades neurodegenerativas, la pancreatitis, las enfermedades oculares, entre otras. No se ha establecido si el estrés oxidante es una consecuencia o la causa de estas enfermedades; sin embargo, se sabe que contribuye de manera importante al daño celular independientemente de la enfermedad (Dröge, 2003).

El cuerpo humano posee un complejo sistema de antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos. Por otra parte, se ha logrado aislar a partir de fuentes vegetales moléculas con gran capacidad antioxidante. En este sentido, los

flavonoides representan uno de los grupos de compuestos antioxidantes más importantes que se encuentran en la naturaleza. Como característica química importante contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y son excelentes quelantes del Fe y otros metales de transición, lo cual les confiere una gran capacidad antioxidante (Martínez-Flores *et al.*, 2002).

El palo azul o palo dulce (*Eysenhardtia polystachya*) es una planta originaria del sureste de Estados Unidos de América, y habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado, y representa una fuente abundante de flavonoides. En la madera del tronco se han identificado a los flavonoides coatlina A y B, isoflavonas y esteroides como el estigmasterol (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Álvarez *et al.*, 1999; 1998). Este vegetal era utilizado desde épocas prehispánicas para tratar enfermedades del tracto urinario (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009); sin embargo, no existen reportes acerca de la capacidad antioxidante del extracto y de los compuestos aislados a partir de la madera de esta especie.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Estrés oxidante.

2.1.1 Definición.

Para poder adaptarse a los efectos colaterales debidos al metabolismo oxidante, los organismos aerobios desarrollaron sistemas de defensa intra y extracelulares para mantener el equilibrio redox, ya que cuando éste se pierde, se llega a un estado conocido como estrés oxidante (Dorado *et al.*, 2003).

2.1.2 Radicales libres y especies reactivas.

La IUPAC define a los radicales libres como entidades moleculares (cualquier átomo, ión, molécula, complejo, conformero, etc. que se identifique como una entidad separada y distinguible) que poseen un electrón desapareado (IUPAC, 2012).

Al poseer un electrón desapareado son sumamente reactivos y su vida media es corta, por lo cual reaccionan cercanos al sitio en el cual se formaron (Venéreo, 2002). En general todos los radicales libres son electrófilos, causando la producción de otro radical libre menos reactivo e inestable que reacciona con otra molécula para producir otro radical libre, continuando así una reacción en cadena.

Por otro lado, las especies reactivas se forman como productos del metabolismo oxidante, y aunque no todas son radicales libres, son moléculas que se transforman fácilmente en radicales libres.

Aunque en todos los procesos metabólicos se producen pequeñas cantidades de radicales libres, como sucede en el retículo endoplásmico, en los microsomas y en los peroxisomas, la fuente endógena de especies reactivas más

importante es el sistema mitocondrial de transporte de electrones (Dorado *et al.*, 2003).

A su vez, también estamos expuestos todo el tiempo a radicales libres creados por la radiación electromagnética del ambiente, la contaminación ambiental o al humo del tabaco (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001).

2.1.2.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO).

Las ERO se forman de la reducción incompleta del O_2 molecular, como se muestra en la figura 1.

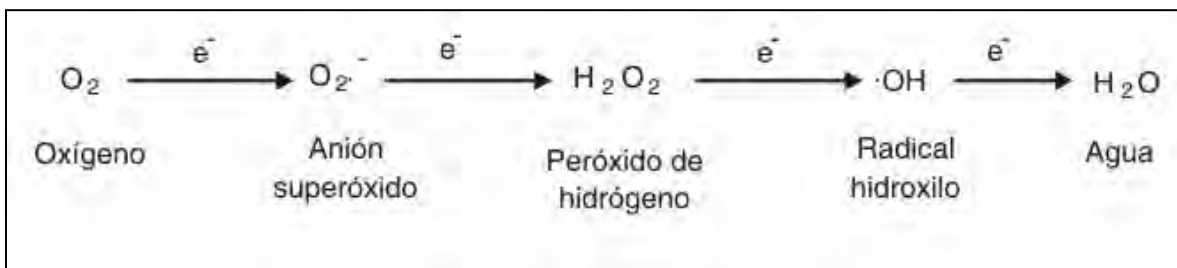


Figura 1. Metabolismo del O_2 hasta H_2O .

Al añadir un electrón al O_2 , se produce el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Éste no se considera que tenga una alta reactividad, y por tanto, el daño que puede provocar es mínimo. Este anión radical puede ser producido por enzimas o por reacciones de autooxidación. El $O_2^{\cdot-}$ es transformado por una familia de enzimas conocidas como superóxido dismutasas (SOD). El producto que se forma de la dismutación enzimática del $O_2^{\cdot-}$ es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Dorado *et al.*, 2003; Aruoma, 1998).

El H_2O_2 puede ser tóxico para las células si se acumula a altas concentraciones intracelulares. Tiene una vida media larga (aproximadamente 4 s) y puede cruzar las membranas celulares. Si no se inactiva puede pasar a través de varias células y potenciar el daño oxidativo en las mismas. Los niveles de H_2O_2 son controlados por las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y glutatión

peroxidasa (GPx). La CAT degrada el H_2O_2 a H_2O , mientras que la GPx también metaboliza al H_2O_2 pero para ello requiere del glutatión (GSH) el cual se oxida a glutatión oxidado (GSSG) (Reiter *et al.*, 2002).

El radical hidroxilo (OH^\bullet) es la especie más reactiva que se ha encontrado en los sistemas biológicos. Tiene la capacidad de reaccionar con casi todas las biomoléculas. Se forma esencialmente a partir de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 , a través de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton, las que requieren trazas de metales de transición como catalizadores. Cabe mencionar que la reacción de Fenton forma parte de las reacciones de Haber-Weiss (Martínez, 2005).

La reacción de Haber-Weiss consta de dos reacciones. El primer paso es la reducción del ión Fe^{3+} a Fe^{2+} por el $\text{O}_2^{\bullet-}$. Posteriormente sucederá la reacción de Fenton, en la cual el Fe^{2+} reaccionará con el H_2O_2 para dar lugar a la formación del OH^\bullet , el OH^- y Fe^{3+} . Esta última reacción también puede suceder con Cu^+ , pasando a Cu^{2+} (Nordberg y Arnér, 2001). Las reacciones mencionadas previamente se ilustran en la figura 2.

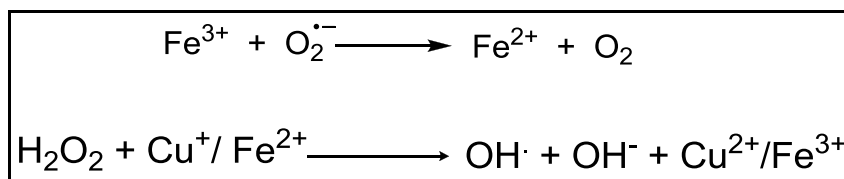


Figura 2. Reacción de Haber-Weiss.

Otras ERO que se conocen y que no son derivadas directamente del metabolismo del O_2 son el ácido hipocloroso (HOCl), el singulete de O_2 ($^1\text{O}_2$) y el ozono (O_3).

El HOCl es generado a partir de H_2O_2 en los neutrófilos cuando se encuentran activados, por acción de la mieloperoxidasa (Aruoma, 1998) como se muestra en la figura 3.

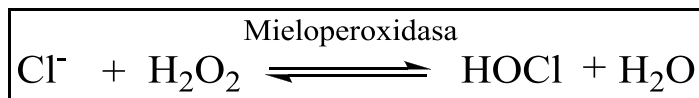


Figura 3. Generación del HOCl a partir de H₂O₂.

El HOCl es un potente agente oxidante y clorante. Puede dañar biomoléculas de función vital, como la alfa-1-antiproteinasa, que se encarga de inhibir enzimas proteolíticas en el plasma, por lo tanto se provoca daño en todos los tejidos. Además, es capaz de atacar aminas primarias y grupos sulfhidrilo los cuales pueden encontrarse en las proteínas y también es capaz de clorar las bases púricas del ADN (Aruoma, 1998).

El ¹O₂ se forma de la inversión de los electrones de los orbitales externos del O₂. Esto origina dos formas de singlete: el delta (¹ΔO₂), que debido a su larga vida media, es el de mayor importancia biológica, y el sigma (¹ΣO₂), más reactivo que el anterior pero de vida media corta porque rápidamente decae al estado delta (Martínez-Cayuela, 1998).

Por último, el O₃ no es producido *in vivo* y sirve para formar un escudo protector contra los rayos UV en la atmósfera. Sin embargo, si se encuentra cerca de la superficie de la tierra, el O₃ se considera un contaminante señalado por muchos autores como el más tóxico que se ha encontrado. Provoca oxidación o peroxidación de las biomoléculas ya sea directamente o por vía radicales libres (Aruoma, 1998).

2.1.2.2 Especies reactivas de nitrógeno (ERN).

La formación de especies reactivas no solamente se da para derivados del O₂. El óxido nítrico (NO[•]) es un radical libre generado a partir de la L-arginina. Por sí mismo tiene una baja toxicidad, pero cuando el O₂^{•-} se encuentra con el NO[•], se lleva a cabo la formación del anión peroxinitrito (OONO⁻), como se muestra en la figura 4.

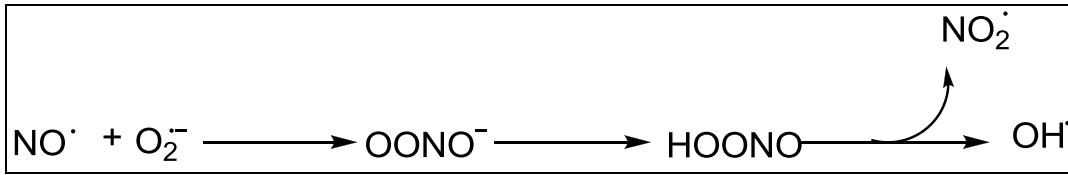


Figura 4. Formación del OONO^- y su degradación.

El OONO^- es igual de reactivo que el OH^\bullet , por lo cual, presenta la misma toxicidad. Además, como se muestra en la figura 4, la degradación del mismo da lugar a la formación del radical OH^\bullet (Reiter *et al.*, 2002).

2.1.2.3 Otras especies reactivas.

El O_2 también puede tener un efecto negativo en las membranas celulares. Si se llegase a formar un radical lipídico (L^\bullet), al encontrarse con el O_2 se forma el radical peroxilo (LOO^\bullet). En la figura 5 se ilustra el mecanismo de peroxidación de lípidos.

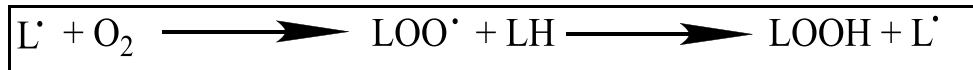


Figura 5. Mecanismo de peroxidación de lípidos.

Un LOO^\bullet puede interactuar con otro lípido (LH) para generar un segundo radical L^\bullet y un peróxido lipídico (LOOH). Los LOOH son menos hidrofílicos que los lípidos de los que provienen, por lo cual la permeabilidad de la membrana aumenta para protones y otros iones, y en el caso de la membrana mitocondrial, disminuye la capacidad de llevar a cabo la fosforilación oxidativa (Reiter *et al.*, 2002).

2.1.3 Sistemas endógenos de defensa antioxidante.

Un antioxidante es cualquier sustancia que en bajas concentraciones, retrasa o inhibe la oxidación (Dorado *et al.*, 2003). Pueden actuar mediante distintos mecanismos, como son:

- Disminuyendo la concentración de oxidantes.
- Evitando la iniciación de la reacción en cadena al neutralizar los primeros radicales libres que se forman.
- Complejando iones metálicos para evitar la formación de especies reactivas.
- Deteniendo la propagación y el aumento de radicales libres.

Los antioxidantes endógenos pueden a su vez clasificarse como enzimáticos y no enzimáticos. En general, trabajan en forma coordinada en una serie de pasos metabólicos (Dorado *et al.*, 2003).

La efectividad de los sistemas antioxidantes disminuye con la edad, así como en ciertos procesos patológicos de tipo infeccioso, inmune, degenerativos, inflamatorios y bajo condiciones ambientales tales como la contaminación atmosférica (Dorado *et al.*, 2003; Reiter *et al.*, 2003).

2.1.3.1 Antioxidantes enzimáticos.

Los antioxidantes enzimáticos están conformados por el sistema citocromo-oxidasa, las SOD, la CAT y las GPx (Dorado *et al.*, 2003).

La SOD cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 . El H_2O_2 a su vez es catalizado tanto por la CAT como por la GPx para su conversión a H_2O . La diferencia radica en que la GPx también puede metabolizar otros peróxidos orgánicos además del H_2O_2 (Aruoma, 1998).

2.1.3.2 Antioxidantes no enzimáticos.

Los antioxidantes no enzimáticos incluyen moléculas como las vitaminas A, C, E, el ácido úrico, aminoácidos como taurina y glicina, y el tripéptido glutatión. Estos antioxidantes pueden clasificarse a su vez en antioxidantes de acción indirecta o directa. Los de acción indirecta son agentes quelantes y los de acción directa son atrapadores de radicales libres. En éste último grupo se encuentran cientos de compuestos tanto de fuentes endógenas como exógenas (Dorado *et al.*, 2003).

Sólo una minoría de estas moléculas son sintetizadas por la célula, como lo son el glutatión y el NADPH. La mayoría de estos compuestos se obtienen a partir de alimentos en la dieta (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001).

2.1.4 Homeostasis y señalización redox.

Existen funciones reguladas por señales oxidativas que inducen respuestas protectoras contra el daño oxidante. Muchas de las respuestas mediadas por las especies reactivas protegen a las células contra el estrés oxidante y restablecen la homeostasis redox.

Las ERO y ERN funcionan como moléculas de señalización en diversos procesos fisiológicos como son:

- Regulación del tono vascular.
- Monitoreo de la tensión de O₂ en el control de la ventilación y en la producción de eritropoyetina.
- Transducción de señales en receptores membranales.
- Renovación de membranas celulares.

- Supervivencia celular en el sistema nervioso embrionario.
- Síntesis y liberación de algunas hormonas y factores de crecimiento.
- Aumento de la transcripción de citocinas durante procesos inflamatorios.
- Señalización celular por mecanismo de segundos mensajeros.

Se ha encontrado también que las ERO a bajas concentraciones estimulan la proliferación celular, mientras que niveles más altos la inhiben. Por otra parte, a bajas concentraciones las ERO inducen la expresión de genes cuyos productos tienen actividad antioxidante, como las enzimas antioxidantes (Dorado *et al.*, 2003).

2.1.5 Daño por estrés oxidante.

La alteración del balance entre pro-oxidantes y antioxidantes puede tener diversos grados de magnitud. En el estrés oxidante leve, bastan para restablecer dicho balance las defensas antioxidantes endógenas, pero en el estrés oxidante grave se llega a severas alteraciones en el metabolismo celular, como fragmentación del ADN, aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, descompartmentalización de iones de Fe^{2+} y Cu^{2+} catalíticos, daño a los transportadores y otras proteínas específicas y peroxidación de lípidos (Dorado *et al.*, 2003).

En la tabla 1 se enlistan distintas condiciones clínicas que se encuentran asociadas al estrés oxidante.

Tabla 1. Condiciones clínicas asociadas con el estrés oxidante (Aruoma, 1998).

Tipo de padecimiento	Nombre del padecimiento
Afecciones en cerebro	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedades neurodegenerativas • Lesión traumática • Neurotoxinas • Deficiencia de Vitamina E • Exceso de O₂ por exposición a cámara hiperbárica • Lesión cerebrovascular • Acumulación de aluminio • Enfermedades desmielinizantes
Afecciones en ojo	<ul style="list-style-type: none"> • Retinopatía fótica • Hemorragia ocular • Cataractogénesis • Daño a la retina degenerativo • Retinopatía prematura
Afecciones en corazón y sistema cardiovascular	<ul style="list-style-type: none"> • Ateroesclerosis • Cardiotoxicidad por adriamicina • Enfermedad de Keshan • Cardiomiopatía alcohólica
Afecciones en riñón	<ul style="list-style-type: none"> • Nefrotoxicidad por iones metálicos • Nefrotoxicidad por aminoglucósidos • Síndrome nefrótico autoinmune
Afecciones en tracto gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none"> • Lesiones inducidas por analgésicos antiinflamatorios no esteroideos. • Envenenamiento oral por hierro • Lesiones por endotoxinas del hígado • Condición diabética generada por aloxano • Lesiones del hígado por hidrocarburos halogenados • Pancreatitis inducida por ácidos grasos libres
Enfermedades autoinmunes e inflamatorias	<ul style="list-style-type: none"> • Artritis reumatoide • Glomerulonefritis • Síndrome de inmunodeficiencia adquirida • Hepatitis B

Tabla 1. Condiciones clínicas asociadas con estrés oxidante (continuación).

Tipo de padecimiento	Nombre del padecimiento
Sobredosis de hierro	<ul style="list-style-type: none"> • Deficiencias nutricionales (Enfermedad de Kwashiorkor) • Talasemia y otras anemias tratadas con múltiples transfusiones sanguíneas • Sobredosis de hierro por dieta (vino tinto, cocinar en ollas de hierro) • Hemocromatosis idiopática
Afecciones en glóbulos rojos	<ul style="list-style-type: none"> • Anemia de Fanconi • Anemia falciforme • Favismo • Malaria • Fotooxidación de protoporfirinas
Afecciones en pulmón	<ul style="list-style-type: none"> • Displasia broncopulmonar • Neumoconiosis por polvo mineral • Toxicidad por bleomicina • Hipoxia • Enfisema • Síndrome de dificultad respiratoria del adulto (provocada por agentes contaminantes oxidantes como O₃, SO₂, y NO₂)
Isquemia-Reperfusión	<ul style="list-style-type: none"> • Transplante de órganos • Infarto al miocardio
Otras condiciones clínicas	<ul style="list-style-type: none"> • Cáncer • Alcoholismo • Envejecimiento • Lesiones por radiaciones

El daño por estrés oxidante puede ser reversible o irreversible, dependiendo de factores como el tiempo que dure el estrés, la efectividad de las defensas antioxidantes, la edad del organismo, el estado nutricional y factores genéticos que codifican para sistemas antioxidantes (Dorado *et al.*, 2003).

2.2 Compuestos polifenólicos.

Los polifenoles (o compuestos polifenólicos) son un grupo de compuestos que se caracterizan por tener en su estructura uno o varios grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático. Son los antioxidantes más abundantes en la dieta y son un componente común en alimentos como frutas, vegetales, cereales, legumbres, chocolate y bebidas como café, té y vino.

Los compuestos polifenólicos se clasifican en base al número de anillos fenólicos que contienen en su estructura, y los elementos estructurales que se unen a estos anillos. Los flavonoides constituyen el grupo más común de compuestos fenólicos y se estima que la ingesta diaria total es de 1 g por día, la cual es mucho mayor a otros antioxidantes como el β -caroteno y las vitaminas C y E que se calcula es menor a 100 mg por día (Grassi *et al.*, 2010).

2.2.1 Flavonoides.

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que se encuentran en las plantas verdes y se especula que participan en el proceso de fotosíntesis (Havsteen, 2002). Estructuralmente presentan el núcleo de difenil propano, compuesto por dos anillos bencénicos (anillos A y B) unidos por una cadena de tres carbonos ($C_6-C_3-C_6$), la cual normalmente forma un centro heterocíclico oxigenado (anillo C) (Grassi *et al.*, 2010; Grotewold, 2006; Bruneton, 1995) (Figura 6).

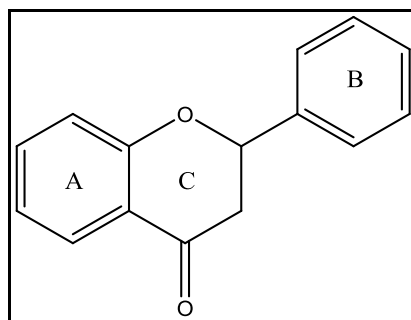


Figura 6. Núcleo estructural de un flavonoide.

Dependiendo de su complejidad estructural y particularmente del estado de oxidación del anillo central C, los flavonoides son clasificados como flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles o flavan-3-oles, isoflavonas y antocianinas. En la figura 7 se ilustran los diferentes tipos de flavonoides (Scalbert *et al.*, 2005; Bruneton, 1995).

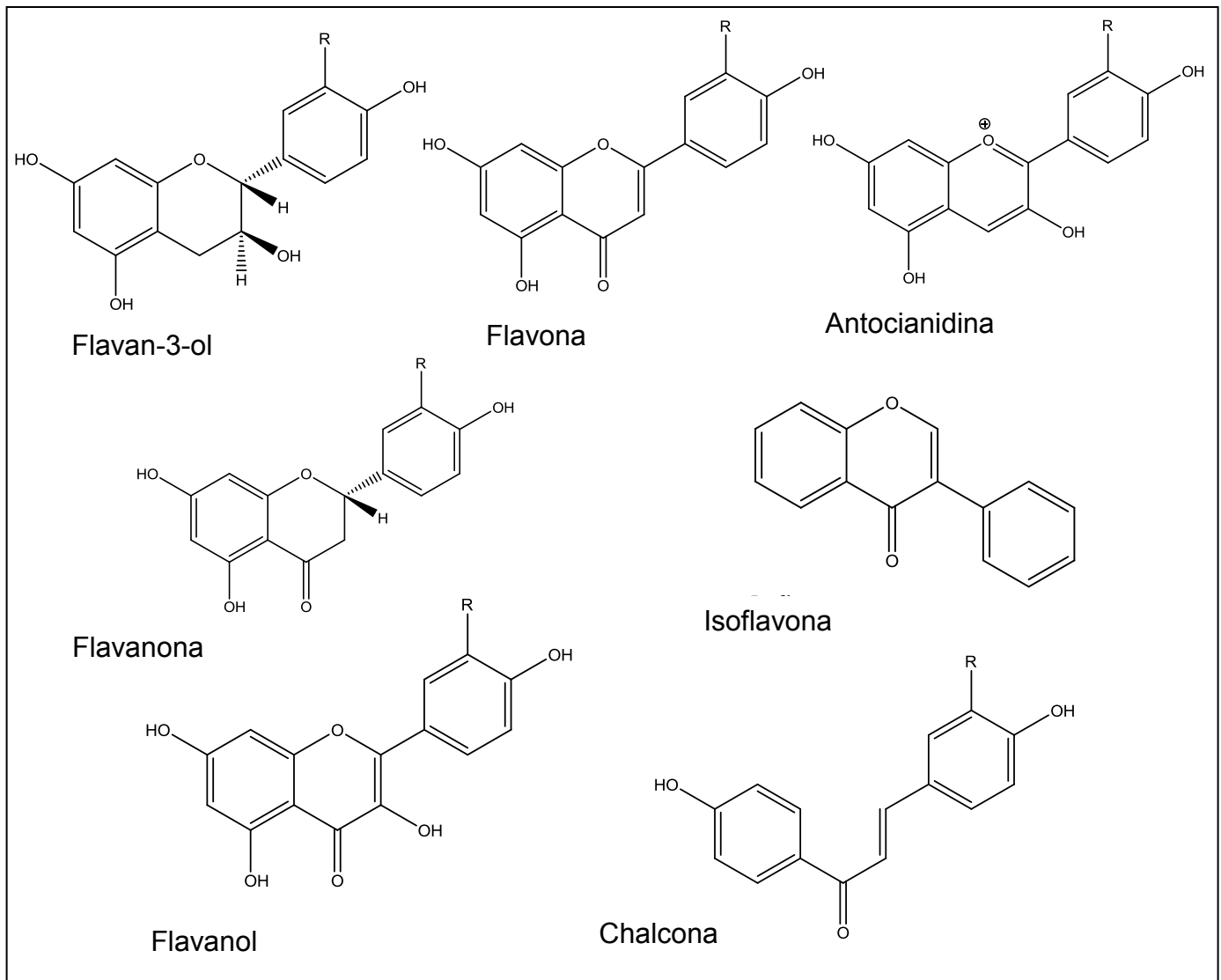


Figura 7. Estructura común de los flavonoides y clasificación.

Los efectos protectores de los flavonoides en sistemas biológicos están asociados con su capacidad de neutralizar radicales libres, quelar metales catalíticos, activar enzimas antioxidantes, reducir radicales derivados del α -

tocoferol e inhibir oxidasas (Grotewold, 2006). Otras propiedades biológicas descritas para este tipo de compuestos son: antiinflamatorias, antialérgicas, hepatoprotectoras, antitrombóticas, antivirales y anticarcinogénicas (López *et al.*, 2006).

2.2.1.1 Chalconas.

Las chalconas son consideradas como los precursores primarios del esqueleto C₆-C₃-C₆ característico de los flavonoides. Dentro de este grupo se encuentran las 2'-hidroxichalconas, 2'-OH-dihidrochalconas, 2'-OH-*retro*-chalconas, auronas y auronoles, como se muestra en la figura 8 (Grotewold, 2006). Dentro de las 2'-OH-dihidrochalconas se encuentra la coatlina B, que es el compuesto estudiado en este proyecto.

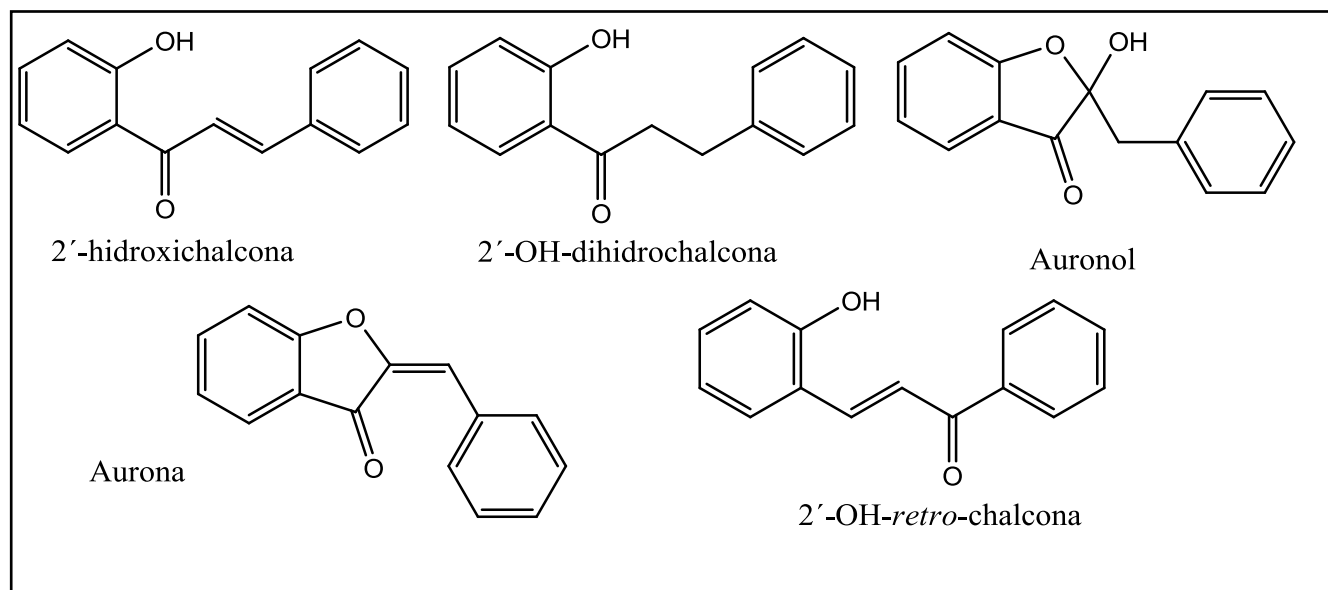


Figura 8. Clasificación de chalconas.

2.3 *E. polystachya*.

2.3.1 Generalidades.

E. polystachya (Figura 9) es un arbusto originario del sureste de Estados Unidos de América, que habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado, desde los 100 hasta los 2300 m sobre el nivel del mar (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Crece entre 3 y 6 m, aunque puede llegar a crecer hasta los 9 m, con un diámetro a la altura del pecho de 15 cm o más (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2009). Tiene hojas pequeñas aromáticas de olor agradable, delgadas (Figura 10), con flores blancas agregadas en espigas (Figura 11). Sus frutos son en forma de vaina con semillas de color café amarillento (Figura 12). Su corteza es delgada, fisurada y de color café grisáceo (Figura 13). Florece de mayo a mediados de septiembre y fructifica de septiembre a enero (Instituto Nacional de Ecología, 2007).



Figura 9. Fotografía de árbol completo de *E. polystachya*.



Figura 10. Hojas provenientes del árbol de *E. polystachya*.



Figura 11. Flores de *E. polystachya*.



Figura 12. Frutos de *E. polystachya*.



Figura 13. Corteza de *E. polystachya*.

2.3.2 Nombres comunes.

- Jalisco: Cuate.
- Puebla: Coatillo, Palo dulce.
- Lengua Náhuatl: *Coatl*.
- Oaxaca: *Cohuatli*, *Cuatle*, *Lánae* (esta última en lengua chontalpa).
- Sinaloa: Rosilla, Palo cuate, Palo dulce.
- Edo. De México: Palo dulce.
- Hidalgo: Palo dulce, *Tlapahuazpatli*, *Ursa* (esta última en lengua otomí).
- Michoacán: Palo dulce.
- Nuevo León: Taray.
- Durango: Taray, Vara dulce, Varaduz.

(Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2009).

2.3.3 Distribución geográfica.

En nuestro país, *E. polystachya* se encuentra distribuida en los estados de Colima, Chihuahua, Chiapas, Coahuila, D.F., Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, y Zacatecas (Figura 14) (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2009).



Figura 14. Distribución geográfica de *E. polystachya* en la República Mexicana.

2.3.4 Usos:

- **Medicinal** (madera). Desde la época prehispánica era muy apreciada esta especie. Se utiliza para el tratamiento de enfermedades en vías urinarias (Acuña, 2007; Amat-Guerri, 2007; Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2009).
- **Combustible** (madera). Esta especie es muy usada para leña debido a sus buenas características energéticas (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2009).

- **Forrajero** (tallo joven, hoja). Es altamente apetecida por el ganado bovino y caprino (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2009).
- **Uso doméstico** (madera). Se elaboran con esta especie copas y vasijas (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2009).

2.3.5 Composición química.

A partir de *E. polystachya* se han aislado distintos compuestos como los flavonoides 7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxiisoflavona y 7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona, (Pérez *et al.*, 2002), (3S)-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxiisoflavona, (3S)-3',7-dihidroxi-2',4',5',8-tetrametoxiisoflavona, estigmasterol, cuneatina, 2',7-dihidroxi-3',4',8-trimetoxiisoflavona (isoduartina), 7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxiisoflavona, 3,4-dimetoxi-8,9-(metilendioxi)pteocarpano (Álvarez *et al.*, 1998), (αR)- $\alpha,3,4,2',4'$ -pentahidroxidihidrochalcona, (αR)-3'-C- β -D-xilopiranosil- $\alpha,3,4,2',4'$ -pentahidroxi dihidrochalcona, (αR)-3'-O- β -D-xilopiranosil- $\alpha,3,4,2',4'$ -pentahidroxidihidro chalcona, (Álvarez *et al.*, 1999), 3'-C- β -glucopiranosil- $\alpha,2',4',4'$ -tetrahidroxichalcona (Coatlina A) y (αR)-3'-C- β -D-glucopiranosil- $\alpha,3,4,2',4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (Coatlina B) (Beltrami *et al.*, 1982).

2.3.5.1 Descomposición de Coatlina B a Matlalina.

El compuesto que se evaluó en este trabajo es la coatlina B. A temperatura ambiente, en agua ligeramente alcalina (pH \approx 7.5) y en presencia de O₂ sufre una reacción irreversible, transformándose en un compuesto llamado matlalina (Figura 15), el cual presenta una fluorescencia azul muy característica a 260 nm. Esta reacción tiene un rendimiento de casi el 100% (Acuña *et al.*, 2009).

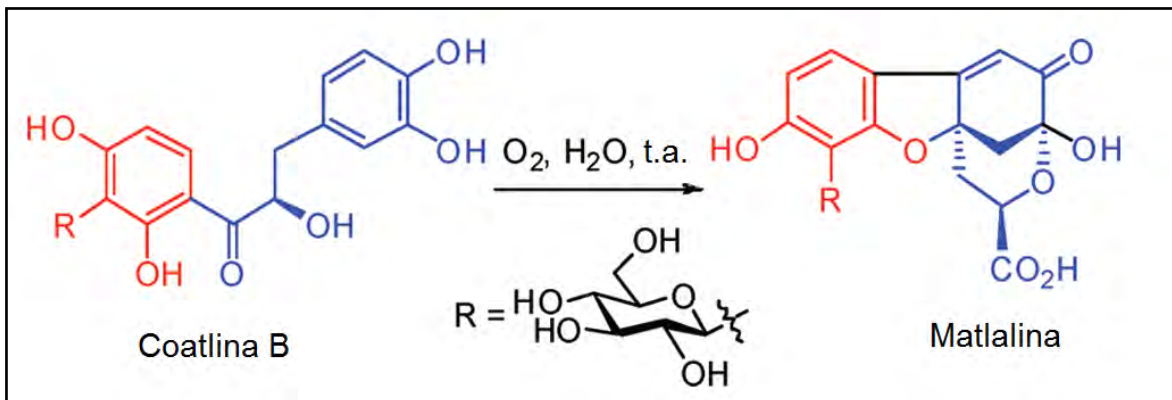


Figura 15. Conversión de Coatlina B a Matlalina.

La matlalina es el compuesto responsable de uno de los nombres comunes que se le dio a *E. polystachya*, “palo azul”, debido a que al colocar la madera de esta especie en agua, se forma un extracto con una tonalidad azulada (Acuña *et al.*, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN.

De acuerdo a estadísticas presentadas por la OMS la esperanza de vida en los últimos años ha tenido una tendencia a ir aumentando, lo cual tiene como consecuencia que se manifiesten de manera más frecuente enfermedades crónico-degenerativas como lo son la aterosclerosis, las enfermedades neurodegenerativas, el cáncer, etc. (OMS, 2011). Por otra parte, la SSA señala que la primera causa de mortalidad en México es *diabetes mellitus*, seguida de las enfermedades isquémicas del corazón y distintos tipos de cáncer (SSA, 2011). Todos estos padecimientos tienen en común un elevado estrés oxidante (Aruoma, 1998). A su vez, el llevar un estilo de vida poco saludable como es el consumo del tabaco y una continua exposición a rayos UV solares, contaminantes en la atmósfera, metales pesados, solventes y pesticidas propician estrés oxidante más prolongado (Migliore y Coppedè, 2009). Aún no está bien dilucidado si el estrés oxidante es una consecuencia de estas enfermedades o si es la causa de las mismas, sin embargo, contribuye de manera sinérgica al daño que provocan (Dorado *et al.*, 2003). Por esta razón, es necesario buscar una alternativa terapéutica para minimizar los daños provocados por el estrés oxidante.

Aunque el cuerpo cuenta con un complejo sistema que regula el estrés oxidante, se han aislado numerosas moléculas con propiedades antioxidantes a partir de productos naturales como son alimentos y plantas. Los flavonoides son capaces de modular genes asociados con el metabolismo, defensas antioxidantes, enzimas, y transportadores de proteínas, además de sus excelentes propiedades redox y su capacidad de quelación de metales pesados debido a los numerosos grupos hidroxilo que contienen en su estructura (Grassi *et al.*, 2010).

E. polystachya es una planta que desde épocas prehispánicas ha sido utilizada en la medicina tradicional mexicana (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2009). Estudios previos han demostrado su habilidad para prevenir la formación de cálculos renales y aumentar la diuresis

en ratas (Pérez *et al.*, 1998); sin embargo, no existen otros estudios conducentes a determinar su eficacia terapéutica. Otros estudios realizados describen el aislamiento de isoflavonas citotóxicas a partir de la madera de esta especie (Álvarez *et al.*, 1998). Por otra parte, se ha descrito que esta planta se adapta fácilmente a distintos tipos de clima y altitudes y se encuentra distribuida a lo largo y ancho del territorio mexicano (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2009). Con base en los antecedentes descritos se decidió evaluar el potencial antioxidante de la madera del palo azul y de uno de sus principales componentes, la coatlina B.

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

- Determinar la capacidad antioxidante del extracto acuoso preparado a partir de la madera de *E. polystachya*, la fracción primaria y el flavonoide coatlina B, utilizando para ello métodos generales y métodos específicos.

4.2 Objetivos particulares.

- Realizar una revisión bibliográfica exhaustiva acerca de *E. polystachya*, especie a partir de la cual se pretende aislar la coatlina B.
- Preparar una infusión de la especie seleccionada. Este proceso permitirá la obtención del extracto en cantidad suficiente para realizar el fraccionamiento primario y obtener la coatlina B necesaria para los ensayos de actividad antioxidante.
- Realizar el fraccionamiento primario del extracto, empleando procesos de partición. Esta actividad conducirá a la obtención de una serie de fracciones de menor complejidad que el extracto original.
- Realizar un fraccionamiento secundario mediante métodos cromatográficos con el objeto de aislar al flavonoide coatlina B a partir de la fracción primaria.
- Confirmar la identidad de la coatlina B utilizando para ello métodos espectroscópicos y espectrométricos.

Objetivos

- Realizar los ensayos pertinentes para evaluar la capacidad antioxidante tanto para la coatlina B, como para el extracto y la fracción primaria, utilizando para ello tanto métodos generales como métodos específicos.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

5.1 Procedimientos generales.

5.1.1 Análisis cromatográficos.

5.1.1.1 Análisis por CCF.

Los análisis por cromatografía en capa fina (CCF) se realizaron utilizando placas de gel de sílice (Merck Sílica Gel 60 F₂₅₄ malla 3.5-7.0, ASTM) de 0.25 mm de espesor. Como reveladores se utilizó luz UV a 254 nm (onda corta) y a 365 nm (onda larga) y como agentes cromógenos vainillina sulfúrica al 1% seguido de calentamiento (aproximadamente 110°C) y vapores de amoníaco seguidos de exposición a luz UV a 254 nm.

5.1.1.2 Análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).

El análisis por CLAE se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) SHIMADZU acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el software LCsolution. El método analítico se desarrolló empleando una columna C₁₈, una mezcla compuesta por Metanol/Ácido trifluoroacético al 0.9% en H₂O (55:45), a una temperatura de 25°C, una velocidad de flujo de 1 mL/min, utilizando un volumen de inyección de 10 µL. La detección del compuesto se realizó a una longitud de onda de 290 y 340 nm.

5.2 Material vegetal.

Las muestras de la madera de *E. polystachya* se recolectaron en el campus de Ciudad Universitaria (Latitud 19°34'3"N, Longitud 99°20'W) por la Dra. Lilia García e identificadas por el M. en C. Ramiro Ríos (Herbario de FES Iztacala, UNAM). La molienda de la madera se realizó en un molino tipo Willey 4. Un ejemplar de referencia del material vegetal utilizado en este estudio se conserva en el laboratorio 111, conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

5.3 Aislamiento de la Coatlina B a partir de *E. polystachya*.

5.3.1 Obtención del extracto acuoso.

Se utilizaron 1,000 g de material vegetal seco y molido, los cuales se sometieron a extracción con el método de infusión utilizando 10, 5 y 2.5 L de agua desionizada sucesivamente. Los extractos resultantes se combinaron y concentraron a presión reducida en un rotavapor IKA RV-10, a 60°C, 70 mBar y 80 rpm. Como resultado del proceso se obtuvieron 145.68 g de extracto seco.

5.3.2 Fraccionamiento primario del extracto.

El extracto seco se sometió a reflujo con 1 L de 2-butanol por 24 h en atmósfera de nitrógeno. La fracción soluble en el 2-butanol se concentró a presión reducida en un rotavapor IKA RV-10 a 60°C, 110 mBar y 60 rpm, obteniendo un extracto butanólico color oro.

5.3.3 Fraccionamiento secundario.

El extracto butanólico se fraccionó utilizando una columna de fase reversa (C₁₈, Bakerbond 5 µm) de mediana presión, una fase móvil MeOH/H₂O 30:70 y un flujo de 1 mL/min. Se recolectaron fracciones de 50 mL cada una y se

concentraron a presión reducida hasta sequedad. Las fracciones se analizaron por CCF y se combinaron en 5 grupos de acuerdo a su similitud cromatográfica.

5.3.4 Obtención, purificación y caracterización de la Coatlina B.

En la fracción FII precipitó de manera espontánea un sólido blanco el cual se sometió a sucesivas recristalizaciones con acetona/H₂O 50:50, el cual fue caracterizado como la chalcona 3'-C-β-D-glucopiranosil-α,2',4',3,4-pentahidroxi dihidrochalcona (coatlina B) por comparación de su tiempo de retención y sus constantes espectroscópicas y espectrométricas (Hernández, 2011).

5.4 Evaluación de la actividad antioxidante.

5.4.1 Generalidades.

En los métodos a continuación descritos se evaluaron tanto el extracto obtenido como la fracción primaria y la coatlina B.

Para las determinaciones se utilizaron tanto métodos espectrofotométricos como espectrofluorométricos. Todos estos métodos, a excepción de la determinación del atrapamiento del O₂⁻, el ONOO⁻ y el HOCl fueron realizados en un espectrofluorómetro Biotek Synergy-HT (Winoosky, E.U.A.). La lectura de estos ensayos se realizó en una placa de plástico de 96 pozos de 300 μL de capacidad cada uno. El plástico de las placas era incoloro para los métodos colorimétricos y negro para los métodos fluorométricos.

Los otros tres métodos mencionados se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU-600, utilizando una celda de cuarzo con 1 cm de paso de luz.

5.4.2 Capacidad de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]).

5.4.2.1 Fundamento.

El fundamento de este ensayo consiste en colocar la muestra en presencia del radical DPPH[•], el cual tiene un color azul-violeta. Al exponerse con una sustancia antioxidante, el DPPH[•] pasará a su forma neutra, como se muestra en la figura 16, la cual tiene un color amarillo. Al medir la absorbancia a 517 nm se cuantifica la cantidad remanente del radical DPPH[•] y se puede conocer qué tanta cantidad de radical logró neutralizar la muestra.

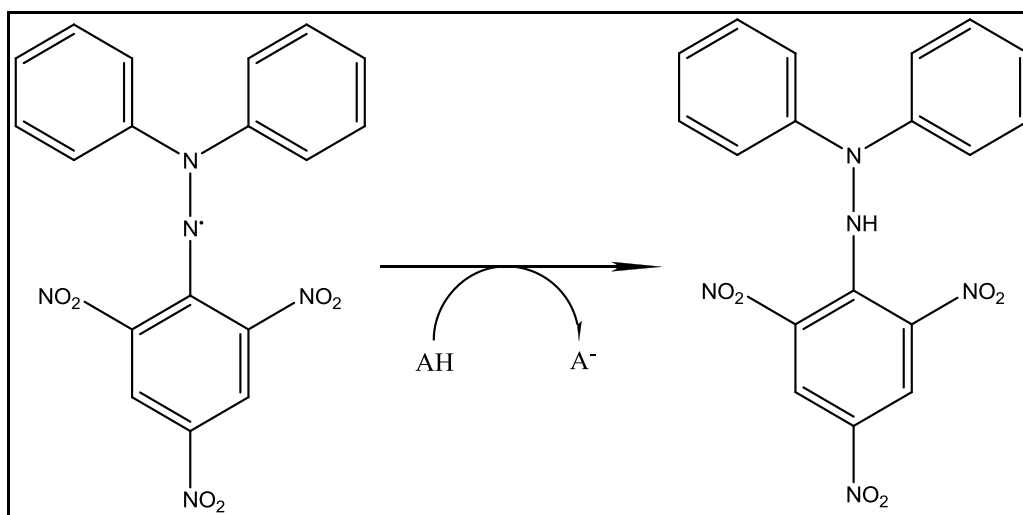


Figura 16. Neutralización del radical DPPH[•] por efecto de un antioxidante.

5.4.2.2 Metodología.

La capacidad de neutralización del extracto, la fracción primaria y la coatlina B hacia el DPPH[•] se evaluaron utilizando la metodología descrita por Govindarajan *et al.* (2003) con modificaciones. Como estándar de referencia se utilizó Trolox® (0-100 μM).

Procedimiento Experimental

En un tubo para centrifuga de 1.5 mL se colocaron 500 μ L de solución metanólica de DPPH^{*} 0.208 mM y 500 μ L de la muestra a evaluar o de la solución preparada de Trolox®. La mezcla se incubó 30 min protegida de la luz. Por último se realizó la lectura de las absorbancias de las soluciones a 517 nm.

5.4.3 Actividad inhibidora del radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio (ABTS^{•+}).

5.4.3.1 Fundamento.

El catión radical se genera mediante una reacción de oxidación entre el ABTS con persulfato de potasio. El ABTS^{•+} (Figura 17) presenta una absorbancia máxima a 734 nm.

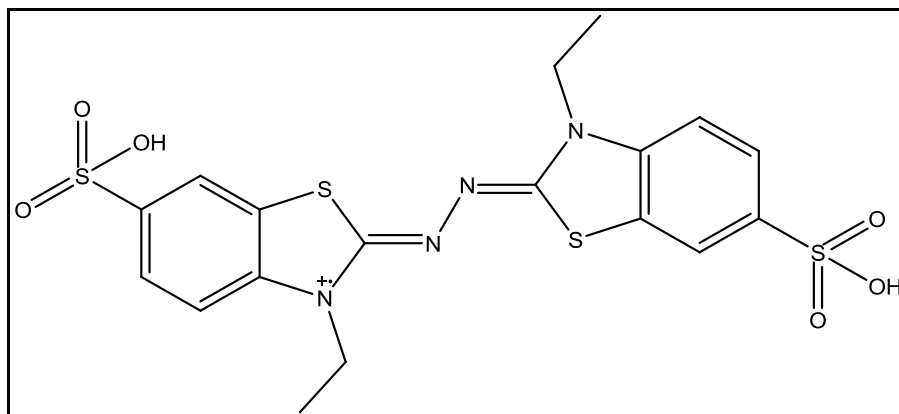


Figura 17. Estructura del radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio.

Cuando el radical es neutralizado por efecto de un antioxidante cambia de color. De esta forma el ABTS^{•+} que queda sin neutralizar es cuantificado.

5.4.3.2 Metodología.

La capacidad de neutralización del radical $ABTS^{•+}$ del extracto, la fracción primaria y la coatlina B se evaluaron utilizando la metodología descrita por Re *et al.* (1999) con modificaciones. Como estándar de referencia se utilizó Trolox® con concentraciones de 0-15 mM.

En un tubo para centrífuga de 1.5 mL se colocaron 9 μ L de la solución acuosa de $ABTS^{•+}$ 7 mM, 10 μ L de la muestra a evaluar o de la solución preparada de Trolox® y 981 μ L de H_2O desionizada. A continuación se realizaron las lecturas de la absorbancia de cada muestra a 734 nm.

5.4.4 Ensayo de atrapamiento del $O_2^{•-}$.

5.4.4.1 Fundamento.

El $O_2^{•-}$ es generado mediante una reacción enzimática por la xantina oxidasa (X.O.). La X.O. utiliza como sustrato a la xantina, generando como productos el $O_2^{•-}$ y ácido úrico. Por otra parte, al ensayo se añade nitroazul de tetrazolio (NBT), que reacciona con el $O_2^{•-}$ lo reduce formando un compuesto llamado formazán, el cual absorbe a 560 nm (Figura 18). Al añadir un compuesto capaz de atrapar el $O_2^{•-}$, no se llevará a cabo la reacción de reducción del NBT y por lo tanto no se presentará absorbancia a 560 nm.

Procedimiento Experimental

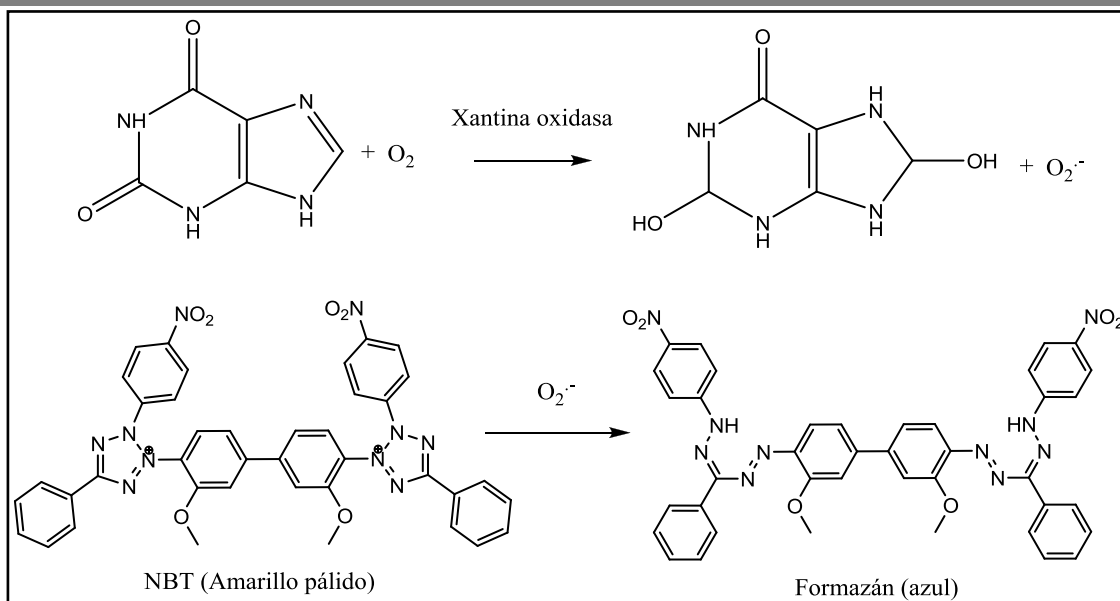


Figura 18. Fundamento del método para evaluar la capacidad de atrapamiento del $O_2^{\cdot-}$.

Como control de la actividad de la X.O. también se cuantificó la formación de ácido úrico, el cual absorbe a 295 nm, para corroborar que la razón por la cual no se esté reduciendo el NBT sea porque el compuesto sea un inhibidor de la X.O.

5.4.4.2 Metodología.

Se siguió la metodología descrita por Bielsky *et al.* (1980). Se prepararon las siguientes disoluciones, realizándolas en agua desionizada: xantina 0.3 mM, NBT 150 μ M, EDTA 0.6 mM, Na_2CO_3 0.4 M y albúmina de suero bovino (ASB) al 0.005%. Por otra parte se preparó una solución de X.O. mezclando 1.2 mg de la misma en 1 mL de sulfato de amonio 2 M, e inmediatamente se colocó en un baño de hielo.

Posteriormente utilizando las disoluciones preparadas anteriormente, se elaboró una mezcla de reacción, la cual consistió en lo siguiente: 18 mL de xantina, 9 mL de NBT, 9 mL de EDTA, 5.4 mL de Na_2CO_3 y 2.7 mL de ASB.

Por último en un tubo para centrífuga de 1.5 mL se colocaron 0.4 mL de la mezcla de reacción descrita anteriormente, 50 μL de la muestra a evaluar y 20 μL de X.O. Se agitó utilizando un agitador vórtex e inmediatamente se procedió a la lectura de la solución en el espectrofotómetro, a 295 y 560 nm. Cada experimento se realizó por triplicado, y se elaboró una referencia del 100% de generación del O_2^- , la cual contenía H_2O desionizada en sustitución de la muestra.

5.4.5 Ensayo de capacidad de degradación del H_2O_2 .

5.4.5.1 Fundamento.

En este ensayo el H_2O_2 se añadió directamente a las muestras. Para cuantificarlo se utilizó el reactivo de FOX, el cual contiene hidroxitolueno butilado (BHT), naranja de xilenol y sulfato ferroso amoniacal. El H_2O_2 oxida al Fe^{2+} pasándolo a Fe^{3+} . El ión Fe^{3+} reacciona con el naranja de xilenol formando un complejo colorido, el cual absorbe a 560 nm. Todo esto se resume en la siguiente figura.

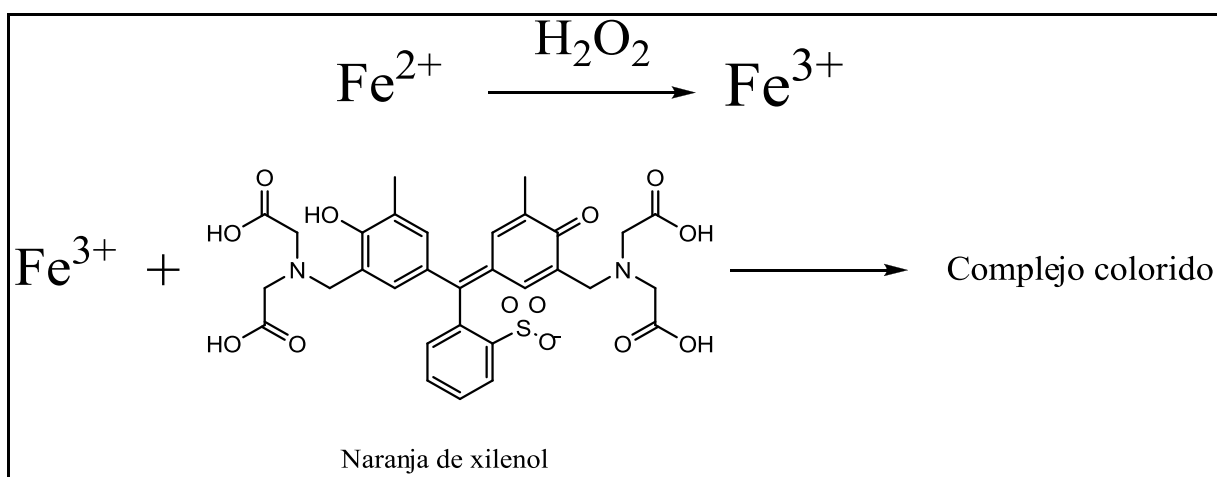


Figura 19. Fundamento del método de cuantificación de H_2O_2 .

5.4.5.2 Metodología.

Se siguió la metodología propuesta por Long y Halliwell (2001). El reactivo de FOX se preparó de la siguiente manera: Se preparó una solución metanólica de BHT 4 mM. Por otra parte se prepararon 2 mL de una solución que contenía naranja de xilenol 1.12 mM y sulfato ferroso amoniacal 2.5 mM, diluidos en H₂SO₄ 250 mM. Estas dos soluciones se mezclaron en una proporción 9:1 respectivamente.

Se incubaron a temperatura ambiente por 30 min 45 µL de las muestras y 45 µL de H₂O₂ 75 µM. Posteriormente se añadieron 10 µL de MeOH y 990 µL de reactivo de FOX. Se incubó por 30 min a temperatura ambiente y por último se transfirieron 300 µL de esta última mezcla a un pozo contenido en una placa de 96 pozos para proceder con la lectura de la absorbancia de las soluciones a 560 nm.

5.4.6 Ensayo de atrapamiento del OH[•].

5.4.6.1 Fundamento.

En este ensayo, el OH[•] es generado mediante la reacción de Fenton. Posteriormente se añade al ensayo tereftalato de sodio, el cual es una molécula no fluorescente que al reaccionar con el OH[•] origina un producto hidroxilado aromático, el 2-hidroxitereftalato, el cual muestra fluorescencia (Figura 20).

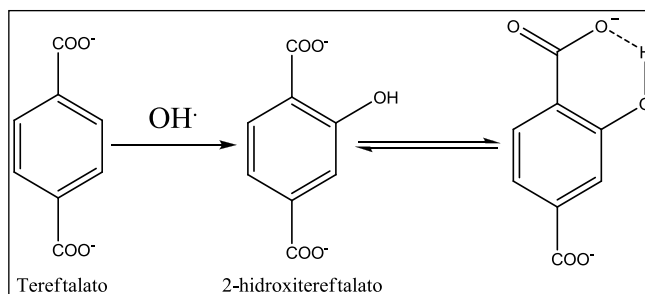


Figura 20. Fundamento del método de cuantificación del OH[•].

5.4.6.2 Metodología.

Se siguió la metodología propuesta por Yan *et al.* (2005) con modificaciones. Se colocaron 20 μL de la muestra a evaluar. Como blanco se utilizó H_2O desionizada en sustitución de las muestras. Por último, como control positivo se realizó una curva estándar con dimetiltiourea (100-10,000 μM).

Posteriormente se preparó una mezcla de reacción con los siguientes reactivos: 4 mL de vitamina C 1 mM, 2 mL de H_2O_2 10 mM, 4 mL de tereftalato de sodio 3.5 mM, 4 mL de una mezcla de EDTA/ FeCl_3 de concentración final 1 mM/1 mM y 4 mL de H_2O .

Por último, se añadieron 180 μL de la mezcla de reacción y se realizó la lectura de las unidades relativas de fluorescencia a una longitud de onda de emisión de 432 nm y excitación 326 nm durante 30 min.

5.4.7 Ensayo de atrapamiento del $^1\text{O}_2$.

5.4.7.1 Fundamento.

El $^1\text{O}_2$ es generado mediante NaOCl y H_2O_2 . Posteriormente se añade histidina y dimetilnitrosoanilina (DMNA). La histidina, al reaccionar con el $^1\text{O}_2$, forma un compuesto reactivo, que posteriormente atacará a la DMNA. La DMNA presenta absorbancia a 440 nm, por lo cual lo que se cuantifica es la disminución de la misma. Cuando se encuentre en la reacción un compuesto antioxidante, se evitará el aclaramiento de la DMNA (Figura 21).

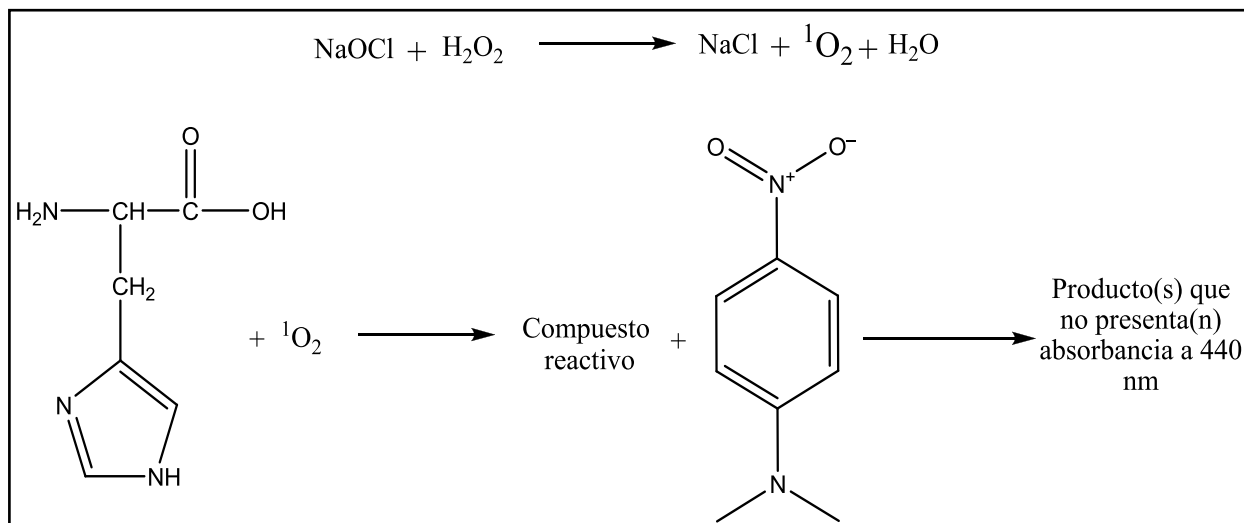


Figura 21. Fundamento del método de cuantificación del ${}^1\text{O}_2$.

5.4.7.2 Metodología.

Se siguió la metodología descrita por Wang y Jiao (2000). En un tubo de ensayo se añadieron siguiendo el orden mencionado 500 μL de amortiguador de fosfatos 60 mM pH=7.1, 100 μL de la muestra a evaluar, 100 μL de histidina 100 mM, 100 μL de H_2O_2 100 mM, 100 μL de DMNA 0.5 mM y 100 μL de NaOCl 100 mM. Posteriormente se incubó esta mezcla a temperatura ambiente durante 40 min, y se realizó la lectura de las absorbancias de las soluciones a 440 nm. Se elaboró una referencia del 100% de generación del ${}^1\text{O}_2$ añadiendo 100 μL más de amortiguador en lugar de la muestra.

5.4.8 Ensayo de neutralización del HOCl.

5.4.8.1 Fundamento.

El HOCl se generó mezclando hipoclorito de sodio (NaOCl) con H_2SO_4 250 mM. Conforme se añade el H_2SO_4 , disminuirá el pH de la disolución, favoreciendo la protonación del NaOCl, generando el HOCl. Para cuantificar el HOCl, se realiza una reacción de oxidación entre éste y ácido tionitrobenzoico (TNB), formando

como producto ácido ditionitrobenzoico (DTNB). El DTNB se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 412 nm. En la figura 22 se resumen las reacciones involucradas en la determinación del HOCl.

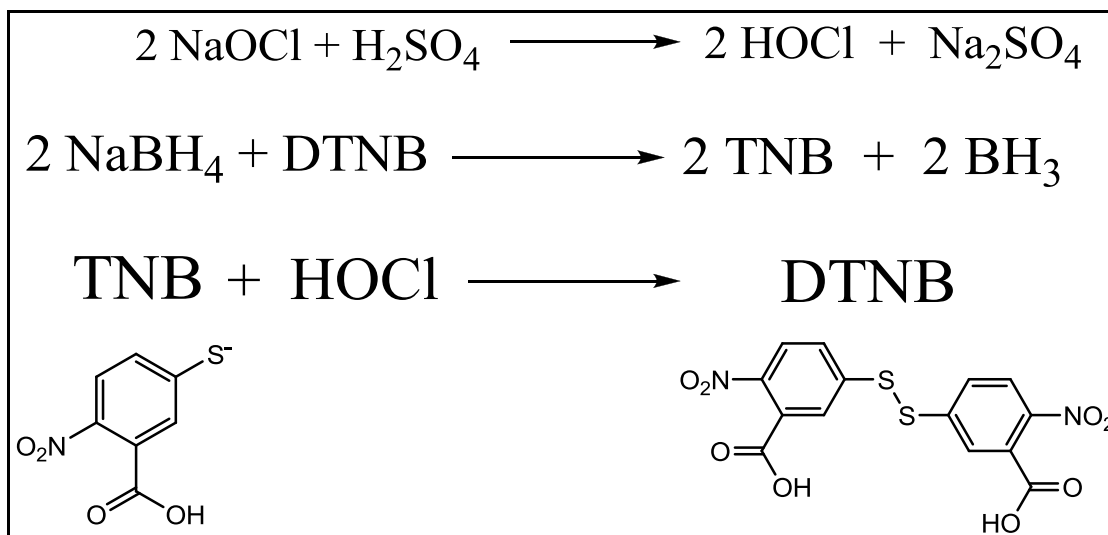


Figura 22. Fundamento del método de cuantificación para el HOCl.

5.4.8.2 Metodología.

Se siguió la metodología propuesta por Govindajaran *et al.* (2003) con modificaciones. A una disolución de NaOCl 5% se añadió H₂SO₄ 250 mM gota a gota hasta ajustar a un pH=6.2. Posteriormente se realizó una dilución 1:25 de esta mezcla con amortiguador de fosfatos 50 mM pH=7.4, y se determinó la absorbancia de esta solución a 235 nm. Utilizando un coeficiente de absortividad molar $\epsilon=100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ se calculó la concentración de la solución de HOCl y se realizó la dilución correspondiente para obtener una concentración final de HOCl 25 μM .

Por otra parte, se realizaron 25 mL de una mezcla que contenía amortiguador de fosfatos 50 mM, pH=6.6 con EDTA 5 mM, DTNB 1.87 mM y NaBH₄ 50 mM. Se incubó a 37°C durante 30 min. Posteriormente, se leyó la absorbancia de esta solución a 412 nm y se calculó la concentración de la

solución de TNB, utilizando un coeficiente de absorptividad molar $\epsilon=13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Por último, se realizó la dilución correspondiente para obtener una solución de TNB $70 \mu\text{M}$.

Finalmente, para realizar el ensayo, en un tubo de ensayo se añadieron 0.4 mL de TNB $70 \mu\text{M}$, 0.1 mL de la muestra a analizar y 0.5 mL de HOCl $25 \mu\text{M}$. Se incubó a temperatura ambiente por 5 min y finalmente se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 412 nm.

5.4.9 Ensayo de atrapamiento del ONOO^- .

5.4.9.1 Fundamento.

La oxidación de la dihidrorodamina 123 (DHR 123) por la acción del ONOO^- da como producto la rodamina 123, la cual puede cuantificarse espectrofotométricamente a 500 nm. Si la muestra presenta propiedades antioxidantes, se disminuirá o anulará la formación de rodamina 123. En la figura 23 se ilustra el fundamento del método de cuantificación del ONOO^- .

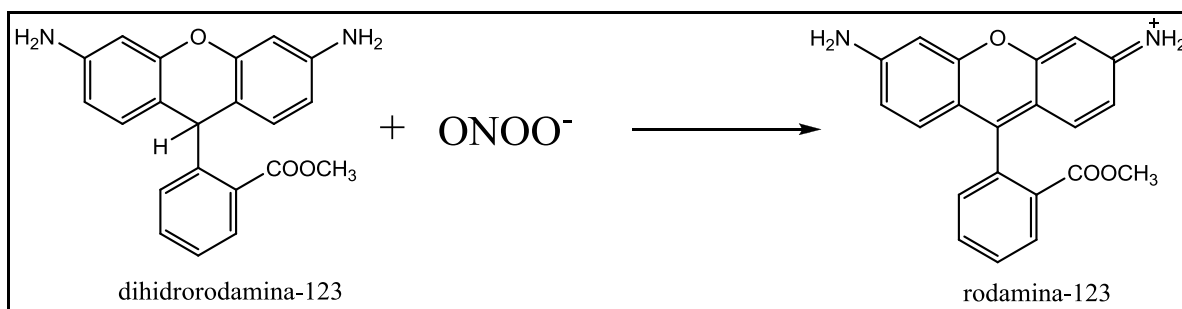


Figura 23. Fundamento del método de cuantificación de ONOO^- .

5.4.9.2 Metodología.

- **Síntesis de ONOO⁻.**

La síntesis del ión ONOO⁻ se realizó siguiendo la técnica de Beckman *et al.* (1991) como se describe a continuación: El ión ONOO⁻ se preparó a partir de una reacción química entre H₂O₂ 0.7 M (en 5 mL de HCl 0.6 M) y KNO₂ 0.6 M (5 mL) y la reacción se detuvo añadiendo 5 mL de NaOH 1.2 M frío al sistema. Para eliminar el H₂O₂ residual, la mezcla de reacción se separó en una columna previamente preparada de 1×5, utilizando 4 g de MnO₂ como fase estacionaria y NaOH 1.2 M como fase móvil. El ONOO⁻ obtenido se almacenó a una temperatura de -80°C. Antes de utilizar el ONOO⁻ en el ensayo, se cuantificó espectrofotométricamente la concentración obtenida, leyendo la muestra a 302 nm y utilizando un coeficiente de extinción molar de 1,670 M⁻¹ cm⁻¹. Se hicieron las diluciones pertinentes para obtener 500 µL de una muestra de ONOO⁻ 1.25 mM.

- **Procedimiento.**

El ensayo se realizó siguiendo la técnica propuesta por Saito *et al.* (2003). En un tubo para centrífuga de 1.0 mL se mezclaron 350 µL de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH=7.4, 50 µL de DTPA 1 mM, 50 µL de la muestra a evaluar, 50 µL de DHR-123 50 µM y 10 µL de ONOO⁻ 1.25 mM. Se agitó vigorosamente y se procedió a la lectura en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 500 nm.

5.4.10 Ensayo de capacidad de absorción de radicales de O₂ (ORAC).

5.4.10.1 Fundamento.

En este ensayo se utiliza como generador de radicales peroxilo el 2,2'-azinobis(2-amidinopropano)dihidrócloruro, también conocido como AAPH, el cual reacciona con la fluoresceína. La fluoresceína se cuantifica cada minuto durante

1.5 h. En ausencia de un compuesto antioxidante, el AAPH reaccionará con la fluoresceína y la fluorescencia de la misma disminuirá con el tiempo. Cuando se añade un compuesto antioxidante, se neutralizarán los radicales LOO^{\bullet} generados y la fluorescencia proveniente de la fluoresceína se mantendrá por un tiempo más prolongado. Al final, se construye una curva con todos los valores de unidades relativas de fluorescencia (URF) y se calcula el área bajo la curva de la misma.

5.4.10.2 Metodología.

Se siguió la metodología propuesta por Huang *et al.*, (2002) con modificaciones. En una placa de plástico color negro con 96 pozos se colocaron 25 μL de AAPH 153 mM, 25 μL de la muestra a evaluar y 150 μL de fluoresceína 40 nM. Inmediatamente después se realizaron las lecturas de las unidades relativas de fluorescencia, cada minuto durante 1.5 h. Posteriormente con todas las lecturas de las URF se realizó el cálculo del área bajo la curva y se interpretaron los datos.

5.5 Análisis estadístico.

Para comparar la actividad atrapadora de las muestras analizadas con respecto al control, se utilizó el programa de estadística Graph Pad Prism versión 3.02 (San Diego, E.U.A.). El análisis estadístico que se realizó fue ANOVA paramétrico seguido de una comparación por el método de Dunnett. Los datos se encuentran expresados como la media \pm E.E.M. Se consideró significativa la comparación a partir de una $p < 0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

6.1 Aislamiento y purificación de la Coatlina B.

6.1.1 Rendimiento.

Tabla 2. Rendimiento obtenido en el proceso de extracción.

Fracción	Peso (g)	Rendimiento (%)
Extracto	145.68	14.57
Fracción primaria	56.4	5.6
Coatlina B	8.6	0.9

6.1.2 Identificación de la Coatlina B.

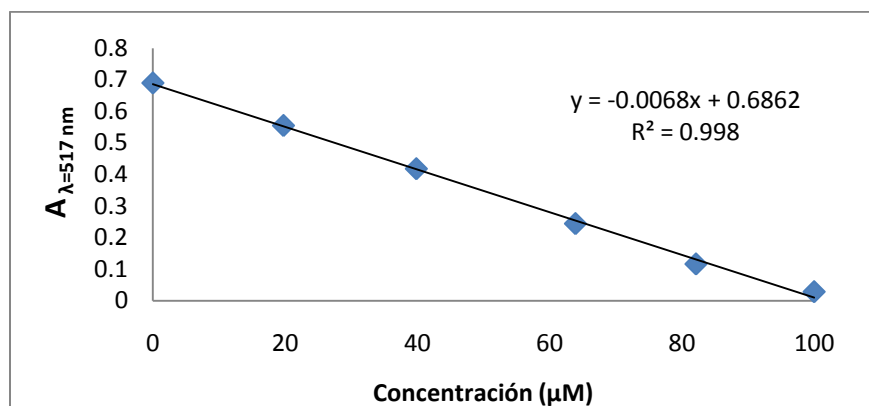
A partir de la fracción secundaria FII se purificó la coatlina B mediante sucesivas cromatografías y recristalizaciones. La identificación de la coatlina B se realizó de manera preliminar mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia. La coatlina B aislada y la referencia presentaron un tiempo de retención de 5.5 min en las condiciones evaluadas. Las constantes espectroscópicas y espectrométricas de la coatlina B aislada son idénticas a las descritas previamente en la literatura (Hernández, 2011; Acuña *et al.*, 2009).

6.2 Evaluación de la actividad antioxidante.

6.2.1 Actividad inhibidora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH').

A continuación se presenta la curva estándar de Trolox® (Gráfica 1) que se realizó para poder encontrar el valor la de capacidad antioxidante equivalente a Trolox® (TEAC) para las muestras, las cuales se presentan en la tabla 3.

Resultados y Discusión de Resultados



Gráfica 1. Curva estándar de Trolox® para el ensayo de atrapamiento de DPPH·.

Tabla 3. Valores TEAC para las muestras analizadas para la capacidad de neutralización del radical DPPH·.

Muestra	Concentración (mg/mL)	Absorbancia promedio ± E.E.M.	TEAC (μmol/L)	TEAC (mg/mL)
Extracto	0.001	0.677±0.006	1.647	0.00041
	0.01	0.487±0.016	29.588	0.00741
	0.1	0.039±0.004	95.471	0.02390
Fracción Primaria	0.01	0.742±0.019	< 1	<0.00025
	0.1	0.480±0.015	30.32	0.00759
	1	0.030±0.002	96.50	0.02415
Coatlina B	0.01	0.739±0.020	< 1	<0.00025
	0.1	0.384±0.014	44.44	0.01112
	1	0.030±0.000	96.50	0.02415

El Trolox® es el nombre del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico. Éste es un análogo soluble de la vitamina E el cual se utiliza en ciertos ensayos de capacidad antioxidante como estándar de referencia. Frecuentemente se hace esta comparación para medir la capacidad antioxidante en bebidas,

Resultados y Discusión de Resultados

alimentos, suplementos alimenticios y en muestras de composición compleja. Para hacer la comparación, se elaboró una curva patrón de Trolox® de absorbancia vs concentración. Por último, se interpolaron los valores de absorbancia que se obtuvieron en las muestras, para obtener una concentración equivalente de Trolox®. Esto es lo que se denomina TEAC.

Sabiendo que el peso molecular del Trolox® es de 250.29 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$, puede calcularse la concentración de los valores de TEAC en mg/mL (debido a que la concentración de las muestras está en mg/mL) y de esta manera comparar la potencia relativa entre la muestra evaluada y el Trolox®. Estos valores se muestran en la última columna de la tabla 3. Haciendo esta comparación se observa que por ejemplo, 0.01 mg de coatlina B equivalen a menos de 0.00025 mg de Trolox®. Por lo tanto, todas las muestras demostraron tener una potencia mucho mayor a la del Trolox®.

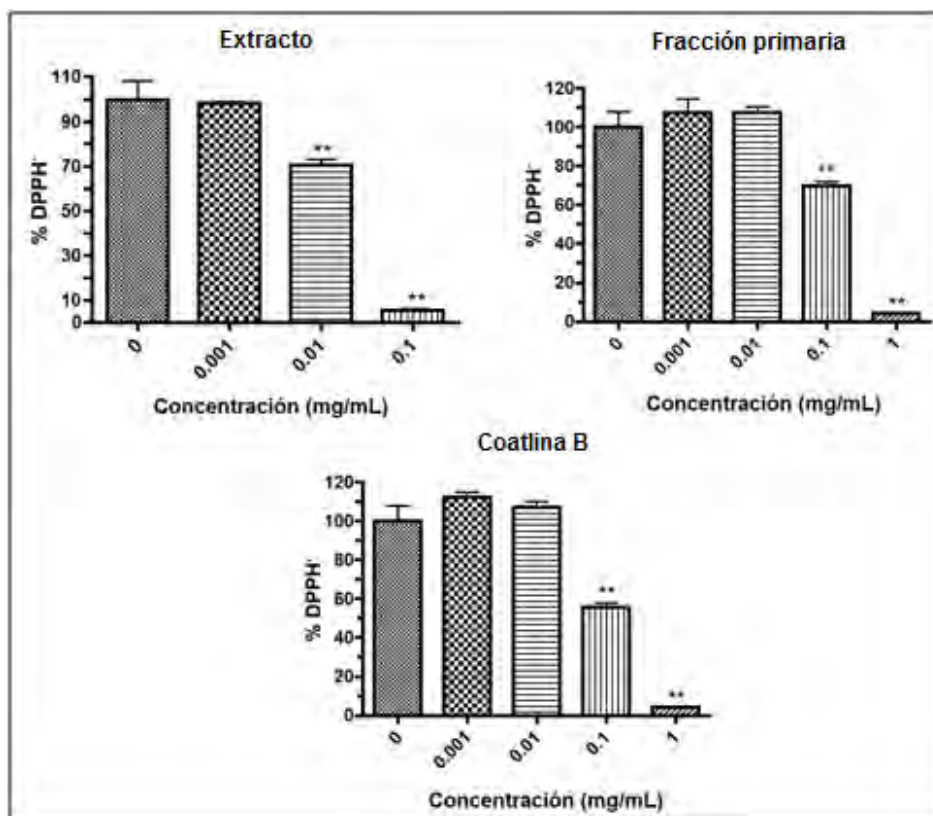


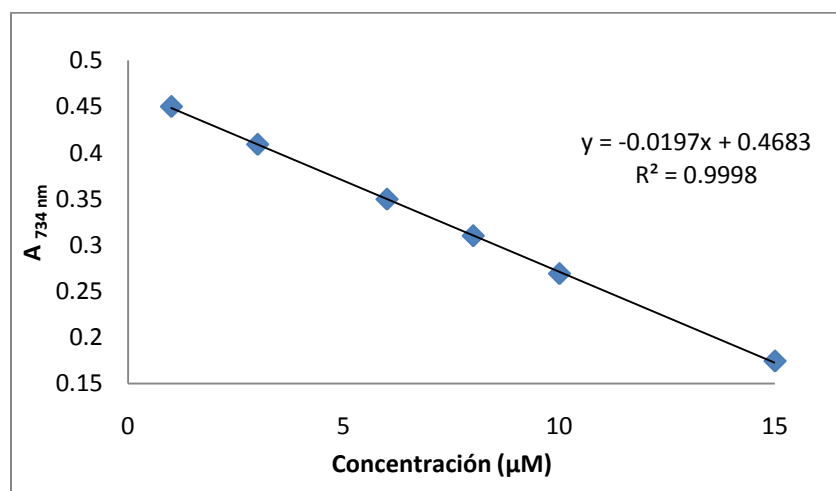
Figura 24. Actividad inhibitoria del DPPH*. Los datos están expresados como media \pm E.E.M., $n=3$, * $p<0.05$ y ** $p<0.01$ vs el grupo 0 mg/mL.

Resultados y Discusión de Resultados

Por otra parte, en la figura 24 se resume la capacidad de neutralización del DPPH[•] del extracto, la fracción primaria y la coatlina B. En esta figura, además de ilustrar que todas las muestras logran disminuir la concentración de DPPH[•] de manera significativa, también se ilustra que la muestra más potente fue el extracto, ya que se requirió de una concentración de 0.1 g/mL para neutralizar casi el 100% del radical, mientras que la fracción primaria y la coatlina B lo lograron hasta una concentración de 1 g/mL.

6.2.2 Actividad inhibidora del radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio (ABTS^{•+}).

A continuación se presenta la curva estándar de Trolox® (Gráfica 2) que se realizó para poder encontrar el valor de TEAC para las muestras. Los valores de TEAC se presentan en la tabla 4.



Gráfica 2. Curva estándar de Trolox® para ensayo de atrapamiento de ABTS^{•+}.

Resultados y Discusión de Resultados

Tabla 4. Valores TEAC para las muestras analizadas para la capacidad de neutralización del catión radical ABTS^{•+}.

Muestra	Concentración (mg/mL)	Absorbancia promedio \pm E.E.M.	TEAC (μ mol/L)	TEAC (mg/mL)
Extracto	0.0001	0.434 \pm 0.005	1.741	0.0004
	0.001	0.416 \pm 0.005	2.655	0.0007
	0.01	0.410 \pm 0.008	2.959	0.0007
	0.1	0.310 \pm 0.017	8.035	0.0020
	1	0.002 \pm 0.000	>15	0.0038
Fracción Primaria	0.0001	0.434 \pm 0.010	1.741	0.0004
	0.001	0.419 \pm 0.029	2.503	0.0006
	0.01	0.418 \pm 0.018	2.553	0.0006
	0.1	0.397 \pm 0.015	3.619	0.0009
	1	0.295 \pm 0.012	8.797	0.0022
Coatlina B	0.0001	0.445 \pm 0.009	1.183	0.0003
	0.001	0.454 \pm 0.009	<1	0.0003
	0.01	0.455 \pm 0.007	0.675	0.0002
	0.1	0.425 \pm 0.011	2.198	0.0006
	1	0.283 \pm 0.005	9.406	0.0024

Se encontró nuevamente que las muestras evaluadas tienen una capacidad antioxidante superior a la del Trolox®.

En la figura 25 se muestra la capacidad de neutralización del ABTS^{•+} por parte del extracto, la fracción primaria y la coatlina B. En esta figura se observa que para el extracto, hubo una diferencia significativa desde la concentración de 0.1 mg/mL y la cual fue notable a 1 mg/mL, ya que logró neutralizar casi el 100% del ABTS^{•+}. Para la fracción primaria y la coatlina B solamente hubo diferencia

Resultados y Discusión de Resultados

significativa a la concentración de 1 mg/mL y no llegaron a neutralizar menos del 50% del ABTS^{•+}. Estos resultados muestran que el extracto posee una capacidad antioxidante superior.

Por último, tanto para el ensayo de ABTS^{•+} como para el DPPH[•] es importante mencionar que si las muestras analizadas tienen la capacidad de atrapar estos radicales, por lo tanto tienen un alto potencial de donar hidrógenos para neutralizar radicales libres.

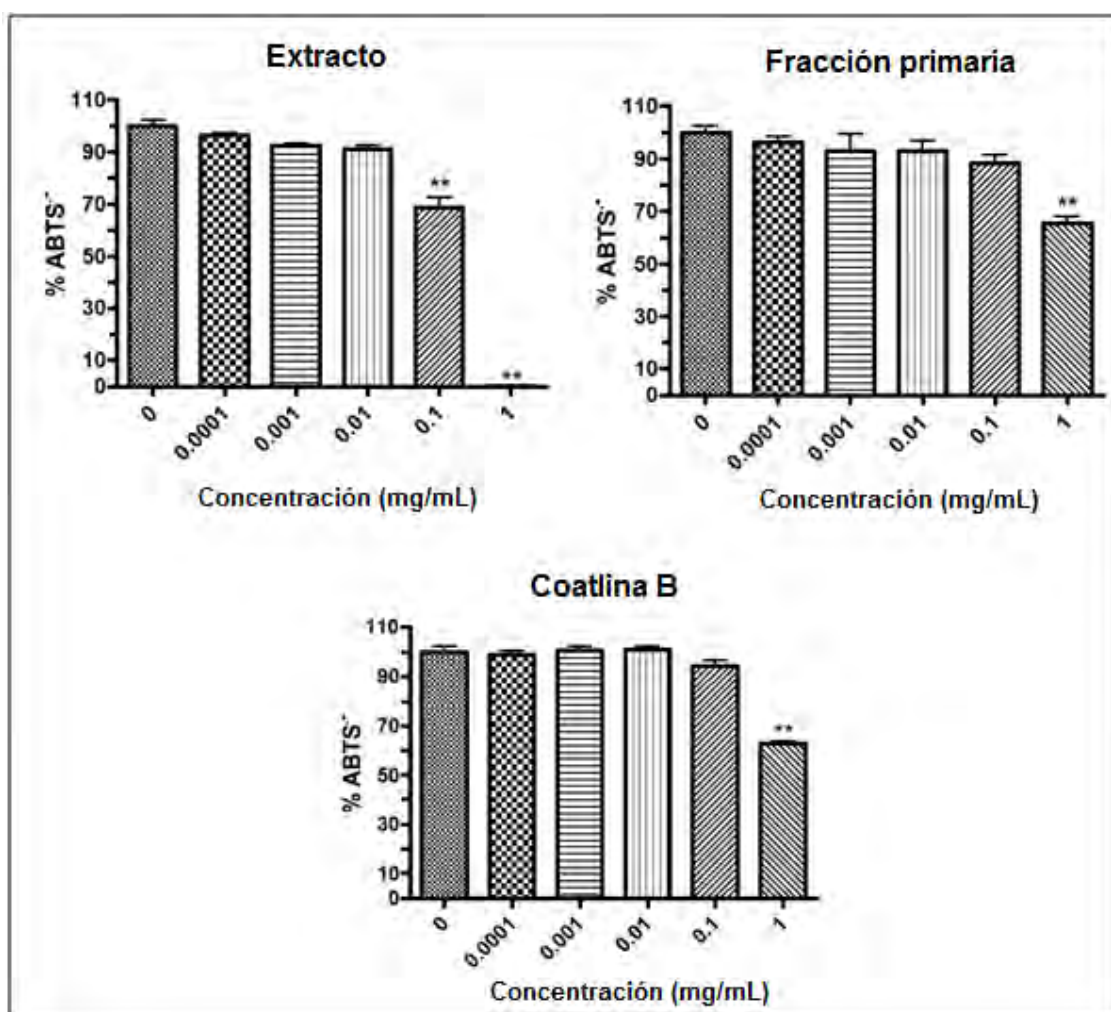


Figura 25. Actividad inhibitoria del ABTS^{•+}. Los datos están expresados como media \pm E.E.M., n=3, *p<0.05 y **p<0.01 vs el grupo 0 mg/mL.

6.2.3 Ensayo de atrapamiento de $O_2^{\cdot-}$.

En la figura 26 se ilustra la actividad enzimática de la X.O. durante el ensayo realizado. Por otra parte en la figura 27 se ilustra el efecto que tiene el extracto, la fracción primaria y la coatlina B con respecto al atrapamiento del $O_2^{\cdot-}$.

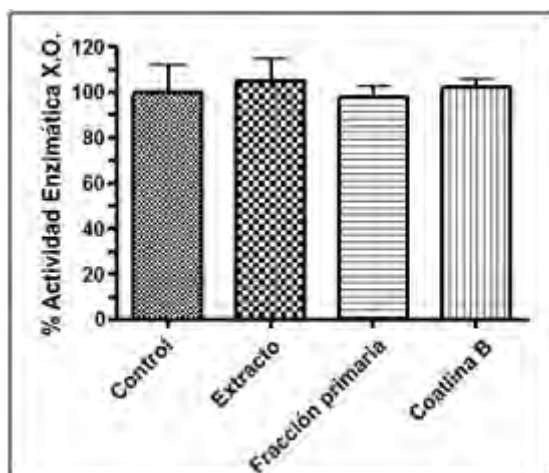


Figura 26. Actividad enzimática de la X.O. La concentración de las muestras fue de 100 $\mu\text{g/mL}$. Los datos están expresados como media \pm E.E.M., $n=3$, * $p<0.05$ y ** $p<0.01$ vs grupo control (0 mg/mL).

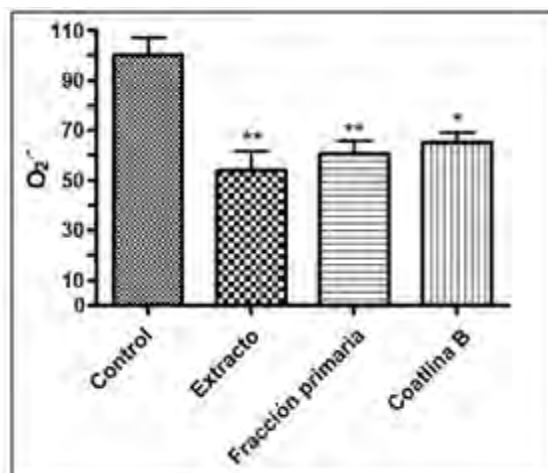


Figura 27. Inhibición de la producción del $O_2^{\cdot-}$. La concentración de las muestras fue de 100 $\mu\text{g/mL}$. Los datos están expresados como media \pm E.E.M., $n=3$ * $p<0.05$ y ** $p<0.01$ vs grupo control (0 mg/mL).

Se encontró que a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ del extracto, fracción primaria y coatlina B, las muestras logran disminuir de manera significativa la concentración de este radical (Figura 27) y no modifican la actividad enzimática de la X.O. (Figura 26), por lo cual el mecanismo antioxidante de las muestras para el $O_2^{\cdot-}$, es un atrapamiento directo del mismo, y no una inhibición de su producción.

6.2.4 Ensayo de capacidad de degradación de H_2O_2 .

A continuación, en la figura 28 se expresa el porcentaje de atrapamiento del H_2O_2 . La concentración de las muestras en este ensayo fue de 1 mg/mL, la cual fue la máxima concentración probada en todos los ensayos del presente trabajo.

Los resultados arrojan que ninguna de las muestras logró disminuir de manera significativa la concentración de H_2O_2 , por lo cual se deduce que ninguna de las muestras tiene la capacidad de atrapar el H_2O_2 .

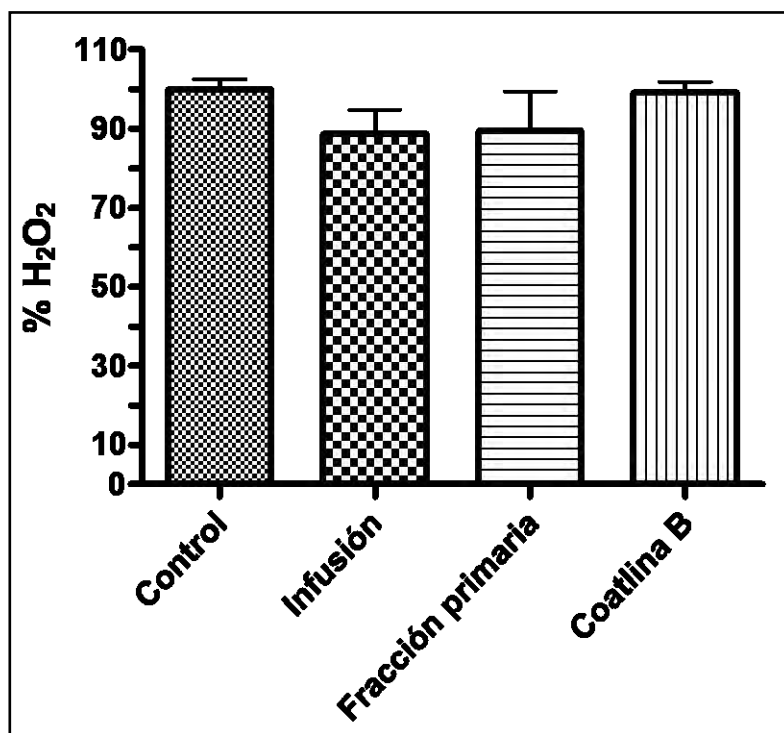


Figura 28. Degradación del H_2O_2 . Los datos están expresados como media \pm E.E.M., n=3. *p<0.05 y **p<0.01 vs grupo control (0 mg/mL).

6.2.5 Ensayo de capacidad de atrapamiento del OH[•].

En la figura 29 se presenta el porcentaje de atrapamiento del OH[•]. Todas las muestras presentaron la capacidad de atrapar este radical, sin embargo, ahora el antioxidante más potente fue la coatlina B. Tanto para la coatlina B como para la fracción primaria se observa una disminución de este radical de una tendencia dosis-respuesta; sin embargo en el extracto únicamente se logra observar una disminución significativa a la concentración más alta. Cabe destacar que, como ya se mencionó en este trabajo, el OH[•] es de las especies reactivas más tóxicas que se conocen.

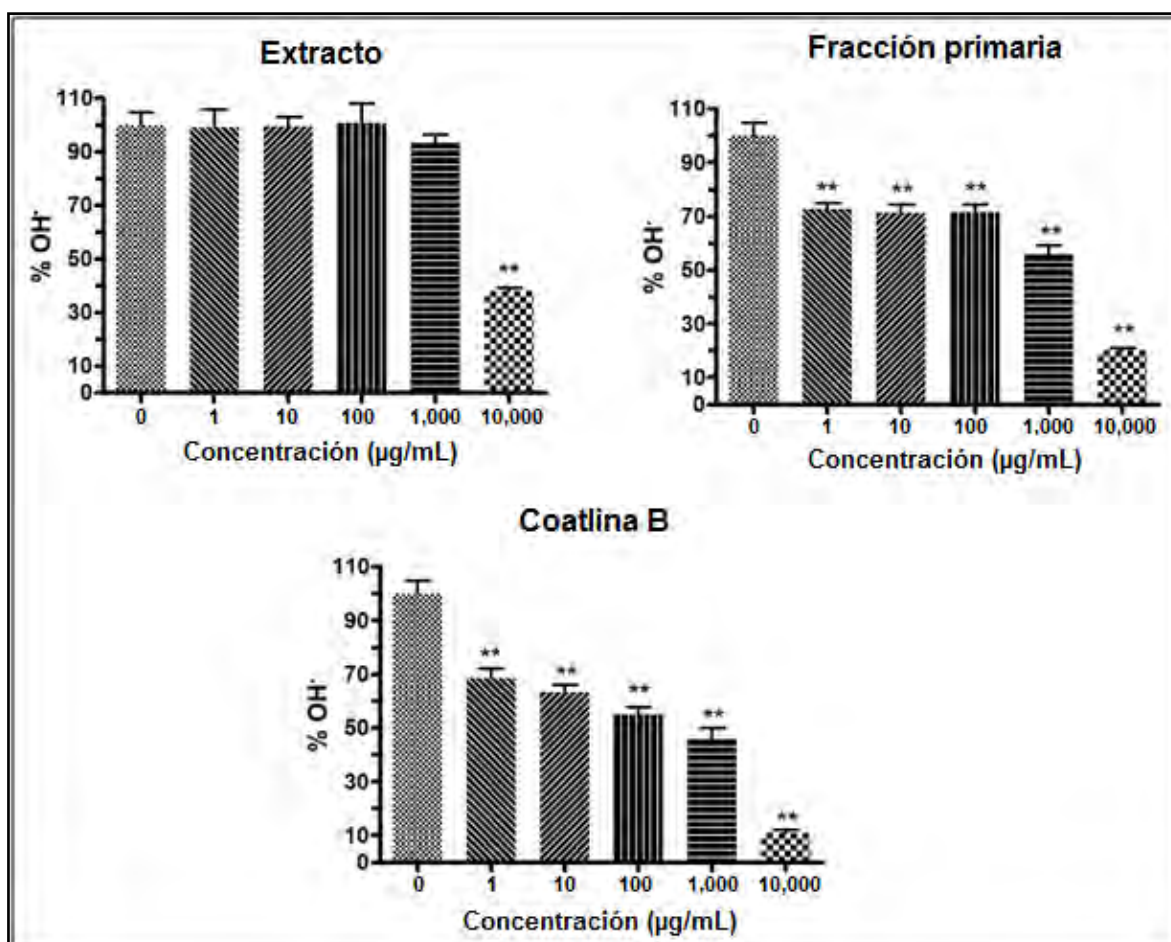


Figura 29. Atrapamiento del OH[•]. Los datos están expresados como media ± E.E.M., n=4, *p<0.05 y **p<0.01 vs grupo control (0 mg/mL).

6.2.6 Ensayo de capacidad de atrapamiento del HOCl.

En la figura 30 se presenta el porcentaje de atrapamiento del HOCl. Se encontró que únicamente el extracto fue capaz de atrapar el HOCl de manera significativa.

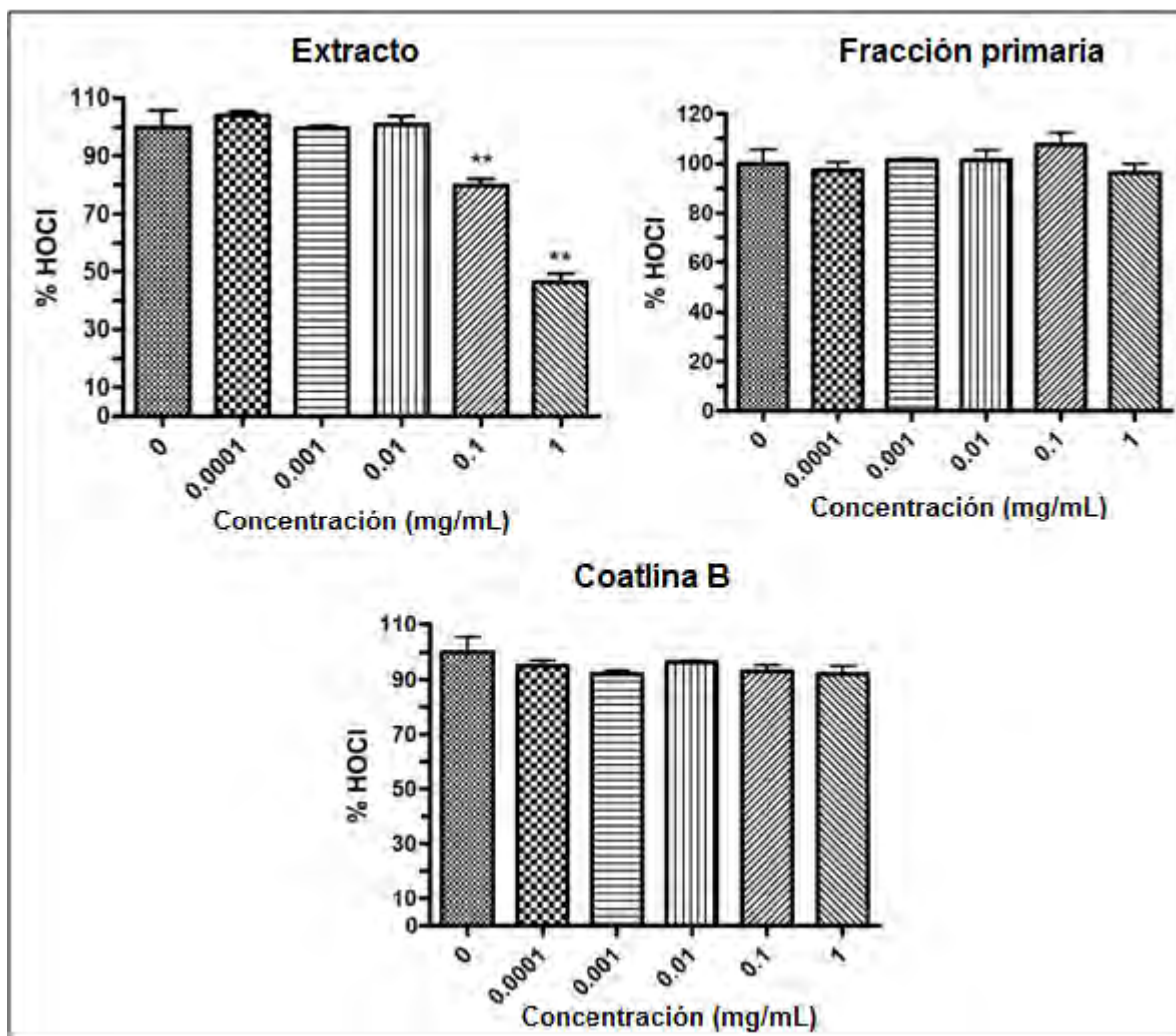


Figura 30. Atrapamiento del HOCl. Los datos están expresados como media \pm E.E.M., n=3, *p<0.05 y **p<0.01 vs grupo control (0 mg/mL).

6.2.7 Ensayo de capacidad de atrapamiento del $^1\text{O}_2$.

En la figura 31 se resume el porcentaje de atrapamiento del $^1\text{O}_2$. Se encontró que únicamente el extracto fue capaz de disminuir la concentración de $^1\text{O}_2$ de manera significativa, sin embargo, solamente logra disminuir la concentración de 0.1 mg/mL un 10%.

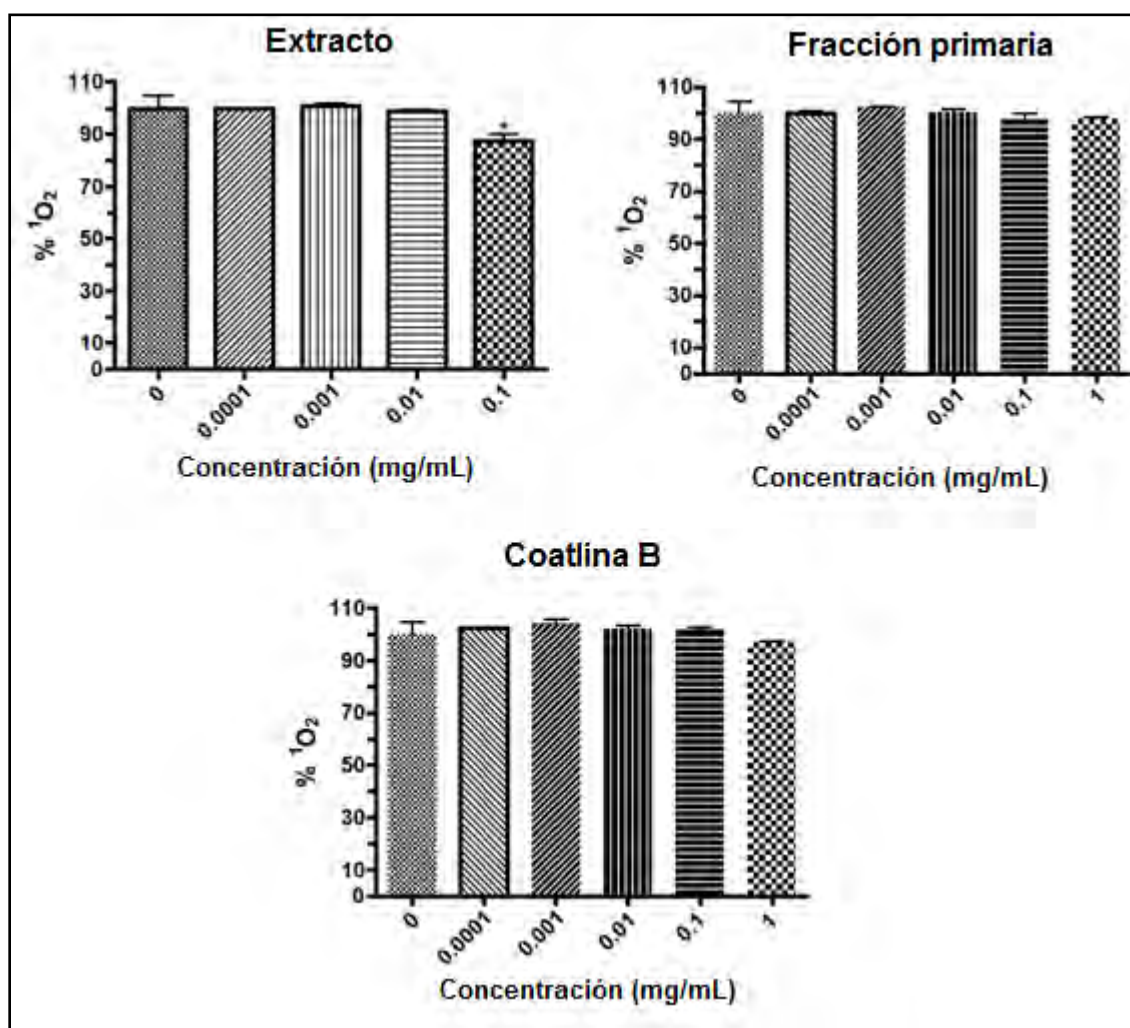


Figura 31. Atrapamiento del $^1\text{O}_2$. Los datos están expresados como media \pm E.E.M., $n=3$, $*p<0.05$ y $**p<0.01$ vs grupo control (0 mg/mL).

6.2.8 Ensayo de capacidad de atrapamiento del ONOO^- .

En la figura 32 se resume el porcentaje de atrapamiento del ión ONOO^- . La concentración de las muestras fue de 1mg/mL. Se puede observar que todas las muestras evaluadas lograron disminuir de manera significativa al ONOO^- , y la que presenta mayor eficacia fue la coatlina B, logrando disminuir la concentración de esta especie un 70%.

Cabe destacar que esta especie reactiva es de las más tóxicas que se conocen hasta el momento y su degradación da como resultado la formación de OH^\bullet , el cual también es de las especies reactivas más tóxicas.

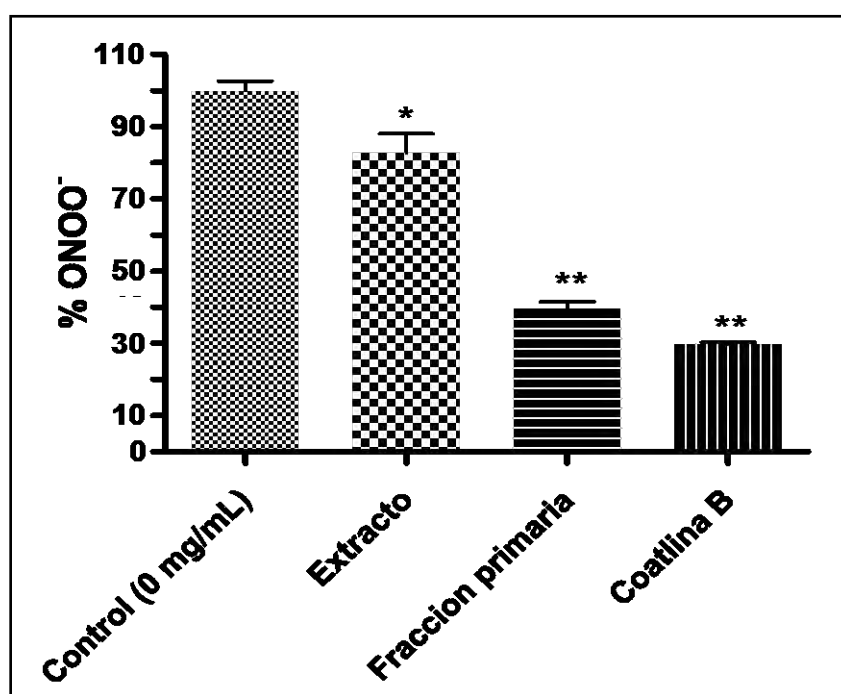
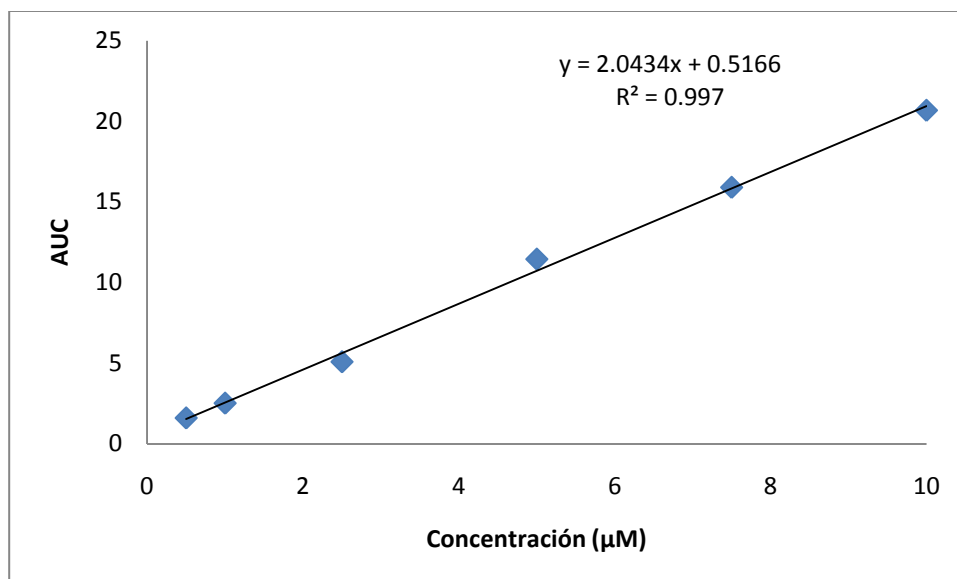


Figura 32. Atrapamiento del ONOO^- . Los datos están expresados como media \pm E.E.M., n=3, *p<0.05 y **p<0.01 vs grupo control (0 mg/mL).

Resultados y Discusión de Resultados

6.2.9 Ensayo de capacidad de absorción de radicales de O₂ (ORAC).

A continuación se presenta la curva estándar de Trolox® que se realizó para poder encontrar el valor de TEAC para las muestras (Gráfica 3). Los valores de TEAC se presentan en la tabla 5.



Gráfica 3. Curva estándar de Trolox® para ensayo de ORAC.

Tabla 5. Valores TEAC para las muestras analizadas para el ensayo de ORAC.

Muestra	Concentración (μg/mL)	Área bajo la curva ± E.E.M.	TEAC (μmol/L)	TEAC (μg/mL)
Extracto	10	20.7601 ± 0.8994	9.907	2.480
Fracción Primaria		3.7796 ± 0.5682	1.597	0.400
Coatlina B		4.6208 ± 0.3898	2.009	0.503

Resultados y Discusión de Resultados

En la tabla 5 puede observarse que todas las muestras presentaron una actividad antioxidante mejor que la del Trolox®. La muestra que resultó ser un antioxidante más potente por tener el mayor TEAC fue el extracto.

Por otra parte, en la figura 33 se ilustra el área bajo la curva calculada por las URF emitidas por la fluoresceína con respecto al tiempo. En este ensayo, los radicales lipídicos van degradando a la fluoresceína, por lo cual si se encuentra una especie antioxidante, va a impedir la degradación de la fluoresceína y por lo tanto aumentarán las URF y el área bajo la curva. Puede observarse que con respecto al control, las tres muestras logran aumentar de manera significativa el área bajo la curva, aunque el mayor aumento se observó con el extracto.

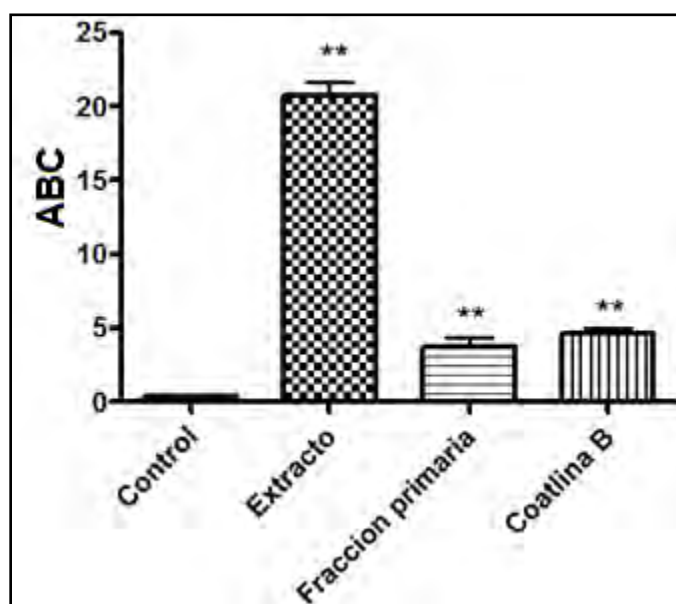


Figura 33. Ensayo de ORAC. La concentración de las muestras fue de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los datos están expresados como media \pm E.E.M., $n=10$, $*p<0.05$ y $**p<0.01$ vs control (0 mg/mL).

6.3 Resumen de resultados.

En la tabla 6 se presenta un resumen en el que se indican los radicales o especies reactivas evaluadas, cuáles muestras pudieron atrapar dicho radical o especie reactiva y cuál fue el mejor atrapador.

Tabla 6. Resumen de resultados. La abreviatura Ext. representa al extracto, Fracc. prim. a la fracción primaria, y C.B. a la coatlina B. Con un asterisco se encuentra marcada la especie que tuvo mayor capacidad de atrapamiento.

	Especie reactiva o radical								
	DPPH [•]	ABTS ^{•+}	O ₂ ^{•-}	H ₂ O ₂	OH [•]	HOCl	¹ O ₂	ONOO ⁻	LOO [•]
Muestras con capacidad atrapadora	Ext.*	Ext.*	Ext.*	--	Ext.	Ext.	Ext.	Ext.	Ext.*
	Fracc. prim.	Fracc. prim.	Fracc. prim.	--	Fracc. prim.	--	--	Fracc. prim.	Fracc. prim.
	C.B.	C.B.	C.B.	--	C.B.*	--	--	C.B.*	C.B.

Se encontró que el extracto fue la muestra que más especies reactivas logró neutralizar, con lo cual es evidente que éste aún contiene otros compuestos antioxidantes capaces de neutralizar una mayor cantidad especies reactivas que la coatlina B por sí misma. Por lo tanto, es necesario continuar el aislamiento de otros compuestos que contenga el extracto.

7. CONCLUSIONES.

- El extracto acuoso obtenido por infusión a partir de *E. polystachya* presenta una potente actividad antioxidante contra las siguientes especies reactivas: $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , 1O_2 , HOCl, $ONOO^-$ y LOO^{\cdot} .
- La coatlina B presenta actividad antioxidante contra las siguientes especies reactivas: $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , $ONOO^-$ y LOO^{\cdot} .
- Tanto el extracto como la fracción primaria y la coatlina B presentan actividad antioxidante para los radicales DPPH $^{\cdot}$, ABTS $^{2+}$ y LOO^{\cdot} más efectiva que el Trolox $^{\text{®}}$. En este sentido, es necesario hacer una comparación más exhaustiva mediante el parámetro de concentración inhibitoria 50 (IC $_{50}$), utilizando otros antioxidantes además del Trolox $^{\text{®}}$ para determinar la potencia relativa de la capacidad antioxidante.

8. PERSPECTIVAS.

- Aislar otros compuestos a partir de *E. polystachya* y evaluar su actividad antioxidante.
- Dilucidar otros mecanismos mediante los cuales tanto la coatlina B como otros compuestos aislados a partir de *E. polystachya* puedan tener actividad antioxidante (Ej. inducción de la sobreexpresión de enzimas antioxidantes, o inhibición enzimas generadoras de radicales libres).
- Realizar un estudio comparativo tanto de la coatlina B como de otros compuestos aislados a partir de *E. polystachya* con otros antioxidantes ya conocidos y determinar su concentración inhibitoria 50.

Conclusiones y Perspectivas

- Realizar evaluaciones *in situ* e *in vivo* de la coatlina B y otros compuestos antioxidantes aislados a partir de *E. polystachya* en distintos modelos de enfermedades asociadas con el estrés oxidante.

9. REFERENCIAS.

- Acuña A.U., Amat-Guerri F., Morcillo P., Liras M., Rodríguez B. (2009). **Structure and formation of the fluorescent compound of *Lignum nephriticum***. Organic Letters. 11(14):3020-3023.
- Álvarez L., Ríos M.Y., Esquivel C., Chávez M.I., Delgado G., Aguilar M.I., Villarreal M.L., Navarro V. (1998). **Cytotoxic isoflavans from *Eysenhardtia polystachya***. J. Nat. Prod. 61:767-770.
- Álvarez L., Delgado G. (1999). **C- and O-glycosyl- α -hydroxydihydro chalcones from *Eysenhardtia polystachya***. Phytochem. 50(4):681-687.
- Aruoma O.I. (1998). **Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease**. JAOCS 75:199-212.
- Beckman J.S., Radi R., Bush K.M., Freeman B.A. (1991). **Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide**. Arch. Biochem. Biophys. 288:481-487.
- Beltrami E., De Bernardi M., Fronza G., Mellerio G., Vidari G., Vita-Finzi P. (1982). **Coatline A and B, two C-glucosil- α -hydroxydihydrochalcones from *Eysenhardtia polystachya***. Phytochemistry 21(12):2931-2933.
- **Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana** (2009). Recuperado en mayo de 2012 de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>.
- Bielsky B.H.J., Shiue G.G., Bajuk S. (1980). **Reduction of nitro blue tetrazolium by $CO_2^{\cdot -}$ and $O_2^{\cdot -}$ radicals**. J. Phys. Chem. 84(8):830-833.

- Bruneton J. (1995). ***Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants***. Editorial Lavoisier Publishing Inc., Francia pp 266-296.
- **Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad** (2009). Recuperado en mayo de 2012 de http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/28-legum18m.pdf.
- Dorado C., Rugeiro C., Rivas S. (2003). ***Estrés oxidativo y neurodegeneración***. Revista Facultad de Medicina, UNAM 46(6):229-235.
- Dröge W. (2003). ***Oxidative stress in aging***. Adv. Exp. Med. Biol. Chem. 543:191-200.
- Govindarajan R., Rastogi S., Vijayakumar M., Shirwaikar A., Rawat A. K., Mehrota S., Pushpangadan P. (2003). ***Studies on the antioxidant activities of Desmodium gangeticum***. Biol. Pharm. Bull. 26(10):1424-1427.
- Gilgun-Sherki Y., Melamed E., Offen D. (2001). ***Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier***. Neuropharmacology 40:959–975.
- Grassi D., Desideri G., Ferri C. (2010). ***Flavonoids: Antioxidants against atherosclerosis***. Nutrients 2:889-902.
- Grotewold E. (2006). ***The science of flavonoids***. Estados Unidos de América: Springer Science + Business Media, Inc. pp 1-4.

- Havsteen B.H. (2002). ***The biochemistry and medical significance of the flavonoids***. Pharmacology & Therapeutics 96:67-202.
- Hernández López J.R. (2011). ***Efecto de la coatlina B, un flavonoide aislado de la especie Eysenhardtia polystachya (palo azul), en un modelo de neurodegeneración***. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química, UNAM.
- Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J., Prior R.L. (2002). ***High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format***. J. Agric. Food Chem. 50:4437-4444.
- Instituto Nacional de Ecología (2007). Recuperado en mayo de 2012 de <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/379/flora42.html>.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (2012). ***Compendium of Chemical Terminology Goldbook***. Version 2.3.1:1234.
- Klein J.A., Ackerman S.L. (2003) ***Oxidative stress, cell cycle and neurodegeneration***. J. Clin. Invest. 111(6):785–793.
- López F. A. T., Del Valle Mondragón L., Pastelín Hernández G. (2006). ***Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica?*** Archivos de cardiología de México 76(S4):33-45.
- Long L.H., Halliwell B. (2001). ***Antioxidant and prooxidant abilities of food and beverages***. Methods in Enzymology 335:181-190.

- Martínez G. (2005). ***Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno.*** Rev. Cubana Farm. 39(3):1-11.
- Martínez-Cayuela M. (1998). ***Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno.*** Ars. Pharmaceutica 39(1):5-18.
- Martínez-Flores S., González-Gallego J., Culebras J.M., Tuñón M.J. (2002). ***Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes.*** Nutr. Hosp. 17(6):271-278.
- Migliore L., Coppedè F. (2009). ***Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging.*** Mutation Research 674:73-84.
- Nordberg J., Arnér E. (2001). ***Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system.*** Free Radical Biol. Med. 31:1287-1312.
- **Organización Mundial de la Salud** (2011). Recuperado en Noviembre de 2011 de http://www.who.int/whosis/whostat/ES_WHS2011_Full.pdf.
- Pérez R., Vargas R., García L., Dávila B. (2002). ***Efecto de isoflavonas aisladas de la corteza de Eysenhardtia polystachya sobre el crecimiento de cristales de oxalato y fosfato de calcio urinario.*** Boletín del Colegio Mexicano de Urología 17(3):167-174.
- Pérez R.M., Vargas R., Pérez G., Zavala M. (1998). ***Antiuroliithiatic activity of Eysenhardtia polystachya Aqueous extract on rats.*** Phytoterapy research 12:144-145.

- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). ***Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.*** Free Radic. Biol. Med. 26(9-10):1231-1237.
- Reiter R.J., Tan D.X., Burkhardt S. (2002) ***Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin.*** Mechanisms of Ageing and Development 123:1007–1017.
- Saito K., Jin D.H., Ogawa T., Muramoto K., Hatakemaya E., Yasuhara T., Nokihara K. (2003). ***Antioxidant properties of tripeptide libraries prepared by combinatorial chemistry.*** J. Agric. Food 51:3668-3674.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C. (2005). ***Dietary polyphenols and the prevention of diseases.*** Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45:287-306.
- **Secretaría de Salud** (2011). Recuperado en noviembre de 2011 de <http://www.sinais.salud.gob.mx/estadisticasportema.html>.
- Venéreo Gutierrez J. (2002). ***Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes.*** Revista Cubana Médica Militar 31(2):126-133.
- Wang S.Y., Zheng W. (2001). ***Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry.*** J. Agric. Food Chem. 49:4977-4982.
- Yan E.B., Unthank J.K., Castillo-Meléndez M., Miller S.L., Langford S.J., Walker D.W. (2005). ***Novel method for in vivo hydroxyl radical measurement by microdialysis in fetal sheep brain in utero.*** J. Appl. Physiol. 98:2304-2310.