

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION ORAL DE EXTRACTOS  
VEGETALES CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, SOBRE LOS  
NIVELES SANGUINEOS DE GLUTATION  
PEROXIDASA EN LA RATA**

**Ingrid María Ramírez Madrid**

**Química Bióloga**

**Guatemala, noviembre 2004**



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION ORAL DE EXTRACTOS VEGETALES  
CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, SOBRE LOS NIVELES SANGUINEOS DE  
GLUTATION PEROXIDASA EN LA RATA**

Informe de Tesis

Presentado por

**Ingrid María Ramírez Madrid**

Para optar al título de

Química Bióloga

**Guatemala, noviembre de 2004**

**JUNTA DIRECTIVA****FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

DECANO: M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán

SECRETARIA: Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona

VOCAL I: Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo

VOCAL II: Lic. Juan Francisco Pérez Sabino

VOCAL III: Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez

VOCAL IV: Br. Roberto José Garnica Marroquín

VOCAL V: Br. Rodrigo José Vargas Rosales

## ACTO QUE DEDICO

A Dios por todas las bendiciones que me ha dado y hacerme muy afortunada.

A mis padres Edgar René Ramírez Aguilar y Rebeca Lucrecia Madrid Andrade de Ramírez por su amor, enseñanzas y apoyo incondicional.

A mi esposo José Alejandro Morales Linares por su amor incondicional.

A mi bebé que esta por nacer.

A mi hermano Edgar René Ramírez Madrid por su amistad y compañía durante todos estos años.

A mis abuelitos Julio Ramírez García y María Isabel Aguilar de Ramírez, Rodolfo Madrid Salazar y Marina Andrade de Madrid por su cariño y enseñanzas.

A mis tíos, primos, suegros y familia política por su compañía a lo largo de mi vida.

A todos mis compañeros y amigos de promoción, en especial a Paola Calderón, Paola Bolaños, Analucía Barahona, Claudia Carranza, Ana Lucía Pineda, María Eugenia Castellanos, Rebeca Méndez y Leticia Tellez.

A mis padrinos de graduación.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Al laboratorio de Bioquímica, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Al Bioterio, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT.

Al Laboratorio FARMAYA.

A mi asesor Dr. Rubén Velásquez por su dirección y apoyo durante la realización de este trabajo, ya que sin su ayuda la realización del mismo no sería posible.

A mis revisoras Licda. Alba Marina Valdéz de García y Licda. Margarita Paz de Ramírez.

A el apoyo brindado por Lic. Armando Cáceres, Licda. Sully Ríos y Christian López.

A todas aquellas personas que de alguna forma hicieron posible la realización de esta investigación.

## INDICE

I.	Resumen _____	1
II.	Introducción _____	3
III.	Antecedentes _____	4
	A. Radicales libres _____	4
	1. Clasificación de radicales libres _____	4
	2. Formación de radicales libres _____	5
	3. Fuentes biológicas de radicales libres _____	6
	4. Daño celular ocasionado por radicales libres _____	7
	5. Efectos tóxicos de los radicales libres _____	8
	B. Antioxidantes _____	10
	1. Clasificación de antioxidantes _____	10
	2. Prevención de enfermedades degenerativas por antioxidantes exógenos _____	17
	C. Estrés oxidativo _____	18
	D. Estudios relacionados _____	20
	E. Solanáceas _____	23
	E. Aspectos de bioética _____	24
	F. Métodos _____	25
IV.	Justificación _____	29
V.	Objetivos _____	30
VI.	Hipótesis _____	31
VII.	Materiales y Métodos _____	32
	A. Universo y muestra _____	32
	B. Recursos _____	32
	C. Procedimientos _____	36
	D. Diseño experimental _____	41
VIII.	Resultados _____	43
X.	Discusión de Resultados _____	46
X.	Conclusiones _____	49

XI.	Recomendaciones	50
VII.	Referencias	51
VIII.	Anexos	57

## I. RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar el efecto de la administración de extractos vegetales con actividad antioxidante sobre los niveles sanguíneos de glutatión peroxidasa en ratas. También, se evaluó la utilidad de dicha determinación como un método para medir el efecto *in vivo* de la ingesta de sustancias antioxidantes. Para esto se midieron los niveles enzimáticos del glutatión peroxidasa en sangre de ratas que recibieron diariamente administración oral de extracto de *Solanum americanum*. Se emplearon 21 ratas albinas de la especie *Ratus norvegicus* divididas en tres grupos: el grupo de una dosis de 0.0312 g/Kg de peso, el grupo de una dosis de 0.312 g/Kg de peso y el grupo control.

Para preparar las dosis deseadas se procedió a obtener el extracto de quilete o *Solanum americanum*, a partir de hierba fresca, se efectuó la extracción con etanol y posteriormente se sometió a concentración en un rotavapor. El extracto mostró un IC<sub>50</sub> de 1.01 mg de extracto, 41.34 Eq de ácido gálico/gramo de extracto y 11.74 µg vitamina C/gramo de extracto. Las dosis se prepararon según el peso de cada rata en solución acuosa con un porcentaje de 2.5-5% de Tween 80; dicha dosis se administró oralmente a cada rata diariamente por 21 días.

Para realizar la medición de glutatión peroxidasa se obtuvo una muestra de sangre de cada rata, realizando determinaciones los días 0, 7, 14 y 21 con el fin de observar los cambios en el transcurso del tiempo. La medición de la enzima glutatión peroxidasa se hizo con un juego de reactivos de Rancel ® por un método espectrofotométrico y los resultados obtenidos se expresan en unidades de glutatión peroxidasa/litro de sangre.

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento dado a los dos grupos experimentales fue efectivo, ya que los valores de glutatión peroxidasa disminuyeron significativamente ( $p = 0.0124$ ) desde el día 14 para ambos tratamientos. Se encontró significativa diferencia en los valores entre los dos tratamientos hasta el día 21 ( $p = 0.0060$ ). Dicha disminución en el organismo de las ratas puede interpretarse como el aumento de la protección de las sustancias antioxidantes de fuente exógena, lo que hace de alguna forma innecesaria la expresión de los sistemas endógenos. Se puede concluir que el método empleado

en este trabajo sí puede ser utilizado como un método para evaluar el efecto *in vivo* de sustancias antioxidantes ingeridas.

## II. INTRODUCCION

El organismo humano y el de los mamíferos, bajo condiciones normales producen sustancias químicamente inestables, llamadas radicales libres. Estos pueden producir daño oxidativo en diversas macromoléculas biológicas, como lípidos, carbohidratos, proteínas e incluso ADN, lo que puede propiciar el inicio de enfermedades degenerativas como cáncer, cardiopatías y cataratas, entre otras (1, 2).

Los antioxidantes son moléculas o sistemas que inhiben la acción de radicales libres (3), pueden ser endógenos o propios del organismo humano y exógenos o provenientes de fuentes alimenticias. Los antioxidantes endógenos se incrementan como respuesta defensiva de organismo contra los radicales libres, dentro de estos se encuentran las enzimas glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa, cuya función principal es causar la reducción del peróxido o lipoperóxido a nivel celular gracias a la localización generalizada de las mismas. En el grupo de los antioxidantes exógenos se encuentra una serie de fotoquímicos y las vitaminas E, C, beta-caroteno, flavonoides y licopeno; los cuales se pueden obtener mediante el consumo habitual de hierbas, frutas y verduras. Los antioxidantes exógenos reaccionan con los radicales libres y modifican su estructura neutralizándolos, por lo que actualmente se recomienda una dieta alta en alimentos antioxidantes para prevenir enfermedades degenerativas como aterosclerosis, isquemia cardiaca, cataratas y ciertos procesos neoplásicos.

El estrés oxidativo es un aumento en la producción de radicales libres y como respuesta a éste se generan antioxidantes endógenos. Sin embargo puede ser que al consumir suficientes antioxidantes exógenos, el organismo no tenga la necesidad de producir la misma cantidad de antioxidantes endógenos al estar sometido a estrés oxidativo. Con base en lo anterior, el objetivo principal de este estudio fue determinar el efecto de la administración de extractos vegetales con actividad antioxidante sobre los niveles sanguíneos de glutatión peroxidasa. Los resultados de esta investigación evaluaron la utilidad de la medición sanguínea de glutatión peroxidasa como modelo animal para evaluar el efecto *in vivo* de la ingestión de antioxidantes.

### III. ANTECEDENTES

#### A. RADICALES LIBRES

Un radical libre es una molécula que posee uno o más electrones no apareados girando en sus órbitas externas, generando inestabilidad. Estos buscan equilibrio y para conseguirlo toman un electrón de cualquier molécula vecina; es decir que oxida la molécula alterando su estructura y convirtiéndola en otro radical libre por medio de una reacción de oxidación, generando de esta forma una reacción en cadena. Por lo anterior el proceso de oxidación se define químicamente como la pérdida de electrones mientras que en la reducción hay ganancia de ellos (4, 5, 6).

##### 1. Clasificación de radicales libres

###### a) **Radicales libres inorgánicos o primarios:**

Se originan por la transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados de reducción de este y se caracterizan por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido, el radical hidroxilo y el óxido nítrico (7).

###### b) **Radicales libres orgánicos o secundarios:**

Se generan por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de dos radicales primarios entre sí, tienen una vida media más prolongada que los primarios (7).

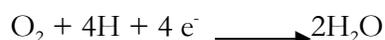
###### c) **Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno:**

Se incluye el grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadas de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito, e hidroperóxidos orgánicos (7).

## 2. Formación de Radicales libres

Los radicales libres se producen continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula. Se ha calculado que de un 2-5% del O<sub>2</sub> consumido en el metabolismo normal se transforma en radicales libres. Al elevarse o disminuir las concentraciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno (EROS), pueden ocasionar importantes alteraciones funcionales. Otros radicales libres pueden provenir de contaminantes tóxicos, como el dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), el monóxido de nitrógeno (NO), capaces de reaccionar con el peróxido de hidrógeno formando radicales libres hidroxilos (-OH) (8, 9).

El oxígeno tiene un rol vital en la respiración como receptor terminal de electrones, pues se reduce a agua al aceptar cuatro electrones, por acción del complejo citocromo-oxidasa de la cadena mitocondrial siguiendo la siguiente reacción (8, 9, 10, 11):



Pero una pequeña proporción forma radicales libres al aceptar un menor número de electrones, dando lugar a diversas formas de oxígeno activo (8, 12):

- Anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>):

Se forma a partir de la captación de un electrón (e<sup>-</sup>) por una molécula de oxígeno.



- Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):

Se forma cuando el radical libre superóxido capta dos protones.



- Radical hidroperóxido (HO<sub>2</sub>):

Se constituyen cuando el O<sub>2</sub> se une a un protón (H<sup>+</sup>).



- Radical hidroxílico (OH<sup>-</sup>):

Aparece cuando el peróxido de hidrógeno se une al superóxido.



Por otra parte, el peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede reaccionar con metales divalentes (8 o unidos a proteínas) y producir  $\text{OH}^-$ , vía reacción de Fenton (13):



La formación de radical  $\text{O}_2^-$  también puede ocurrir a nivel de la NADPH-oxidasa según la siguiente reacción (13):



### 3. Fuentes biológicas de radicales libres

#### a) **Mitocondria:**

Es la principal fuente de radicales libres, este fenómeno se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, que es la última etapa de producción de protones de alta energía, y cuyo pasaje a través de la membrana mitocondrial genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar el ATP o adenosín trifosfato (8).

#### b) **Peroxisomas:**

Son organelos del citosol muy ricos en oxidasas y que generan  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual es depurado por enzimas específicas (catalasas) y transformado en agua (8).

#### c) **Leucocitos polimorfonucleares:**

Cuando son activados por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos, los leucocitos poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa generadora de  $\text{O}_2^-$  que en presencia de hierro se transforma en  $\text{OH}^-$ , que es altamente tóxico (8, 9).

**d) Xantina deshidrogenasa:**

Predomina en los endotelios, normalmente depura las xantinas (isquemia, estimulación del calcio). Es muy importante en las células endoteliales, miocardio y otros tejidos (8).

**e) Retículo endoplasmático:**

Los citocromos sufren reacciones de autooxidación con formación de radicales libres  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  (8).

**f) Membrana plasmática:**

Por acción de la lipooxigenasa y la prostaglandina sintetasa dentro de las reacciones inflamatorias mediadas por el ácido araquidónico (9, 12, 14).

**4. Daño celular ocasionado por radicales libres**

El daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas:

**a) Lípidos:**

Es en ellos donde se produce un daño mayor por parte de los radicales libres, ya que afecta las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, alterando la permeabilidad celular, produciendo edema y muerte celular. La peroxidación lipídica representa una forma de daño histórico que puede desencadenarse por el oxígeno, el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo que es el más dañino. Los ácidos grasos son componentes de las membranas celulares, de allí su importancia para un funcionamiento normal como la regeneración y reproducción celular. Una vez que se inicia este proceso toma forma de cascada, con producción de radicales libres que lleva a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos, a partir de los ácidos insaturados; una vez formados, estos radicales libres son los responsables de los efectos citotóxicos (7, 10, 15, 16, 17, 18).

**b) Proteínas:**

Hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y formación de grupos carbonilos. En la membrana celular, por la acción de los radicales libres, se producen enlaces cruzados lípido- lípido, proteína-proteína y lípido-proteína. Los lípidos peroxidados son compuestos más polares y difícilmente estables en el interior hidrofóbico de la membrana. Por ello, la peroxidación de los lípidos disminuye la fluidez de la membrana, aumenta la permeabilidad inespecífica a los iones e inactiva las enzimas ligadas a la membrana. Como resultado final ocurre pérdida de la estructura en bicapa de la membrana, aumenta la permeabilidad y se puede producir la lisis celular (7, 10, 18).

**c) Acido desoxirribonucleico (ADN):**

Ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes. Este mecanismo directo de carcinogénesis se complementa con la capacidad de los radicales libres de activar sustancias procancerígenas, mutagénicas y promotoras como los hidroperóxidos de los ácidos grasos, los hidroperóxidos del colesterol, los endoperóxidos, los epóxidos del colesterol y de los ácidos grasos, los enoles y otros aldehídos, así como radicales alcoxi e hidroperoxi (7, 9, 10).

**5. Efectos tóxicos de los radicales libres**

La peroxidación lipídica origina una disfunción neuronal en la homeostasia iónica, incrementa la vulnerabilidad de la célula a la excitotoxicidad y puede promover cascadas de excitotoxicidad por desorganización de los sistemas de regulación en el retículo endoplasmático y en las mitocondrias, con lo cual compromete la importante función de secuestro del calcio iónico, promoviendo la muerte celular. Este proceso puede ocurrir en diferentes estados degenerativos agudos como la isquemia cerebral y el daño cerebral

traumático, así como en procesos degenerativos crónicos como la enfermedad de Alzheimer y la de Parkinson; en menor medida se observa durante la actividad fisiológica normal en circuitos neuronales (15).

El daño a biomoléculas que determinan los radicales libres se halla implicado en la génesis de numerosos procesos:

- Aparato cardiovascular:

Ocurre peroxidación de lípidos en las partículas de lipoproteínas de baja densidad con daño de otros componentes. Puede ocasionar aterosclerosis, infarto al miocardio, cirugía cardíaca, diabetes, cardiopatía alcohólica (4, 6).

- Sistema neurológico:

Enfermedad de Parkinson, Alzheimer, neuropatía alcohólica, hiperoxia, isquemia o infarto cerebral, traumatismos craneales (6).

- Aparato Ocular:

Hay modificaciones irreversibles en las proteínas originando cataratas, daño de la retina, fibroplasia retrolental (4).

- Envejecimiento:

Peroxidación de los ácidos grasos de la membrana celular y daño del ADN. Los radicales libres toman un electrón de las células de colágeno de la piel por lo que esta pierde su elasticidad y aparecen arrugas y resequedad (4).

- Cáncer:

El ADN es dañado. Puede ocurrir un crecimiento anormal de las células al perder su capacidad de reconocimiento hacia las células vecinas causando así una proliferación descontrolada (4).

## **B. ANTIOXIDANTES**

Los antioxidantes son compuestos que retrasan la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de la propagación de la reacción de oxidación. El antioxidante al reaccionar con el radical libre cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico. Cuando la vitamina E reacciona con los radicales libres, por ejemplo, los vuelve más inofensivos, y convirtiéndose la vitamina E en un radical libre, que reacciona a la vez con carotenos, produciendo otro radical más débil que reacciona con la vitamina C que lo neutraliza y lo hace hidrosoluble, es eliminando por la orina (15, 19, 20).

Los antioxidantes naturales pueden tener una o más de las siguientes propiedades: secuestro de radicales libres, actuar como agentes reductores, formar complejos potenciales de metales prooxidantes y erradicar singletes de oxígeno. Estas propiedades redundan en su capacidad anticancerígena, antiviral, antiinflamatoria, modificadora de la permeabilidad capilar e inhibidora de la agregación plaquetaria (17, 21).

### **1. Clasificación de Antioxidantes**

Los antioxidantes se pueden clasificar siguiendo criterios distintos:

- Según el sitio de donde provienen: endógenos o propios del organismo y exógenos o provenientes de fuentes alimenticias.
- Según su mecanismo de acción en: primarios, secundarios y terciarios.

#### **a) Clasificación de antioxidantes según el sitio de proveniencia**

##### **i. Endógenos:**

Son los sistemas antioxidantes que se producen dentro del organismo para combatir la acción de los radicales libres. Existen dos tipos, el más importante que está conformado por las enzimas y está dado por compuestos antioxidantes que actúan tanto a nivel celular como extracelular. Son los responsables de la capacidad antioxidante de los fluidos biológicos, como

el plasma, y de la protección del daño oxidativo de las distintas partículas y macromoléculas circulantes. Dentro de estos se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPX) y proteínas de unión a metales (GR). En el segundo grupo se encuentran los antioxidantes secundarios no enzimáticos como lo son el glutatión, la coenzima Q y el ácido tiocico (6, 22).

### ***Endógenos enzimáticos:***

- Superóxido dismutasa:

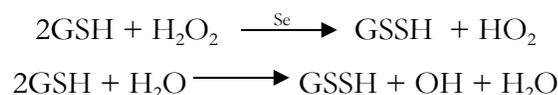
Actúa neutralizando los radicales superóxido convirtiéndolos en peróxido de hidrógeno en concentraciones en orden inferiores a 10 siempre en presencia de Zinc ( $Zn^{+}$ ).



Su distribución es amplia en el organismo, está formada por un grupo de enzimas metaloides: Cu-SOD y Zn-SOD que contienen cobre y zinc en su sitio activo y se encuentran en el citosol y en el espacio intermembranoso mitocondrial y Mn-SOD que contiene manganeso y se localiza en la matriz mitocondrial. Estas enzimas transforman el oxígeno para formar peróxido de hidrógeno y su función principal es la protección contra el anión superóxido (6, 7, 12).

- Glutatión peroxidasa:

Su actividad está estrechamente ligada a la presencia de Selenio (Se). Esta enzima actúa principalmente en las mitocondrias y cloroplastos catalizando dos tipos de reacciones:



La primera reacción presenta la reducción del agua oxigenada a radical hidroperóxido en presencia de glutatión reducido, y la segunda reacción muestra la reducción del hidroperóxido a compuestos más estables en presencia de glutatión. Dentro de sus funciones la más importante es proteger a la célula contra la acción de los radicales libres de peróxido de hidrógeno; además protege a los lípidos de la

membrana celular de la peroxidación. Cuando los organismos son expuestos a fármacos, radiaciones, sustancias oxido-reductoras, estará disminuida la síntesis de glutatión, llegando a ser insuficientes sus concentraciones y reduciéndose las posibilidades defensivas de la célula frente a radicales libre. (7, 12).

- Catalasas:

Reducen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular, eliminando el peróxido de hidrógeno casi al mismo tiempo de su formación.



Tiene una amplia distribución en el organismo humano, alta concentración en hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo y epitelios, prácticamente nula en tejido nervioso y se localiza a nivel celular: mitocondrias, peroxisomas y citosol. En el citosol es dependiente de cobre y zinc, y en la mitocondria dependiente de manganeso. Presenta dos funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa y forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (7, 12, 23).

- Proteínas de unión a metales (GR):

Frenan la disponibilidad del hierro que es necesario para la formación del radical hidroxilo. En el plasma sanguíneo se encuentran proteínas como la transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, albúmina y bilirrubina (4, 6)

### ***Endógenos no enzimáticos:***

- Glutatión:

Es producida por el hígado a partir de aminoácidos (cisterna, ácido glutamínico y glicina), protege a las células y tejidos arteriales, es de vital importancia ya que solo o unido a enzimas o minerales forma complejos antioxidantes. Posee habilidad destoxicante de metales pesados y drogas y previene el cáncer del hígado (24).

- **Coenzima Q:**

Es indispensable para la vida pues participa en la producción de adenosín trifosfato y el transporte de protones y electrones en la mitocondria. En su forma reducida  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  es un potente antioxidante evitando la lipoperoxidación de la membrana, reduce la vitamina E oxidada en su medio lipídico, anticipándose a la acción de la vitamina C o glutatión reducido, que requiere un medio hidrófilo (14).

- **Acido tióctico**

Este ácido asegura el buen funcionamiento de las enzimas antioxidantes y potencia la acción de la vitamina E, vitamina C y glutatión (24).

## ii. **Exógenos**

Son los antioxidantes obtenidos mediante la dieta, los cuales se pueden obtener de frutas y vegetales principalmente. Dentro de éstos antioxidantes se puede mencionar a la Vitamina C, Vitamina E, betacarotenos, fenoles, flavonoides y taninos, entre otros. Los efectos principales de las vitaminas antioxidantes son como secuestradores de radicales libres. Se clasifica en los siguientes grupos:

### ***Hidrosolubles***

- **Vitamina C:**

Es un agente oxidante y poderoso, su principal acción la ejecuta en los compartimientos acuosos celulares. Se puede obtener de frutas cítricas como la naranja, mandarina, pomelo, frutilla, melón, kiwi y vegetales como el tomate, brócoli, pimientos, espinaca, berro. La vitamina C puede degradarse por acción del calor, contacto con el oxígeno, tiempo de cocción y almacenamiento. Sus principales acciones son:

- Protege a los lípidos plasmáticos de la oxidación.
- Regenera los radicales oxidados de la Vitamina E cediéndoles un electrón para devolverlas en su forma reducida y antioxidante.

- Es el mayor captador de elementos oxidantes en la fase acuosa del organismo, antes de que estos dañen los electos lipídicos.
- Neutraliza el oxígeno singlete.
- Captura radicales hidroxilos y anión hiperóxido(1, 6, 7, 9, 12, 14, 15, 18).

### *Liposolubles*

- Vitamina E:

Esta vitamina actúa a nivel de la estabilidad e integridad de las membranas biológicas, protegiendo sus lípidos insaturados contra las agresiones de los radicales libres en los nervios, músculos, sistema circulatorio e inmunológico. Puede encontrarse en aceites vegetales, margarina, germen de trigo, frutas secas y vegetales de hojas verdes. La asimilación depende de la cantidad de la grasa de la comida ingerida y del adecuado funcionamiento pancreático y biliar; asimismo su absorción es facilitada por el selenio. Sus acciones principales son:

- Disminuye riesgos en formación de placas ateromatosas.
- Inhibe peroxidación lipídica inducida por ejercicio.
- Neutraliza el oxígeno singlete.
- Principal defensa contra el daño oxidativo de la membrana en tejidos.
- Captura radicales hidroxilos y anión superóxido
- Neutraliza peróxidos (1, 9, 12, 15, 23).

- $\beta$ -caroteno:

Es un precursor de la vitamina A que se encuentra solamente en alimentos de origen vegetal. Los  $\beta$ -carotenos tiene efectos protectores de las células, neutralizando los radicales libres y el oxígeno reactivo y aumentando la resistencia inmunológica. Las fuentes de  $\beta$ -caroteno son las hortalizas de hojas verdes, zanahoria, frutas como el durazno, damasco, melón, pomelo y mango. El  $\beta$ -caroteno es lábil a la luz. Sus funciones principales son:

- Protege a neutrófilos de los radicales libres producidos en reacciones inflamatorias sin alterar la capacidad destructora de bacterias de estos.

- Neutraliza el oxígeno singlete.
- Destoxicante del oxígeno libre reactivo (1, 12, 15, 19, 25).

### ***Oligoelementos:***

Los más destacados en su participación como antioxidante exógenos son el Selenio, Cobre, Zinc y Manganese. Su actividad reside en participar en la acción de enzimas antioxidantes (14, 15, 19).

- Selenio:

Su misión es proteger las células contra la acumulación de radicales superóxido, que lesionan la membrana celular, neutralizando compuestos de acción mutagénica o carcinogénica. Es vital para la acción de la enzima glutatión peroxidasa (12).

- Cobre:

Es un componente de la superóxido dismutasa. (12).

- Hierro:

Es parte fundamental de las proteínas transportadoras de oxígeno, participa en la síntesis de enzimas y favorece el transporte de electrones en la cadena respiratoria (12).

- Zinc:

Forma parte de la enzima superóxido dismutasa, realizando su acción antioxidante al proteger los grupos sulfhidrilos de su oxidación. Aumenta la supervivencia de la célula a radiaciones UV (12).

### ***Fenoles:***

Los compuestos fenólicos tienen la fórmula general AR-OH, donde AR es un anillo aromático y el -OH está directamente unido a este anillo. Los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes naturales, esta actividad puede variar significativamente dependiendo de ciertas variables como su concentración, la estructura química de la molécula y su grado de oxidación. En cuanto a la concentración

se ha encontrado que aún con cantidades pequeñas de antioxidantes, algunos antioxidantes fenólicos entran a la circulación sistémica y causan un aumento significativo en el estado antioxidante del plasma (11, 12, 16).

Estudios *in vitro*, han mostrado que muchos polifenoles naturales poseen capacidad de quelar metales, especialmente cobre y hierro, lo cual los hace actuar indirectamente como antioxidantes ya que inhiben la acción de los metales como catalizadores en la formación de radicales libres (17).

A pesar de la diversidad estructural, los fenoles se clasifican en dos grupos:

- Flavonoides:

Son sustancias polifenólicas de bajo peso molecular y se encuentran en una gran variedad de frutas y vegetales. Actúan como estabilizadores de la membrana. Incluyen la mirecítina, quercetina, kampferol, isorhamnetina (que existe tanto como conjugados azucarados como no azucarados), catequina y epicatequina y las antocianinas. Los flavonoides poseen la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica, secuestrar radicales libres y oxígeno activo, quelar iones de hierro e inactivar lipoxigenasas (10, 26).

- No Flavonoides:

Encontramos los ácidos fenólicos (benzoico y cinámico), que parecen ejercer un efecto sobre el aroma más que sobre el gusto, y los estilbenos (resveratrol) que juegan un rol en la defensa contra el ataque de patógenos actuando como fungicida. Incluyen ácido gálico, hidroxicinamatos, ácido caféico y ácido caftárico, stilbenos, (trans y cis resveratrol) y trans resveratrol- O-  $\beta$ - glucósido (16, 19, 20) .

a) **Clasificación de los antioxidantes según su mecanismo de acción:**

Se conocen tres tipos principales de mecanismos antioxidantes:

- i. **Primarios:** Previenen la formación de nuevos radicales libres, convirtiéndolos en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas (1, 8).

Dentro de estos se encuentran: enzima superóxido dismutasa, enzima glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (remueve el peróxido de hidrógeno), glutatión reductasa (cataliza la reducción del glutatión oxidado a glutatión reducido el cual será utilizado por la glutatión peroxidasa para la reducción del peróxido y de lipoperóxidos, los cuales son especies reactivas del oxígeno) y glutatión S transferasa: importante enzima detoxificadora de agentes nocivos (27 ,28).

- ii. **Secundarios:** Capturan los radicales libres, evitando la reacción en cadena (Ej: vitamina E o alfa-tocoferol, vitamina C o ácido ascórbico, beta-caroteno, ácido úrico, bilirrubina, albúmina, ubiquinol-10, metionina) (15).

- iii. **Terciarios:** Reparar las biomoléculas dañadas por los radicales libres (Ej: enzimas reparadoras de ADN y metionina sulfóxido reductasa) (15, 17).

2. **Prevención de enfermedades degenerativas por antioxidantes exógenos**

En países desarrollados se ha demostrado que patologías crónicas como aterosclerosis y cáncer son las dos principales causas de muerte, y están asociadas a daño oxidativo. Lo mismo ocurre con las complicaciones de otras condiciones patológicas como artritis, diabetes, neuropatías, demencias, y el proceso biológico del envejecimiento, que se aceleran en función de la magnitud del estrés oxidativo. La evidencia epidemiológica sugiere que el consumo de frutas y verduras puede reducir el riesgo de cáncer, enfermedad cardiovascular, reforzamiento del sistema inmune, detoxificación, reducción de la inflamación y tumores llevando a la

hipótesis que esto se debe en parte a la presencia de compuestos antioxidantes en frutas y verduras (11, 29, 30-33).

Dentro de los antioxidantes que se encuentran más comúnmente en frutas y verduras cuya función es neutralizar la acción oxidante de un radical libre sin perder su propia estabilidad electroquímica, se puede mencionar la vitamina C,  $\beta$ -carotenos, vitamina E, flavonoides, entre otros (8, 11, 22, 34).

### **C. ESTRÉS OXIDATIVO**

El estrés oxidativo es la exposición de la materia viva a fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre radicales y los mecanismos antioxidantes, ya sea un déficit de defensas antioxidantes o por un incremento exagerado de radicales libres. (1, 7, 12, 35).

Durante el transcurso de los años los radicales libres provocan en un organismo daños irreversibles dentro de los cuales se puede mencionar la disminución en el número de mitocondrias, alteraciones en la permeabilidad celular y anomalías en la respiración celular. Estos efectos pueden ser provocados por el estrés oxidativo y este a su vez puede ocasionar enfermedades degenerativas. La producción excesiva de radicales libres puede ser causada por factores internos o externos; dentro de los internos se pueden mencionar la actividad de células fagocíticas, cadenas transportadoras de electrones en mitocondrias y microsoma, y acción de enzimas antioxidantes; y respecto de los segundos, los rayos ultravioletas, radiaciones ionizantes, polución ambiental, óxidos de nitrógeno, hierro, ácidos grasos polinsaturados, medicamentos, tabaco, alcohol, drogas, pesticidas (7, 12). Ver Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de los factores que incrementan el estrés oxidativo (15).

Químicos	Aumento de metales pesados.
Xenobióticos	Componentes del humo del tabaco.
Fármacos	Adriamicina.
Físicos	Radiaciones ultravioleta e hiperoxia.
Orgánicos y Metabólicos	Dieta hipercalórica, dieta con poco contenido de antioxidantes, diabetes mellitus, ejercicio extenuante, procesos inflamatorios y traumatismos y fenómeno de isquemia-reperusión.

En algunas patologías se cree que el estrés oxidativo tiene una contribución significativa en su desarrollo, como en la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, artritis reumatoide y el fenómeno llamado “paradoja del oxígeno” que se representa posterior a un fenómeno de isquemia, durante la repercusión, cuando el aporte del oxígeno no disminuye el daño sino que lo incrementa participando en reacciones de oxidación de proteínas y lipoperoxidación (Oxi). Sin embargo, no existen pruebas directas de que el estrés oxidativo sea el responsable de la muerte de las células cerebrales en la enfermedad de Parkinson, pero si existen distintos hallazgos en humanos y animales apoyan esta hipótesis:

- ✓ Disminuyen: glutatión reducido en la sustancia negra, glutatión peroxidasa y ácidos grasos poliinsaturados en la sustancia negra.
- ✓ Aumentan: hierro en la sustancia negra, actividad de la superóxido dismutasa y productos derivados de la peroxidación lipídica (36).

Se ha demostrado que a pacientes con infarto agudo al miocardio a los que se les suministra selenio como tratamiento adicional muestran un incremento en la actividad de la glutatión peroxidasa y las complicaciones durante los primeros tres días son menos frecuentes. En estudios realizados en placas ateroscleróticas carotídeas y en arterias mamarias de pacientes bajo cirugía de bypass arterio coronario se midieron las actividades de la glutatión peroxidasa dependiente de selenio, encontrándose un pico de antioxidante enzimático relacionado con la glutatión peroxidasa presente en las lesiones ateroscleróticas humanas; lo cual sugiere que un desbalance antioxidante-radical libre en la pared vascular puede involucrarse en el proceso aterogénico (6). Ver cuadro 2.

Cuadro 2. Niveles de glutatión peroxidasa en diversas patologías (27).

Patología	Nivel de glutatión peroxidasa
Diabetes mellitas	Disminuye en islotes de Langerhans y páncreas
Obesidad	Disminuye en el corazón
Úlcera péptica	Disminuye en el tejido hepático y mucosa gástrica
Isquemia/repercusión	Aumenta en pared vascular
Ejercicio y envejecimiento	Aumenta en hígado y mitocondriales del corazón

Es evidente que en este proceso la alimentación constituye un factor exógeno importante que puede acelerar o desacelerar procesos degenerativos como cáncer, cataratas, tumores, entre otros. La dieta debe proveer suficiente cantidad de sustancias antioxidantes naturales y además, el propio individuo preocuparse por asegurar una ingesta adicional en situaciones que por condiciones especiales así lo ameriten: ejercicio físico, estado nutricional, estado fisiológico, estados patológicos, condición ambiental, estilo de vida (10).

#### **D. ESTUDIOS RELACIONADOS**

En un estudio realizado por Urquiaga y col. se evaluó la capacidad antioxidante del plasma (medida por cromatografía como oxidación LDL y oxidación LDL mediada por cobre), medida, polifenoles plasmáticos, daño oxidativo al ADN (ácido desoxirribonucleico) y función endotelial a los 0, 30, 60 y 90 días. Se demostró que una dieta con elevada cantidad de antioxidantes aumenta los antioxidantes plasmáticos, al igual que la ingestión de vino. Los resultados indican que la dieta con baja cantidad de antioxidantes induce daño en el ADN, mientras que una dieta con alta cantidad de antioxidantes protege el ADN. Con ambas dietas, el consumo de vino lleva a niveles de daño oxidativo al ADN muy bajos (22).

Otras investigaciones han sugerido que las ratas mejora su nivel de capacidad cerebral al recibir una dieta con elevada cantidad de antioxidantes, ya que se comprobó tal hecho al comparar tres tipos de alimentos en el metabolismo de las ratas: un grupo recibió una dieta enriquecida con espirulina (alto en antioxidante), otro grupo recibió manzanas (moderado en actividades antioxidantes), y uno tercero recibió pepinillos, que es bajo en antioxidantes.

Posteriormente se pudo observar que las ratas que recibieron como alimento manzanas y espirulina mostraron una mejoría en la respuesta neuronal de su metabolismo, pues se encontró que la sustancia inflamatoria acumulada con la edad en el cerebro había desaparecido (37).

Montenegro y colaboradores realizaron un estudio en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 controlados (glicemia  $\leq 120$  mg/dl) y no controlados (glicemia  $\geq 120$  mg/dl). Se les determinó glucosa, lípidos séricos, malondialdehído, óxido nítrico, glutatión reducido y vitamina C. Los niveles de triacilglicéridos y la relación colesterol total /HDL, vitamina C oxidada y glutatión (que es el principal mecanismo de defensa antioxidante) son menores en los pacientes diabéticos no controlados; lo que demuestra que los sistemas antioxidantes se encuentran dañados. El control de la glicemia basal se relacionó con los niveles altos de óxido nítrico que es un mecanismo antioxidante. Por lo que se puede concluir que la determinación de los indicadores oxidación/antioxidación permite evaluar el estado de las defensas antioxidantes en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 (38).

En un estudio de Sala y col. se propuso valorar el estrés oxidativo, en forma indirecta mediante la determinación del valor de antioxidantes totales (TAS), glutatión peroxidasa (GPX) y superóxido dismutasa (SOD) en suero de pacientes con accidentes vasculares encefálicos (AVE) isquémicos. Además, se evaluó el papel de determinados factores de riesgo como hipertensión arterial y diabetes. Se observó una tendencia de valores más bajos de GPX en los enfermos. La presencia concomitante de hipertensión arterial y diabetes asociadas se correlacionó con niveles significativamente menores de SOD. Los pacientes que cursaban además procesos infecciosos, presentaron valores de TAS más bajos que el resto. Se concluye que los radicales libres del oxígeno podrían estar involucrados en la fisiopatogenia del AVE isquémico mediante las modificaciones producidas por los factores de riesgo como hipertensión arterial y diabetes (39).

En un estudio realizado por Aviño y colaboradores se buscó establecer la existencia de estrés oxidativo en el nervio óptico después de la administración crónica de etanol en ratas adultas, en comparación con ratas alimentadas con dieta isocalórica libre de etanol. Luego de

seis semanas, se extrajeron los nervios ópticos y se determinaron parámetros relevantes en la modulación del estrés oxidativo: glutatión (GSH) y malondialdehído (MDA), que es el principal derivado de la peroxidación lipídica. El contenido de GSH en el nervio óptico fue significativamente menor en el grupo alimentado con etanol, mientras que la concentración de MDA fue significativamente mayor en este grupo comparado con el grupo control. El incremento de los productos de peroxidación lipídica junto con el descenso de los antioxidantes celulares, confirman en este modelo experimental la implicación del estrés oxidativo en la toxicidad del etanol en el nervio óptico de rata, y descartan la influencia del estado nutricional sobre los parámetros estudiados (40).

En el año 2002 García F y col evaluaron la influencia del daño oxidativo efectuado por radicales libres en la infección amigdalal, el estudio se efectuó en amígdala y sangre. Como indicadores del estrés oxidativo se determinaron los niveles de superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GRT) y estado de antioxidación total (EAT) en el tejido amigdalal; también se midió la concentración de SOD en el tejido adenoideo y exudado ótico. Se observaron fuertes correlaciones entre la SOD eritrocitaria y amigdalal, SOD y GPX amigdalal, SOD y EAT amigdalal y GPX y EAT amigdalal. Las concentraciones de la SOD en el tejido adenoideo y el exudado ótico no influyeron en los niveles en sangre. Podemos concluir que el daño oxidativo en las amígdalas viene determinado por la frecuencia o gravedad de las infecciones locales, y es valorable mediante la concentración de SOD en el tejido amigdalal o en la sangre periférica, pudiendo considerarse un buen marcador de sufrimiento amigdalal (41).

Miratello y col investigaron la relación entre el estado redox y la hemodiálisis (HD), evaluando los siguientes parámetros antioxidantes en pacientes tratados con enalapril: medición de enzimas antioxidantes en eritrocitos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa), determinación de antioxidantes liposolubles (alfa-tocoferol, beta-caroteno, y ubiquinol-10-total), determinación de glutatión total eritrocitario y de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Se concluyó que en los pacientes en HD crónica existen profundas alteraciones de las defensas antioxidantes circulantes; y que un estrés oxidativo adicional se produce durante la sesión de HD. Por otra parte, el tratamiento con enalapril mejora varios componentes de las defensas antioxidantes en este grupo de pacientes (42).

### E. *Solanum americanum*

*Solanum americanum* conocido también en Guatemala como hierba mora o quilete; pertenece a la familia de las Solanáceae. Es una hierba anual o perenne, con raíz típica, tallo erguido de hasta 40 cm. Posee hojas laminares, aovadas, pecioladas y alternas, que son comestibles. Sus flores se encuentran en racimos axilares o terminales, son pentámeras y de color violeta. El fruto es una baya y se consume como condimento. No es una planta tóxica. Es nativa de suelos pedregosos y se desarrolla en cualquier época del año. Su aprovechamiento generalmente es doméstico (43).

Posee un alto contenido nutricional y en nuestro medio tiene se emplea tradicionalmente como alimento. Dentro de sus utilidades medicinales se encuentran: tratamiento de la erisipela, neuralgias, combatir el reumatismo, las hojas maceradas en agua se emplean en las fiebres tifoideas y tifus exantemático; el jugo de los frutos se usa como sedante a las hemorroides externas y el cocimiento para la tos convulsiva. Estudios realizados en Guatemala por Coto I. y Caballeros K. se establecieron que esta hierba posee carotenos y que es una fuente potente de antioxidantes (44, 45).

*Solanum americanum* contiene solaninas que glucoalcaloides tóxicos de acción parecida a la de los alcaloides tropánicos (como la anticolinérgica). Sin embargo, esta toxicidad solamente se ha reportado en niños que comen sus frutos causando una gastroenteritis, la cual se trata mediante la inducción del vómito. La toxicidad de esta hierba es muy utilizada para el tratamiento de hongos en el caso de una vaginitis e infecciones fúngicas superficiales en la piel (43).

## **F. ASPECTOS DE BIOETICA**

La palabra bioética proviene de Bios que significa vida y de ethike que quiere decir moral o conciencia. Según la Organización Panamericana de la Salud bioética es un estudio sistemático en el campo de las ciencias biológicas y la atención de la salud, en la medida que esta conducta se examine a la luz de valores y principios morales. Sin embargo, la bioética no solo abarca la ética médica sino también profesiones afines, investigaciones biomédicas, cuestiones sociales (salud pública, ocupacional, control de la natalidad), investigación animal y ecológica (46).

Las ciencias médicas y profesiones afines deben trabajar con moral y ética, cuando se trabaje con humanos o animales, ya que ambos son seres vivientes que sienten. Al trabajar con animales de cualquier especie para cualquier tipo de investigación se debe tratar que los animales sufran lo menos posible, ya que se debe respetar la ley natural de la vida de cada especie. La bioética es un tema muy polémico, sin embargo antes de tratar con cualquier ser viviente se debe hacer conciencia de sus derechos como tal, siguiendo un proceso adecuado para realizar cualquier tipo de investigación (47).

Dentro de este trabajo el tema de bioética es muy importante ya que se va a trabajar con ratas que son animales de experimentación, por lo que al utilizar los modelos biológicos descritos anteriormente se debe tratar de que el sufrimiento sea el menor posible dentro de las posibilidades del estudio. En este caso los puntos críticos son la administración oral y la extracción sanguínea, por lo que para realizar ambos procedimientos el sujeto que los utilice debe informarse acerca de éstos y luego practicarlos con algún experto que lo supervise y tomando en cuenta las recomendaciones pertinentes. Al realizar el trabajo de investigación debe seguirse adecuadamente los procedimientos para tratar que la rata sufra lo menos posible.

## G. MÉTODOS

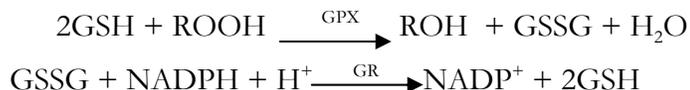
### 1. Método de Medición de Antioxidantes Endógenos

Los antioxidantes endógenos son determinados en humanos y animales experimentales, y se realizan en sangre entera con heparina.

#### a) **Determinación de la enzima Glutación Peroxidasa**

##### i. Método Plagia y Valentine

La glutatión peroxidasa (GPX) cataliza la oxidación del glutatión (GSH) por el hidroperóxido de cumeno. El glutatión oxidado (GSSG) en presencia de glutatión reductasa (GR) y NADPH es inmediatamente convertido a su forma reducida con una oxidación concomitante de NADPH en NADP<sup>+</sup>. Se mide la disminución de la absorbancia a 340 nm (48).



##### ii. Método de Bentler

Para la determinación de GSH se utiliza sangre completa con heparina (0,2 mg de heparina por ml de sangre); siguiendo el procedimiento experimental de Bentler, se toma una alícuota de sangre (0,2 ml), se le agrega 1,8 ml de agua destilada fría, al hemolizado se le agregan 3,0 ml de solución precipitante, se mezcla, se deja reposar por 3 minutos y luego se centrifuga, se toman 2 ml del sobrenadante claro y se le agregan 8,0 ml de solución fosfato y 1 ml de ácido 5, 5' ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). A los cinco minutos se lee en el fotocolorímetro a 410 nm contra el blanco y se utiliza una curva de calibración del estándar de GSH preparado (49).

## **b) Ensayos Biológicos**

### **i. Administración oral de extractos vegetales en ratas**

La administración es llevada a cabo con la utilización de una aguja de acero inoxidable de aproximadamente 11 centímetros de longitud; esta se inserta en una jeringa que ya tiene la dosis exacta a administrar. La rata debe sostenerse fuertemente del cuello con la mano izquierda para inmovilizarla y con la mano derecha se introduce la sonda en la garganta de la rata sin que tope en ninguna parte para no dañar a la rata (50).

### **ii. Extracción sanguínea en ratas**

La muestra sanguínea se obtendrá de la cola de la rata, ya que es el único método por medio del cual se puede extraer en diversas oportunidades sangre de la misma rata y el sufrimiento es menor que en otros procedimientos. Se emplean agujas de calibre delgado de 26-27, ya que la vena de la rata es delgada. Para extraer la sangre la rata se introduce en una caja especial y posteriormente se dilata la vena de la cola limpiando con xilol o introduciéndola en agua caliente, con el fin de dilatar la vena y así facilitar la extracción.

## **2. Determinación de Antioxidantes Exógenos**

### **a) Determinación de Actividad Antioxidante Total**

- Método de DPPH

El DPPH (2,2 difenil 1- picridilhidrazilo) es un radical estable soluble en metanol que puede aceptar un electrón o radical hidrógeno para convertirse en una molécula diamagnética estable. Debido a que el DPPH reacciona con agentes reductores adecuados, este electrón se aparea y la solución pierde color en forma estequiométrica con el número de electrones que se toman. Esta actividad ha sido utilizada para evaluar la actividad antioxidante de plantas, extractos microbianos y alimentos (51, 52, 53).

Los resultados de este método son expresados en inhibición al 50 por ciento  $IC_{50}$ , el cual se define como la cantidad de extracto o la materia vegetal requerida para dar un 50 por ciento de disminución en la absorbancia en comparación con la solución blanco. (38).

Desde el punto de vista metodológico el DPPH es un método fácil y exacto para la medición de actividad antioxidante en frutas y verduras por lo que es recomendado para medir la actividad antioxidante en este tipo de muestras. Este método presenta también la ventaja de ser una prueba no enzimática y es utilizado para proveer información en la reactividad básica de compuestos para el secuestro de radicales (38, 32).

La desventaja del método es que es menos sensible que otros métodos para la determinación de antioxidantes hidrofóbicos (38).

Hisatomi *et al* utilizó este método para la medición de la actividad antioxidante en el pericarpio de la semilla de pimienta japonesa y fue utilizado también en el estudio de actividad antioxidante en extracto de *Thymus zygis* realizado por Soares J *et al* (52, 54).

## **b) Determinación de Vitamina C**

- Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Es una técnica de separación en dos fases, una sólida estacionaria y una líquida móvil. El material para análisis se extrae con solventes apropiados y se inyecta presión dentro de las columnas de diámetro angosto. El solvente pasa por un detector que mide una propiedad específica de la solución que está pasando, tal como su naturaleza química, su fluorescencia o su absorción de la luz (ó radiaciones UV). Estas son registradas en una tira de papel o monitor electrónico en forma de picos, los cuales pueden ser medidos manualmente o con computadoras. Con este método es posible realizar cuantificaciones simultáneas de diversas vitaminas siendo algunas de ellas carotenos, riboflavina, folatos, vitamina C, tiamina y piridoxina. Se ha comprobado que el método es altamente específico y no existen interferencias de otros compuestos, por lo que se utiliza para análisis de rutina (44, 55, 56).

**c) Determinación de Fenoles Totales por el Método de Folin-Ciocalteu**

Los fenoles, al igual que las proteínas, reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu para dar un complejo coloreado. Se utiliza una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10 por ciento y se emplea ácido gálico como estándar. El reactivo de Folin-Ciocalteu detecta todos los grupos fenólicos encontrados en extractos y el contenido total de fenoles es calculado en equivalentes de ácido gálico y comparado con una curva estándar del mismo (21, 57, 58).

#### IV. JUSTIFICACION

En el organismo humano se encuentra una producción equilibrada de radicales libres y antioxidantes, pero algunas veces se produce un estrés oxidativo que incrementa la generación de radicales libres, causando a la vez un incremento en la producción de antioxidantes endógenos para mantener ese equilibrio entre ambos. El estrés oxidativo puede ser ocasionado por diversos factores: químicos, xenobióticos, físicos, fármacos, orgánicos y metabólicos. Algunas enfermedades degenerativas están relacionadas con la producción de radicales libres, entre las cuales se encuentran cáncer, cardiopatías, cataratas y aterosclerosis (14).

Recientemente se ha promovido el consumo de frutas y vegetales en general, ya que hay diversos estudios que demuestran que estos alimentos contienen gran cantidad de antioxidantes, que pueden tener una función similar a la de los antioxidantes endógenos lo que sugiere que al consumirlos se puede prevenir enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Dentro de los estudios ya realizados no se ha reportado ninguna medición de la actividad antioxidante *in vivo* asociado a la ingesta de este tipo de alimentos, por lo que este estudio pretendía establecer el efecto que genera la administración oral de un extracto vegetal sobre los niveles sanguíneos de glutatión peroxidasa en ratas.

Para ésto se utilizó extracto de *Solanum americanum*, conocida comúnmente como quilete, ya que sus niveles de actividad antioxidante son elevados, además de que su consumo es habitual en la población guatemalteca. La enzima que se empleó como indicador es la glutatión peroxidasa, ya que de las enzimas endógenas antioxidantes, ya que es la que posee una mayor amplitud de acción sobre los radicales libres. Esta convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres. El estudio se desarrolló en ratas albinas hembras de la especie *Ratus norvegicus*, cuyo metabolismo es similar al del hombre y se utilizaron solamente hembras para evitar variaciones debidas al sexo.

## V. OBJETIVOS

### **General:**

- Determinar el efecto de la administración de extractos vegetales con actividad antioxidante sobre los niveles sanguíneos de glutatión peroxidasa en ratas.

### **Específicos:**

- Medir niveles enzimáticos en sangre de ratas que han recibido una administración por vía oral de una dosis diaria de extracto de *Solamun americanum* que posee actividad antioxidante.
- Evaluar la utilidad de la determinación sérica de glutatión peroxidasa para ser utilizada como método para medir el efecto *in vivo* de la ingesta de sustancias antioxidantes, en ratas hembras de la especie *Ratus norvegicus*.

## VI. HIPOTESIS

La administración oral de extractos de *Solamun americanum* con actividad antioxidante por un período de 21 días disminuye los niveles sanguíneos de glutatión peroxidasa en ratas albinas hembras de la especie *Ratus norvegicus*.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. UNIVERSO Y MUESTRA

#### 1. Universo

Ratas albinas

#### 2. Muestra

21 ratas albinas hembras de la especie *Ratus norvegicus*, con un peso aproximado de 350-400 gramos. Estas se dividieron en 3 grupos de 7 ratas cada uno:

- Primer grupo: Grupo control, solo se administró agua diariamente (1.5 ml).
- Segundo grupo: Se administró una dosis diaria de 0.0312g/Kg de peso (1.5 ml).
- Tercer Grupo: Se administró una dosis diaria de 0.312g/Kg de peso (1.5 ml).

Para calcular las dosis se tomó en cuenta que en el trabajo de Tesis elaborado por Caballeros K., se determinó que 1 gramo de materia fresca es equivalente a 0.032 gramos de extracto de *S. americanum*. Por lo que para administrar una dosis de 0.975 gramos de materia fresca que es una cantidad de hierba que la rata puede consumir normalmente fue necesario administrar 0.0312 g de extracto/Kg de peso en la rata, asimismo se empleó una dosis 100 veces mayor por lo que al segundo grupo de ratas se les administró 0.312 g de extracto/Kg de peso que equivale 9.750 gramos de quilete; que es una cantidad que definitivamente una rata de peso promedio de 300 gramos no consume en día normal. Las dosis se establecieron de esta forma, tomando en cuenta algunas dosis diarias de vitaminas para humanos, empero la dosis dada a las ratas es mayor ya que se consideró que la hierba no solamente contiene antioxidantes sino también otros compuestos.

#### 3. Unidad de muestreo:

Rata

#### 4. Unidad observacional:

Sangre de rata

## B. RECURSOS

### 1. Humanos

Ingrid Ramírez Madrid	Tesista
Dr. Rubén Velásquez	Asesor
Encargado Bioterio	Asesor-Técnico

### 2. Físicos

#### 1. Equipo

- Espectrofotómetro (Milton Roy Spectronic 21D)
- Balanza analítica (Mettler H 35 AR)
- Balanza semianalítica (Mettler Toledo PB 303 Delta Range)
- Potenciómetro (Fisher Accumet pH Model 620)
- Rotavapor R 300 (Büchi Switzerland)
- Vortex (Mistral Mixer Lab-line)
- Campana de extracción
- Baño de María
- Termómetro
- Gradillas
- Horno

#### 2. Reactivos

*Determinación de capacidad antioxidante total por el método de DPPH*

- Metanol (EM Science para HPLC)
- 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) (SIGMA)
- Hidróxido de sodio (Merck)
- Acetato de sodio anhidro (Merck)
- Acido acético glacial (Merck)
- Acido clorhídrico (EM Science p.a.)

- Agua destilada

*Determinación de fenoles totales por el método de Folin*

- Reactivo de Folin Ciocalteu
- Carbonato de Sodio
- Acido Gálico

*Determinación de Vitamina C*

- Estándar de Acido Ascórbico
- Buffer de Fosfatos
- Metanol HPLC
- Agua HPLC

*Medición de Glutación peroxidasa*

Kit de Ransel Cat. No. RS 505 para medición de Glutación Peroxidasa, que contiene

- Reactivo:
 

Glutación	4mmol/l
Glutación reductasa	≥ 0.5 U/l
NADPH	0.28mmol/l
- Tampón
 

Tampón fosfato	0.05 mol/l, pH7.2
EDTA	4.3 mmol/l
- Hidroperóxido de cumeno 0.18 mmol/l
- Diluyente
- Reactivo de Drabkin
- Xantina oxidasa 80 U/l

### 3. Cristalería

- Vaso de precipitar (100 ml, 250 ml y 1000 ml)
- Probetas (10 ml, 50 ml y 100 ml)
- Cubetas de lectura para espectrofotómetro

- Balones aforados (100 ml, 200 ml y 1000 ml)
- Agitadores de vidrio
- Tubos pyrex para 10 ml
- Vidrios de reloj
- Beakers

#### 4. **Material para Bioterio**

- Jeringas con agujas
- Cajas especiales para extracción de sangre en ratas
- Concentrado para ratas
- Aguja de acero inoxidable para administración oral de ratas
- Guantes
- Cajas para crianza de ratas
- Algodón

#### 5. **Otros**

- Micropipetas (5-40  $\mu$ l, 50-200  $\mu$ l, 200-1000  $\mu$ l) (Seropette Stanbio Laboratory)
- Micropipeteadores
- Macropipeteadores
- Tips
- Papel mayordomo
- Computadora personal
- Hojas
- Impresora
- Tinta
- Fotocopias
- Acceso a internet
- Folders con gancho

## 2. Institucionales

- Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
- Biblioteca, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Bioterio, Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

## C. PROCEDIMIENTOS

### 1. Preparación del Extracto

Para preparar el extracto se seleccionó la hierba *Solanum americanum* conocida popularmente como quilete, ya que el trabajo de Tesis “Optimización de dos Métodos para el Tamizaje de la Actividad Antioxidante de Extractos Vegetales” demuestra que el quilete posee mayor capacidad antioxidante que la uva, la cual es una de las frutas que posee mayor poder antioxidante (45).

En recipientes de vidrio herméticos se colocó y pesó entre 250-500 gramos de la muestra vegetal fresca, se añadió etanol hasta cubrir la hierba y se maceró con un agitador de vidrio. Los recipientes se protegieron de la luz, se saturaron con atmósfera de nitrógeno y almacenaron por 4 días. Al cabo de los 4 días se filtró el etanol de cada recipiente y se almacenó el filtrado en frascos ámbar, con atmósfera de nitrógeno, protegidos de la luz y en refrigeración. El residuo de la hierba se colocó de nuevo en el frasco al cual se añadió etanol hasta cubrir y el procedimiento de extracción se repitió, todos los filtrados se adicionaron en el mismo recipiente. Este procedimiento se efectuó hasta que el residuo no mostró color. El peso seco del extracto se determinó para calcular el rendimiento.

Los extractos se evaporaron hasta sequedad en rotavapor a 40 °C: en un balón de 1 litro se añadió 500 ml de extracto que fue protegido de la luz y se situó el balón en el rotavapor. Al evaporarse casi totalmente el etanol se volvió a llenar el balón con el extracto, esto se repitió hasta evaporar todo el extracto. Se invirtió el balón con la materia seca boca abajo en un recipiente ámbar de boca ancha y previamente tarado. Luego de 20 minutos se lavó el balón con etanol absoluto hasta que se extrajo toda la materia seca y se depositó la

materia etanólica recuperada en el frasco ámbar tarado. La materia etanólica recuperada en el frasco ámbar se sometió bajo corriente de nitrógeno hasta evaporar el etanol y posteriormente se desecó totalmente el extracto en una desecadora. El frasco con la materia seca de la hierba se almacenó con atmósfera de nitrógeno, se protegió de la luz y se refrigeró hasta su uso. Por último se realizó las determinaciones de medición de actividad antioxidante total, vitamina C, fenoles totales, además se determinó el peso seco de la hierba (Ver anexo I-IV).

## **2. Selección de ratas y asignación de tratamiento**

Se pesaron todas las ratas y fueron divididas en tres grupos, cada grupo constituidos por ratas de pesos similares. Se colocó una marca individual a cada rata en cada grupo para conocer el peso de cada una de ellas. Ya formados los tres grupos, se les asignó el siguiente tratamiento por 21 días:

- Grupo Control: se le dió una dosis diaria de 1.5 ml de agua.
- Grupo 1: se administró el extracto de la hierba en una dosis de 0.0312 g/Kg de peso de la rata, disuelto en 1.5 ml de agua.
- Grupo 2: se administró el extracto de la hierba en una dosis de 0.312 g/Kg de peso de la rata, disuelto en 1.5 ml de agua.

## **3. Administración del Extracto**

Se prepararon las dosis para cada grupo de ratas de la siguiente forma (diariamente):

- Grupo control: para cada rata se midió 1 ml de agua y añadir 3 gotas de Tween 80, homogeneizar .
- Grupo 1 (dosis 0.0312 g/Kg peso): según el peso de cada rata, se pesó la cantidad necesaria de materia seca de la hierba y se reconstituyó con 1 ml de agua y 3 gotas de Tween 80, ésta se agitó en vortex hasta obtener solución homogénea.
- Grupo 2 (dosis 0.312 g/Kg peso): según el peso de cada rata, pesar la cantidad necesaria de materia seca de la hierba y se reconstituyó con 1 ml de agua y 2 gotas de Tween 80, esta se agitó en vortex hasta obtener solución homogénea.

Las dosis fueron administradas a cada grupo de la siguiente forma: para la administración oral a la rata, ésta se sostuvo firmemente de la piel del cuello por la parte de atrás; así la cabeza de la rata se inmovilizó, abriendo así la tráquea de la rata. Se enroscó la jeringa llena de la sustancia a administrar con la sonda de acero inoxidable, y se introdujo por un lado de la boca hasta llegar al estómago, y se penetró suavemente, si esto no ocurre se debe sacar la sonda y volver a intentarlo. La descarga de la sustancia debe ser inicialmente despacio aumentando la velocidad en un corto tiempo. Si la rata no muestra movimientos bruscos, entonces es una buena administración; en cambio si la rata se mueve demasiado y la solución aparece en la boca y en la nariz se debe suspender inmediatamente (50).

#### **4. Obtención de la Sangre y Medición de Glutación Peroxidasa**

##### **a) Extracción sanguínea**

La sangre se obtuvo en los días 0, 7, 14 y 21 días para medir la glutatión peroxidasa. Para llevar a cabo la extracción sanguínea se lleva a cabo el siguiente procedimiento:

- En un beacker de 500 ml calentar agua a 60°C.
- Limpiar la cola de la rata con algodón xilol o alcohol al 90%.
- Colocar la rata en una caja especial para extracción sanguínea.
- Meter la colita de la rata dentro del agua caliente por 3 segundos aproximadamente, hasta que la rata mueva la cola dentro del agua.
- Buscar la mejor vena en la cola de la rata y proceder a extraer 0.5 ml de sangre.
- Almacenar la sangre (por lo menos 0.5 ml como mínimo) en tubo con heparina.
- Proseguir con la medición de la enzima glutatión peroxidasa

## b) Medición de Glutación Peroxidasa

### *Reactivos*

- Reactivo

Reconstituir el vial con el volumen apropiado de Tampón. Estable durante 48 horas entre 4 -8 °C u 8 horas entre 15-25 °C.

- Tampón

Listo para usar. Estable hasta la fecha de caducidad cuando se observa entre 2-8 °C.

- Hidroperóxido de cumeno

Diluir 10µl con 10 ml de agua bidestilada y mezclar bien, agitando vigorosamente ya que el cumeno es difícil de disolver. Debe utilizarse una solución fresca preparada en el día. Concentrado es estable hasta la fecha de caducidad cuando se conserva entre 2-8 °C.

Para medir el volumen de hidroperóxido de cumeno debe utilizar una pipeta con acción de desplazamiento positiva y capilares de cristal.

- Diluyente

Reconstituir el contenido de un vial de diluyente 4 con 200 ml de agua bidestilada. Estable durante 4 semanas cuando se observa entre 2-8 °C ó 3 días entre 15-25 °C.

### *Procedimiento*

Longitud de onda	340 nm
Cubeta	1 cm de espesor
Temperatura	37 °C
Medición	frente al aire

## Pipetar en cubeta

	Macro		Semimicro	
	Muestra diluida	Reactivo blanco	Muestra diluida	Reactivo blanco
Muestra diluida	0.05 ml	----	0.02 ml	----
Agua destilada	----	0.05 ml	----	0.02 ml
Reactivo	2.50 ml	2.50 ml	1.00 ml	1.00 ml
Cumeno	0.10 ml	0.10 ml	0.04 ml	0.04 ml

Mezclar y leer la absorbancia inicial de la muestra y de reactivo blanco al cabo de un minuto y empezar a cronometrar simultáneamente. Leer de nuevo al cabo de 1 y 2 minutos. Restar el valor obtenido para el blanco de la muestra.

***Cálculos***

Calcular la concentración de glutatión peroxidasa a partir de la siguiente fórmula:

$$U/l \text{ de hemolizado} = 8412 \times \Delta A \text{ 340 nm/segundo}$$

- Linealidad: si el cambio de la absorbancia excede a 0.1 a 340 nm diluir la muestra con el diluyente, y multiplicar el resultado por el factor de dilución.
- Los resultados se obtienen en U/l de sangre entera.

**5. Tabulación y análisis estadístico**

Para el análisis de los resultados se realizó una tabulación de los datos obtenidos diariamente los días 0, 7, 14 y 21 (Ver Tabla en Anexo 5). Se efectuó un análisis estadístico de los resultados de los tres grupos por día, a su vez de cada grupo durante los 21 días. Los resultados obtenidos se presentaron gráficamente.

## D. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 1. Tipo de estudio

- a) Según el tipo de ocurrencia de los hechos y registros de la información:  
Prospectivo
- b) Según el período y secuencia del estudio:  
Transversal
- c) Según el control de las variables por el investigador:  
Prueba no controlada
- d) Según el análisis y alcance de los resultados:  
Diseño totalmente al azar

### 2. Tamaño de la muestra (número de réplicas)

Se calculó de la siguiente manera:

$$(\text{numero de réplicas por tratamiento}) n_j = \frac{2 \text{NC}^2 \sigma^2 p}{\Delta^2}$$

NC = nivel de confianza

$\Delta$  = límite de confianza

$\sigma$  = Varianza

$\Delta = \pi$

$\Delta^2 = \pi^2$

$n_j = 21$  réplicas

$21/3 = 7$  ratas por tratamiento

### 3. Análisis de Datos

Para realizar el análisis se llevó a cabo ANDEVA de medidas repetidas.

Se hizo un análisis en los siguientes aspectos:

- Si la manipulación para la administración oral del extracto vegetal causó estrés oxidativo y a su vez indujo un incremento en la enzima endógena glutatión peroxidasa en el grupo control.
- Al administrar extractos vegetales con actividad antioxidante se efectuó una protección contra el estrés oxidativo, lo cual disminuyó el nivel endógeno de glutatión peroxidasa.
- Dentro de cada grupo de tratamiento se observaron los cambios con respecto al tiempo en la enzima glutatión peroxidasa durante el transcurso de los 21 días, las mediciones se efectuaron los días 0, 7, 14 y 21.
- Se evaluaron las diferencias encontradas dentro de los tres tratamientos para observar los efectos que se desarrollaron durante la ingesta de extractos vegetales con actividad antioxidante sobre la enzima glutatión peroxidasa.
- Si hubo respuesta, la determinación puede ser usada como método para evaluar el efecto *in vivo* de ingestión de sustancias antioxidantes.
- Se utilizó una hierba con alta actividad antioxidante; a su vez se emplearon dos dosis de la misma para asegurar que conforme mayor sea la ingestión de extractos vegetales con antioxidantes será mayor la disminución de la enzima endógena.
- Se determinó si la enzima glutatión peroxidasa es un indicador del estrés oxidativo en ratas.

Los resultados se expresarán de la siguiente forma:

- Cantidad de Enzima Glutatión Peroxidasa: U/l de sangre entera.

## VIII. RESULTADOS

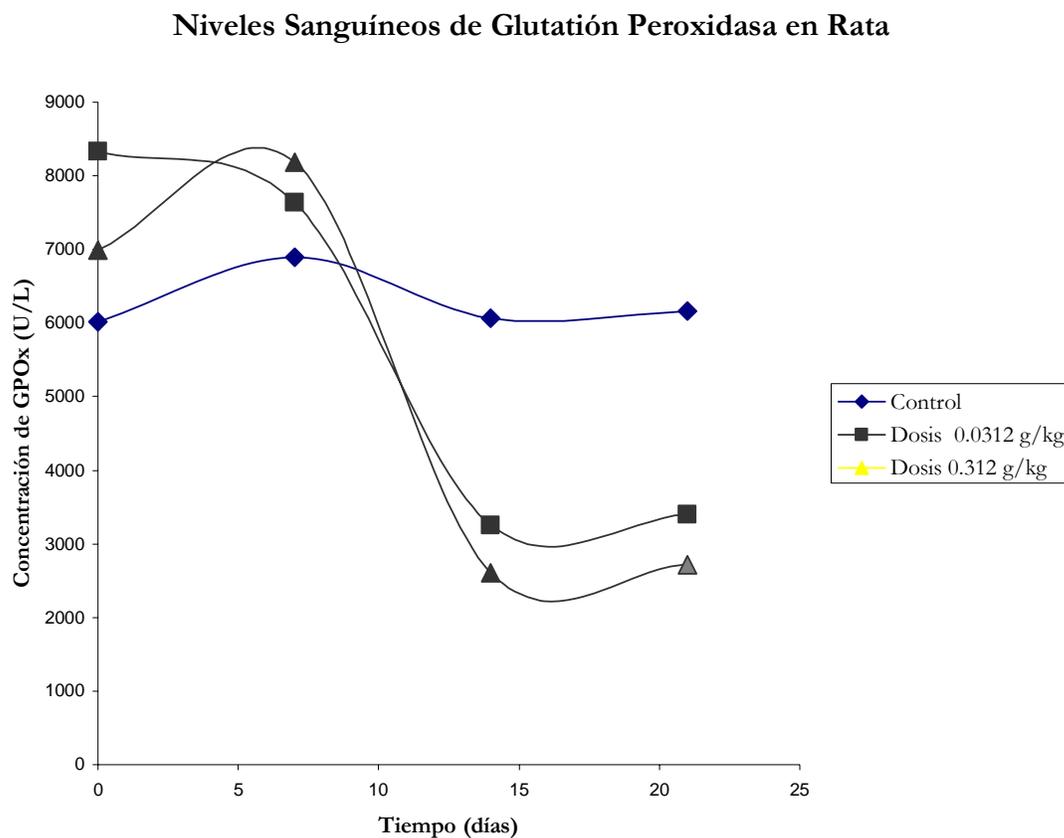
Las ratas fueron sometidas a un tratamiento durante 21 días, de los cuales en los días 0, 7, 14 y 21 se midió la concentración sanguínea de glutatión peroxidasa. En la tabla 1 se muestran las medias de los valores medios de glutatión peroxidasa/litro de sangre para cada grupo en los días indicados. En la figura 1 se muestra gráficamente cómo los datos varían para cada grupo en el transcurso de los días del tratamiento. Se puede observar que los niveles de glutatión peroxidasa sanguínea del grupo control no variaron apreciablemente, mientras los otros dos grupos muestran niveles de glutatión peroxidasa menores conforme transcurren los días, en especial en el grupo de la dosis de 0.312 g/kg de peso corporal. Los resultados para cada rata en el transcurso de los días se muestran en el Anexo V.

Tabla 1. Niveles de glutatión peroxidasa sanguíneos, expresados en unidades de la enzima/litro de sangre para los tres grupos: control, dosis 0.0312 g/kg de peso corporal y 0.312 g/kg de peso corporal.

Unidades de glutatión peroxidasa/litro de sangre Media $\pm$ DS*			
	Grupo Control	Grupo 0.0312 g/Kg	Grupo 0.312 g/Kg
<b>Día 0</b>	6011 $\pm$ 1676	8328 $\pm$ 6021	6997 $\pm$ 6365
<b>Día 7</b>	6897 $\pm$ 4224	7637 $\pm$ 5570	6272 $\pm$ 3940
<b>Día 14</b>	6060 $\pm$ 3337	3251 $\pm$ 1051	2611 $\pm$ 714
<b>Día 21</b>	6159 $\pm$ 578	3400 $\pm$ 1297	2710 $\pm$ 964

\* DS. Desviación estándar

**Figura 1.** Niveles de glutatión peroxidasa para los tres grupos de ratas durante los días 0, 7, 14 y 21 de tratamiento.



En la tabla 2 se presentan los resultados del análisis estadístico mediante una prueba de varianza de dos vías. La tabla muestra los valores de probabilidad para el estudio completo (modelo), y para las diferencias que pueden existir por efecto de la dosis (tratamiento) o por influencia de los individuos (rata). Se puede observar que el tratamiento (administración de extractos) produjo diferencias en relación al control, a partir del día 14 de estudio ( $p = 0.0124$ ). Las diferencias en el modelo son significativas a partir del día 21 ( $p = 0.0060$ ), lo cual indica que los niveles de glutatión peroxidasa fueron distintos para los 3 grupos (dosis 0.0312 g/kg de peso y dosis 0.312 g/kg de peso y control).

Tabla 2. Niveles de significancia (probabilidades) indicados por el análisis de varianza según el modelo, tratamiento e individuo.

<b>Probabilidad según</b>			
<b>Día</b>	<b>Modelo</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Rata</b>
<b>0</b>	0.3222	0.1868	0.4116
<b>7</b>	0.7329	0.8687	0.5856
<b>14</b>	0.0561	0.0124*	0.2578
<b>21</b>	0.0060*	0.0002*	0.8504

\* Diferencias significativas.

## IX. DISCUSION DE RESULTADOS

En el presente trabajo se determinó el efecto de la administración oral de extractos vegetales con actividad antioxidante sobre los niveles sanguíneos de glutatión peroxidasa en la rata; para ello se empleó extracto de quilete (*Solanum americanum*); que es de consumo popular en Guatemala y de la cual ha sido reportada considerable cantidad de antioxidantes (45).

Como es posible observar en los resultados obtenidos, al inicio del experimento todos los grupos presentaron gran dispersión de sus valores de glutatión peroxidasa sanguíneos, con porcentajes de coeficiente de variación (desviación estándar/media x 100) entre 70-90%. Esto se puede explicar por varios factores que pudieron haber influido en los resultados, como lo son: la dificultad para obtener la muestra, la falta de estandarización de la metodología debido a los pocos recursos económicos y lo oneroso de los reactivos, además de posibles limitaciones de la misma.

Sin embargo durante el transcurso de los días, se puede verificar que las mediciones presentan desviaciones estándar menores, en especial en el último día (día 21), donde los valores de porcentaje de coeficiente de variación son de 9% para el grupo control, 38% para el grupo de dosis 0.0312 g/kg de peso y 35% para el grupo de dosis 0.312 g/kg de peso; los que son sustancialmente menores en comparación con los días iniciales del estudio.

Se puede observar que los valores promedio para el grupo control variaron muy poco durante el desarrollo del estudio, estos oscilaron entre 6011 y 6897. Para los días 0, 7, 14 y 21 respectivamente, el grupo de la dosis de 0.0312 g/kg de peso los resultados fueron 8328, 7637, 3251 y 3400 U/l y para el grupo de la dosis de 0.312 g/kg de peso 6997, 6272, 2611 y 2710 U/l. Lo cual indica una disminución de cerca de 40% de la enzima glutatión peroxidasa para ambos grupos. Esto refleja la efectividad del tratamiento dado a las ratas para disminuir los valores de glutatión peroxidasa. Los resultados del análisis estadístico, que se pueden observar en la tabla 2, indican que la diferencia de los niveles de glutatión peroxidasa entre los grupos experimentales (dosis 0.0312 g/kg de peso y dosis 0.312 g/kg de peso) y el grupo control son estadísticamente significativas ( $p = 0.0124$ ) a partir del día 14. Asimismo se puede observar que el el día 21 los valores de glutatión peroxidasa sanguínea para los tres grupos (control,

dosis 0.0312 g/kg de peso y dosis 0.312 g/kg de peso) son diferentes ( $p = 0.0060$ ). Esto quiere decir que 14 días después de recibir una dosis diaria de extracto de quilete (entre 0.0312-0.312 g/kg de peso) se puede notar una disminución en los niveles de glutatión peroxidasa sanguínea y que a partir del día 21 el efecto se vuelve dependiente de la dosis.

El efecto sobre los niveles sanguíneos de glutatión peroxidasa causados por la ingesta de extractos vegetales con actividad antioxidante, sugieren que la metodología empleada en esta investigación, puede ser utilizada para evaluar el efecto *in vivo* que la ingestión de sustancias antioxidantes generan en el organismo

En la figura 1 se puede observar que las curvas dadas por el comportamiento de la concentración de glutatión peroxidasa son bimodales ya que los valores de dicha enzima aumentan del día 0 al día 7, sin embargo los días 14 y 21 se observa una disminución de la misma. Esto podría deberse a dos procesos: el primero consistente en la manipulación diaria de las ratas para la administración de los extractos lo que causaría un estrés oxidativo, y el consiguiente incremento de los niveles de glutatión peroxidasa; y el segundo evento consistiría en que en la sangre de la rata se alcanzan niveles estables de sustancias exógenas y por ende dichas sustancias empiezan a tener un efecto significativo en el organismo disminuyendo los niveles sanguíneos de esta enzima.

La disminución de glutatión peroxidasa en el organismo de las ratas puede interpretarse como el aumento de la protección de las sustancias antioxidantes de fuente exógena, lo que hace de alguna forma innecesaria la expresión de los sistemas endógeno; ya que dichos antioxidantes son empleados por las células corporales para eliminar los radicales libres; por lo que la necesidad y la producción de enzimas antioxidantes endógenas se ve disminuida lo cual se ve reflejado en la disminución de esta enzima.

Para conocer la actividad antioxidante del extracto se midió su actividad antioxidante total y los contenidos de fenoles totales y vitamina C. La actividad antioxidante total se midió como  $IC_{50}$ , es decir, la cantidad de sustancia, expresada en miligramos, que se necesita para reducir en un 50% la absorbancia de una solución de 50  $\mu M$  de DPPH. La relación entre el

IC<sub>50</sub> y la actividad antioxidante total es inversamente proporcional, lo cual significa que una sustancia posee mayor actividad antioxidante cuando requiere menor cantidad de miligramos para reducir el DPPH. Los resultados analizados para el quilete fueron: IC<sub>50</sub> de 1.01 mg de extracto, fenoles totales 41.34 Eq de ácido gálico/gramo de extracto y 11.74 µg de vitamina C/gramo de extracto.

Al determinar la acción que ejerce la ingestión de extractos vegetales con actividad antioxidante sobre los niveles de glutatión peroxidasa, se demostró que sí hay una respuesta significativa consistente en la disminución de los niveles sanguíneos de la enzima glutatión peroxidasa. Por lo tanto el método desarrollado dentro de este trabajo, puede ser utilizado como un método para evaluar el efecto de la ingestión de diversas sustancias antioxidantes.

## X. CONCLUSIONES

- A. La ingesta de extractos etanólicos de quilete en dosis de 0.0312 g/kg de peso y de 0.312 g/kg de peso durante 21 días causa una disminución del 40 % sobre los niveles sanguíneos de glutatión peroxidasa.
- B. El efecto de la ingesta oral de antioxidantes exógenos sobre la concentración sanguínea de glutatión peroxidasa en la rata se puede observar desde el día 14.
- C. Luego de 21 días de ingesta las variaciones de glutatión peroxidasa sanguínea son dependientes de la dosis.

## **IX. RECOMENDACIONES**

- A. Emplear este método para evaluar el efecto que ejercen otras frutas y vegetales sobre el estrés oxidativo.
- B. Analizar el efecto que posee la ingestión oral de sustancias antioxidantes sobre los niveles séricos de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa.
- C. Estandarizar la metodología en un próximo estudio para observar las desviaciones que se obtengan de los resultados de la población a estudiar.

## **XII. BIBLIOGRAFIA**

1. Ziegler E., Filer L. Conocimientos Actuales sobre Nutrición. 7 ed. Washington: Instituto Nacional de Ciencias de la Vida, 1996. XV+731 (pp.342-363).
2. El Sistema de Defensas Antioxidantes es Múltiple y Específico. Boletín Ciencia, Vino y Salud. Vol 3. Noviembre 1999.
3. Cisneros E., Pupo J., Céspedes E. Enzimas que Participan como Barreras Fisiológicas para Eliminar los Radicales Libres: III. Glutación Peroxidasa. Instituto de Ciencias Básicas y Periclínicas “Victoria de Girón”. Rev Cubana Invest Biomed 1997; 16:10-15.
4. Radicales Libres, Antioxidantes y Tabaquismo. Junio 2003. (En línea). Guatemala. Consultado 13.03.04. Disponible en [www.freehosting.net](http://www.freehosting.net)
5. Murray R, *et al.* Bioquímica de Harper. 12 ed. México: El Manual Moderno, 1992. 740p. (p.106)
6. Céspedes T, Sánchez D. Algunos Aspectos sobre el Estrés Oxidativo y la Terapia de Suplementación. Rev Cubana Cardiol 2000;14(1):55-60.
7. Venereo J. Daño Oxidativo, Radicales libres y Antioxidantes. Rev Cubana Med Milit 2002;31(2):126-133.
8. Roche. Patología de los Radicales Libres y su Prevención con Vitaminas Antioxidantes; El  $\beta$ -caroteno, la Vitamina E y la Vitamina C en la Profilaxis de las Enfermedades. Doc. Tec. 12p(p3-9)
9. Rodríguez J, Menéndez J y Trujillo Y. Radicales Libres en la Biomedicina y Estrés Oxidativo. Rev Cub Med Milit 2001;30(1):15-20.

10. Majem L, Bartheina A, Verdú M. Nutrición y Salud Pública. España: Masson, 1994. (pp. 203-205, 353-357)
11. Dermarcheiler C, Ciccía G. Antioxidantes de Origen Vegetal. Ciencia Hoy. 1998: 34: 32-43.
12. Pérez D. Seminario de Radicales Libres. Instituto Biológico de la Salud.
13. Ríos M. El estrés Oxidativo y el Destino Celular. Dpto de Quim.biolog. FCEyN, UBA. 2002.
14. South, J. Las Teorías sobre las Causas de Envejecimiento. 2003.
15. Roche. Antioxidant Vitamins. Doc. Tec. 12p (pp1-5)
16. Yokozawa T, Ju Cho E, Hara Y, Kitani K. Antioxidative Activity of Green Tea Treated With Radical Initiator 2,2'-azobis (2-amidinopropane.) Dihydrochloride. J. Agric. Food Chem. 2000;48:5068-5073.
17. Yen G, Chen H, Peng H. Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Various Tea Extracts. J. Agric. Food Chem. 1997;45:30-34.
18. Liao K, Yin M. Individual and Combined Antioxidant Effects of Seven Phenolic Agents in Human Erythrocyte Membrane Ghosts and Phosphatidylcholine Liposome Systems: Importance of the Partition Coefficient. J. Agric. Food Chem. 2000;48:2266-2270.
19. Valverde I, Periago M, Ras G. Significado Nutricional de los Compuestos Fenólicos en la Dieta. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 2000: 50:5-4.

20. Valdés J, Brugueras M. El Estrés Oxidativo y los Antioxidantes. Tendencias de Salud en Cuba, Departamento de Información, 2000.
21. Zielinski H, Koslowska H. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Cereal Grains and Their Different Morphological Fraction. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:2008-2016.
22. Urquiaga I, Urzúa U, Leighton F. Antioxidantes Naturales. Impacto en la Salud. 8vo Congreso latinoamericano de Grasas y Aceites. Pontificia Universidad de Chile
23. Zorrilla A. El Envejecimiento y el Estrés Oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed* 2002;21(3):178-185.
24. Bach, J. y Bach P. Los Radicales Libres. Resumen del Capítulo dedicado a los Antioxidantes. *Nutricional Healing* 2003. Ed Aveny
25. Boletín Ciencia y Vino. El Sistema de Defensas Antioxidantes es Múltiple y Específico.
26. Surai P. Protección Antioxidantes en el Intestino: un buen Comienzo es la Mitad de la Batalla. Centro de Investigaciones de Ciencia Aviar, SAC. Auchincruive, Agr, Scotland.
27. Cisneros E. La glutatión reductasa y su importancia biomédica. *Rev Cubana Invest Biomed.* Instituto de Ciencias Básicas y Periclínicas “Victoria de Girón”.
28. Damalso, A. Estudio Preliminar sobre el Estrés Oxidativo en Intestino de Ratas Parcialmente Hepactectomizadas. UNL. Santa Fé. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
29. Léger C, Kadiri-Hassani N, Descomps B. Decreased Superoxide Anion Production in Cultured Human Promonocytes Cells (THP-1) Due to Polyphenol Mixtures From Olive Oil Processing Waste Waters. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:5061-5067.

30. Gao X, *et al.* Changes in Antioxidant Effects and Their Relationship to Phytonutrients in Fruits of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) During Maturation. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:1485-1490.
31. Nicoloy M, Calligaris S, Manzocco L. Effect of Enzymatic and Chemical Oxidation on the Antioxidant Capacity of Catechin Model Systems and Apple Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:4576-4580
32. Gil M, *et al.* Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship With Phenolic Composition and Processing. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:4581-4589.
33. Wan S, Lin H. Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:140-146.
34. Nestel P, Trumbo P. El Papel de los Carotenoides Provitamina A en la Prevención y Control de la Deficiencia de Vitamina A. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición;* 1999: 49: 21S-31S.
35. Rozowski, J, *et al.* Diferencias en Antioxidantes Plasmáticos según el Nivel Socioeconómico en Mujeres Chilenas. *REV Med Chile* V. 129 No.1. Santiago Ene 2001.
36. Larumbe, R. Estrés Oxidativo y Enfermedad de Parkinson. *Anales Revisiones.*
37. Kathleen D. Frutas y Vegetales Benéficos para la Memoria. *Heath Scout* 2002.
38. Silva F, *et al.* Phenolic Acids and Derivates: Studies on the Relationship Among Structure, Radical Scavenging Activity, and physicochemical Parameters. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:2122-2126.

39. Sala R, *et al.* Rol de Estrés Oxidativo en Fisiopatogenia Vascular Encefálica Isquémica. Instituto Gamma.
40. Aviño, J. *et al.* Estrés oxidativo en el nervio óptico de la rata inducido por la administración de etanol. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología. Mayo 2002.
41. García F, *et al.* Perfil Oxidativo de Infección Amigdalar y Sangre. Hospital Clínico de la Universidad de Valencia; 2002: 53:398-404-
42. Miratello V, *et al.* Bajos Niveles de Defensas Antioxidantes Mejorados por IECA en Pacientes con Hemodiálisis. Rev de Nefrol. Diál. Y Trans. 1998; 48:3-14.
43. Linares E. Etnobotánica de transeco, Yura-Chivay, Departamento Arequipa, Perú. Revista chilena de flora y vegetación. V. 3, No. 1, 2002.
44. Cotto, I. Contenido de cuatro Vitaminas en Chomtee (*Lysianthes synanthera* B.), Gushnay (*Spathiphyllum phrynifolium*) y Madre de Maíz (*Dioscorea convolvulaceae*). Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1999. 74p. (pp. 32-35)
45. Caballeros K. Optimización de un Método para el Tamizaje de la Actividad Antioxidante de Extractos Vegetales. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2001.
46. Cervetto J. Documento de Bioética. Presidente del Comité de Ética del Hospital Posadas.
47. Bioethics. Excerpted from Compton's Interactive Encyclopedia
48. Paglia, D.E. and Valentine, W.N., J. Lab Clin Med. 1967; 70: 158.

49. Montenegro J, *et al.* Determinación de Agentes Antioxidantes Séricos en Diabéticos Tipo 2. Facultad de Medicina, Universidad de Zulia: 2001:17
50. Baker, Henry J., Lindsey J. Russel, Weisbroth Steven H. Eds. The Laboratory Rat. Vol II. Research Applications. New Cork: Academic Press, 1980. xiii+276p. (pp.1-42).
51. Da Porto C, Calligaris S, Celotti E, Nicoli M. Antirradical Properties of Comercial Cognacs Assessed by the DPPH Test. J. Agric. Food Chem. 2000;48:4241-4245.
52. Soares J, *et al.* Antioxidant Activities of Some Extracts of *Thymus zygis*. Free Rad. Res. 1997;26:469-478.
53. Hu C, Kitts D. Studies on The Antioxidant Activity of *Echinacea* Root Extract. J. Agric. Food Chem. 2000;48:1466-1472.
54. Hisatomi E, Matsui M, Cobayashi A, Kubota K. Antioxidative Activity in the Pericarp and Seed of Japanese Pepper (*Xanthoxylum piperitumi* DC). J. Agric. Food Chem. 2000;48:4924-4928.
55. López, C. Manual para la Preparación de Materiales de Plantas para Análisis Químico de Actividad de Vitamina A. Guatemala, Centro de Estudios en Sensoriopatías, Senectud e Impedimentos y Alteraciones Metabólicas-CESSIAM., 1994 (pp. 6-9, 15-31)
56. The United States Pharmacopeia. 23th. ed. EE.UU: United States Phamacopeial Convention, Inc., 1995. (p.131)
57. Plummer, D. Introducción a la Bioquímica Práctica. Colombia: McGraw-Hill Latinoamericana, 1981. 345p. (p. 137).
58. Manual de Prácticas de Laboratorio de Biomoléculas y Bioquímica. Guatemala: Universidad de San Carlos, 1999.

## ANEXO I

### Determinación de capacidad antioxidante total por el método de Difenilpicrilhidrazilo (DPPH)

i. Preparación de reactivos:

*Reactivo DPPH*

- ✓ Se prepara el volumen necesario de acuerdo a la relación 0.00219 g de DPPH en 10 ml de metanol.

*Amortiguador acetato pH 6*

- ✓ Se pesa 2.72g. de acetato de sodio anhidro y disolverlo en 100ml de agua destilada en balón aforado, el cual se almacena en frasco ámbar sin refrigeración.
- ✓ Se pesa en un beacker 24 g. de NaOH y disolver en 100 ml. de agua destilada, del cual se obtiene una dilución 3 N.
- ✓ Se mide 47.5 ml. de acetato de sodio y se agregan 2.4 ml. de ácido acético.
- ✓ Se ajusta la solución a pH 6.0 con NaOH.

Para determinar la actividad antioxidante total se evalua la absorbancia a 517 nm de la hierba. Con dicha evaluación se establece si es necesario concentrar o diluir la hierba para realizar una curva con concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1. En tubos rotulados se agrega las siguientes soluciones en las cantidades indicadas:

	<b>Blanco</b>	<b>Control</b>	<b>Control de ensayo</b>	<b>Ensayo</b>
Buffer de acetatos (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
Metanol (ml)	2.0	1.5	1.9	1.4
Muestra (ml)	---	---	0.1	0.1
DPPH (ml)	---	0.5	---	0.5

Luego de agregar las cantidades necesarias en cada tubo de ensayo, este se debe agitar en vórtex por 30 segundos e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos y luego se lee la absorbancia a 517 nm contra el blanco respectivo.

A partir de las absorbancias obtenidas calcular la concentración del extracto utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{[\text{abs. Control} - \text{abs. Muestra}]}{\text{abs. Control}} * 100 = \%$$

Se obtienen los resultados y se grafica la concentración del extracto en el eje X y las absorbancias obtenidas en el eje Y, interpolando así el valor de  $IC_{50}$ , con la ecuación:

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{M}$$

De acuerdo a lo anterior se diluye, liofiliza o concentra dependiendo si el porcentaje es mayor a 50% o menor a 50% respectivamente. Las diluciones realizadas deben abarcar un porcentaje abajo y arriba del 50%. El  $IC_{50}$  se debe expresar por gramo de la planta para reducir el 50% de DPPH.

## ANEXO II

### Determinación de Fenoles:

i. Preparación de Soluciones:

- ✓ Se pesan 10 mg de sodio y se disuelve en 10 ml de agua destilada.
- ✓ Se mide 1ml de ácido gálico y se diluye en 9ml de agua destilada, se debe realizar la preparación de éste en el momento que se va a utilizar.
- ✓ Se preparan los tubos con las diferentes soluciones abajo citadas:

Se mide una curva patrón con estándares de ácido gálico de la siguiente forma:

	H <sub>2</sub> O (ml)	Ácido gálico (ml)	Folin (ml)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10% (ml)
Blanco	8.00	0	0.8	1.6
P <sub>1</sub>	3.975	0.25	0.4	0.8
P <sub>2</sub>	3.950	0.50	0.4	0.8
P <sub>3</sub>	3.900	1.00	0.4	0.8
P <sub>4</sub>	3.850	1.50	0.4	0.8
P <sub>5</sub>	3.800	2.00	0.4	0.8
P <sub>6</sub>	3.750	2.50	0.4	0.8

La medición de fenólicos de la hierba se efectúa agregando a tubos rotulados lo siguiente:

	H <sub>2</sub> O (ml)	Extracto (ml)	Folin (ml)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10% (ml)
M <sub>1</sub>	3.95	0.05	0.4	0.8
M <sub>2</sub>	3.90	0.10	0.4	0.8

Se mezcla cada tubo y se coloca en baño de maría a una temperatura de 90<sup>o</sup> – 100<sup>o</sup> C por un minuto. Los tubos se enfrían y la absorbancia de cada uno se lee a 765 nm.

Los Eq de ácido gálico se calculan a partir de la curva patrón mediante una ecuación de la recta:

$$\text{Eq ácido gálico} = \frac{\text{Abs} - \text{m}}{\text{b}}$$

### ANEXO III

#### ✓ Determinación de vitamina C

- i. Preparación de Reactivos
  - ✓ Fase móvil: Buffer de fosfatos y metanol en concentraciones de 95:5
  - ✓ Todos los reactivos a utilizar se filtran previo a iniciar las inyecciones.
  
- ii. Determinación:
  - ✓ Se inyectan estándares de ácido ascórbico para obtener una curva patrón.
  - ✓ Se filtran los jugos utilizando membranas de 20 $\mu$ m de poro.
  - ✓ Se inyecta una cantidad adecuada de hierba.

Las áreas obtenidas se integran a la siguiente ecuación de la recta basada en la curva patrón para obtener los valores de vitamina C

## ANEXO IV

### Determinación del peso seco de la hierba

Se realiza por triplicado el siguiente procedimiento:

- ✓ Introducir un vidrio de reloj en un horno a 100 °C por una hora, retirar y dejar que alcance la temperatura ambiental en una desecadora (aproximadamente 15 min). Determinar el peso del vidrio de reloj.
- ✓ Repetir el procedimiento hasta obtener un peso constante.
- ✓ Agregar exactamente 1 gramo de la muestra y se lleva a 100 °C por una hora. Retirar del horno y se introduce en una desecadora hasta que alcanza la temperatura ambiente (aproximadamente 15 min). Determinar el peso.
- ✓ Repetir el procedimiento hasta que se alcanza un peso constante.
- ✓ Restar la tara y determinar el peso seco de la materia vegetal expresado como mg de materia seca/g de materia vegetal.

**ANEXO V****Tabla 1.** Mediciones de glutatión peroxidasa realizadas a cada grupo en el transcurso de los 21 días.

<b>Grupo</b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 7</b>	<b>Día 14</b>	<b>Día 21</b>
<b>Grupo Control</b>	Unidades de glutatión peroxidasa/litro de sangre			
Rata 1	5173.38	1724.46	3448.92	6208.14
Rata 2	8967.19	5173.38	7242.73	6897.92
Rata 3	5863.16	4483.59	5173.38	6208.14
Rata 4	7242.73	5518.27	4138.70	5863.25
Rata 5	4483.90	14485.46	4138.70	6897.92
Rata 6	6208.05	6552.95	13105.90	5518.35
Rata 7	1724.46	10346.76	5173.38	5518.35
<b>Media</b>	3251.83	6897.83	6060.24	6158.87
<b>Grupo dosis 0.312 g/kg</b>	Unidades de glutatión peroxidasa/litro de sangre			
Rata 1	9312.08	11036.54	2414.24	3104.11
Rata 2	1724.43	5518.27	2069.35	3104.11
Rata 3	20348.63	14830.36	3448.92	3793.89
Rata 4	2759.14	12071.22	2069.35	2759.22
Rata 5	5518.27	3104.3	2069.35	1379.65
Rata 6	4138.70	4483.60	3793.81	3449.00
Rata 7	5173.38	6208.06	2414.24	1379.65
<b>Media</b>	6996.38	6271.72	2611.32	2709.95
<b>Grupo dosis 0.0312 g/kg</b>	Unidades de glutatión peroxidasa/litro de sangre			
Rata 1	14140.57	19658.84	3793.81	2759.21
Rata 2	4483.59	4483.60	1034.68	2414.32
Rata 3	4483.59	3104.03	3793.81	2759.21
Rata 4	4138.70	4828.49	3104.03	4828.57
Rata 5	1379.76	5863.16	3104.03	5518.35
Rata 6	16209.92	7587.62	3793.81	2069.43
Rata 7	13450.79	7932.52	4138.70	3449.00
<b>Media</b>	8326.68	7636.89	3251.84	3399.73

---

Ingrid María Ramírez Madrid  
TESISTA

---

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda  
ASESOR

---

Licda. Alba Marina Valdéz de García  
REVISORA

---

Licda. Margarita Paz de Ramírez  
REVISORA

---

Licda. Alba Marina Valdéz de García  
DIRECTORA

---

M.Sc. Gerardo L. Arroyo Catalán  
DECANO