

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

The seal of the Universidad de San Carlos de Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a figure holding a staff and a banner, set against a background of mountains. The shield is flanked by two columns. Above the shield is a cross. The Latin motto "PLUS ULTRA" is inscribed on a ribbon across the shield. The outer ring of the seal contains the text "UNIVERSITAS CAROLINA GUATEMALENSIS INTER CETERAS ORBIS CONSPICUA".

**Evaluación de la actividad antioxidante de
cinco especies vegetales utilizadas
popularmente para el tratamiento de
afecciones de la memoria y los nervios**

Isabel Cristina Gaitán Fernández

Maestría en Producción y Uso de Plantas
Medicinales
MUPLAM

Guatemala, noviembre de 2009

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

**Evaluación de la actividad antioxidante de
cinco especies vegetales utilizadas
popularmente para el tratamiento de
afecciones de la memoria y los nervios**

Trabajo de graduación

Presentado por

Isabel Cristina Gaitán Fernández

Para optar al grado de

Maestría

Maestría en Producción y uso de plantas
medicinales

MUPLAM

Guatemala, noviembre de 2009

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

JUNTA DIRECTIVA

| | |
|---|------------|
| OSCAR MANUEL CÓBAR PINTO, PH. D. | DECANO |
| LIC. PABLO ERNESTO OLIVA SOTO, M.A. | SECRETARIO |
| LICDA. LILLIAN RAQUEL IRVING ANTILLÓN, M.A. | VOCAL I |
| LICDA. LILIANA VIDES DE URIZAR | VOCAL II |
| LIC. LUIS ANTONIO GÁLVEZ SANCHINELLI | VOCAL III |
| BR. MARIA ESTUARDO GUERRA VALLE | VOCAL IV |
| BR. BERTA ALEJANDRA MORALES MÉRIDA | VOCAL V |

CONSEJO ACADÉMICO

ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

OSCAR MANUEL CÓBAR PINTO, PH. D.
LICDA. ANNE MARIE LIERE DE GODOY, MSc.
DR. JORGE LUIS DE LEÓN ARANA
DR. JORGE ERWIN LÓPEZ GUIÉRREZ
LIC. FELIX RICARDO VELIZ FUENTES, MSc.

AGRADECIMIENTOS

Universidad de San Carlos de Guatemala

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Por su orientación, apoyo, agradezco a:

Lic. Armando Cáceres Estrada

Licda. María Eugenia Paredes Sánchez, M. A.

Ing. Agr. José Vicente Martínez, M. Sc.

Por el préstamo de las instalaciones y equipo para el trabajo práctico:

Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A mis profesores de la maestría MUPLAM: Licda. María Eugenia Paredes, M. A, Lic. Rodolfo Orozco, M.A, Ing. Agr. José Vicente Martínez, M. Sc., Lic. Sully Cruz, M.A., Lic. Armando Cáceres, Lic. Benito Soler, M

A mis compañeros y amigos de la Maestría: Licda. Keila Guerrero, Licda. Jennifer Contreras. Licda. Ligia Castro, Licda. Nathalia Granados Licda. Diana Pinagel y Lic. Christian Farfán

DEDICATORIA

A mis padres, Mario Gaitán y Lily de Gaitán: por su amor, comprensión, paciencia y apoyo, gracias por estar siempre conmigo.

A mis hermanas Janethe y Lily: por su cariño

INDICE

| | |
|----------------------------|---|
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Introducción | 3 |
| 3. Definición del problema | 5 |

| | |
|---|----|
| 4. Justificación | 6 |
| 5. Marco teórico | 7 |
| 5.1 Radicales libres | 7 |
| 5.2 Estrés oxidativo | 8 |
| 5.3 Desórdenes neurodegenerativos y afecciones de la memoria | 9 |
| 5.3.1 Enfermedad de Alzheimer (EA) | 9 |
| 5.3.2 Enfermedad de Parkinson | 11 |
| 5.3.3 Esclerosis lateral amiotrófica (ELA) | 12 |
| 5.4 Vulnerabilidad del cerebro ante el estrés oxidativo (Ke <i>et al.</i> , 2004). | 13 |
| 5.5 Papel de los antioxidantes | 14 |
| 5.6 Estudios recientes sobre la actividad antioxidante de especies vegetales | 15 |
| 5.7 Estudios de actividad antioxidante en Guatemala | 16 |
| 5.8 Metodologías de evaluación de la actividad antioxidante | 17 |
| 5.8.1 Método por TLC | 18 |
| 5.8.2 Método colorimétrico con DPPH | 18 |
| 5.8.3 Actividad reductora de Fe ⁺³ a Fe ⁺² | 19 |
| 5.8.4 Actividad antioxidante por el sistema de emulsión del ácido linoléico | 19 |
| 5.8.5 Determinación de los compuestos fenólicos | 19 |
| 5.9 Ficha técnica de las plantas en estudio | 19 |
| 5.9.1 <i>Brugmansia candida</i> Pers | 19 |
| 5.9.2 <i>Chiranthodendron pentadactylon</i> Larr. | 20 |
| 5.9.3 <i>Erythrina berteroana</i> Urb | 22 |
| 5.9.4 <i>Ternstroemia tepezapote</i> Schlect. & Cham. | 22 |
| 5.9.5 <i>Wigandia urens</i> (Ruiz & Pav.) Kunth <i>var caracasana</i> (Kunth) D. Gibson | 24 |
| 6. Objetivos | 25 |
| 7. Hipótesis | 26 |
| 8. Áreas a investigar | 27 |

| | |
|-----------------------------|----|
| 9. Materiales y métodos | 28 |
| 10. Resultados | 37 |
| 11. Discusión de resultados | 42 |
| 12. Conclusiones | 45 |
| 13. Referencias | 46 |
| 14. Anexos | 53 |

1. RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objeto de evaluar la actividad antioxidante de cinco especies vegetales popularmente usadas para afecciones nerviosas o de la memoria: *Brugmansia candida* Pers. (florifundia), *Chiranthodendron pentadactylon* Larr. (manita), *Erythrina berteroana* Urb. (palo de pito), *Ternstroemia tepezapote* Schlect. & Cham. (tila), y *Wigandia urens* (Ruiz & Pav.) Kunth var. *caracasana* (Kunth) D. Gibson (chocón). La determinación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de las

cinco especies se evaluó por el método de referencia basado en la oxidación del reactivo de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina); método utilizado únicamente para compuestos polares (Ravishankara *et al.*, 2002).

En una primera fase, todos los extractos presentaron actividad antioxidante por la prueba de DPPH, siendo las especies *Chiranthodendron pentadactylon* y *Brugmansia candida* las de mayor actividad.

En la segunda fase se montó el método y determinó de forma cualitativa la actividad antioxidante utilizando el método descrito por Muraina en el 2009. Este método utiliza como reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) (Muraina *et al.*, 2009). Con esta metodología se evidenció actividad antioxidante en cuatro especies vegetales (*Brugmansia candida*, *Chiranthodendron pentadactylon*, *Erythrina berteroana* y *Ternstroemia tepezapote*), tanto para el extracto diclorometánico como en el metanólico.

Por último se pretendió estandarización la metodología de MTT como una técnica cuantitativa, se buscó evaluar sus ventajas y desventajas sobre el método de referencia que utiliza DPPH. El método se estandarizó utilizando ácido gálico como antioxidante de referencia y llevando a cabo curvas de calibración con diluciones seriadas a partir de una concentración de 10 mg/mL. Sin embargo, se encontró que la curva de medición pierde linealidad a diluciones altas de ácido gálico, ya que la coloración desaparece, dando lugar a una interpretación errónea a altas concentraciones.

Por la técnica de cuantitativa de MTT se evaluaron tanto los extractos polares como apolares de las cinco especies, sin embargo los resultados de actividad antioxidante no son concluyentes, ya que no mostraron un punto de corte de actividad negativa incluso a muy altas diluciones (0.020 mg/mL); siendo una excepción a esto los extractos de *Wigandia urens* var. *caracasana* donde si se demostró ausencia de actividad a concentración de 10 mg/mL.

De los resultados obtenidos se puede decir que las especies estudiadas podrían contribuir a disminuir los riesgos de afecciones nerviosas o de la memoria por su actividad antioxidantes y que el método de cuantitativo de MTT no se puede comparar con el método cuantitativo de DPPH ya que algunos de los resultados no son concluyentes por la pérdida de linealidad de la metodología a altas diluciones. Además, el método de MTT (tanto cualitativo como cuantitativo) requiere de condiciones de esterilidad más estrictas y tiempo de incubación más prolongado.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas son afecciones que generalmente se encuentran en pacientes de la tercera edad, sin embargo pueden aparecer en diversas etapas de la vida. La más común es la enfermedad de Alzheimer en cuya fisiopatología se encuentra involucrada la formación placa amiloide, proceso donde existe una disminución del neurotransmisor acetilcolina por el aumento de la actividad de la acetilcolinesterasa y la presencia de radicales libres (Rubinsztein, 2006).

Los radicales libres son sustancias químicas reactivas que se producen durante el metabolismo normal, pero su acumulación se puede deber a factores como la disminución de antioxidantes fisiológicos (Grisham; McCord, 1986).

Los antioxidantes presentes en las especies vegetales pueden servir como tratamiento alternativo para la disminución de la sintomatología en los síndromes neurodegenerativo, al disminuir la cantidad de radicales libres lo que retarda la formación de la placa amiloide y por ende la pérdida de la memoria. Por lo anterior, en el presente estudio se evaluó la actividad antioxidante de los extractos diclorometánicos y metanólicos de cinco especies vegetales utilizadas popularmente por la población para afecciones relacionadas a la memoria y que están siendo evaluados por su actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa: *Brugmansia candida* Pers, *Chiranthodendron pentadactylon* Larr., *Erythrina berteroana* Urb., *Ternstroemia tepezapote* Schlect. & Cham., y *Wigandia urens* (Ruiz & Pav.) Kunth var. *caracasana* (Kunth) D. Gibson. Esta evaluación se realizó de forma cunitativa por el método de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina) en los extractos metanólicos y por la técnica cualitativa de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) para ambos extractos.

Se encontró por el método de referencia que todas las especies presentan actividad antioxidante, siendo el extracto metanólico de *Chiranthodendron pentadactylon* el de mayor actividad. El método cualitativo de MTT evidenció actividad antioxidante en las especies estudiadas con excepción de *Wigandia urens* var. *caracasana*.

También se estandarizó la metodología cuantitativa de la actividad antioxidante por el método de MTT, sin embargo no se pudo hacer una comparación de los resultados obtenidos con esta metodología y el método de referencia de DPPH, ya que la primera presentó resultados no concluyentes de actividad.

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Los síndromes neurodegenerativos son afecciones de la memoria y la conducta, de las cuales la forma más frecuente es la enfermedad de Alzheimer, que afecta principalmente a personas de la tercera edad. El principal factor involucrado en la enfermedad de Alzheimer es una deficiencia o disminución de los niveles de acetilcolina, sin embargo el incremento de las sustancias oxidativas contribuyen a la formación de la placa amiloide y degeneración de las funciones cerebrales (Hensley *et al.*, 1994). Las sustancias oxidativas son radicales que conducen a reacciones no controladas, resultando en daños oxidativos importantes en macromoléculas biológicas como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Halliwell, 1994). Las sustancias antioxidantes presentes en muchas especies vegetales pueden disminuir este daño producido por los radicales libres

El estudio de la actividad antioxidante de sustancias presentes en las especies vegetales se ha trabajado en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia desde 1996 por Velásquez y colaboradores (Bolaños, 2003, Calderón, 2007, Caballeros, 2001, Ramírez 2004). En el año 2007 se inicia con otro estudio por Cáceres y colaboradores, donde se evaluó la actividad antioxidante de especies medicinales como perseverantes de alimentos y desarrollo de nutricéuticos (Cáceres *et al.*, 2009). Actualmente en Guatemala no existen estudios de esta actividad asociados con la prevención de la formación de la placa amiloide y la mejora de afecciones relacionadas con la pérdida de la memoria.

En el presente estudio se evaluó la actividad antioxidante de cinco especies vegetales que se utilizan por la población guatemalteca en el tratamiento de afecciones nerviosas o de la memoria por el método cuantitativo de DPPH y el cualitativo de MTT; y se estandarizó la metodología cuantitativa utilizando MTT con el fin de comparar los resultados obtenidos con el método de DPPH.

4. JUSTIFICACIÓN

El presente estudio evaluó la actividad antioxidante de cinco especies vegetales las cuales se utilizan por la población para el tratamiento de distintas afecciones de la memoria.

La actividad antioxidante tiene una función importante en estos síndromes neurodegenerativos ya que contribuye a la disminución de radicales libres (especies químicas reactivas que degeneran las funciones cerebrales), los cuales se sabe que, aunque no son la principal causa de estas patologías, si están directamente involucrados en la fisiopatología de la enfermedad por su contribución a la formación de la placa amiloide (Hensley *et al.*, 1994).

La evaluación de la actividad antioxidante ha sido estudiada en Guatemala desde 1996 por Velásquez y colaboradores en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; desde el 2007 se está evaluando actividad en especies vegetales medicinales como perseverantes de alimentos y desarrollo de nutricoséuticos (Bolaños, 2003; Calderón, 2007; Caballeros, 2001; Ramírez 2004). A la fecha, no se ha evaluado esta actividad en plantas que se utilizan para mejorar la actividad cerebral, inhibir la formación de la placa amiloide y disminuir la pérdida de la memoria. Existen evidencias que ciertos componentes bioactivos presentes en extractos de plantas, pueden inducir mecanismos de neuroprotección, inmunomodulación o bien evitar el estrés oxidativo (Auroma *et al.*, 2003). Por tanto, es importante su evaluación con el fin de contar con opciones terapéuticas a partir de especies vegetales y contribuir a la validación de su uso popular.

En el estudio se determinó la actividad antioxidante por el método cuantitativo de referencia de DPPH y de forma cualitativa y cuantitativa con MTT, esto último con el fin de contar con otra metodología alternativa, ya que la de referencia es solo para compuestos polares.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Radicales libres

Las moléculas endógenas o exógenas que son receptoras de electrones (como es el caso del oxígeno) reaccionan fácilmente con radicales libres y se convierten ellas mismas en radicales; estas moléculas se conocen como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Grisham; McCord, 1986). Estos compuestos incluyen el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo ($\bullet OH$), los cuales inducen el daño oxidativo de biomoléculas (lípidos proteínas y ácidos nucleicos) (Halliwell, 1994); este daño eventualmente produce enfermedades degenerativas en humanos (Pincemail, 1995).

El daño producido por las especies reactivas de oxígeno es un proceso natural que no se puede evitar, ya que estos compuestos son producidos por el metabolismo normal del cuerpo y son importantes en funciones fisiológicas (por ejemplo por la actividad de la lipooxigenasa durante la formación de prostaglandinas o en reacciones fisicoquímicas). Debido a su alta reactividad, su acumulación produce daño que afecta la estructura celular y la integridad funcional (Ke *et al.*, 2004).

Tabla 1. Formación de ROS por la reducción del oxígeno molecular en la cadena de transporte de electrones

| Reacción de formación | Nombre del radical |
|---|-----------------------|
| $O_2 + e + H^+ \rightarrow HO_2$ | radical hidroperoxilo |
| $HO_2 \rightarrow H^+ + O_2^{\bullet-}$ | radical superóxido |
| $O_2^{\bullet-} + 2H^+ + e \rightarrow H_2O_2$ | peróxido de hidrógeno |
| $H_2O_2 + e \rightarrow OH^- + OH$ | radial hidroxilo |
| (v) $OH + e + H^+ \rightarrow H_2O$ | |
| $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow OH^- + OH + O_2$ | Reacción Haber–Weiss |
| $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow OH^- + OH + Fe^{3+}$ | Reacción de Fenton |

Fuente: Ke *et al.*, 2004

Desde hace aproximadamente 10 años, se ha incrementado el estudio de los polifenoles, sustancias que se encuentran en especies de origen vegetal, casi todos ellos poseen actividad antioxidante importante (Scalbert *et al.*, 2005).

La función principal de los polifenoles se encuentra asociada a la prevención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, como son los procesos degenerativos de la memoria (Robards; Antolovich, 1997). El grupo de polifenoles incluye los fenoles simples, ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinámicos, estilbenos, flavonoides y proantocianidinas (Wollenweber, 1993).

Los antioxidantes son entonces, compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas al terminar el inicio o la propagación de la cadena de reacciones de oxidación (Lindenschmidt *et al.*, 1986). Esta actividad antioxidante también se le atribuye a otras especies químicas diferentes a los polifenoles, como lo son las vitaminas, carotenoides, terpenos, alcaloides, flavonoides, lignanos, etc. (Liu; Ng, 2000).

5.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una condición causada por un desequilibrio entre la producción de oxígeno reactivo y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Este entorno reductor es preservado por las enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Desbalances en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ácido desoxiribonucleico (ADN) (Schafer; Buettner, 2001).

En el ser humano, el estrés oxidativo está involucrado en muchas enfermedades, como la aterosclerosis, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer y también puede ser importante en el envejecimiento. Sin embargo, las especies reactivas de oxígeno pueden resultar beneficiosas ya que son utilizadas por el sistema inmunitario como

un medio para atacar y matar a los patógenos. Las ROS son también utilizadas en la señalización celular (Lennon *et al.*, 1991).

5.3 Desórdenes neurodegenerativos y afecciones de la memoria

Neurodegeneración es el término generalizado para definir la pérdida progresiva de la estructura o función de las neuronas, incluyendo la muerte de las mismas (Rubinsztein, 2006).

Muchas enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Parkinson, Huntington y Alzheimer se producen como resultado de procesos oxidativos. El descubrimiento de similitudes en las fisiopatologías de estas enfermedades ofrece la esperanza de avances terapéuticos, ya que se podrían mejorar muchas de estas enfermedades de una forma simultánea. Entre las características fisiopatológicas de estas enfermedades neurodegenerativas se encuentran el ensamble de proteínas atípicas y la muerte celular inducida por el estrés oxidativo. La neurodegeneración por lo general es un proceso que aparece con la edad y que se caracteriza por desórdenes neurológicos que se manifiestan por daño de las neuronas, así como el deterioro severo y crónico de la memoria y el movimiento (Rubinsztein, 2006).

5.3.1 Enfermedad de Alzheimer (EA):

También llamada demencia senil de tipo Alzheimer (SDAT), es la forma más común de demencia. Es una enfermedad hasta el momento incurable y terminal. Fue descrita por primera vez por el psiquiatra y neuropatólogo alemán Alois Alzheimer en 1906 (Brookmeyer *et al.*, 1998).

En general se diagnostica en personas mayores de 65 años, aunque de forma menos frecuente puede presentarse en edades más tempranas (Berchtold; Cotman, 1998). Se estima que alrededor de 26.6 millones de personas en todo el mundo padecían esta enfermedad para el año 2006, y se cree que estos valores podrían cuadruplicarse en el 2050 (Brookmeyer *et al.*, 1998).

5.3.1.1 Estadios de la enfermedad

5.3.1.1.1 Pre demencia: Los primeros síntomas se confunden frecuentemente con síntomas relacionados al envejecimiento o el estrés. Las pruebas neuropsicológicas pueden revelar problemas cognitivos leves incluso hasta ocho años antes de que el paciente presente el cuadro clínico clásico de la enfermedad. Los primeros síntomas pueden afectar la mayoría de actividades de la vida diaria. El déficit más evidente es la pérdida de la memoria a corto plazo, así como la incapacidad para adquirir nueva información. También pueden presentarse problemas sutiles en la atención, planificación, flexibilidad, pensamiento abstracto o impedimentos en la memoria semántica (memoria de significados, las relaciones y el concepto) (Brookmeyer *et al.*, 1998).

5.3.1.1.2 Demencia moderada: los pacientes pueden realizar tareas con cierta independencia (como usar el baño), pero requieren asistencia en la realización de tareas más complejas (como ir al banco, pagar cuentas, etc.). Paulatinamente llega la pérdida de aptitudes como las de reconocer objetos y personas. Además, pueden manifestarse cambios de conducta como arranques violentos. Los problemas del lenguaje son cada vez más evidentes debido a la inhabilidad para recordar el vocabulario y las capacidades para leer y escribir empeoran progresivamente. Las secuencias motoras complejas se vuelven menos coordinadas. Durante esta fase, la memoria a largo plazo, que hasta ese momento permanecía intacta, se deteriora (Brookmeyer *et al.*, 1998).

5.3.1.1.3 Demencia avanzada: La enfermedad trae deterioro de masa muscular perdiéndose la movilidad, incapacidad de alimentarse a sí mismo e incontinencia. El lenguaje se torna severamente desorganizado llegándose a perder completamente (Brookmeyer *et al.*, 1998).

5.3.1.2 El estrés oxidativo en la enfermedad de Alzheimer

Existe evidencia de la relación entre la formación de placas β -amiloides, el estrés oxidativo y la neurotoxicidad que conforman la fisiopatología de la enfermedad. La formación de la placa amiloide y su proteína precursora se ve inducida por el sistema

generador de ROS catalizado por metales (hemoglobina, hemina o Fe^{2+} , en combinación con H_2O_2) (Hensley *et al.*, 1994).

Otro mecanismo involucrado es el aumento de la enzima acetilcolinesterasa, (enzima humana de que se encuentra en los tejidos nerviosos cuya función principal es hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina), la cual inhibe la transmisión sináptica del impulso nervioso (Soreq; Seimand, 2001).

5.3.1.3 Tratamiento

Los medicamentos utilizados como la galantamina y fitoestigmina tienen acción inhibitoria sobre la acetilcolinesterasa, sin embargo pueden presentar hepatotoxicidad por su uso a largo plazo. Además muchas de estas drogas no previenen ni revierten el daño producido. Por tanto, hay una constante búsqueda de nuevas drogas que produzcan con menor toxicidad y sean más eficaces en el tratamiento (Soreq; Seimand, 2001).

5.3.2 Enfermedad de Parkinson

Enfermedad degenerativa del sistema nervioso central producida por la pérdida de neuronas en la materia gris y la disfunción de los circuitos neuronales relacionados con el control de los movimientos corporales (Shapira *et al.*, 1992).

Los síntomas más típicos de la enfermedad son la bradicinesia (lentitud de los movimientos voluntarios), acinesia (ausencia de movimiento), la rigidez muscular y el temblor, si bien suelen coexistir otros síntomas tanto sensitivos como vegetativos, cognitivos y afectivos. Es un trastorno propio de personas de edad avanzada, aunque existen formas de inicio juvenil (Shapira *et al.*, 1992).

5.3.2.1 El estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson

La fisiopatología de la enfermedad incluye el proceso agresión específica y cambios asociados al envejecimiento.

Los mecanismos se deben a que las neuronas pierden la sustancia gris, el cual es un proceso de estrés oxidativo. El daño resultante de una sobreproducción de ROS, donde se excede la capacidad antioxidante del cerebro, se puede deber a:

- Aumento del depósito de hierro en la sustancia negra,
- disminución de la ferritina y el glutatión y
- defectos en la función de la cadena respiratoria (Shapira *et al.*, 1992).

5.3.3 Esclerosis lateral amiotrófica

También conocida como enfermedad de neurona motora (MND) o enfermedad de Lou Gehrig. Se caracteriza por una degeneración de las neuronas motoras de la corteza cerebral, médula espinal y el cerebro. Un 10% de los casos son de origen genético como consecuencia de un gen autosómico dominante, que produce una mutación del gen superóxido dismutasa (Barber *et al.*, 2006).

La debilidad muscular implica dificultad para caminar y la dificultad de coordinación en alguna de las extremidades (las manos, especialmente). La extensión de ese debilitamiento y de la parálisis del tronco termina por provocar problemas para masticar, tragar y respirar. Progresivamente, aparecen movimientos musculares anormales como fasciculaciones, espasmos, sacudidas, calambres, debilidad, pérdida de masa muscular o de peso corporal. No se ven afectadas las facultades intelectuales, órganos de los sentidos, esfínteres o función sexual (Barber *et al.*, 2006).

Existen algunos mecanismos propuestos por medio de los cuales actúan ciertos fármacos utilizados en el tratamiento de esta patología, dentro de los cuales se encuentra (Aggarwal; Cudkowicz, 2008):

5.3.3.1 Agentes antiexcitotóxicos (riluzole, gabapentin, topiramato)

5.3.3.2 Antioxidantes (vitamina E, glutatión, N-acetilcisteína, coenzima Q10, selegilino, topiramato)

5.3.3.3 Inmunomoduladores (gangliosido, interferon beta-1A, ciclofosfamida)

5.3.3.4 Reguladores de calcio (verapamil, nimodipina)

5.3.3.5 Metabolismo energético (monohidrato de creatina, coenzima Q10, L-treonina)

5.3.3.6 Factores tróficos (factor neutrofílico ciliar, factor derivado del cerebro, hormona liberadora de tirotropina)

5.3.3.7 Anti-apoptótico (omigapil, minociclina, pentoxifilina)

5.3.3.8 Antiinflamatorio (celecoxib, minociclina, pentoxifilina)

5.3.3.9 Parasimpatomimético (3,4-diaminopiridina, fitostigmina)

5.3.4 El estrés oxidativo en la enfermedad esclerosis lateral amiotrópica

A pesar que la esclerosis lateral amiotrópica es causada por defecto en un solo gen (mutaciones en la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa (SOD1)), la enfermedad es el resultado de una cascada compleja que implica la diafonía entre las neuronas motoras, las células glía y los músculo (Carri; Grignasch; Bendotti, 2006).

La pérdida del gen superóxido dismutasa produce la pérdida de las neuronas, disminución del transporte de glutamato y del antioxidante N-acetilcisteína. Este último predispone al daño por los radicales libres (Gurney *et al.*, 1994).

5.4 Vulnerabilidad del cerebro ante el estrés oxidativo (Ke *et al.*, 2004).

El cerebro constituye un órgano susceptible ante el daño producido por radicales libre debido a las siguientes características:

5.4.1 El cerebro que constituye únicamente un 2% del peso del cuerpo, consume el 50% del oxígeno total inspirado. El 5% del oxígeno consumido por las células se estima que se reduce a ROS, por lo tanto grandes cantidades de ROS se pueden generar en el cerebro comparado con otros tejidos que utilizan menos oxígeno.

5.4.2 El cerebro es rico en ácidos grasos poliinsaturados que son particularmente susceptibles al daño por ROS.

5.4.3 El líquido cefalorraquídeo contiene complejos de hierro y cobre de pequeño peso molecular, que catalizan la formación de radicales hidroxilos altamente reactivos. Es pobre en antioxidantes, transferrina y ceruloplasmina que normalmente bloquean la agregación de estos metales. La liberación de neurotransmisores excitatorios inducen una

cascada de reacciones en las membranas postsinápticas, dando como resultado la formación de ROS. Dependiendo de la densidad de las neuronas esto puede causar lesiones localizadas en el sistema nervioso.

5.4.4 La liberación de ROS durante la oxidación de la dopamina por la monoaminoxidasa en las terminaciones nerviosas de las neuronas dopaminérgicas puede producir un aumento del estrés oxidativo en ciertas regiones del cerebro, como la sustancia gris. Este mecanismo tiene un rol importante en la enfermedad de Parkinson

5.4.5 El óxido de nitrógeno (NO) es formado en las neuronas por la enzima óxido nítrico sintetasa, la cual está distribuida ampliamente en el cerebro y es activada por la calmodulina. La interacción del NO con el radical superóxido se cree que está implicada no solo en el metabolismo normal de las neuronas sino también en su degeneración.

5.4.6 El ácido ascórbico que puede actuar como un antioxidante, así como un prooxidante, está presente en elevadas concentraciones tanto en la materia gris como la materia blanca del cerebro. Actúa como prooxidante cuando el hierro libre de las regiones del cerebro aumenta durante la hemorragia intracerebral.

5.4.7 El cerebro contiene una menor proporción de catalasa y glutatión peroxidasa comparado con el hígado.

5.4.8 Un antioxidante endógeno producido por la glándula pineal llamado melatonina disminuye la cantidad de ROS, pero su concentración disminuye en forma marcada con la edad.

5.4.9 El daño neuronal por ROS tiende a ser acumulativo durante el tiempo.

La disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la disminución del metabolismo son elementos en común que conllevan al daño neurodegenerativo, incluyendo además el envejecimiento normal del cerebro (Jordan *et al.*, 2003).

5.5 Papel de los antioxidantes

Los antioxidantes endógenos o exógenos pueden reducir la concentración de ROS, al inhibir o retrasar la oxidación de las sustancias. Esto se puede llevar a cabo disminuyendo propiamente la concentración de los ROS o metales que catalizan la oxidación (Fe^{3+} , Cu^{2+} ,

etc.) o interferir con la cadena de reacciones que desencadenan la oxidación. También pueden actuar fortaleciendo el sistema de defensa antioxidante celular.

Los antioxidantes se clasifican de la siguiente forma, de acuerdo a su mecanismo de acción:

5.5.1 Actividad antioxidante enzimática: actúan específicamente sobre los ROS después de que se han formado y posteriormente los degradan:

5.5.2 Eliminación catalítica de las ROS por enzimas peroxidasas como la superóxido bismutasa, catalasas y peroxidasas

5.5.3 Actividad antioxidante preventiva: bloquean los promotores de secuenciación de la oxidación y la transición de metales como hierro y cobre.

5.5.4 Actividad de inhibición o interrupción de la reacción antioxidante: interfieren en la reacción al ser oxidados antes que los radicales libres disminuyendo de esta forma la energía disponible para la reacción (Murthy, 2001).

5.5.5 Compactación de las ROS por agentes de bajo peso molecular (incluyendo glutatión, α -cetoácidos, ácido lipoico y coenzima Q) o por moléculas obtenidas de la dieta (vitaminas C y E)

5.5.6 Protección de las biomoléculas por proteínas de choque térmico que actúan reparando o removiendo las proteínas dañadas (Siân *et al.*, 2006).

5.6 Estudios recientes sobre la actividad antioxidante de especies vegetales

De los estudios más recientes encontrados de actividad antioxidante destacan los siguientes:

En las hierbas medicinales y culinarias utilizadas en Noruega se demostró que la actividad antioxidante más potente se encuentra en *Origanum vulgare* L. (orégano), *Salvia* sp. (salvia), *Mentha x piperita* L. (menta), *Thymus vulgaris* L. (tomillo), *Melissa officinalis* L. (melisa) y *Eugenia caryophyllata* Thunb (clavo) (Dragland *et al.*, 2003) y ciertas especies de las familias Rosaceae, Ericaceae, Asteraceae y Punicaceae (Halvorsen *et al.*, 2002).

En un estudio de 104 vegetales, frutas, bebidas y aceites que se consumen en Italia se demostró la actividad antioxidante utilizando tres metodologías diferentes, donde la mejor actividad se encontró en espinaca, pimientos, espárragos y diversas bayas (Pellegrini *et al.*, 2003).

En diez especies medicinales de Portugal se encontró que *M. officinalis*, *Hypericum undulatum* Schousb. ex Willd, *Laurus nobilis* L. y *Lavandula pedunculata* L. poseen actividad antioxidante y son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (Ferreira *et al.*, 2006).

En 70 plantas medicinales usadas en Croacia la actividad antioxidante determinada por el método de reducción férrica y fenoles presentó valores sobresalientes la especie de *M. officinalis* (Katalinic *et al.*, 2006).

De acuerdo a la base de datos de fitoquímica USDA 2003 algunas especies vegetales con elevado contenido de antioxidantes son *Glicine max* L. (frijol de soya), *Camelia sinensis* L. (té), *Foeniculum vulgare* Mill (hinojo), orégano, *Allium cepa* L. (cebolla), *T. vulgaris*, *Myristica* sp. (nuez), *Psidium guajava* L. (guayaba), *Cocos nucifera* L. (coco) y otras especies menos conocidas (Suhaj, 2006).

5.7 Estudios de actividad antioxidante en Guatemala

Se ha investigado especies vegetales guatemaltecas en las Universidades de Salerno, Italia y Granada, España conjuntamente con la Universidad de San Carlos de Guatemala. Estos estudios se realizaron con el apoyo del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) y el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. También se ha evaluado la actividad antioxidante en trabajos de tesis *ad gradum*. Dentro de dichos estudios se pueden citar los siguientes

Sobre la estandarización de métodos de actividad antioxidante, uno de los primeros estudios de tesis *ad gradum* en Guatemala fue el de Caballeros en el 2001. En este estudio

se buscó la optimización de dos métodos para el tamizaje de la actividad antioxidante de extractos vegetales.

El extracto etanólico de pericón (*Tagetes lucida* L.) tienen actividad antioxidante superior al α -tocoferol, la cual se le atribuye a los flavonoles (Aquino *et al.*, 2002).

En cinco especies usadas en el Caribe guatemalteco para enfermedades infecciosas, tres de ellas: *Acalypha guatemalensis* Pax. et Hoffm., *Ocimum micranthum* Willd. y *Smilax spinosa* Mill. presentaron actividad significativa en modelos de antioxidación y peroxidación lipídica (Navarro *et al.*, 2003).

Se evaluaron jugos de fruta producidos industrialmente (que incluyó a 28 tipos diferentes) donde se determinó que tienen propiedades antioxidantes, lo cual no cambia con la presencia o ausencia de aditivos (Bolaños, 2003).

La raíz de *Valeriana prionophylla* Standl. demostró actividad antioxidante y vasorelajante (Piccinelli *et al.*, 2004).

Un estudio realizado sobre el efecto de la administración oral de extractos vegetales con actividad antioxidante, sobre los niveles sanguíneos de glutatión, peroxidasa en la rata demostró que el tratamiento dado a los dos grupos experimentales fue efectivo, ya que los valores de glutatión peroxidasa disminuyeron significativamente desde el día 14 para ambos tratamientos (Ramírez, 2004).

Se evaluó la actividad antioxidante de alimentos nativos guatemaltecos encontrando que *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn, *Lycianthes synanthera* (Sendtn.) Bitter, *Solanum americanum* Mill y *Solanum wendlandii* Hook. poseen actividad significativa (Salazar *et al.*, 2006).

En el 2007 se evaluó la actividad antioxidante total de jugo de naranja almacenado bajo distintas condiciones, donde se demostró que ésta se ve modificada por el tiempo de almacenamiento, los compuestos fenólicos totales son afectados por la temperatura de

almacenamiento y la vitamina C no sufre variaciones significativas por las condiciones de almacenamiento a las que se sometieron los jugos en este estudio. Aun así, los cambios observados no afectan significativamente las propiedades antioxidantes de los jugos analizados (Calderón, 2007).

Durante 2008 en el proyecto FODECYT 28-2007, se han estandarizando procedimientos macrométricos, micrométricos y por cromatografía en capa fina (TLC) para evaluar la actividad antioxidante de especies vegetales nativas (Cáceres *et al.*, 2009).

5.8 Metodologías de evaluación de la actividad antioxidante

Se han desarrollado una gran variedad de métodos para medir la inhibición de las ROS. Básicamente, se basan en la inhibición de estas especies por la presencia de compuestos antioxidantes.

Entre los métodos se incluye la utilización de radicales coloreados como el radical del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenziazolina-6-sulfonato (ABTS \bullet +) y el radical de 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPH \bullet) (Miller; Rice-Evans, 1997, Sánchez-Moreno *et al.*, 1998).

Debido al aumento en la demanda de información sobre la actividad antioxidante de las especies se requiere un método rápido y sensible.

5.8.1 Método por TLC: consiste en la aplicación de la muestra, estándar antioxidante ácido gálico y ácido ascórbico (1 mg/mL) en una placa cromatográfica de silica gel 60F₂₅₄ y dejarla correr en una solución saturada (acetato de etilo:ácido acético:ácido fórmico:agua). Los extractos con actividad antioxidante presentan decoloración del DPPH en las bandas respectivas.

5.8.2 Método colorimétrico con DPPH: es un radical libre utilizado para evaluar la actividad atrapadora de radicales de un compuesto o extracto vegetal (Ravishankara *et al.*, 2002). Se prepara una serie de tubos de reacción por ensayo, donde se coloca blanco del control y tampón de acetato (tubo 1), acetato y metanol (tubo 2), extracto de la muestra

(tubo 3), tampón de acetato, metanol, extracto y solución de DPPH (tubo 4). Se incuba a temperatura ambiente por 30 min. y posteriormente la absorbancia se lee en un espectrofotómetro (517 nm) contra el blanco de cada muestra. Se interpola el valor de CI_{50} , que es la concentración del extracto requerida para disminuir un 50% la absorbancia de DPPH (Lima, 2003).

5.8.3 Actividad reductora de Fe^{+3} a Fe^{+2} : Se utiliza el método descrito por Oyaizu en 1986, donde al extracto se le adiciona amortiguador de fosfatos y ferrocianuro de potasio. La mezcla se incuba durante 20 min. a $50^{\circ}C$ y se le agrega ácido tricloroacético. Se centrifuga y separa el sobrenadante. Las lecturas de absorbancia se determinan a 700 nm (Duh *et al.*, 1997).

5.8.4 Determinación de la actividad antioxidante en el sistema de emulsión del ácido linoléico: Se determina la actividad antioxidante como el grado de inhibición de la peroxidación del ácido linoléico. A una solución de dicho ácido y amortiguador de fosfatos se le agrega muestra de las especies vegetales en estudio. La mezcla es incubada a $40^{\circ}C$ y se mide en diferentes días el grado de oxidación. Los valores de absorbancia de la mezcla se leen a 500 nm para obtener el contenido de peroxidación. (Parras *et al.*, 2007).

5.3.1 Determinación de los compuestos fenólicos: Las muestras se preparan agregando agua, reactivo de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio (Na_2CO_3) y muestra. Se realiza la lectura espectrofotométrica de la absorbancia a 765 nm. Utilizando una curva patrón se calcula la concentración de compuestos fenólicos totales expresados como equivalentes de ácido gálico/g de peso seco (Lima, 2003).

5.9 Ficha técnica de las plantas en estudio

5.9.1 *Brugmansia candida* Pers

5.9.1.1 Familia: Solanaceae

5.9.1.2 Sinonimias: *Datura candida* (Pers.) Safford

5.9.1.3 Nombres vernáculos: florifundia, campana, floripondio, kampani (Quechí), kevapunta trompetero (Gentry; Standley, 1974).

5.9.1.4 Descripción botánica: Arbusto siempre verde de 2-4 m de altura con ramas suavemente pubescentes. Hojas alternas, ovadas, de 15-25 cm de longitud, de color verde grisáceo, tomentosos. Flores blancas, atrompetadas, colgantes, de 25-30 cm de longitud, muy fragantes durante la noche, cáliz corto, más o menos persistente. Fruto tipo cápsula de 7-10 cm de longitud, colgante, con numerosas semillas reniformes (Lillo; Sánchez, 2004).

5.9.1.5 Composición química: Los principales compuestos químicos son alcaloides tropanos como la hiosciamina, atropina y escopolamina. Las semillas y las flores son la principal fuente de estos alcaloides, sin embargo se pueden encontrar en toda la planta (Fonnegra; Botero, 2006).

5.9.1.6 Usos medicinales atribuidos: La infusión o la decocción de las hojas se usa en cataplasmas para aliviar los dolores reumáticos y artríticos. Su principal uso es como embriagante y alucinógeno. Todas las partes de la planta son altamente tóxicas y narcóticas (Fonnegra; Botero, 2006).

Es utilizada por los nativos de El Salvador en varios casos de problemas de memoria, se utilizan las flores para hacer una decocción. El género *Brugmansia* es conocido por sus alcaloides tropánicos que son tóxicos, por lo que el remedio deben ser tratados con la debida cautela (Adams; Gmünder; Hamburger, 2007).

5.9.2 *Chiranthodendron pentadactylon* Larr.

5.9.2.1 Familia: Sterculiaceae

5.9.2.2 Sinonimias: *Cheirostemon platanooides* Humb. & Bonpl., *C. platanooides* Baill (Cáceres, 1996).

5.9.2.3 Nombres vernáculos: Mano de león, Tayuyo, Canac, Q'anaq', Mano de mico, Árbol de las manitas, Majagua, mapasúchil (del Nahuatl macpal-xochitl que significa "flor de mano"), Cacpalxochitl, Papasuchil, Ranac, Palo de tayuco, Teyacua, Mapilxochitl, Mano de dragón, Palo de yaco (Cáceres, 1996).

5.9.2.4 Descripción botánica: Árbol grande, de 12-30 m de alto o más, tronco de 1-2 m de diámetro. Hojas palmatinervias largo pecioladas, más o menos ovado-redondeadas en su contorno, 12-30 cm de largo, subagudas a acuminadas, profundamente y estrechamente cordada en la base, superficialmente lobadas o subentereas, verde oscuro y glabrado arriba, densamente café-tomentoso abajo. Pedúnculos más cortos que el cáliz. Cáliz de 3.5-5cm de largo, café-tomentoso en la parte externa, glabro en la parte interna y de un color rojo oscuro encendido, con una gran estructura nectarífera en la base de cada lóbulo. La columna de estambres igualando el cáliz, sustentando en su ápice cinco largas ramas curvadas, estas prolongándose en puntas muy delgadas y ahusadas. La cápsula oblongo-elipsoide, muy dura y leñosa, 10-15 cm de largo, profundamente pentalobada, los ángulos estrechos y borde sin punta. Los arilos de las semillas son anaranjados (Standley; Steyemark, 1949).

5.9.2.5 Composición química: no hay información disponible.

5.9.2.6 Usos medicinales atribuidos: Se reporta que las flores son usadas por los indígenas para el tratamiento de úlceras crónicas, oftalmia, inflamación de los ojos y hemorroides. La flor de manita también se recomienda comúnmente para problemas del corazón, diarrea, disentería, nervios, epilepsia, inflamaciones en la piel (dermatitis), llagas, quemaduras, raspones. Las flores, corteza y hojas se usan en baños para tratar las hemorroides (Lemus, 1990, Linares *et al.*, 1998). Además se utiliza para dolor de cabeza, calmar los nervio y controlar la epilepsia (Morton, 1981).

A las flores y hojas se les atribuye propiedad analgésica, antiepiléptica, antiinflamatoria, antidontálgica, astringente, cardiotónica, catártica, diurética y emoliente (Niembro, 1990, Orellana, 1987).

5.9.3 *Erythrina berteroana* Urb

5.9.3.1 Familia: Fabaceae

5.9.3.2 Sinonimias: *Erythrina neglecta* Krukoff & Moldenke

5.9.3.3 Nombres vernáculos: Piñón del pito, búcare espinoso, piñón de cerca, pito, miche, coralillo (Guatemala), quilite (El Salvador), pitón (Honduras), elequeme (Nicaragua), poro de montaña (Costa Rica), gallito (Panamá), coralbean (Inglés). (Mena, 1994).

5.9.3.4 Descripción botánica: Árbol de hasta 8 m de altura, a menudo arbusto, con el tronco y las robustas ramas rodeadas de agudos agujones. Hojas lampiñas, pinnadamente tres foliadas. Foliolos aovados, 5-15 cm de largo. Rómbicos. Flores vistosas en racimos de 10-30 cm de largo. Rojo coral en forma de machete. Legumbre lineal, moniliforme de 11-28 cm de largo, 1-1.5 cm de ancho algo aplanada. Semillas color escarlata con una pequeña mancha negra (Standley; Steyermark, 1946).

5.9.3.5 Composición química: la raíz y la corteza contienen flavonoides, las hojas flavonoides y alcaloides. Tanto las hojas como las semillas contienen los alcaloides erisodina, erisopina, erisotiopina: la madera alí y beta eritroidina. (Soto-Hernández; Jackson, 1993, Chawla; Jackson, 1982, Hernández; Jackson, 1994)

5.9.3.6 Usos medicinales atribuidos: Las hojas y la corteza se utilizan por su acción como hipnótica, purgante y diurética (House *et al.*, 1995). Se ha descrito su uso etnomédico para el tratamiento de afecciones de la memoria (INN, 1978).

5.9.4 *Ternstroemia tepezapote* Schlect. & Cham.

5.9.4.1 Familia: Theaceae

5.9.4.2 Nombres vernáculos: Baratillo, trencillo, chucul, hualicuc, uixlilil-caax, pañol, chique, roble, river craboo, trompillo, hierba del cura, tilo, flor de tila, tila estrella, palo huaco (Martínez, 1992).

5.3.1.7 Partes usadas: Flores y frutos. Se emplean frescas o secas (Linares *et al.*, 1990).

5.9.4.3 Descripción botánica: Arbusto o árbol, algunas veces 15 m de alto, con un tronco de 15 cm o más de diámetro. Hojas oblongo-ovadas u oblongo-oblanceoladas, 7-13 cm de largo, principalmente 3-4 cm de ancho, obtusas o redondeadas en el ápice o algunas veces subagudo, cuneadas o atenuadas en la base, enteras o levemente crenuladas, los nervios inconspicuos en ambas superficies, algunas veces impresas arriba. Pedicelos 1.5-2.5 cm de largo, bractéolas dos, desiguales, ampliamente ovadas o suborbiculares, 2-3 mm de largo. Sépalos desiguales, los más externos suborbiculares, alrededor de 8 mm de largo, glandular-lenticulados, frecuentemente conspicuos o algo enteros, pétalos rosado-blancuzcos, lanceolados u ovados, 8 mm de largo, agudos, unidos hasta en la mitad de su longitud. Estambres cerca de 50 y 2-seriadas. Ovario bilocular, 4-5 ovulado, el estilo 6-7 mm de largo, el estigma puntiforme. Fruto cónico u ovoide cónico, 1-2 cm de largo, 1-1.5 cm de ancho en la base (Standley; Steyermark, 1952, Stevens *et al.*, 2001).

5.9.4.4 Usos medicinales atribuidos: La flora de Guatemala reporta que en Huehuetenango, la corteza de *T. tepezapote* se emplea como uno de los numerosos remedios para mordedura de serpientes (Standley; Steyermark, 1952). En Honduras se utiliza para los nervios e insomnio. (Alcorn, 1984). El cocimiento de *T. sylvatica* se utiliza como calmante de los nervios. Un uso más generalizado es para el tratamiento de enfermedades del corazón y los nervios. *T. pringlei* se usa para tratar los nervios y el insomnio. En Michoacán, México, se usa para el alivio de dolores reumáticos. En Jalisco, se recomienda contra la tos. Otras formas de preparación incluyen las hojas, que son aplicadas en baños (tópicos) (Linares *et al.*, 1990).

Se puede utilizar en combinación con otros ingredientes: El fruto de *Ternstroemia* spp. mezclado con toronjil morado (*Agastache mexicana* (Kunth.) Lint et Epling), toronjil blanco (*Agastache mexicana* spp. *xolocotziana*) y toronjil azul y chino (*Dracocephalum moldavica* L.), hinojo (*F. vulgare*), flor de manita (*C. pentadactylon*), flor de azahar (*Citrus* spp.), pasiflora (*Passiflora* spp.) y flor de plátano (*Musa x paradisiaca* L.) se utiliza para el tratamiento de enfermedades del corazón y de los nervios. Otra combinación utilizada para el tratamiento anterior es fruto de trompillo (*Ternstroemia* spp.), raíz de valeriana (*Valeriana* spp.), azahar (*Citrus* spp.), hinojo (*F. vulgare*) y los tres toronjiles. Dado que esta planta se considera de naturaleza caliente, se emplea con otras plantas de diferentes características para obtener compuestos templados para el tratamiento de enfermedades de los nervios y del corazón (Linares *et al.*, 1990).

5.9.5 *Wigandia urens* (Ruiz & Pav.) Kunth var. *caracasana* (Kunth) D. Gibson

5.9.5.1 Familia: Boraginaceae

5.9.5.2 Nombres comunes: Chichicaste, chocón, quemadora y ortiga (Standley *et al.*, 1973).

5.9.5.3 Descripción botánica: Arbusto de 2-5 m de alto, tallo herbáceo, con pelusilla blanca. Hojas alternas, tallo acanalado, 50-60 cm de largo, dentado en la base, agujas en el peciolo. Flores sésiles, moradas acampanadas de 1-2 cm de ancho. 5 estambres; cáliz persistente, hispido, estigma clava; ovarios ovoides sedosos, panículas terminales de 50-60 cm de largo. Cápsula oblongo-cónica, 8 mm de largo, bivalva. Semillas numerosas, pequeñas, rugosas, café. (Gibson, 1970).

5.9.5.4 Composición química: no hay información disponible

5.9.5.5 Usos medicinales atribuidos: La infusión de hojas y flores se usa para diarrea, inapetencia, indigestión, retención urinaria, reumatismo, nerviosismo y tos ferina (Aguilar, 1966, Díaz, 1976, Morton, 1981, INN, 1978). A la raíz se le atribuyen propiedades diuréticas, febrífugas y sudoríficas (Morton, 1981).

6. OBJETIVOS

6.1 General

Contribuir en la determinación de la actividad antioxidante de especies vegetales que se utilizan por la población guatemalteca para el tratamiento de enfermedades relacionadas con los nervios y la memoria.

6.2 Específicos

6.2.1 Medir la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de cinco especies vegetales por la técnica de referencia de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina).

6.2.2 Evaluar extractos metanólicos y diclorometánicos de las cinco especies por el método cualitativo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio).

6.2.3 Montar y validar la metodología cuantitativa para determinar la actividad antioxidante por técnica de MTT.

6.2.4 Comparar los resultados obtenidos tanto por la técnica de MTT como con el método de referencia de DPPH para determinar si ambos métodos son similares.

7. HIPÓTESIS

Al menos una especie vegetal posee actividad antioxidante en uno de sus extractos.

Los métodos de DPPH y MTT revelan resultados comparables entre sí.

8. AREA A INVESTIGAR

Estudio Farmacológico de actividad antioxidante *in silico* de extractos vegetales.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Universo

Plantas medicinales guatemaltecas utilizadas popularmente para afecciones relacionadas con los nervios y la memoria

9.2 Muestra

Extractos diclorometánicos y metanólicos de las especies

- *Brugmansia candida* (florifundia)
- *Chiranthodendron pentadactylon* (manita)
- *Erythrina berteroana* (piñon de pito)
- *Ternstroemia tepezapote* (tilo)
- *Wigandia urens* var. *caracasana* (chocón)

9.3 Diseño estadístico

Diseño de estudio no probabilístico por conveniencia, utilizando análisis de varianza (ANOVA), con un intervalo de confianza del 95% ($p=0.05$)

9.4 Repeticiones

Cada ensayo de la determinación de la actividad antioxidante se realizó por cuadruplicado.

La validación de la metodología se realizó mediante curvas de calibración en diferentes siete días y siete curvas en un solo día, haciendo un total de siete repeticiones de cada corrida.

9.5 Materiales

- Bolsas rojas para descarte
- Caja plástica horizontal para cámara húmeda
- Descartador de punzocortantes
- Espátulas

- Frascos ámbar con tapón de rosca de 100 mL
- Papel aluminio
- Papel mayordomo
- Pipetas automáticas de volumen variable
- Pizetas con agua destilada
- Placas de 96 pozos nuevas no estériles
- Puntas para pipetas de 10, 100 y 1000 μ L
- Recipiente plástico de descarte
- Recipiente plástico para pesar
- Tubos cónicos de 15 y 50 mL
- Vaso de precipitación

9.6 Reactivos

- Amortiguador PBS pH 7.5
- Diclorometano
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina)
- Etanol al 70%
- Metanol absoluto
- MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio)

9.7 Equipo

- Agitador de placas
- Autoclave
- Balanza analítica
- Balanza semianalítica
- Campana de flujo laminar
- Espectrofotómetro
- Incubadora a 37°C
- Refrigeradora a 5°C

9.8 Metodología

9.8.1 Obtención de extractos

Los extractos fueron proporcionados por el proyecto FODECYT 39-2008 (Evaluación de la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa por diez especies medicinales y aromáticas nativas como posible fuente para el tratamiento de afecciones de la memoria).

9.8.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH

Se utilizaron microplacas no estériles de 96 pozos de fondo plano preparadas bajo luz indirecta, tratando de proteger la reacción de la luz que puede degradar el reactivo.

- Con pipetas automáticas se prepararon la serie de pozos con muestra, metanol y solución de DPPH 500 μM .
- Se pesaron 100 g de cada extracto y diluyeron en 10 mL de metanol.
- Antes de realizar la curva de lectura de la actividad antioxidante, se realizó una lectura directa del extracto, de la siguiente forma:
 - Pozo 1, blanco control (50 μL de metanol)
 - Pozo 2, control, (150 μL de solución de DPPH);
 - Pozo 3, blanco ensayo 1, (50 μL de muestra);
 - Pozo 4, ensayo 1, (50 μL de muestra y 150 μL de solución de DPPH);
 - Pozo 5, blanco ensayo 2, (15 μL de muestra y 35 μL de metanol);
 - Pozo 6, ensayo 2, (15 μL de muestra, 35 μL de metanol y 150 μL de solución de DPPH).

| | | Muestra (μL) | Metanol (μL) | Solución de DPPH (500μM) |
|----------|---------------|---|---|---|
| | | Blanco Control | -- | 50 |
| | | Control | -- | 150 |
| A | Blanco | 50 | -- | -- |
| | Ensayo | 50 | -- | 150 |
| B | Blanco | 15 | 35 | -- |
| | Ensayo | 15 | 35 | 150 |

- El porcentaje de inhibición se calculó para que se encontrara entre el 70 y 10%; al obtener valores más altos se realizaron diluciones del extracto y se repitió nuevamente hasta obtener un porcentaje de inhibición adecuado,
- Luego se realizó la curva de lectura con la dilución que presentaba el porcentaje de inhibición adecuado.
- Calculo de porcentaje de inhibición:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{absorbancia del control} - \text{absorbancia del ensayo}}{\text{Absorbancia del control}} * 100.$$

Curva de lectura

- Se preparó una curva de lectura con 8 pozos de reacción utilizando para cada pozo el blanco respectivo.
- La muestra y reactivos para cada pozo siguieron las siguientes proporciones:
 - Pozo 1 50 µL de metanol
 - Pozo 2: 50 µL de DPPH
 - Pozo 3: 200 µL muestra
 - Pozo 4: 50 L de muestra y 150 µL de DPPH
 - Pozo 5: 180 µL de muestra, 20 µL de metanol
 - Pozo 6: 45 µL de muestra, 5 µL de metanol y 150 µL de solución de DPPH
 - Pozo 7: 160 µL de muestra y 20 de metanol
 - Pozo 8: 40 µL de muestra , 10 µL de metanol y 150 µL de solución de DPPH
 - Pozo 9: 140 µL de muestra y 60 µL de metanol
 - Pozo 10: 35 µL de muestra , 15 µL de metanol y 150 µL de DPPH
 - Pozo 11: 120 µL de muestra y 80 µL de metanol
 - Pozo 12: 30 µL de muestra, 20 µL de metanol y 150 µL de DPPH
 - Pozo 13: 100 µL de muestra y 100 µL de metanol
 - Pozo 14: 25 µL de muestra, 25 µL de metanol y 150 µL de DPPH
 - Pozo 15: 80 µL de muestra y 120 µL de metanol
 - Pozo 16: 20 µL de muestra, 30 µL de metanol y 150 µL de DPPH
 - Pozo 17: 60 µL de muestra y 140 µL de metanol
 - Pozo 18: 15 µL de muestra, 35 µL de metanol y 150 µL de DPPH

| | Pozo | Muestra (μL) | Metanol (μL) | Solución de DPPH (500μM) | Concentración aproximada |
|----------|---------------------------|--|--|--|-------------------------------------|
| | Blanco Control | --- | 200 | --- | ----- |
| | Control | --- | --- | 200 | |
| 1 | Blanco 1 | 200 | --- | --- | 1 |
| | Ensayo 1 | 50 | --- | 150 | |
| 2 | Blanco 2 | 180 | 20 | --- | 0.9 |
| | Ensayo 2 | 45 | 5 | 150 | |
| 3 | Blanco 3 | 160 | 40 | --- | 0.8 |
| | Ensayo 3 | 40 | 10 | 150 | |
| 4 | Blanco 4 | 140 | 60 | --- | 0.7 |
| | Ensayo 4 | 35 | 15 | 150 | |
| 5 | Blanco 5 | 120 | 80 | --- | 0.6 |
| | Ensayo 5 | 30 | 20 | 150 | |
| 6 | Blanco 6 | 100 | 100 | --- | 0.5 |
| | Ensayo 6 | 25 | 25 | 150 | |
| 7 | Blanco 7 | 80 | 120 | --- | 0.4 |
| | Ensayo 7 | 20 | 30 | 150 | |
| 8 | Blanco 8 | 60 | 140 | --- | 0.3 |
| | Ensayo 8 | 15 | 35 | 150 | |

- A cada pozo se le hizo el respectivo blanco el cual incluye la misma proporción de muestra y metanol.
- La placa se agitó con un agitador para placas durante 30 segundos e incubó temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 minutos.

- Las placas se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.
- El porcentaje de inhibición se calculó con los valores de % de inhibición de la curva de lectura (Y) y la concentración aproximada (X), se realizó un análisis de regresión lineal y el cálculo del valor de R^2 .
- Las curvas se repitieron hasta obtener un valor de R cercano a 1 (Lima, 2003).

Los valores de actividad antioxidante se obtuvieron al realizar los siguientes cálculos:

$$IC_{50}: \frac{50 \% - pendiente}{Intercepto}$$

mg de materia vegetal seca:

$$\frac{(Peso\ alícuota / ml\ reconstitución) * 1000 * IC_{50}}{1}$$

mg de extracto:

$$\frac{mg\ materia\ vegetal\ seca}{Dilución}$$

mg de extracto seco:

$$mg\ extracto - [(mg\ Extracto / 100) * \% Humedad]$$

9.8.3 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos por método cualitativo de MTT

- En un tubo cónico se pesaron 100 mg de cada uno de los extractos.
- Los extractos diclorometánicos se disolvieron previamente en 500 μ L de DMSO para facilitar la solubilidad.
- Se agregó un volumen hasta completar los 10 mL de solución con PBS.
- La concentración final de cada extracto fue de 10 mg/mL
- Se limpió la campana de la misma forma como se hizo en la estandarización de de la metodología.
- Agregar los reactivos en los pozos de la placa de la siguiente forma:
 - A1-H1: 200 μ L de PBS
 - A2-H2: 200 μ L de reactivo de MTT

- A3-H3: 150 μ L de ácido gálico (0.15625 mg/mL) y 50 μ L de MTT (control de cambio de coloración de MTT)
- A4-H4: 150 μ L de extracto (10 mg/mL) y 50 μ L de MTT
- Las placas se cubrieron con papel aluminio para evitar la oxidación por la luz.
- Se incubaron las placas a 37°C en cámara húmeda durante 2 horas.
- Las placas se leyeron de forma visual de la siguiente forma:
 - o Actividad positiva: ausencia de coloración morada
 - o Actividad negativa: coloración morada

9.8.4 Montaje y estandarización de la metodología por MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio)

- Se preparó una solución de ácido gálico en agua a una concentración de 10 mg/mL.
- La campana de flujo laminar se esterilizó, realizando una limpieza previa con alcohol al 70% y dejando luz ultravioleta durante 15 minutos.
- Colocar dentro de la campana la placa de 96 pozos, pipetas automáticas, puntas para pipetas (previamente autoclaveadas), plato para pesar y los tubos cónicos.
- Agregar los reactivos en los pozos de la placa de la siguiente forma:
 - o A1-H1: 200 μ L de PBS
 - o A2-H2: 200 μ L de reactivo de MTT
 - o A3-H3: 200 μ L de ácido gálico (10 mg/mL)
 - o A4-H4: 150 μ L de ácido gálico (10 mg/mL) y 50 μ L de MTT
 - o A5-H5: 150 μ L de ácido gálico (5 mg/mL) y 50 μ L de MTT
 - o A6-H6: 150 μ L de ácido gálico (2.5 mg/mL) y 50 μ L de MTT
 - o A7-H7: 150 μ L de ácido gálico (1.25 mg/mL) y 50 μ L de MTT
 - o A8-H8: 150 μ L de ácido gálico (0.625 mg/mL) y 50 μ L de MTT
 - o A9-H9: 150 μ L de ácido gálico (0.3125 mg/mL) y 50 μ L de MTT
 - o A10-H10: 150 μ L de ácido gálico (0.15625 mg/mL) y 50 μ L de MTT
- Las placas se cubrieron con papel aluminio para evitar la oxidación por la luz.
- Se incubaron las placas a 37°C en cámara húmeda durante 2 horas.
- Las placas se leyeron en un espectrofotómetro a 490 nm y un filtro diferencial de 630 nM.

- Se tomó como punto de corte los pozos en los cuales había desaparición de la coloración púrpura.

9.8.5 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos por método cuantitativo de MTT

- En un tubo cónico se pesaron 100 mg de cada uno de los extractos.
- Los extractos diclorometánicos se disolvieron previamente en 500 μ L de DMSO para facilitar la solubilidad.
- Se agregó un volumen hasta completar los 10 mL de solución con PBS.
- La concentración final de cada extracto fue de 10 mg/mL
- Se limpió la campana de la misma forma como se hizo en la estandarización de de la metodología.
- Agregar los reactivos en los pozos de la placa de la siguiente forma:
 - A1-H1: 200 μ L de PBS
 - A2-H2: 200 μ L de reactivo de MTT
 - A3-H3: 150 μ L de ácido gálico (0.15625 mg/mL) y 50 μ L de MTT (control de cambio de coloración de MTT)
 - A4-H4: 150 μ L de extracto (10 mg/mL) y 50 μ L de MTT
 - A5-H5: 150 μ L de extracto dilución 1:2 (5 mg/mL) y 50 μ L de MTT
 - A6-H6: 150 μ L de extracto dilución 1:4 (2.5 mg/mL) y 50 μ L de MTT
 - A7-H7: 150 μ L de extracto dilución 1:8 (1.25 mg/mL) y 50 μ L de MTT
 - A8-H8: 150 μ L de extracto dilución 1:16 (0.625 mg/mL) y 50 μ L de MTT
 - A9-H9: 150 μ L de extracto dilución 1:32 (0.3125 mg/mL) y 50 μ L de MTT
 - A10-H10: 150 μ L de extracto dilución 1:64 (0.15625 mg/mL) y 50 μ L de MTT.
 - A11-H11: 150 μ L de extracto dilución 1:128 (0.0781 mg/mL) y 50 μ L de MTT
 - A12-H12: 150 μ L de extracto dilución 1:128 (0.0781 mg/mL) y 50 μ L de MTT
- Las placas se cubrieron con papel aluminio para evitar la oxidación por la luz.
- Se incubaron las placas a 37°C en cámara húmeda durante 2 horas.
- Las placas se leyeron en un espectrofotómetro a 490 nm y filtro diferencial de 630 nm.

- Se tomó como punto de corte los pozos en los cuales había desaparición de la coloración púrpura.

9.8.6 Comparación entre metodología de DPPH y MTT

Los resultados se pretendían a analizar por medio de un análisis de varianza para precisión y exactitud, sin embargo debido a los resultados obtenidos no fue posible hacer la comparación.

10. RESULTADOS

10.1 Obtención de extractos

Los extractos fueron proporcionados por el proyecto FODECYT 39-2008, los cuales corresponden a las especies vegetales escogidas

En la Tabla 1, se describe el nombre común, la parte utilizada, el lugar de colecta y el número de herbario de cada una de las especies en el Herbario del Laboratorio de Productos Naturales Farmaya.

Tabla 1. Especies utilizadas en el estudio

| Especie | Nombre común | Parte utilizada | Lugar de colecta | No. Herbario | % Rendimiento |
|--|---------------------|------------------------|--|---------------------|----------------------|
| <i>Brugmansia candida</i> Pers | florifundia | Flor | Carretera Chimaltenango-Tecpán | 1,089 | |
| <i>Chiranthodendron pentadactylon</i> Larr. | manita | Flor | Ecoparcela el Kakahuatal, Samayac, Suchitepéquez | 1,088 | D: 0.570 M: 16.62 |
| <i>Erythrina berteroana</i> Urb. | piñon de pito | Corteza | Ecoparcela el Kakahuatal, Samayac, Suchitepéquez | 1,134 | |
| <i>Ternstroemia tepezapote</i> Schlect. & Cham. | tilo | Flor | Aldea San Ignacio, San Pedro Pinula, Jalapa | 1,108 | M: 1.184 D: 3.402 |
| <i>Wigandia urens</i> (Ruiz & Pav.) Kunth var. <i>caracasana</i> (Kunth) D. Gibson | chocón | Flor | Ecoparcela el Kakahuatal, Samayac, Suchitepéquez | 1,068 | |

No. De Herbario proporcionado por Farmaya, S.A.

D: extracto diclorometánico

M: extracto metanólico

10.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método de referencia de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina)

Los extractos metanólicos fueron evaluados utilizando para ello la metodología estándar de DPPH (Tabla 2). Se encontró actividad antioxidante en los cinco extractos metanólicos evaluados.

Tabla 2. Evaluación de la actividad antioxidante por el método de DPPH

| Planta | Peso Alícuota (g) | Volumen de reconstitución (mL) | Factor de dilución | Actividad antioxidante total (IC ₅₀) expresada como | | |
|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|--------------------|---|--------------|--------------|
| | | | | mg extracto seco* | Valor mínimo | Valor máximo |
| <i>B. candida</i> | 1.003 | 10 | 1:40 | 4.7130 ±0.1931 | 4.5199 | 4.9061 |
| <i>C. pentadactylon</i> | 1.006 | 10 | 1:45 | 7.018 ±0.6952 | 6.3228 | 7.7132 |
| <i>E. berteroana</i> | 1.002 | 10 | 1:5 | 8.0434 ±0.3904 | 6.653 | 9.4338 |
| <i>T. tepezapote</i> | 1.010 | 10 | 1:20 | 10.801 ±0.1510 | 10.6500 | 10.9514 |
| <i>W. urens var caracasana</i> | 1.006 | 10 | 1:5 | 1.8178±0.4021 | 1.4157 | 2.2199 |

*Promedio ± Desviación Estándar

Fuente: datos experimentales

10.3 Evaluación de la actividad antioxidante por el método cualitativo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio)

Se determinó la actividad antioxidante de forma cualitativa en los extractos diclorometánicos y metanólicos de las cinco especies de estudio. Se obtuvo resultados positivos en cuatro especies (*B. candida*, *C. pentadactylon*, *E. berteroana* y *W. urens var caracasana*) (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de actividad antioxidante por el método cualitativo de MTT

| Especie | Diclorometano | Metanol |
|--------------------------------|---------------|---------|
| <i>B. candida</i> | + | + |
| <i>C. pentadactylon</i> | + | + |
| <i>E. berteroana</i> | + | + |
| <i>T. tepezapote</i> | + | + |
| <i>W. urens var caracasana</i> | - | - |

(+): Actividad antioxidante positiva

(-): Actividad antioxidante negativa

Fuente: datos experimentales

10.4 Estandarización de la metodología antioxidante cuantitativa utilizando reactivo de MTT

En la Tabla 4 se presentan los resultados de promedio y desviación estándar las curvas de estandarización de la metodología utilizando reactivo de MTT durante siete días consecutivos y de siete curvas realizadas en un solo día.

En la dilución 1:32 (0.3125 mg/mL) se pierde nuevamente la coloración morada del reactivo (color que indica una actividad antioxidante negativa).

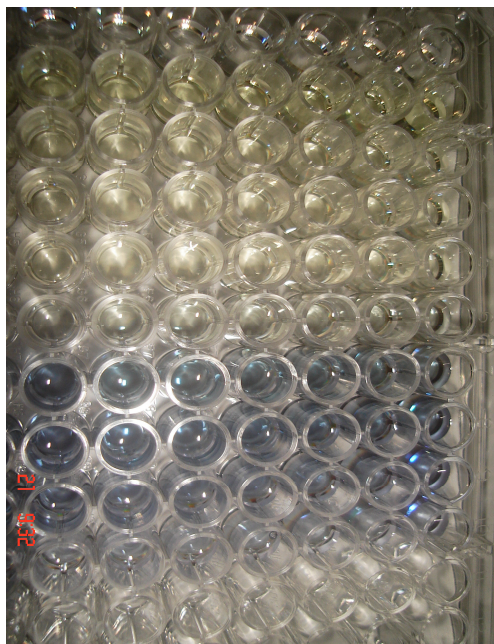
Tabla 4. Promedio y desviación estándar de las curvas de calibración con ácido gálico y MTT durante 7 días consecutivos y 7 curvas en 1 día

| Reactivo | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 | 7 Curvas | X | DS |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|--------|------|
| PBS | -0.010 | -0.002 | -0.001 | -0.025 | 0.003 | -0.025 | -0.004 | 0.001 | -0.008 | 0.01 |
| B1 MTT | 0.003 | 0.004 | 0.001 | 0.003 | -0.005 | 0.001 | 0.002 | 0.003 | 0.001 | 0.00 |
| B1 Ácido gálico | 0.008 | 0.008 | 0.006 | 0.008 | 0.006 | 0.006 | 0.005 | 0.187 | 0.029 | 0.06 |
| Ácido gálico + MTT | 0.005 | 0.006 | 0.005 | 0.005 | 0.002 | -0.003 | 0.007 | 0.093 | 0.015 | 0.03 |
| Dil 1:2 | -0.001 | -0.009 | -0.005 | 0.011 | 0.000 | 0.013 | -0.022 | 0.047 | 0.004 | 0.02 |
| Dil 1:4 | -0.060 | -0.111 | -0.043 | -0.062 | -0.061 | -0.043 | -0.050 | -0.022 | -0.056 | 0.03 |
| Dil 1:8 | -0.157 | -0.195 | -0.144 | -0.172 | -0.201 | -0.172 | -0.197 | -0.144 | -0.173 | 0.02 |
| Dil 1:16 | -0.207 | -0.250 | -0.167 | -0.220 | -0.225 | -0.219 | -0.229 | -0.176 | -0.211 | 0.03 |
| Dil 1:32 | -0.190 | -0.264 | -0.164 | -0.181 | -0.200 | -0.189 | -0.181 | -0.145 | -0.189 | 0.03 |

X: promedio

DS: desviación estándar

Fuente: datos experimentales

Fotografía 1. Reacción colorimétrica de cada uno de los pocillos de la curva

PBS
MTT
Blanco de ácido gálico
Acido gálico 10 mg/mL
Dilución 1:2
Dilución 1:4
Dilución 1:8
Dilución 1:16
Dilución 1:32
Dilución 1:64

10.5 Determinación de la actividad antioxidante por el método de MTT

Los resultados de la determinación de la actividad antioxidante se presentan en la tabla 5. De los diez extractos solamente se pudo evaluar la actividad negativa de los extractos diclorometánicos y metanólicos de *W. urens* var. *caracasana*, ya que el resto no se puede evaluar la misma.

Tabla 5. Determinación de la actividad antioxidante por el método de MTT

| Especie | Dicloromentano | Metanol |
|--|-----------------------|----------------|
| <i>B. candida</i> | No concluyente | No concluyente |
| <i>C. pentadactylon</i> | No concluyente | No concluyente |
| <i>E. berteroana</i> | No concluyente | No concluyente |
| <i>T. tepezapote</i> | No concluyente | No concluyente |
| <i>W. urens</i> var. <i>caracasana</i> | Negativo | Negativo |

Fuente: datos experimentales

10.6 Comparación de los resultados de ambas metodologías (DPPH y MTT cuantitativo).

La comparación entre los resultados obtenidos de ambas metodologías no se pudo realizar por medio de un análisis estadístico de ANOVA como estaba propuesto, ya que los resultados del método de MTT no fueron concluyentes en cuatro de las cinco especies evaluadas.

11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los extractos vegetales del estudio fueron proporcionados por el proyecto FODECYT 39-2008 (Cáceres *et al.*, 2009). Los extractos fueron flor de *Brugmansia candida*, flor de *Chiranthodendron pentadactylon*, corteza de *Erythrina berteroana*, flor de *Ternstroemia tepezapote* y flor de *Wigandia urens* var. *caracasana*. Estos extractos se prepararon por percolación haciendo una extracción fraccionada inicialmente con diclorometano y finalmente con metanol. Este tipo de extracción permite hacer una separación entre los metabolitos secundarios apolares y polares que contienen el extracto. El mensturo se concentró utilizando temperatura y presión reducida en el equipo de rotaevaporación hasta obtener un extracto seco, con el cual se trabajo la actividad antioxidante.

Los extractos se evaluaron mediante la metodología estándar para compuestos polares que utiliza el reactivo de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina). Este reactivo se caracteriza por poseer un electrón desapareado en su último orbital, el cual es un radical libre que se estabiliza por resonancia. Debido a esta propiedad, el DPPH se utiliza como una molécula idónea para determinar el poder antioxidante de una sustancia basándose en la captura de radicales libres presentes (Stashenko *et al.* 2003)

Se utilizó la metodología micrométrica estandarizada, donde los resultados se expresan en base al valor de IC₅₀, el cual indica la cantidad de extracto seco que puede disminuir el 50 % del color de una solución del radical libre DPPH; a medida que los valores son menores (diluciones más altas) mayor es la capacidad antioxidante del extracto.

Los resultados de actividad antioxidante por esta metodología demostraron mayores capacidad antioxidante en los extractos de *Chiranthodendron pentadactylon* (flor) seguido de *Brugmansia candia* (flor) y *Ternstroemia tepezapote* (flor). Sin embargo, los cinco extractos evaluados demostraron inhibición de la coloración del reactivo. Los extractos de menor actividad fueron *Erythrina berteroana* (corteza) y *Wigandia urens* var. *caracasana* (corteza).

También se evaluaron los dos tipos de extracto de las cinco especies de forma cualitativa utilizando el método descrito por Muraina y colaboradores, que utiliza el reactivo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) (Muraina *et al*, 2009). Se encontró que cuatro especies presentan actividad antioxidante en sus dos extractos, siendo los únicos negativos los extractos de *Wigandia urens* var *caracasana*.

Durante el estudio se montó y estandarizó una metodología alternativa al método de referencia (método de DPPH) basada en la inhibición de la oxidación del reactivo de MTT y la determinación cuantitativa de la actividad antioxidante. Se utilizó como reactivo antioxidante ácido gálico a diferentes concentraciones.

El método se estandarizó realizando una curva de calibración en siete diferentes días y siete curvas en un solo día. La concentración inicial de ácido gálico fue de 10 mg/mL hasta una concentración de 0.15625 mg/mL. Se encontró que después de 0.3125 mg/mL la coloración del MTT desaparecía nuevamente disminuyendo primero su intensidad y en las concentraciones más pequeñas desapareciendo totalmente. Lo anterior puede sugerir que el método no tiene un comportamiento lineal, lo cual dificulta la lectura de compuestos o extractos con concentraciones altas de actividad antioxidante ya que no pueden ser detectadas por el cambio de coloración a este punto de corte. Se buscó la estandarización de este método ya que el reactivo de MTT es ampliamente utilizado por su facilidad de detección ya que la coloración producida es muy evidente, además que ha utilizado como una técnica viable en la automatización de pruebas.

De las cinco especies vegetales estudiadas se evaluaron tanto extractos diclorometánicos como metanólicos por el método cuantitativo de MTT. De los resultados obtenidos solamente en los extractos de *W. urens* var *caracasana* se evidenció la coloración púrpura del MTT, lo que indica que no tienen actividad antioxidante a una concentración igual o menor a los 10 mg/mL (punto de corte), pero que si es posible detectar con este método la actividad antioxidante. En el resto de extractos no se puede concluir si tiene o no actividad a una concentración de 10 mg/mL.

Se podría realizar una determinación de la actividad antioxidante en extractos acuosos ya que según la metodología descrita en el estudio de Muraina del 2009, si se encontró actividad en este tipo de extractos. De ser válida en este caso la metodología podría utilizarse de forma cuantificable por espectrofotometría utilizando una curva de calibración a base de ácido gálico u otro antioxidante comercial.

Los resultados obtenidos en ambas técnicas cuantitativas (DPPH y MTT) no se pudieron comparar ya que los resultados de esta última no fueron concluyentes.

Al comparar ambas la factibilidad de realización de ambas metodologías, el método de DPPH es un método más simple en su realización comparada con el MTT, ya que el primero requiere de un tiempo de incubación únicamente de 30 minutos y el segundo necesita de 2 horas, lo que prolonga el tiempo de obtención de resultados. Además el método de MTT necesita condiciones de esterilidad más rigurosos, ya que una contaminación microbiana en el material utilizado o en las soluciones de extractos pueden dar resultados falsos positivos, ya que el reactivo de MTT vira en presencia de metabolismo bacteriano activo. La contaminación en este estudio se minimizó filtrando las soluciones de extracto con filtros de 0.2 μm y esterilizando todo el material así como el área de trabajo. Estas condiciones hacen más difícil y laborioso la metodología. Cabe mencionar también que se requiere incubación a 37°C, lo que no es necesario en DPPH.

12. CONCLUSIONES

1. Las cinco extractos metanólicos de las especies en estudio presentaron actividad antioxidante por el método de DPPH, donde se encontró que la flor de *Chiranthodendron pentadactylon* tiene la mayor actividad.
2. Los resultados de actividad antioxidante por el método cualitativo de MTT demostraron actividad positiva en ambos extractos las especies de *Brugmansia candida*, *Chiranthodendron pentadactylon*, *Erythrina berteroana* y *Ternstroemia tepezapote*.
3. Se estandarizó la metodología de antioxidante basada en la inhibición de la oxidación del reactivo de MTT utilizando ácido gálico como compuesto antioxidante.
4. El método cuantitativo de MTT pierde la coloración a diluciones altas de los compuestos, lo que dificulta la interpretación de resultados, ya que no se puede discriminar entre un resultado positivo o uno no concluyente.
5. No se pueden comparar los resultados de actividad antioxidante por los métodos de MTT y DPPH ya que con el primero no se puede concluir la actividad en ciertos casos.

13. REFERENCIAS

- Adams, M; Gmünder, F; Hamburger, M. 2007. Plants traditionally used in age related brain disorders - A survey of ethnobotanical literature. *J. Ethnopharmacol.* 113:363-381.
- Aggarwal, S; Cudkowicz, M. 2008. ALS Drug Development: Reflections from the Past and a Way Forward. *Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics.* 5: 516–527
- Aguilar, JI. 1966. Relación de unos aspectos de la flora útil de Guatemala. GT. Ministerio de Agricultura. 348-375 p.
- Alcorn, JB. 1984. Huastec Mayan Ethnobotany. University of Texas Press, Austin. US. 982 p.
- Aquino, R *et al.* 2002. An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. *Journal of Natural Products.* 65:1773-1776.
- Auroma, OI; Baborun, T; Jen, LS. 2003. Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Rev. Mutat. Res.* 544:203-215.
- Barber, S; Mead, R; Shaw P. 2006. Oxidative stress in ALS: A mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta* 1762:1051–1067
- Berchtold, NC; Cotman, CW. 1998. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960's. *Neurobiology Aging.* 19(3):173-89.
- Bolaños, BP. 2003. Determinación de las propiedades antioxidantes de los jugos de fruta producidos industrialmente disponibles para su consumo en el área metropolitana de la Ciudad de Guatemala. Tesis Químico Biólogo. Guatemala, GT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. 65 p.
- Brookmeyer, R *et al.* 1998. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Journal of Public Health.* 88(9): 1337-42.
- Brugmansia candida*. Disponible en <http://images.search.yahoo.com/images/>. Fecha de consulta 15 de julio de 2009.

- Caballeros K. 2001. Optimización de dos métodos para el tamizaje de la actividad antioxidante de extractos vegetales. Tesis Químico Biólogo. Guatemala, GT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. 54 p.
- Cáceres, A *et al.* 2009. Actividad antioxidante de doce especies nativas como posibles preservantes de alimentos y fuente para el desarrollo de nutracéuticos. Proyecto FODECYT 28-2007.
- Cáceres, A. 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria Dirección General de Extensión, Universidad de San Carlos de Guatemala. GT. 239p.
- Cáceres, A; Samayoa, B. 1989. Tamizaje de la actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Cuaderno de investigación. GT. Dirección general de Investigación. Universidad de San Carlos de Guatemala. no. 6-89.138 p.
- Calderón P. 2007. Determinación de las propiedades antioxidantes de jugos de naranja comerciales sometidos a distintas condiciones de almacenamiento. Tesis Químico Farmacéutico. Guatemala, GT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. 61 p.
- Carrí MT; Grignaschi, G; Bendotti, C. 2006. Targets in ALS: designing multidrug therapies. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 27:267-273.
- Chawla, As; Jackson, AH. 1982. Erythrina Alkaloids: Isolation and Characterization of Alkaloids from Erythrina bertenosana Seeds and Leaves. Foration of Oxoerythroidines. Ludgate, P; *Journal of Chemical Society Perkin Transactions*. 6:2903-2907.
- Díaz, JL. 1976. Uso de las plantas medicinales de México. MX. Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales. 320 p.
- Dragland, S *et al.* 2003. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *Journal of Nutrition*. 133:1286-1290.
- Duh, PD *et al.* 1997. Antioxidant activity of Mung Ben Hulls. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 74:1059-1063.

- Erythrina berteriana* Urb. Disponible en http://herbaria.plants.ox.ac.uk/adc/downloads/capitulos_especies_y_anexos/erythrina_berteroana.pdf. Fecha de consulta 15 de julio de 2009
- Ferreira, A *et al.* 2006. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*. 108:31-37.
- Fletes, L. 1990. Confirmación de la acción antibacteriana in vitro de cuatro plantas de la flora silvestre guatemalteca. Lic. en Química Biológica. Guatemala, GT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. 75 p.
- Fonnegra, R; Botero, H. 2006. Plantas Mágico-Religiosas: Historias, Mitos y Leyendas. Colección Autores Antioqueños No. 141. Secretaría de Educación para la Cultura de Antioquia, Dirección de Fomento a la Cultura, Imprenta Departamental, Medellín.
- Gentry, J; Standley P. 1974. Flora of Guatemala, Chicago Natural History Museum Press. *Fieldiana Botany*. 24:38-40.
- Gibson, D. 1970. Verbanaceae. Flora of Guatemala. *Fieldiana Botany*. 24:109-111, 202-215.
- Grisham, M; McCord, J. 1986. Chemistry and cytotoxicities of reactive oxygen metabolites. *Biology of oxygen radicals*. American Physiological Society. 1-18 p.
- Gurney, ME *et al.* 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 264:1772-1775.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet*. 344:721-724.
- Halvorsen, BL *et al.* 2002. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal of Nutrition*. 132:461-471.
- Hensley, K *et al.* 1994. A model for β -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Science*. 91:3270-3274.
- Hernández, MS; Jackson, AH. 1994. Erythrina alkaloids isolation and characterization from seven Erythrina species. *Planta Medica*. 60:175-177.
- House, P *et al.* 1995. Plantas Medicinales Comunes de Honduras. Tegucigalpa, HN. Litografía López S. de R.L. 555 p.

- IIN. 1978. Aspectos de la medicina popular en el área rural de Guatemala. Guatemala Indígena 13:1-617.
- Jordan, J *et al.* 2003. Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. *Journal of Physiology Biochemistry*. 59:129-141.
- Katalinic, V *et al.* 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts from antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94, 550-557.
- Ke, C *et al.* 2004. Role of oxidative stress in neurodegeneration: Recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Phytopharmacology & Biological Psychiatry*. 28:771-799.
- Lemus, M. 1990. Evaluación de la actividad diurética *in vivo* de *Chiranthodendron pentadactylon* Larreategui (manita) distribuida por centros naturistas de la ciudad de Guatemala. Tesis Químico Farmacéutico. Guatemala, GT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Lennon, S; Martin, S; Cotter, T. 1991. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 24: 203-14.
- Lillo, A; Sánchez, M. 2004. Árboles en España: Manual de identificación. Mundi-Prensa Libros, Madrid, ES. 652 p.
- Lima, S. 2003. Evaluación de distintos solventes para el proceso de extracción en la determinación de la actividad antioxidante de quilete (*Solanum americanum*) y mamey (*Mammea americana*). Tesis Lic. en Química Biológica. Guatemala, GT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. 53 p.
- Linares, E *et al.* 1990. Teses curativos de México. Instituto de Biología. UNAM. 140p.
- Linares, E *et al.* 1998. Selección de plantas medicinales de México. Editorial LIMUSA. MX. 125p.
- Lindenschmidt, R *et al.* 1986. The effect of dietary butylated hydroxyl toluene on liver and colon tumor development on mice. *Journal of Toxicology*. 38:151-160.
- Liu, F; Ng, T. 2000. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Science*. 66:725-735.
- Martínez, M. 1992. Las plantas medicinales de México. 6 ed. México Distrito Federal, MX. Ediciones Botas. 656 p.

- Mena, G. 1994. Obtención y aprovechamiento de extractos *vegetales* de la flora salvadoreña. San Salvador, SV. Editorial Universitaria. 559 p.
- Miller, N; Rice-Evans, C. 1997. Factors influencing the antioxidant activity determined by ABTS radical cation assay. *Free Radical Research*. 26:195-199.
- Morton, J. 1981. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Charles C Thomas. US. 1420 p.
- Muraina, I *et al.* 2009. Can MTT be used to quantify the antioxidant activity of plants extracts. *Phytomedicine*. 16: 665-668.
- Murthy, MRV. 2001. Coenzyme Q and related isoprenoid compounds: biosynthesis regulation, functions and biomedical implications. Prominet Press Arizona 237-260.
- Navarro, MC *et al.* 2003. Antibacterial, antiprotozoal and antioxidant activity of five plants used in Izabal for infectious diseases. *Phytotherapy research*. 17:325-329.
- Niembro, A. 1990. Árboles y arbustos útiles de México. MX. Editorial LIMUSA. 206 p.
- Orellana, SL. 1987. Indian Medicine in Highland Guatemala. Albuquerque, New Mexico Press. 308 p.
- Parras, MDP *et al.* 2007. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chemistry*. 102:582-592.
- Pellegrini, N *et al.* 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition*. 133:2812-2819.
- Piccinelli, AL *et al.* 2004. New lignans from the roots of *Valeriana prionophylla* with anti-oxidative and vaso-relaxant activities. *Journal of Natural Products*. 67:1136-1140.
- Pincemail, J. 1995. Free radical and antioxidants in human diseases. *Berlin*. 83-98.
- Ramírez IM. 2004. Efecto de la administración oral de extractos vegetales con actividad antioxidante, sobre los niveles sanguíneos de glutatión peroxidasa en la rata. Tesis Químico Biólogo. Guatemala, GT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. 63 p.
- Re, R *et al.* 1998. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay PII S0891-5849: 00315-3
- Robards, K; Antolovich, M. 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *Analyst*. 122:11-34

- Rubinsztein, DC. 2006. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*. 443(7113):780–786.
- Sánchez-Moreno, C *et al.* 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Science Food Agriculture*. 76:270-276.
- Scalbert, A *et al.* 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 45:287-306.
- Schafer, F; Buettner, G. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*. 11: 1191-212.
- Shapira, AHV *et al.* 1992. Mitochondrial function in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*. 32:116-124.
- Soreq, H; Seidman, S. 2001. Acetylcholinesterase, new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci*. 2:294-302
- Soto-Hernández, M; Jackson, AH. 1993. Studies of alkaloids in foliage of *Erithrina berteniana* and *E. poeppigiana*. Detection of Beta- Erythroidine in Foats Milk. *Phytochemical analysis*. 43:97-99.
- Standley, PC; Steyemark, JA. 1946. Flora of Guatemala. Chicago Natural History Museum. *Fieldiana: Botany*. 24(5):522
- Standley, PC; Steyemark, JA. 1949. Flora of Guatemala. Chicago Natural History Museum. *Fieldiana: Botany* 24(6):408-409.
- Standley, PC; Steyemark, JA. 1952. Flora of Guatemala. Chicago Natural History Museum. *Fieldiana: Botany* 24(7): 34-36.
- Stashenko, E *et al.* 2003. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in Vitro de los metabolitos secundarios volátiles de las plantas de la Familia Verbenaceae. *Revista Académica Colombiana*.
- Stevens, WD *et al.* 2001. Flora de Nicaragua. Missouri, US. Missouri Botanical Garden Press. (3):2510.
- Suhaj, M. 2006. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19:531-537.
- Wigandia urens* (Ruiz & Pav.) Kunth var. *caracasana* (Kunth) D. Gibson. Disponible en <http://www.zimbabweflora.co.zw/cult/imagedisplay.php>

Wollenweber, E. 1993. Flavones and flavonols. In J.B. Harbone (Ed). The flavonoids advances in research since 1986. London, UK. Chapman & Hall. 259-235 p.

14. ANEXOS

Anexo 1. Plantas del estudio

Brugmansia candida Pers

(Florifundia)



Fotografía. Licda. María Eugenia Paredes

Chiranthodendron pentadactylon Larr.

(Manita)



Fotografía. Luis Álvarez

Erythrina berteroana Urb.

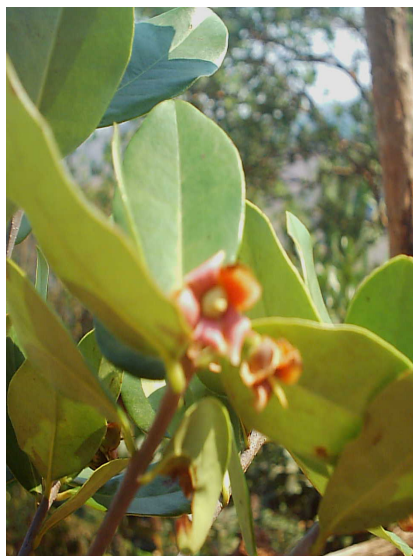
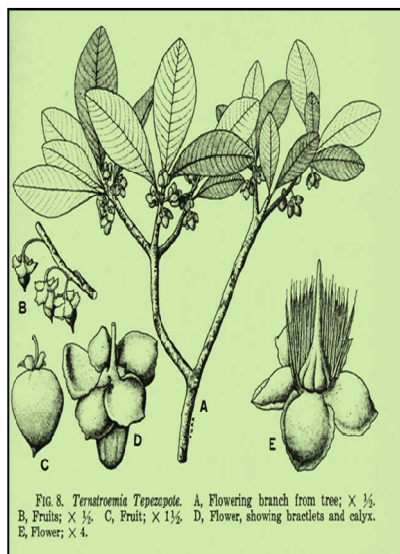
(Pito)



Fotografía. autor

Ternstroemia tepezapote Schlect. & Cham.

(Tilo)

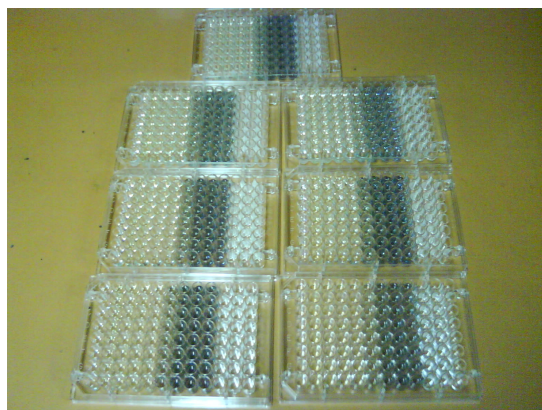


Fotografía. Luis Álvarez

Wigandia urens (Ruiz & Pav.) Kunth var. *caracasana* (Kunth) D. Gibson
(Chocón)



Fotografía Bart Wursten College Rd, Harare

Anexo 2. Metodología de actividad antioxidante con MTT

Curvas de calibración con ácido gálico

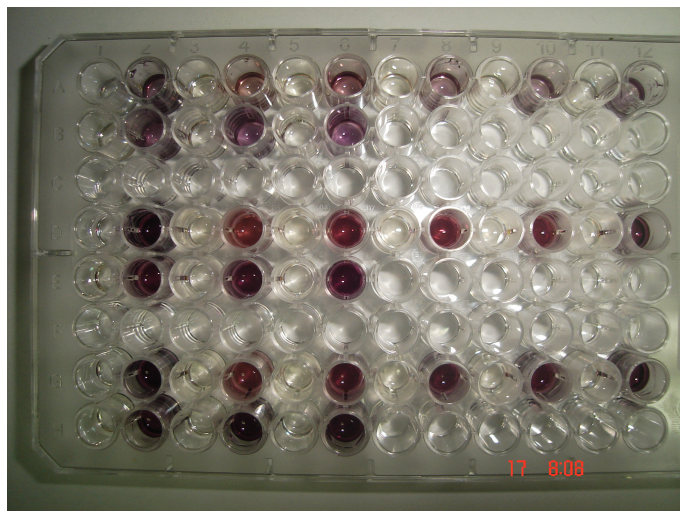


Resultado no concluyente



Resultado negativo

Anexo 3. Metodología de actividad antioxidante con DPPH



Curva de actividad a distintas concentraciones

Licda. Isabel Cristina Gaitán Fernández
AUTORA

Lic. Armando Cáceres Estrada
ASESOR

Ing. Arg. José Vicente Martínez Arévalo
REVISOR

M.A. María Eugenia Paredes Sánchez
REVISORA

Licda. Anne Marie Liere de Godoy, MSc.
DIRECTORA

Oscar Manuel Cobar Pinto, PhD
DECANO