

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS

**ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y ANTIOXIDANTE DE
LAS ESPECIES *Barkleyanthus salicifolius* Kunth y
Penstemon gentianoides H.B.K.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORADO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. MARIANA DOMÍNGUEZ LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CARLOS LEONARDO ARMANDO CÉSPEDES ACUÑA

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 2 del Edificio C del Instituto de Química de la UNAM, bajo la tutoría del Dr. Carlos Leonardo A. Céspedes Acuña y la asesoría de la Dra. Rocio Cruz Ortega y el Dr. Ricardo Reyes Chilpa.

Agradezco a CONACYT el apoyo de beca No. 173018 otorgada para la realización de este trabajo. Agradezco también al programa de intercambio académico TIES la beca otorgada durante las estancias de investigación realizada en la Universidad de Illinois Urbana en laboratorio de la Dra. Elizabeth Jeffery.

Agradecimientos

Agradezco profundamente al Dr. Carlos Céspedes Acuña la dirección de este trabajo. Muchas gracias por toda la confianza que depositó en mí y por haberme alentado a superarme profesionalmente.

Mi más sincera gratitud a la Dra. Rocío Cruz Ortega y al Dr. Ricardo Reyes Chilpa, miembros del comité Tutorial por el apoyo, guía y los aportes dados para el enriquecimiento de este trabajo. Muchas gracias por el tiempo que me proporcionaron.

Muchas gracias al Dr. Manuel Jiménez Estrada por el tiempo y las aportaciones dadas al trabajo, cuando formó parte del comité tutorial.

A los miembros del Jurado, Dra. Ana Luisa Anaya Lang, Dra. Rocío Cruz Ortega, Dr. Eduardo Gracia Zepeda, Dr. José Pedraza Chaverri, Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte y Dr. Manuel Jiménez Estrada, por las observaciones y las propuestas realizadas.

Al personal técnico del Instituto de Química, M. en C. Antonio Nieto Camacho y la M. en C. Teresa Ramírez Apan, por su apoyo y consejo en la realización de los ensayos de actividad biológica. A la M. en C. Elizabeth Huerta, M. en C. Angeles Peña y la Dra. Beatriz Quiroz por el apoyo en la realización de los experimentos de RMN H¹ y RMN C¹³,

ÍNDICE

ÍNDICE	i
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABLAS	xiii
1. PROLOGO	1
2. INTRODUCCIÓN	
2.1 Inflamación.....	2
2.1.1 Tipos de inflamación.....	3
2.1.2 Inflamación aguda.....	3
2.1.3 Inflamación crónica.....	4
2.1.4 Mediadores moleculares involucrados en la inflamación.....	5
2.1.5 Mediadores celulares involucrados en la inflamación.....	5
2.1.5.a Neutrófilos.....	6
2.1.5.b Monocitos y Macrófagos.....	7
2.1.7 Enzimas involucradas en la inflamación.....	8
2.1.7.a Fosfolipasa A ₂ (PLA ₂).....	8
2.1.7.b Ciclooxygenasa-2 (COX-2).....	8
2.1.7 c Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).....	10
2.1.8 Factor Nuclear kappa B (NF-κB).....	11
2.1.9 Especies reactivas oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) en el proceso inflamatorio.....	14
2.2 Generación de ERO y ERN en sistemas biológicos.....	16
2.3 Compuestos provenientes de plantas con actividad anti-inflamatoria y antioxidante.....	19
2.3.1 Flavonoides.....	21

2.3.2 Triterpenos pentacíclicos.....	23
2.3.3 Iridoides.....	25
2.3.4 Fenilpropanoides.....	27
2.4. Especies vegetales.....	30
2.4.1 <i>Barkleyanthus salicifolius</i>	30
2.4.2 <i>Penstemon gentianoides</i>	32
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
4. HIPÓTESIS.....	34
5. OBJETIVO GENERAL.....	34
6.1 Objetivos particulares.....	34
6. MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1 Material Vegetal.....	36
6.2 Extractos Vegetales.....	37
6.3 Actividad antioxidante	
6.3.1 Método del radical DPPH'	37
6.3.2 Ensayo ORAC.....	37
6.3.3 Ensayo FRAP.....	38
6.3.4 Determinación de fenoles con el ensayo Folin-Ciocalteu.....	38
6.3.5 Inhibición de la Lipoperoxidación inducida con FeSO ₄ , cuantificada por la técnica TBARS.....	39
6.4 Actividad antiinflamatoria	
6.4.1 Ensayo de actividad antiinflamatoria frente a edema inducido con TPA en oreja de ratón.....	39
6.4.2 Inducción de la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS en los macrófagos RAW 264.7.....	40
6.4.3 Ensayo de toxicidad en los macrófagos RAW 264.7 empleando MTT.....	41

6.4.4 Determinación de nitritos en macrófagos RAW 264.7.....	42
6.4.5 Evaluación del estrés oxidativo en macrófagos RAW 264.7 empleando DCFH-DA	42
6.5 Cromatografía.....	43
6.6 Instrumentación.....	43

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Actividad antioxidante y antiinflamatoria de los extractos de <i>P. gentianoides</i> y <i>B. salicifolius</i>	45
7.1.1 Actividad antioxidante de en el modelo de DPPH'.....	45
7.1.2 Inhibición de la lipoperoxidación	48
7.1.3 Inhibición de la inflamación en el modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón.....	53
7.1.4 Actividad de los compuestos diosmetina y plantarenalósido frente al radical DPPH' e inflamación en el modelo de TPA.....	54
7.2 Actividad antioxidante de <i>P. gentianoides</i> y de <i>B. salicifolius</i> en los modelos de DPPH', TBARS, ORAC, FRAP y determinación de compuestos fenólicos por Folin-Ciocalteu	
7.2.1 Actividad antioxidante en los modelos de DPPH' y TBARS.....	58
7.2.2 Actividad antioxidante en los modelos ORAC y FRAP.....	59
7.2.3 Determinación de compuestos por Folin-Ciocalteu.....	61
7.2.4 Actividad antioxidante de las fracciones en los modelos DPPH' y TBARS.....	62
7.2.5 Actividad antioxidante de las fracciones los modelos de actividad antioxidante ORAC y FRAP.....	63
7.2.6 Determinación de compuestos fenólicos de las fracciones por Folin-Ciocalteu.....	64
7.3. Estudio fitoquímico de la partición en acetato de etilo (E) de <i>P. gentianoides</i>	65

7.3.1 Elucidación estructural del compuesto penstemínosido (5) 8-O-trans-cinamoil, 6 hidroxil, 1 – [β -D- glucopiranosido-6'-O-(4''-hidroxil-cinamoil)]-catalpol.....	69
7.3.2 Constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos aislados de <i>P. gentianoides</i>	80
1 Luteolina.....	80
2 Diosmetina	80
3 Globularicisina	80
4 Plantarenalósido.....	81
6 Martinósido.....	81
7 Verbascósido.....	82
7.4 Ensayos de viabilidad, actividad antiinflamatoria y antioxidante en la línea celular macrófagos RAW 264.7.	
7.4.1 Viabilidad de los macrófagos RAW 264.7	83
7.4.2 Expresión de las enzimas COX-2 e iNOS en los macrófagos RAW 264.7.....	85
7.4.3 Producción de nitritos en los macrófagos RAW 264.7.....	96
7.4.4 Ensayo de actividad antioxidante en los macrófagos RAW 264.7 evaluada con DCFH	101
7.4.5 Actividad antioxidante de los compuestos de <i>P. gentianoides</i> frente al radical DPPH [•] y peroxidación de lípidos.....	105
8 CONCLUSIONES.....	109
9. ANEXO	
I. Fundamento de las técnicas.....	112
II. Espectros.....	121
III. Artículos	
10.BIBLIOGRAFÍA.....	135

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ruta biosintética de la formación de prostanoïdes derivados del ácido araquidónico

Figura 2. Generación del NO

Figura 3. Activación del Factor NF-κB

Figura 4. Rutas de la formación no enzimática de isoprostanos por la peroxidación del ácido araquidónico causada por radicales libres

Figura 5. Estructura de flavonoides con actividad biológica

Figura 6. Estructura de triterpenos pentacíclicos con actividad biológica.

Figura 7. Estructura de iridoides con actividad biológica.

Figura 8. Estructura de iridoides con actividad biológica

Figura 9. Actividad antiinflamatoria de algunos compuestos provenientes de plantas

Figura 10. Furanos eremofilanos aislados de *Barkleyanthus salicifolius*.

Figura 11. Esquema de estudio de las especies.

Figura 12. Voucher *B. salicifolius*

Figura 13. Voucher *P. gentianoides*

Figura 14. Estructura química de los compuestos diosmetina y platarenalósido

Figura 15. Procedimiento para la obtención de particiones (n-Hex: C; CH₂Cl₂: D; AcOEt: E y MeOH/H₂O B) del extracto de hojas de *P. gentianoides* en MeOH (A) y de las fracciones de la partición E (F-1, F-2, F-3, F-4, F-5, F-6, F-7 y F-8).

Figura 16. Estructuras químicas de 1) luteolina, 2) diosmetina, 3) globularicisina y 4) plantarenalósido 5) penstemínósido, 6) martinósido y 7) verbascósido.

Figura 17. Estructura química del nuevo iridoide tipo catalpol (5%), nombrado Penstemínósido: 8-O-trans-cinnamoil, 6-hidroxi, 1-[β-D-glucopiranosido-6'-O-((4''-hidroxi)-cinnamoil)]-catalpol.

Figura 18. Espectro de RNM ¹³C del penstemínósido (5)

Figura 19. Espectro RMN ¹H del penstemínósido (5)

Figura 20. Espectro RMN ¹H del penstemínósido (5).

Figura 21. Espectro RMN ¹H del penstemínósido (5).

Figura 22. Espectro del experimento NOESY pensteminósido (5).

Figura 23. Espectro del experimento COLOC pensteminósido (5).

Figura 24. Espectro del experimento FLOCK pensteminósido (5).

Figura 25. Fraccionamiento del extracto metanólico de la hojas de *P. gentianoides*.

Figura i. Reacción general del paso de DPPH^{*} radical a DPPH reducido.

Figura ii. Formación de Malondialdehído (MDA) por peroxidación de lípidos inducida con FeSO₄ y formación de la especie colorida con el ácido tiobarbitúrico (TBA).

Figura iii. Reacción general de la fluoresceína con el radical peroxilo formado a partir del compuesto AAPH.

Figura iv. Mecanismo propuesto de entrada del DCFH-DA dentro de la célula. Después de que el DCFH-DA cruza la membrana celular, este es deesterificado a DCFH, el cual es oxidado a DCF fluorescente por especies reactivas del oxígeno.

Figura v. Formación de MTT de formazan a partir de MTT

Figura vi. Reacción de Griess

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Mediadores moleculares solubles de la inflamación.

Tabla 2. Nomenclatura de las isoenzimas óxido nítrico sintasa

Tabla 3. Estímulos que activan NF-κB

y proteínas reguladas por NF-κB

Tabla 4. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y ANTIOXIDANTE DE LAS ESPECIES *Barkleyanthus salicifolius* Kunth y *Penstemon gentianoides* H.B.K.

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el estudio biológico y fitoquímico de las especies *B. salicifolius* y *P. gentianoides* empleadas en la medicina tradicional por sus propiedades anti-inflamatorias, se determinó la actividad antioxidante de los extractos orgánicos mediante ensayos como DPPH[•], TBARS, ORAC, FRAP así como su contenido de compuestos fenólicos. Por otro lado se evaluó la actividad anti-inflamatoria de los extractos en el modelo de inducción de la inflamación en oreja de ratón empleando TPA y la inhibición de la expresión de dos enzimas directamente relacionadas con la inflamación, como son iNOS y COX-2 en la línea celular macrófagos murinos RAW 264.7. Se empleó esta misma línea celular como modelo biológico para determinar la inhibición del estrés oxidativo.

La partición en AcOEt de las hojas de *P. gentianoides* presentó mayor actividad antioxidante en los modelos empleados con una CI_{50} de 14.1 y 18.5 $\mu\text{g/mL}$ en los ensayos DPPH[•] y TBARS, 3524.8 $\mu\text{mol TE/g}$ y 377.9 $\mu\text{mol CatE/g}$ en los ensayos ORAC y FRAP respectivamente. También presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos (591.8 $\mu\text{mol CatE/g}$). Se realizó el fraccionamiento por cromatografía obteniéndose ocho fracciones de las cuales la fracción F-5 fue la que presentó mayor actividad antioxidante con una CI_{50} de 38.6 $\mu\text{g/mL}$ en DPPH[•], 15501.8 $\mu\text{mol TE/g}$ y 1235.0 $\mu\text{mol CatE/g}$ así como el mayor contenido de compuesto fenólicos 4931.31 $\mu\text{mol de Cat E/g}$.

En el modelo de inhibición de la expresión de las enzimas iNOS y COX-2, en la inhibición de la producción nitritos y en la inhibición del estrés oxidativo en las células RAW 264.7. La partición E presentó la mayor inhibición de la expresión de ambas enzimas, en la producción de nitritos (80%) y en la inhibición del estrés oxidativo (52.3%) pero no así la fracción F-5 presentó la mayor actividad, siendo la F-3 la que

presentara la mayor inhibición en la expresión de ambas enzimas, en la producción de nitritos (95%) y en la inhibición del estrés oxidativo (46%).

Estas fracciones se sometieron a cc. Los compuestos obtenidos fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas como RMN ^1H y RMN ^{13}C , así como experimentos bidimensionales homonucleares y heteronucleares y técnicas espectrométricas. Los compuestos obtenidos fueron verbascósido y martinósido (F-5), luteolina y diosmetina (F-3), globularicisina (F-4), penstemínósido (F-1, compuesto nuevo), plantarenalósido (extracto crudo de MeOH).

De estos compuestos los flavonoides luteolina y diosmetina presentaron actividad inhibidora de la expresión de las enzimas iNOS y COX-2 en las células RAW 264.7, así como en la inhibición en la producción de nitritos. En el ensayo de actividad antioxidante solo la luteolina presentó actividad inhibidora del estrés oxidativo empleando el mismo sistema.

En los ensayos de actividad antioxidante DPPH $^{\bullet}$ y TBARS luteolina y diosmetina así como los fenilpropanoides martinósido y verbascósido presentaron actividad antioxidante siendo los más activos la luteolina y el verbascósido (50 μM ; 66.2 y 87.25 en DPPH $^{\bullet}$ y 93.28 y 87.53 en TBARS respectivamente)

Con los resultados obtenidos en los modelos empleados se demostró que *P. gentianoides* presenta mezclas de compuestos con fuerte actividad antioxidante en los modelos químicos, así como en los sistemas biológicos utilizados.

También es evidente que los compuestos que presentan una fuerte actividad antioxidante no presentan una inhibición en la expresión de las enzimas iNOS y COX-2 la cuales se encuentran estrechamente ligadas con los procesos inflamatorios.

ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF

Barkleyanthus salicifolius Kunth y

Penstemon gentianoides H.B.K.

ABSTRACT

We performed a biological and phytochemical study of two plants used in traditional medicine because of their antioxidant and anti-inflammatory properties. Both plants were subjected to a biodirected fractionation using organic extracts and evaluating the biological activity. The antioxidant activity was screened using chemical assays such as DPPH[•], TBARS, ORAC, FRAP and content of phenols. Anti-inflammatory activity was evaluated by two methods: 1) ear rat inflammation induction method, using TPA, and 2) the inhibition of expression of two enzymes involved with the inflammation process, iNOX and COX-2 in murine macrophage cell line RAW 264.7. Oxidative stress also was determined in the same cell line.

Ethyl acetate partition showed the highest antioxidant activity, with an IC₅₀ of 14.1 and 18.5 µg/mL in DPPH[•] and TBARS assays; 3524.8 µmol TE/g and 377.9 µmol CatE/g in ORAC and FRAPS assays, as well as the highest content of phenols (591.8 µmol CatE/g). Fractionation of this partition by column chromatography produced eight fractions, being F-5 the fraction with the highest antioxidant activity, with an IC₅₀ of 38.6 µg/mL in DPPH[•], 15501.8 µmol TE/g and 1235.0 µmol CatE/g, and with phenol concentration of 4931.31 µmol Cat E/g. On the other hand, partition E showed the highest inhibition of iNOS and COX-2 expression, reduced nitrate production (80%), and decreased oxidative stress by 52.3%.

Chemical compounds were identified by spectroscopic techniques, such as, ¹HNMR and ¹³CNMR, including two-dimensional homonuclear (COSY) and heteronuclear (HMBC, FLOCK and COLOC). The identified compounds were verbascoside and martiniside (F-5), luteoline and diosmetine (F-3), globularisicine (F-4), pensteminoside (F-1, new compound), and plantarenaloside (from whole MeOH extract). From these compounds luteolin and diosmetin, flavonoids had high inhibitory

activity on the expression of iNOS and COX-2, and in nitrite production, and also decreased oxidative stress. In DPPH[•] and TABARS antioxidant assays luteolin, diosmetin, martinoside and verbascoside compounds at 50 μ M had antioxidant activities, showing the highest activity luteolin and verbascoside (66.2% and 87.25% in DPPH[•] and 93.28% and 87.53% in TBARS).

In this study we isolated compounds from *P. gentianoides* compounds with strong antioxidant activity, but low or none anti inflammatory effect.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y ANTIOXIDANTE DE LAS ESPECIES *Barkleyanthus salicifolius* Kunth y *Penstemon gentianoides* H.B.K.

1. PROLOGO

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que entre 65 y 80 por ciento de la población del mundo, depende de la medicina tradicional como su forma primaria de atención a la salud (Cordell, 1995). El uso de las plantas en la medicina tradicional en nuestro país es muy amplio, y actualmente representa una valiosa fuente de extractos y compuestos biológicamente activos y estructuralmente novedosos para ser investigados, los cuales a su vez pueden ser empleados para el desarrollo de nuevos fármacos (De la Heras *et al.*, 1998).

En la actualidad existe un avance significativo en los estudios de una gran cantidad de especies de plantas, tanto de sus extractos crudos, fracciones y principalmente de compuestos puros aislados de ellas, que están enfocados al descubrimiento y desarrollo de nuevas sustancias con actividad biológica. Con lo que respecta al objetivo de este trabajo, en publicaciones recientes se han descrito estudios con diversas especies de plantas con propiedades antiinflamatorias empleadas en la medicina tradicional de diferentes países; estos estudios se han enfocado al aislamiento e identificación de los compuestos responsables y a la comprobación de su actividad por diversos modelos, teniendo un gran impacto las pruebas de actividad antioxidante como pruebas complementarias, y para determinar sus mecanismos de acción.

El presente trabajo de tesis doctoral tiene como objetivo aportar información científica enfocada al estudio fitoquímico y de actividad biológica de las especies *B. salicifolius* y *P. gentianoides* empleadas en la medicina tradicional mexicana por sus propiedades antiinflamatorias.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Inflamación

La inflamación puede ser definida como la respuesta fisiológica del sistema de microcirculación y sus contenidos a un daño, con el fin de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano afectado. En el ámbito macroscópico, la respuesta se acompaña de los conocidos signos clínicos como rubor, tumor o edema, calor y dolor.

Diversos estímulos pueden provocar la reacción inflamatoria, cada tipo de estímulo presenta un patrón característico de reacción o de respuesta que constituye una variante relativamente menor del mismo fenómeno. Los estudios se pueden clasificar en tres grupos:

- (i) Físicos: trauma mecánico, irradiación, frío o calor;
- (ii) Químicos; ácidos, alcaloides, fenoles y otros irritantes inflamatorios como turpentina, kaolin y carragenina.
- (iii) Infección e inmunidad: daño provocado por organismos vivientes como virus, bacterias, parásitos u hongos, y daño por respuesta inmune como hipersensibilidad (Sedgwick y Willoughby, 1985).

Los patógenos pueden iniciar la respuesta inflamatoria por distintos e idiosincráticos mecanismos, incluyendo la activación del sistema de proteasas plasmáticas por interacción con los productos de degradación de las paredes de las células bacterianas constituidas principalmente de polisacáridos y lipopolisacáridos (LPS) y por la secreción de toxinas (Musher *et al.*, 1996).

La habilidad para desencadenar una respuesta inflamatoria es esencial para la supervivencia, dado los innumerables agentes patógenos y lesivos ambientales existentes; aunque el mayor problema que surge de la respuesta inflamatoria es que la defensa se dirija tanto hacia agentes dañinos como a no dañinos, provocando en algunas situaciones y enfermedades que la respuesta pueda ser intensificada y perpetuada sin un beneficio manifiesto (Campbell y Halushka, 1999).

2.1.1 Tipos de inflamación

La respuesta inflamatoria comprende la inflamación aguda y la crónica. La inflamación aguda es rápida, ocurre en corto tiempo (minutos o días), se responde de manera uniforme a un daño agudo, y está caracterizada por la acumulación de fluidos, proteínas plasmáticas y neutrófilos. En contraste, en la inflamación crónica se observan fenómenos de larga duración (semanas, meses o indefinidamente) e incluye flujo de linfocitos, macrófagos y crecimiento de fibroblastos (Rosenberg y Gallin, 1999).

2.1.2 Inflamación aguda

En la inflamación aguda se inician una serie de eventos moleculares como la producción de mediadores solubles pro-inflamatorios que promueven la sintomatología de la inflamación, los que incluyen:

1. *Vasodilatación*. Es uno de los síntomas tempranos a daño agudo. Las arteriolas son las primeras involucradas, seguidas por los capilares, resultando en el incremento del flujo sanguíneo. Este incremento es el responsable de las características de calor y rubor.

2. *Incremento de la permeabilidad vascular*. En respuesta a un estímulo inflamatorio las células endoteliales que recubren las vénulas disminuyen sus uniones intercelulares produciendo poros, permitiendo el paso de proteínas plasmáticas y por lo tanto generando un edema.

3. *Agrupamiento y activación de células*. Una de las respuestas iniciales y cruciales de la inflamación es el agrupamiento de neutrófilos, macrófagos y leucocitos del flujo sanguíneo al foco de inflamación para destruir y, si es posible, eliminar la sustancia extraña.

4. *Fiebre o calor*. Los agentes productores del calor conocidos como pirógenos son producidos por los leucocitos en respuesta a un estímulo específico, como el de las endotoxinas bacterianas. Diversos mediadores pro inflamatorios están involucrados en este proceso, como son interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y prostaglandinas (Rosenberg y Gallin, 1999).

2.1.3 Inflamación crónica

La inflamación crónica es el resultado de una respuesta prolongada de la inflamación aguda que no ha podido ser reparada. La transición de la inflamación aguda a inflamación crónica puede ser el resultado de tres mecanismos diferentes:

- 1) persistencia del daño inflamatorio,
- 2) la presencia de un antígeno endógeno, o
- 3) varios factores endógenos los cuales pueden alterar el tipo de célula y su función en el sitio de inflamación (Mackay *et al.*, 1985).

En algunos casos el estímulo en la inflamación crónica puede ser un componente “normal” del tejido. Esto ocurre en enfermedades inflamatorias donde el proceso es iniciado y mantenido por una anomalía en la regulación de la respuesta inmune a un propio tejido, conocido también como enfermedad autoinmune (<http://medweb.bham.ac.uk>).

Ejemplos de enfermedades que involucran la inflamación crónica:

- Tuberculosis.
- Colecistitis crónica.
- Bronquiectasis.
- Artritis reumatoide.
- Tiroiditis de Hashimoto.
- Enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn's).
- Silicosis y otras neumoconosis.
- Rechazo de implantes.

La histología encontrada en la inflamación crónica incluye la formación de granulomas –principalmente macrófagos y linfocitos- que son rodeados eventualmente por una membrana fibrótica- que se forma en los tejidos como parte de una respuesta inflamatoria a una irritación persistente, así como crecimiento de fibroblastos y tejido vascular (Wynn y Cheever, 1995).

Algunos trabajos sobre la inflamación crónica se han enfocado en el papel del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) cuya actividad ha sido asociada con endotoxinas, citocinas, virus y oxidantes. Cuando el factor NF- κ B es activado regula la

expresión de enzimas pro inflamatorias, de moléculas de adhesión, de E-selectinas y numerosas citocinas quimiotácticas.

2.1.4 Mediadores moleculares involucrados en la inflamación

Los procesos de inflamación son iniciados, regulados y por último eliminados por la acción de numerosas sustancias llamadas *mediadores inflamatorios solubles*, entre las que se encuentran: las citocinas proinflamatorias, aminas y péptidos, mediadores lipídicos, óxido nítrico, especies reactivas del oxígeno y proteasas plasmáticas (Tabla 1). Algunos de estos mediadores existen en forma inactiva y son activados como productos de la inflamación; otros son sintetizados y/o liberados por células involucradas en respuesta a la respuesta inflamatoria (Rosenberg *et al.*, 1999).

Tabla 1. Mediadores moleculares involucrados en la inflamación

(Rosenberg *et al.*, 1999).

I. Citocinas proinflamatorias IL-1 IL-6 IL-8 IL-12 Factor de necrosis tumoral (TNF- α) Interferón- γ (IFN- γ)	II. Mediadores lipídicos Prostaglandinas Leucotrienos Factor activador de plaquetas IV. Óxido Nítrico (NO)
III. Aminas y péptidos Histamina Serotonina Neuropeptidos	V. Especies reactivas del oxígeno (ERO) VI. Proteasas plasmáticas Complemento (C3) Cinas (Brdicininina)

2.1.5 Mediadores celulares involucrados en la inflamación

En la respuesta inflamatoria están involucradas una gran cantidad de células, entre las que destacan las células fagocíticas profesionales (neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos) estas son las principales responsables de la fagocitosis y la destrucción de microorganismos extraños, entre otras funciones. Las células fagocíticas responden a los mediadores solubles de la inflamación mediante la migración al sitio dañado para la ingesta y destrucción de patógenos invasores, así

como del tejido afectado, permitiendo la reparación del daño. Estas células fagocíticas llevan a cabo sus funciones de eliminación del material extraño a través de una variedad de mecanismos los cuales pueden estar divididos en: 1) los que son dependientes del oxígeno y 2) los que son independientes del oxígeno.

Por otro lado, en la respuesta inflamatoria aguda se considera que las principales células involucradas son leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y en las lesiones crónicas las células mononucleares (monocitos y macrófagos) (Mackay *et al.*, 1985).

2.1.5.a Neutrófilos

Los neutrófilos, son células blancas que pertenecen a los "Granulocitos", miden de 12 a 18 micrómetros, representan entre un 40 a 75% siendo las células más abundante en la sangre. Se caracterizan por presentar un núcleo con cromatina compacta segmentada en 2 a 5 lóbulos conectados por delgados puentes. Su citoplasma contiene abundantes gránulos finos color púrpura que contienen abundantes enzimas destructoras, así como una sustancia antibacteriana llamada fagocitina, necesarias para la lucha contra los agentes extraños (Cruse *et al.*, 2004).

Los leucocitos neutrofilicos son las principales células involucradas en el sistema inmune y en la inflamación. El neutrófilo es una célula muy móvil y su consistencia gelatinosa le facilita atravesar las paredes de los vasos sanguíneos y migrar hacia los tejidos para destruir microbios y responder a estímulos inflamatorios. La principal función de los neutrófilos es la de detener o retardar la acción de agentes infecciosos o materiales extraños. Su propiedad más importante es la fagocitosis y son capaces de ingerir bacterias y pequeñas partículas.

Un componente importante en el mecanismo de defensa de los neutrófilos es el complejo enzimático conocido como NADPH oxidasa, el cual es el principal responsable de la producción del radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Henderson *et al.*, 1996). Esta enzima ensamblada en la membrana fagosomal contiene dos componentes integrales de la membrana gp91-phox y p22-phox (de *phagocyte oxidase*) y tres componentes citosólicos p-47phox, p67-phox y rac que catalizan la producción del $O_2^{\bullet-}$ a partir de oxígeno molecular y electrones libres; después el $O_2^{\bullet-}$ es convertido al

metabolito tóxico peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la acción de la superóxido dismutasa, o a ácido hipocloroso por la proteína mieloperoxidasa. Por otro lado, los neutrófilos también son capaces de producir mediadores pro-inflatorios como IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, entre otros.

2.1.5. b Monocitos y macrófagos

Los macrófagos son células del sistema inmune que se localizan en los tejidos, los cuales provienen de la migración de los monocitos (leucocitos) a través de los capilares sanguíneos. Esta diferenciación de monocito a macrófago involucra varios cambios, por ejemplo el monocito aumenta su tamaño de 5 a 10 veces, sus organelos incrementan tanto en número como en complejidad, adquiere capacidad fagocítica, produce altas concentraciones de enzimas líticas y empieza a secretar gran variedad de sustancias que realizan diferentes funciones, como inhibir el crecimiento de una variedad de células y microorganismos (Cohn, 1983). La actividad de los macrófagos es una actividad complementaria a los neutrófilos durante la inflamación aguda, y estos toman un papel central durante la inflamación crónica (Rosenberg y Gallin, 1999).

Los macrófagos forman parte de la inmunidad celular innata, es decir, inician una respuesta natural contra los microorganismos, debido a que presentan receptores de membrana para numerosas moléculas bacterianas, como son: receptor para lipopolisacáridos (CD14), receptores C11b/CD18, receptores para manosas, y receptor para glúcidos (Gordon, 1999).

La estimulación de los macrófagos con lipopolisacáridos (LPS) y/o interferón- γ (IFN- γ) resulta entre otras respuestas en la expresión de dos enzimas importantes en la respuesta inflamatoria, 1) la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y 2) la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Por otro lado, los macrófagos al ser activados aumentan el consumo de oxígeno molecular y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) ayudando en la defensa contra organismos invasores y estimulando la producción de intermediarios inflamatorios como IL-1, TNF- α , entre otros.

2.1.7 Enzimas involucradas en la inflamación

2.1.7.a Fosfolipasa A₂ (PLA₂).

La fosfolipasa A₂ (PLA₂) es una enzima que hidroliza el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos liberando ácidos grasos, principalmente el ácido araquidónico y lisofosfolípidos. La fosfolipasa A₂ es producida por numerosas células bajo la acción de diferentes estímulos como la IL-1, TNF- α y lipopolisacáridos, los cuales provocan su acumulación en los líquidos inflamatorios (Valdes *et al.*, 2002).

El ácido araquidónico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico), es un ácido graso de 20 carbonos, componente normal en los fosfolípidos de las membranas celulares. Una vez liberado el ácido araquidónico es metabolizado hasta obtener productos oxigenados por la acción de diferentes sistemas enzimáticos como las ciclooxigenasas (COX) y la lipooxigenasas (LOX) (Campbell y Halushka, 1996).

2.1.7.b Ciclooxigenasa-2 (COX-2)

La COX también llamada prostaglandina sintetasa es una enzima que produce prostaglandinas en la mayoría de los tejidos y tipos de células. Diferentes estudios han mostrado que la actividad de COX se incrementa en los estados de inflamación y es inducida por citocinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento (DeWitt, 1991). Siguiendo estas observaciones y de acuerdo a una amplia investigación se descubrieron dos isoformas existentes de COX. 1) La isoforma constitutiva ciclooxigenasa-1 (COX-1), que se encuentra presente en el estómago, intestino o riñón, tejidos donde la producción de prostaglandinas juega un papel citoprotector al mantener los procesos fisiológicos normales, y 2) la isoforma inducible ciclooxigenasa-2 (COX-2) la cual se expresa en los procesos inflamatorios en diversas células incluyendo fibroblastos y macrófagos, los cuales aumentan en gran medida la producción de prostaglandinas proinflamatorias (Smith *et al.*, 2000; Wu, 1995).

Las prostaglandinas son formadas en una conversión de dos pasos del ácido araquidónico (Figura 1). Primero la enzima convierte el ácido araquidónico a endoperóxido cíclico (PGG₂) por la acción de la ciclooxigenasa (COX), la cual promueve la captura de dos moléculas de oxígeno para formar el anillo endoperóxido

en los carbonos C-9 y C-11 y el grupo hidropéroxido en C-15 dando lugar a PGG₂. La segunda actividad involucra la reducción del peróxido para producir PGH₂ con un grupo hidroxilo en C-15, que es esencial para la actividad biológica. PGH₂ es un producto intermediario inestable del metabolismo del ácido araquidónico, que es rápidamente convertido a una variedad de productos que incluyen prostaglandinas como PGE₂, PGF₂, PGD₂, tromboxanos; TXA₂ o prostaciclina; PGI₂ por enzimas isomerasas específicas (Needleman *et al.*, 1986).

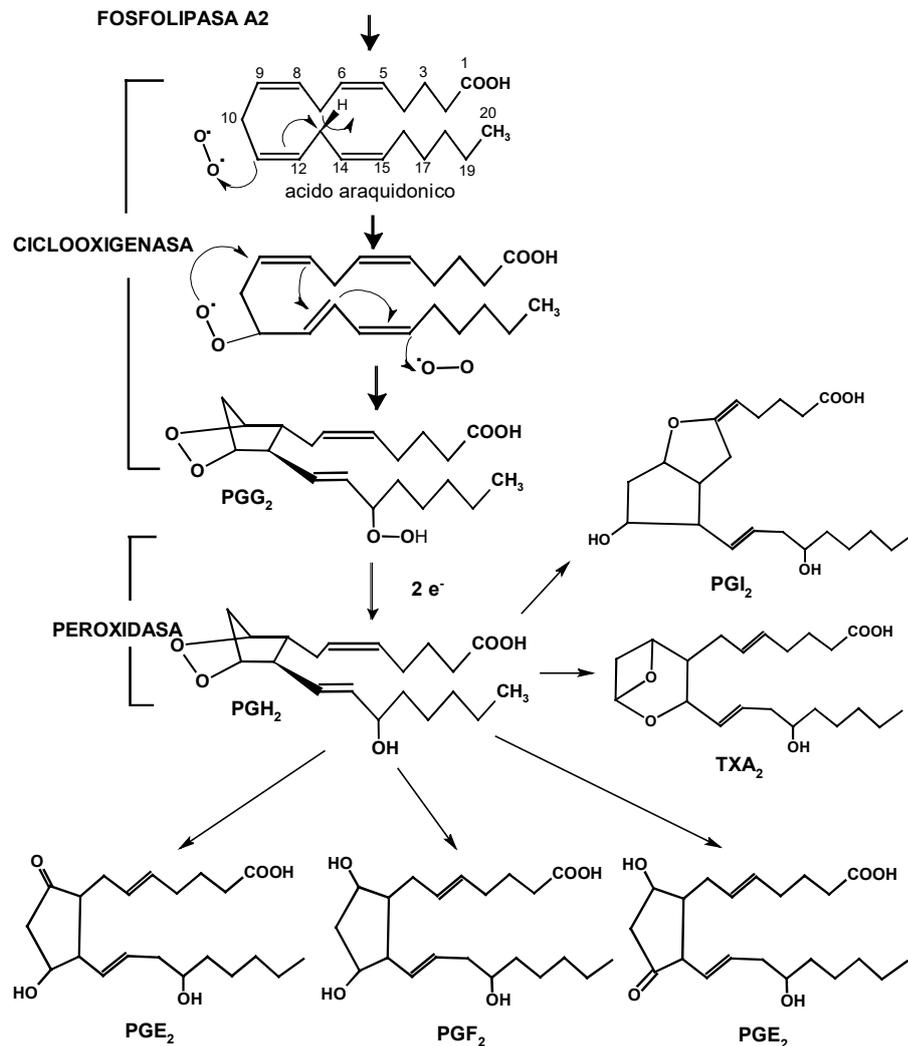


Figura 1. Formación de prostanoideos derivados del ácido araquidónico mediada por la enzima ciclooxygenasa. (Adaptado de Campbell y Halushka, 1996).

2.1.7.c Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)

Las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS por sus siglas en inglés nitric oxide synthase) están divididas en una familia de tres enzimas conocidas como óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS) (Tabla 2). Estas enzimas son las responsables de la producción de óxido nítrico (NO^\bullet) (Figura 2), el cual es una molécula altamente prooxidante y conocida también como un radical libre. El NO^\bullet está involucrado en diversos mecanismos celulares como vasodilatador, en señalización celular, así como en mecanismos de defensa (Nathan *et al.*, 1994; Xie *et al.*, 1994).

En la respuesta inflamatoria la isoforma que se expresa es la iNOS, la cual se presenta especialmente en los macrófagos, y está regulada a nivel transcripcional por diferentes estímulos extracelulares como son: componentes de la pared celular bacteriana, principalmente lipopolisacáridos (LPS) o varias citocinas (Nathan *et al.*, 1994).

Se ha demostrado que el NO^\bullet tiene actividad citotóxica frente a diferentes materiales extraños o infecciosos, como son bacterias, parásitos, helmintos y virus, así como frente a células tumorales (Moncada *et al.*, 1991; Palmer *et al.*, 1988; Hibbs *et al.*, 1987). Durante el proceso inflamatorio la producción de NO^\bullet se incrementa significativamente y puede llegar a ser “autodestructiva como se ha reportado en las enfermedades inflamatorias crónicas como artritis o enfermedad de Crohn’s. Así mismo, se ha observado la sobreproducción de NO^\bullet en enfermedades auto inmunes, rechazo en el trasplante de órganos y sepsis (Hooper *et al.*, 1995; Schmidt; Walter, 1994).

La COX-2 y la iNOS son dos de las principales enzimas involucradas en la respuesta inflamatoria, ambas pueden ser activadas por el factor $\text{NF-}\kappa\text{B}$, o bien pueden ser activadas por las mismas citocinas proinflamatorias, por ERO, especies reactivas del nitrógeno (ERN) y normalmente están presentes en la misma célula o tejido al mismo tiempo (Wu, 1995; Salvemini *et al.*, 1993).

Tabla 2. Nomenclatura de las isoenzimas óxido nítrico sintasa
(Nathan *et al.*, 1994).

Numérica	Descripción	Definición
NOS I	nNOS	Enzima constitutiva neuronal su actividad está regulada por Ca^{2+} intracelular. La nNOS se caracteriza por su baja producción de NO^\bullet .
NOS II	iNOS	Enzima inducida por citocinas, su actividad es independiente de Ca^{2+} intracelular. La iNOS se expresa prototípicamente por macrófagos murinos y se caracteriza por su alta producción de NO^\bullet .
NOS III	eNOS	Enzima constitutiva endotelial su actividad es regulada por Ca^{2+} intracelular. La eNOS se caracteriza por su baja producción de NO^\bullet .

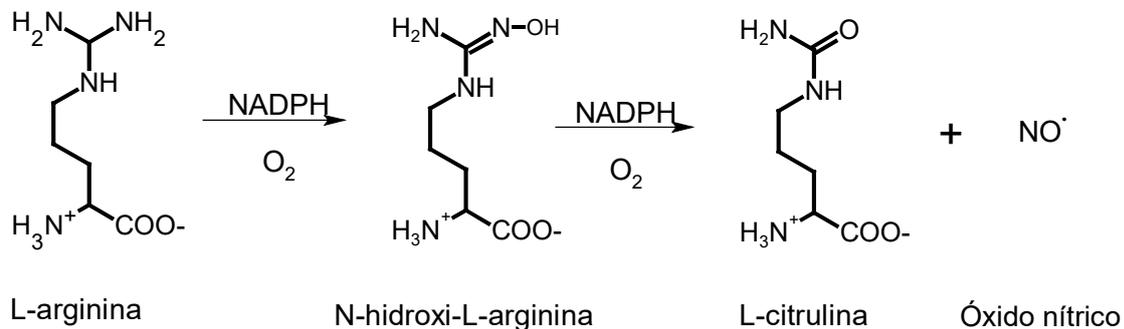


Figura 2. Generación del NO^\bullet , por la oxidación del átomo nitrógeno guanidino terminal de la L-arginina empleando oxígeno molecular (O_2) como sustrato y NADPH como cofactor.

2.1.8 Factor nuclear kappa B (NF- κ B)

Un factor de transcripción particularmente importante en la respuesta inmune e inflamatoria es el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B). El NF- κ B es un mensajero celular que actúa como un factor de transcripción el cual se expresa en una

gran variedad de células, muchos genes inducibles que codifican para citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión celular, factores de crecimiento, proteínas de fase aguda, factores de transcripción y enzimas relacionadas con el estrés oxidativo presentan sitios de unión con el NF- κ B (Tabla 3) (Kopp *et al.*, 1995; Baeuerle, 1996).

**Tabla 3. Estímulos que activan NF- κ B
y proteínas reguladas por NF- κ B (Barnes *et al.*, 1997)**

ESTÍMULOS QUE ACTIVAN NF- κ B	PROTEÍNAS REGULADAS POR NF- κ B
CITOCINAS	CITOCINAS PRO INFLAMATORIAS
TNF- α	TNF- α
IL-1B	IL-1 β
IL-17	IL-2
ACTIVADORES DE PROTEÍNA CINASA C	IL-6
Esteres de forbol	Factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos
Factor activador de plaquetas	QUIMIOCINAS
OXIDANTES	Interleucina-8
Peróxido de hidrógeno	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 α
Ozono	Proteína quimiotáctica de macrófagos 1
VIRUS	Gro- α , - β y γ
Rinovirus	Eotaxin
Virus de la influenza	ENZIMAS INFLAMATORIAS
Virus Epstein-Barr	Óxido nítrico sintasa inducible
Citomegalovirus	Ciclooxigenasa-2
Adenovirus	5-Lipooxigenasa
ESTIMULO INMUNE	Fosfolipasa A ₂
Fitohemaglutinina	MOLÉCULAS DE ADHESIÓN
Anticuerpos Anti-CD3 (activación de linfocitos T)	Molécula de adhesión intracelular 1
Antígenos	Molécula de adhesión vascular 1
OTROS	E-selectina
Lipopolisacáridos	RECEPTORES
Radiación ultravioleta	Receptor de interleucina 2 (canal α)
	Receptor de células T (canal β)

Diferentes estímulos activan el NF- κ B incluyendo la proteína cinasa C, virus, LPS y compuestos oxidantes (Kopp *et al.*, 1995). La activación del NF- κ B permite un incremento coordinado en la expresión de varios genes cuyos productos median la repuesta inmune e inflamatoria. Los productos de los genes que están regulados por NF- κ B también causan la activación del NF- κ B (Tabla 3). Este tipo de regulación

positiva puede amplificar y perpetuar la respuesta inflamatoria local (Barnes *et al.*, 1997).

Estudios recientes han demostrado que NF- κ B es un factor de transcripción primordial en la expresión y la regulación de COX-2 e iNOS (Figura 3) enzimas estrechamente relacionadas con la respuesta inflamatoria (Surh *et al.*, 2001; D'Acquisto *et al.*, 1997).

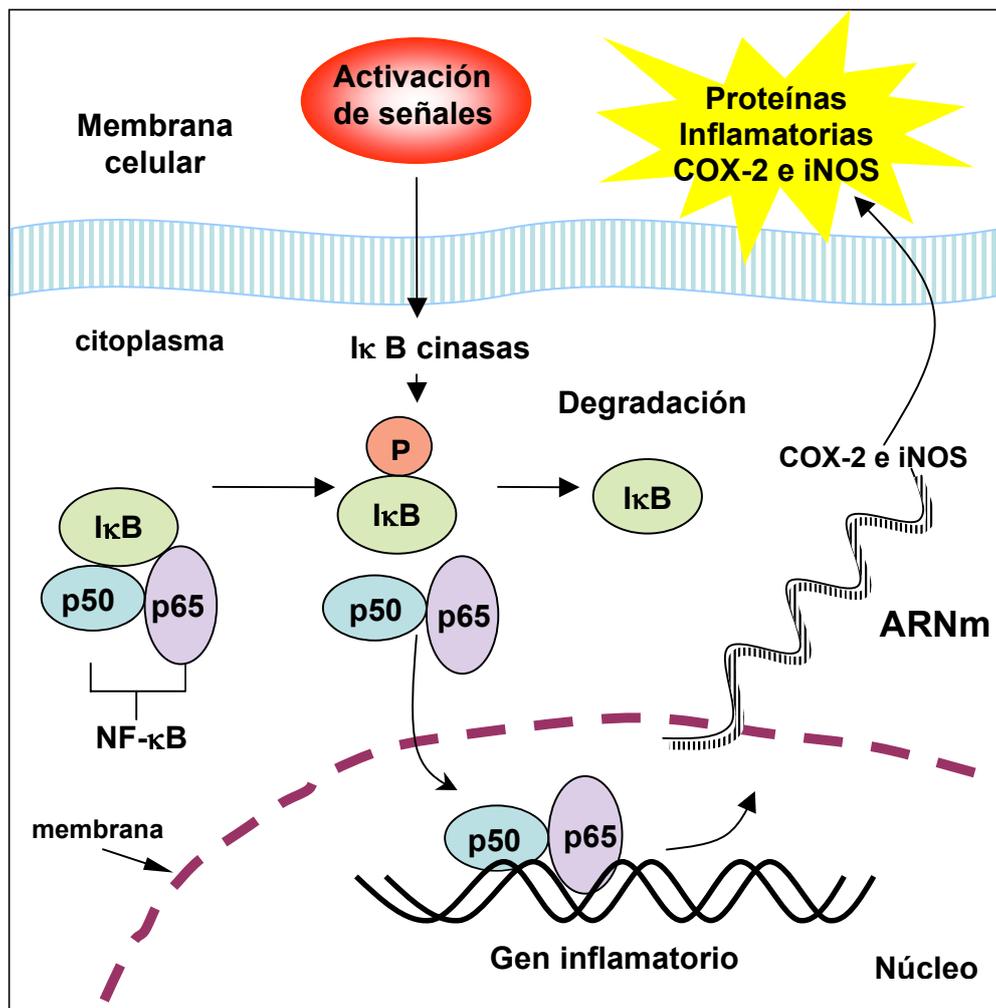


Figura 3. Activación del Factor NF- κ B (tomado de Barnes *et al.*, 1997)

La respuesta inflamatoria es usualmente acompañada por la generación local de ERO y ERN como el $O_2^{\bullet-}$, el H_2O_2 y NO^{\bullet} . Mientras que a altas concentraciones las ERO y ERN atacan las células blanco y microorganismos, a bajas concentraciones sirven

como segundos mensajeros que transmiten señales inflamatorias a las células vecinas. Las ERO y ERN pueden aumentar su efecto a través de la activación del NF-κB, por lo que los antioxidantes pueden actuar inhibiendo el NF-κB (Lee *et al.*, 1998). Algunos ejemplos de estos son los compuestos antioxidantes ditiocarbamato de pirrolidina y acetilcisteína, los cuales bloquean la activación de algunas proteínas cinasas (Schreck *et al.*, 1991).

2.1.9 Especies reactivas del oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) en el proceso inflamatorio

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) se pueden agrupar en radicales y no radicales; Un radical libre es definido como un átomo o molécula la cual posee uno o más electrones desapareados, y es capaz de existir independientemente (Tabla 4) (Halliwell y Gutteridge 1989).

Tabla 4. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Halliwell y Gutteridge 1989)

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO			
RADICALES		NO RADICALES	
Anión superóxido	$O_2^{\bullet-}$	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	$\bullet OH$	Ácido hipocloroso	$HOCl$
Radical peroxilo	$\bullet OOR$	Ozono	O_3
Radical perhidroxilo	$\bullet OOH$	Oxígeno en singulete	1O_2
Radical alcoxilo	$\bullet OR$		
ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO			
RADICALES		NO RADICALES	
Óxido nítrico (monóxido de nitrógeno)	NO^{\bullet}	Ácido nitroso	HNO_2
		Catión nitrosilo	NO^+
Dióxido de nitrógeno	NO_2^{\bullet}	Anión nitrosilo	NO^-
		Tetróxido de dinitrógeno	N_2O_4
		Trióxido de dinitrógeno	N_2O_3
		Peroxinitrito	$ONOO^-$
		Nitrito	NO_2^-
		Nitrato	NO_3^-

Las especies reactivas con centro de oxígeno o con centro de nitrógeno juegan un papel importante como mediadores de la inflamación crónica y aguda (Babior *et al.*, 1973; Vappatalo, 1986). La mayor actividad de las ERO en la inflamación está centrada principalmente en la formación del radical $O_2^{\bullet-}$ la cual se lleva a cabo por la enzima NADPH oxidasa de los neutrófilos activados, eosinófilos y macrófagos (Weiss, 1989). Esta producción extracelular de $O_2^{\bullet-}$ representa más del 90% del consumo del oxígeno de la célula activada (Grisham y Granger 1988; Weiss, 1989).

Otra forma de producción de radicales de oxígeno por las células del tejido afectado y por las células inmunes infiltradas está relacionada con la generación de citocinas pro inflamatorias (Wong *et al.*, 1989; Schulze-Osthoff *et al.*, 1992; Hirose *et al.*, 1993). Así mismo, la generación de ERO derivados de la mitocondria inducidos por IL-1 o TNF- α pueden ser mecanismos a través de los cuales las ERO activen la transcripción de NF- κ B (Schreck y Baeuerle, 1994).

En cuanto a la conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, se ha identificado una vía no enzimática por medio de la cual se generan una serie de autacoides¹ bioactivos derivados de lípidos llamados *isoprostanos*, catalizados por radicales libres independientes de la ciclooxigenasa (Figura 4) los cuales provocan lesión tisular. Se ha propuesto que dichos agentes contribuyen a la fisiopatología de la respuesta inflamatoria la que no mejora con los antiinflamatorios esteroideos o no esteroideos disponibles (Morrow *et al.*, 1990). La contribución de las ERO y ERN a la respuesta inflamatoria total, aunque ciertamente significativa, es probable que varíe dependiendo del estímulo que este ocasionando la respuesta, y que la actividad de las especies reactivas no sea la misma en el tiempo de duración, ya que diferentes mediadores inflamatorios (y quizá antioxidantes) son producidos y removidos en el sitio dañado. Así, la variable efectividad de la terapia antioxidante en los desórdenes inflamatorios es entendible (Frei, 1994).

¹Autacoide: del griego (*autos* -> propio y *akos* -> Alivio) y está definido como una sustancia formada metabólicamente por un grupo de células que altera la función de otras células a nivel local.

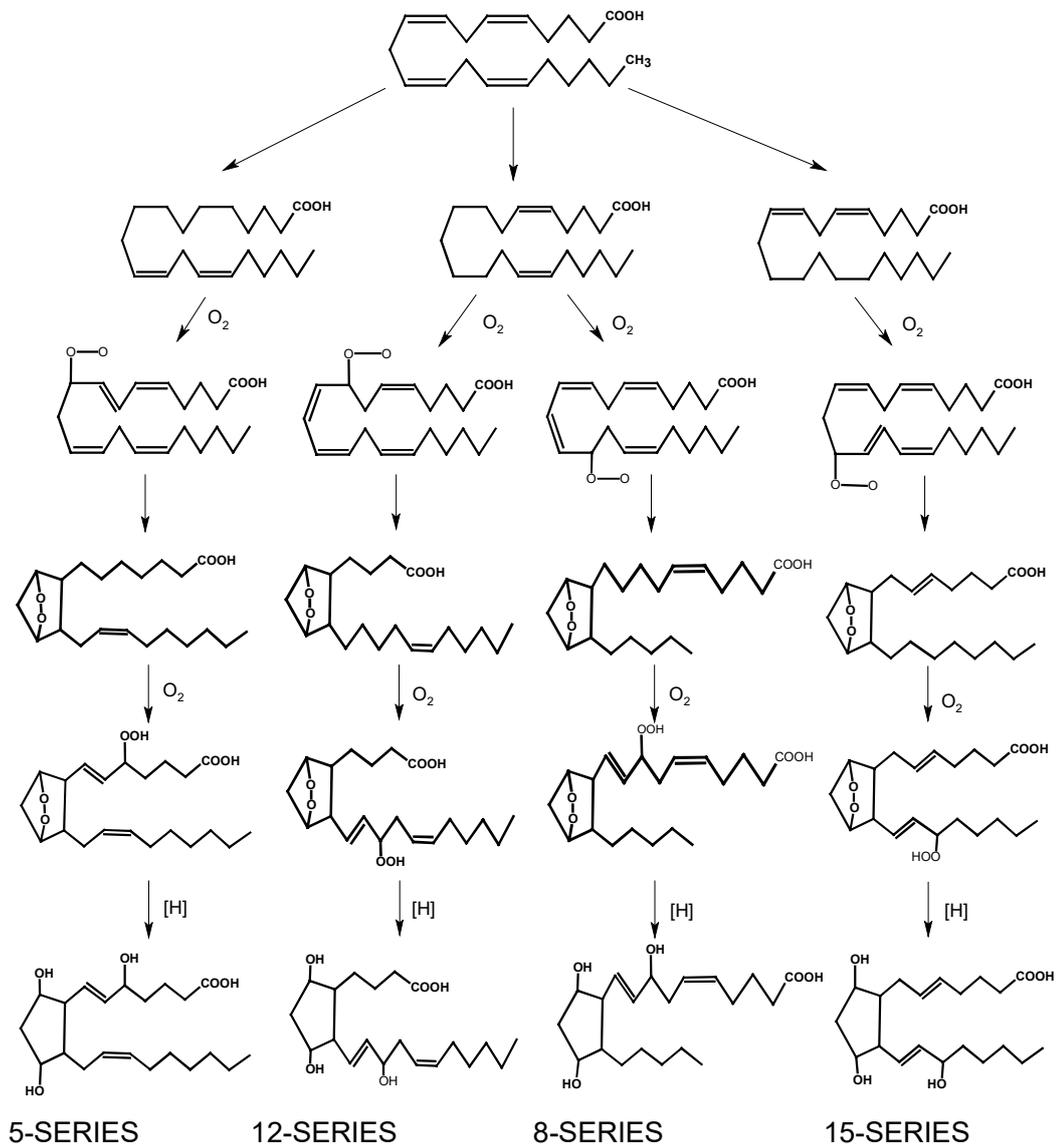


Figura 4. Rutas de la formación no enzimática de isoprostanos por la peroxidación del ácido araquidónico causada por radicales libres (Roberts y Morrow, 1999).

2.2 Generación de ERO y ERN en sistemas biológicos

Las ERO y ERN son esenciales para muchos procesos biológicos normales, como son la activación de fagocitos, el metabolismo de eicosanoides, o bien, formando parte de una serie de eventos en respuesta a una invasión de microorganismos y material extraño, generando factores quimiotácticos, entre otros (Flohé *et al.*, 1985;

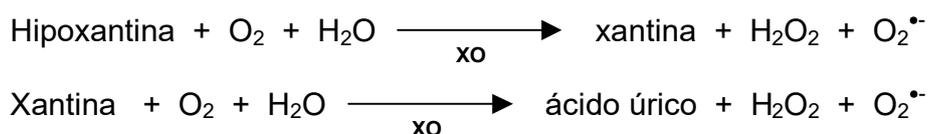
Hurst y Barrette, 1989). También están implicados en la señalización celular, sin embargo, juegan un papel importante en la generación de daño celular, iniciando una gran variedad de reacciones oxidativas tóxicas (Rice-Evans *et al.*, 1993), como son la iniciación de la peroxidación lipídica, inhibición de la respiración mitocondrial, inhibición de la actividad de la bomba Na^+/K^+ , inactivación de los canales de sodio y otras reacciones oxidativas de proteínas (Cuzzocrea *et al.*, 2000). También están implicados en la fisiopatología de varios trastornos clínicos, incluyendo isquemia, reperfusión, aterosclerosis, hipertensión aguda, shock hemorrágico, diabetes mellitus, cáncer (Hemnani y Parihar, 1988) e inflamación (Yoshikawa *et al.*, 1983; Halliwell y Gutteridge 1984; Yuda *et al.*, 1991; Bodamyali *et al.*, 2000), entre otros.

La fuente más importante de formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y/o H_2O_2 se lleva a cabo durante el transporte de electrones en la mitocondria, otra fuente celular de estos radicales es la transferencia de electrones que involucra el NADPH-citocromo P450 y la NADPH oxidasa en los fagocitos. El radical superóxido formado durante el estallido respiratorio de los fagocitos origina la producción de enzimas dependientes de NADPH.

En el estado inactivado los neutrófilos tienen un metabolismo apagado, el cual se activa al estar en contacto con un microorganismo, resultando en el secuestro del microorganismo invasor dentro de una vacuola conocida como fagosoma. Cuando el patógeno es transportado dentro de esta vesícula, el leucocito incrementa su consumo de O_2 aumentando la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$, siendo la enzima NADPH oxidasa la principal responsable de la generación del radical superóxido (De Leo *et al.*, 1996).



Otras fuentes adicionales de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 son la xantina oxidasa (XO), aldehído oxidasa, monoamino oxidasa, urato oxidasa y la L- y D-aminoacil oxidasa.



En la vacuola se encuentran presentes el $O_2^{\bullet-}$, el H_2O_2 , y el HOCl los cuales pueden reaccionar entre si para formar otras especies reactivas como el $\bullet OH$ y causar un efecto microbicida. El $\bullet OH$ es uno de los radicales más reactivos que se conocen el cual es generado por la reacción con un ion metal, conocida como reacción de Haber-Weiss (reacción 2), entre otras (Eberhardt 2001; Lloyd *et al.*, 1997).

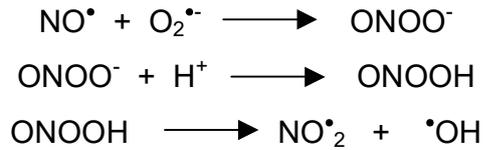
Generación de ERO a partir de otras ERO

1. $H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow \bullet OH + \bar{OH} + Fe^{3+}$ reacción de Fenton
2. $O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$
 $H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow \bullet OH + \bar{OH} + Fe^{3+}$

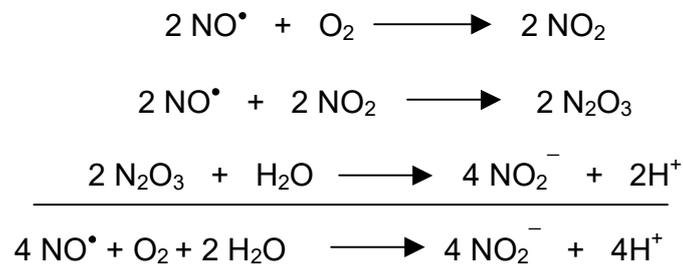
 $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \longrightarrow \bullet OH + \bar{OH} + O_2$ reacción de Haber-Weiss
catalizada con hierro
3. $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$
4. $H_2O_2 + HOCl \longrightarrow {}^1O_2 + HCl + H_2O$ dismutación
5. $O_2^{\bullet-} + HOCl \longrightarrow \bullet OH + Cl^- + {}^1O_2$

Además de las especies reactivas del oxígeno, los fagocitos producen NO^{\bullet} . El NO^{\bullet} al estar en un sistema biológico versátil puede reaccionar con otras moléculas y generar ERN entre otros radicales, los cuales también juegan un papel importante en la fisiología y la fisiopatología celular.

Una de las reacciones más importantes es su interacción con el anión radical $O_2^{\bullet-}$, generando anión peroxinitrito ($ONOO^-$), un potente agente oxidante que reacciona con un gran número de moléculas blanco, como son los grupos sulfidrilos generando daño celular (Williams, 2004). Se sabe también que este anión es un potente pro-inflamatorio y citotóxico (Beckman *et al.*, 1990), a pH fisiológico sufre protonación formando ácido peroxinitroso ($ONOOH$), molécula termodinámicamente inestable que se descompone espontáneamente para producir dióxido de nitrógeno (NO_2) y una fuente de radicales hidroxilo ($\bullet OH$) independiente de la catálisis por hierro:



Otra de las reacciones importantes del NO^\bullet es su oxidación, en donde el producto final es el ion nitrito el cual es cuantificado por la reacción de Griess y los resultados son empleados para determinar indirectamente la producción de NO^\bullet (Williams, 2004).



Como mecanismos de defensa frente a esta gran variedad de ERO y ERN existen constituyentes fisiológicos normales de las células de mamíferos, como las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa; los compuestos creatinina, ácido úrico, poliaminas, retinol, etc., y antioxidantes obtenidos de la dieta como el ácido ascórbico, el tocoferol y los carotenos que protegen a las membranas celulares, lipoproteínas y ADN del daño oxidativo causado por ERO/ERN. Así mismo, un gran número de compuestos extraños a las células han sido reconocidos como potentes antioxidantes, entre ellos se encuentran los compuestos fenólicos que incluyen flavonoides, cumarinas, xantonas, etc., a las cuales se les ha dado una considerable atención (Geronikaki *et al.*, 2006).

2.3 Compuestos provenientes de plantas con actividad antiinflamatoria y antioxidante

A lo largo de la historia la humanidad ha empleado los productos naturales para el tratamiento de diversas enfermedades de acuerdo a una amplia fuente de información empírica, la cual ha servido para que en los últimos siglos aproximadamente el 50% de los medicamentos prescritos sean derivados o

sintetizados a partir de productos naturales, en especial de origen vegetal. Sin embargo, de 250,000 plantas superiores solo aproximadamente del 5 al 15% han sido analizadas por sus posibles usos medicinales (Balandrin *et al.*, 1993; Summer, 2000).

En el campo de los productos naturales, disciplinas como la Etnofarmacología o la Etnobotánica están tomando interés en la investigación sistematizada de plantas, empleando como estrategia de búsqueda los antecedentes empíricos y de uso medicinal, lo cual las vuelve candidatos potenciales para la obtención de metabolitos con actividad biológica y farmacológica (Testa *et al.*, 1993).

Utilizando esta técnica sistematizada se ha comprobado que algunos compuestos de origen vegetal presentan actividad antitumoral, antiviral, antiinflamatoria, antipirética, hepatoprotectora, hipotensora, hipertensora y antioxidante, de esto que las especies vegetales sigan siendo una fuente de compuestos con potencial actividad biológica (Duke, 1992).

Tomando interés en la actividad antiinflamatoria se ha comprobado que una gran cantidad de compuestos como terpenoides, flavonoides, alcaloides entre otros se encuentran involucrados en la inhibición de la respuesta inflamatoria actuando como inhibidores de la expresión y actividad de la COX-2 e iNOS, inhibiendo la fosfolipasa A₂ (PLA₂), inhibiendo la traslocación de los factores de transcripción NF-κB o AP-1, y de igual forma, actuado en la respuesta antiinflamatoria inhibiendo la producción de radicales libres.

En el caso de la actividad antioxidante diversos compuestos como son una gran variedad de flavonoides (Ramasarma, 2000), terpenos, lignanos, alcaloides y cumarinas (Ng *et al.*, 2000; Hatano *et al.*, 1989), pueden actuar como atrapadores de radicales libres ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, etc.), en la inhibición de enzimas involucradas en la generación de radicales libres (xantina oxidasa, proteína cinasa C, lipooxigenasa, ciclooxigenasa, etc.), como quelantes de metales de transición (hierro y cobre), inhibidores de la peroxidación y como reparadores de daños provocados en la célula por oxidación (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Por otro lado, es un hecho que no todos los compuestos de origen vegetal también llamados metabolitos secundarios (MS) son de interés para su desarrollo clínico, sin embargo, los MS son herramientas útiles para dilucidar los mecanismos

bioquímicos implicados en diferentes modelos experimentales. Abriendo con esto nuevas perspectivas en el campo de la Biología Molecular (Heinrich *et al.*, 1998).

2.3.1 Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de tipo fenilpropano que generalmente se encuentran como O-glicósidos, aunque también se encuentran de forma natural como agliconas. Poseen como unidad básica un esqueleto de 15 carbonos provenientes de la malonil coenzima A y de la *p*-cumaril coenzima A. La mayoría de los flavonoides se representan como moléculas de tipo C₆-C₃-C₆, con dos anillos aromáticos (A y B) y un heterociclo (C) con oxígeno (Harborne *et al.*, 2000). Hasta 1973 se conocían aproximadamente 900 flavonoides naturales, hoy en día el número sobrepasa los 6,400 flavonoides identificados y aislados de fuentes naturales. En años recientes se han realizado diferentes estudios para determinar la actividad biológica de los flavonoides tanto *in vitro* como *in vivo* (Pathak *et al.*, 1991; Céspedes *et al.*, 2006). Con respecto a su actividad antiinflamatoria algunos flavonoides pueden modular la síntesis de prostaglandinas; también funcionan como inhibidores enzimáticos y poseen propiedades antioxidantes lo cual favorece la recuperación del proceso inflamatorio. En cuanto a sus mecanismos de acción, existen aquellos que pueden inhibir la enzima ciclooxigenasa, como son la hesperetina (I) y la galangina (I) (Michel *et al.*, 1985; Bauman *et al.*, 1982). Mientras que flavonoides como la quercetina (III), la ramnetina (IV) y la miricetina (V) pueden inhibir la enzima lipooxigenasa. Además, la quercetina también es un buen inhibidor de la PLA₂ (Middleton *et al.*, 1994, Kim *et al.*, 2001). Los flavonoides pueden presentar propiedades antiinflamatorias a través de su acción antioxidante inhibiendo a la formación de radicales libres generados como subproductos de las rutas de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, lo cual les permite actuar contra el daño tisular. Su potencial antioxidante radica en la capacidad de captar radicales libres, ejemplo de estos son la catequina (VI), rutina (VII) y morina (VIII) (Hollman *et al.*, 1997) (Figura 5).

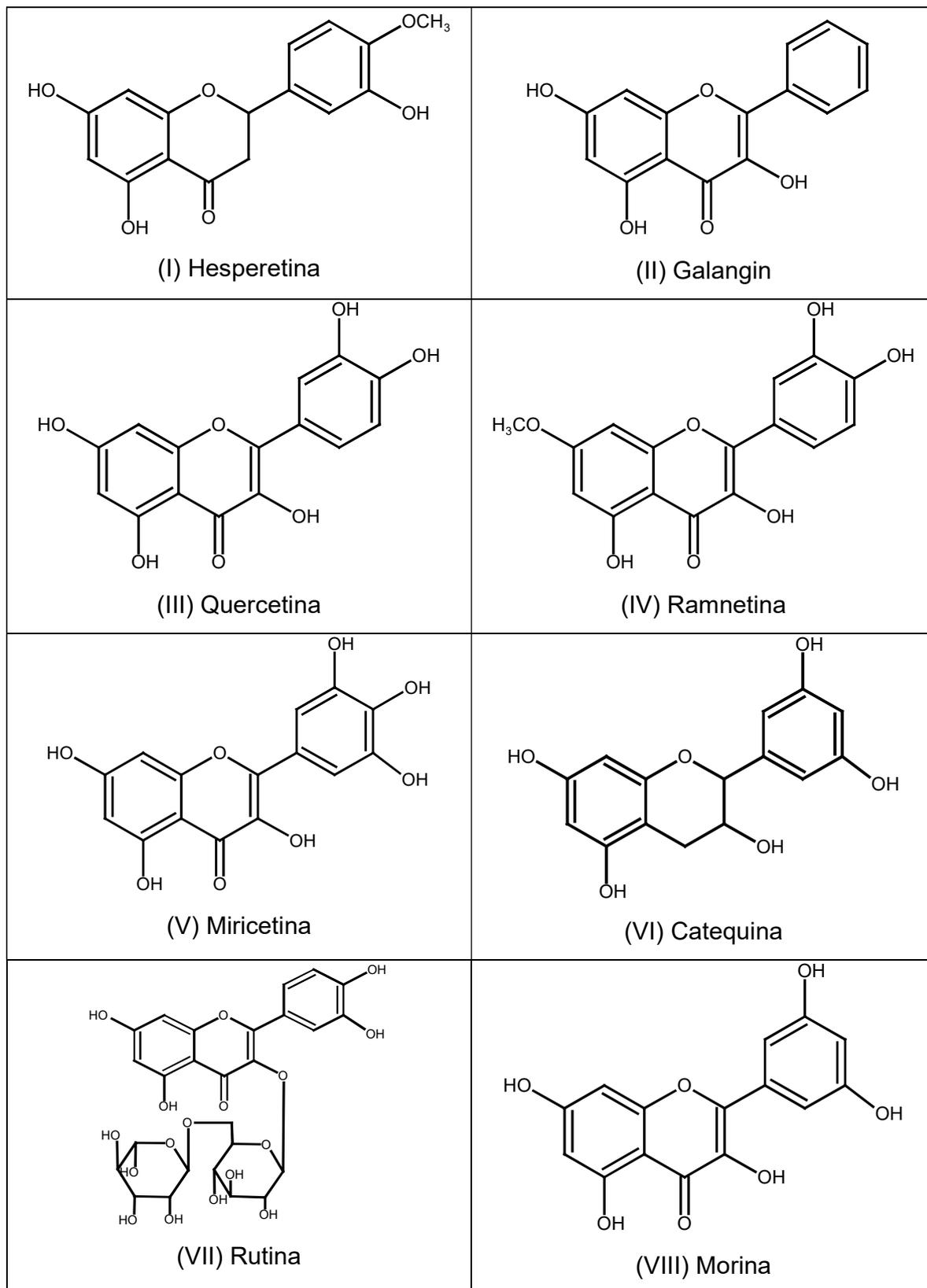


Figura 5. Estructura de flavonoides con actividad antiinflamatoria o antioxidante

2.3.2 Triterpenos pentacíclicos

Los triterpenos (30 átomos de carbono: seis unidades isoprenicas) se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, ya sea en su estado libre o acompañados de azúcares. Estos compuestos se pueden dividir en familias tomando en cuenta el número de anillos que los conforman (acíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos); dentro de estas familias se encuentran subclasificados por grupos (α -amirina, β -amirina, lupeol, etc.) (Mahato *et al.*, 1992).

Entre las propiedades biológicas de los triterpenos se encuentra su capacidad como agentes antiinflamatorios, actuando sobre la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, ejemplos de estos son la α y β -amirina (IX y X), el ácido 18- β -glicirretínico (XI), glicirrizina (XII), ácido oleanólico (XIII), ácido ursólico (XIV) y la carbenoxolona (XV), estos compuestos son abundantes en los alimentos vegetales (Safayhi *et al.*, 1997; Akamatsu *et al.*, 1991; Wasternack *et al.*, 1994). Otros compuestos tipo triterpeno que presentan actividad antiinflamatoria son el β -sitosterol (VXI) (Gupta *et al.*, 1980; Martínez-Vázquez *et al.*, 1999) el taraxesterol (XVII) y el cicloartenol (XVIII) (Akihisa *et al.*, 1999) (Figura 6).

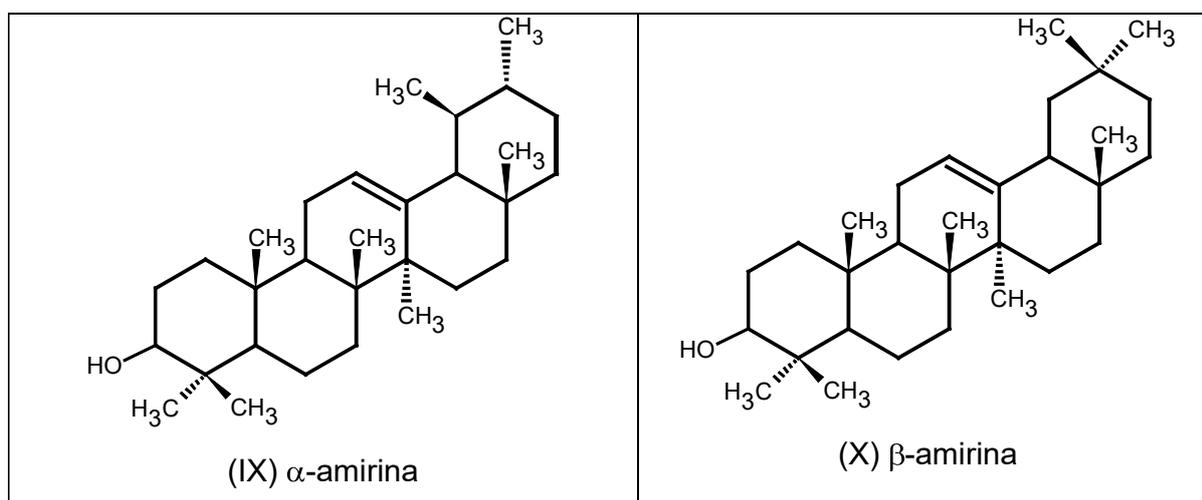


Figura 6 (continuación). Estructura de triterpenos pentacíclicos con actividad antiinflamatoria o antioxidante.

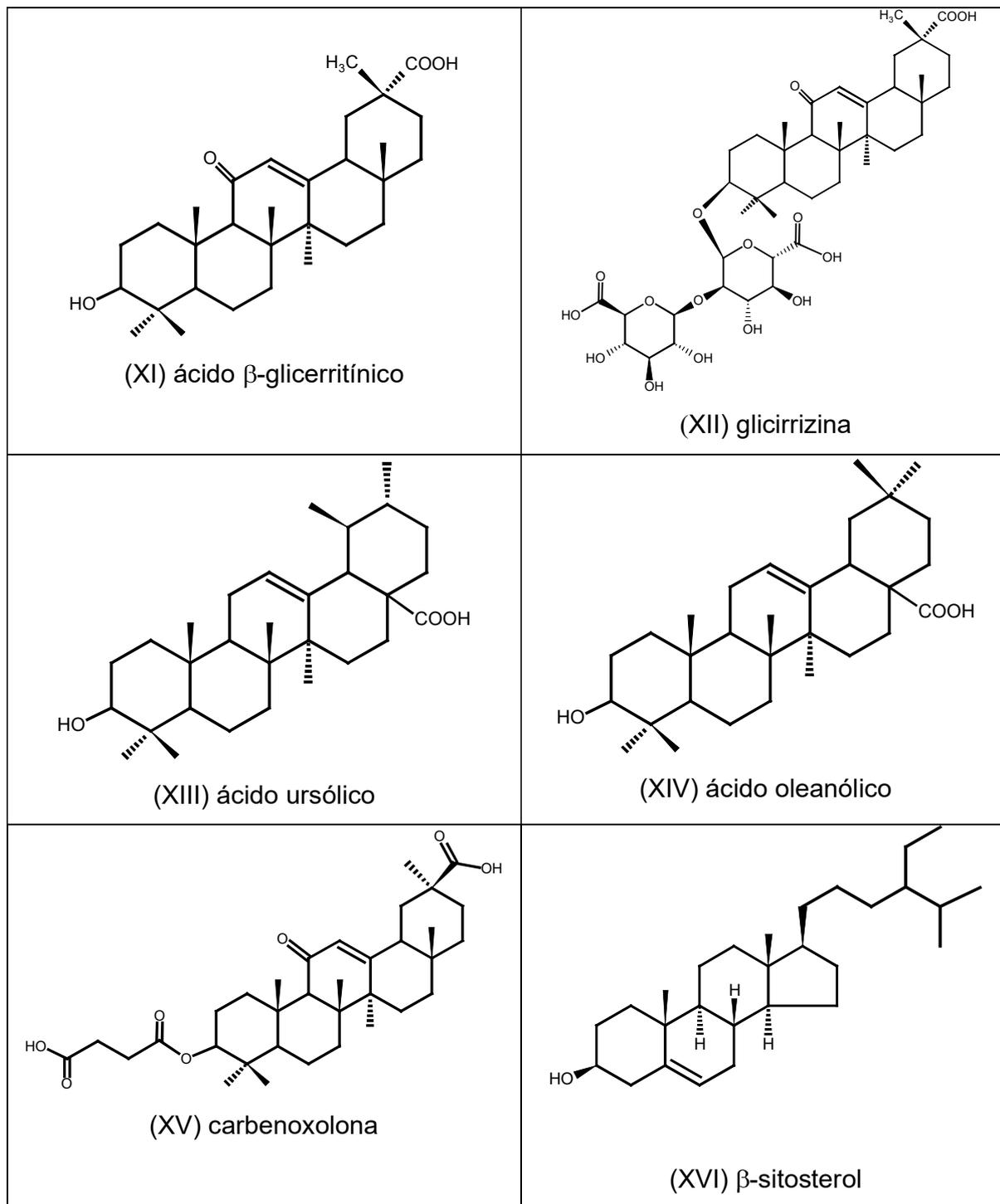


Figura 6 (continuación). Estructura de triterpenos pentacíclicos con actividad antiinflamatoria o antioxidante.

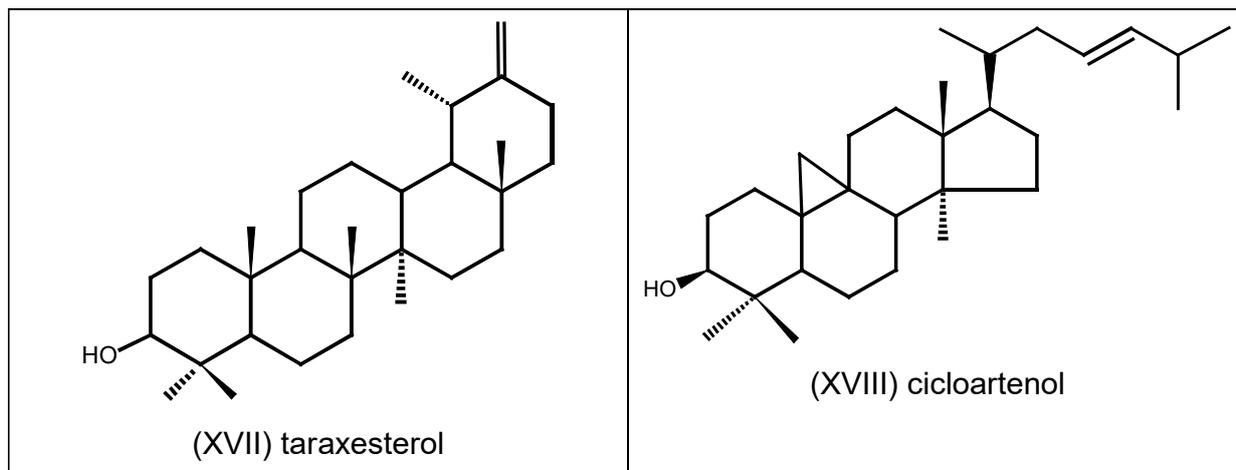


Figura 6 (continuación). Estructura de triterpenos pentacíclicos con actividad antiinflamatoria o antioxidante.

2.3.3 Iridoides

Los iridoides se distinguen estructuralmente por estar formados por un anillo básico de dihidropirano fusionado a un ciclopentano, se dividen en iridoides metilciclopentano monoterpénicos, iridoides glicosilados, secoiridoides (con anillo ciclopentano abierto) y alcaloides monoterpénicos y bis iridoides (Boros y Stermitz 1990) a estos compuestos se les han encontrado propiedades farmacológicas, ya sea como hipotensores, analgésicos, antiinflamatorios, diuréticos, antidiarreicos, antivirales, sedantes y citotóxicos. Este tipo de compuestos se encuentran en varios órdenes vegetales como las Gentianales, Oleales, Dipsacales, Coranales y Scrophulareales (Rosendal *et al.*, 1989).

Como ejemplo de iridoides involucrados en la actividad antiinflamatoria se han reportado: el catalposido (IXX) que inhibe la actividad de la iNOS (Oh *et al.*, 2002), el patridoide II (XX) que inhibe la producción del TNF- α (Ju *et al.*, 2003), la lamiida (XXI) el cual presenta actividad inhibitoria de la peroxidación de lípidos (Horwart *et al.*, 2002), el bartsiosido (XXII) que se encuentra involucrado en la inhibición de tromboxanos (Bermejo *et al.*, 2000.), el agnusido (XXIII) y el peduncularisido (XXIV) tienen actividad en la inhibición de la COX-2 (Suksamram *et al.*, 2002). Con lo que respecta a modelos animales se ha encontrado que el ácido logánico (XXV) y aucobina (XXVI), presentan una alta actividad en la inhibición de edemas (Recio *et al.*, 1994) (Figura 7)

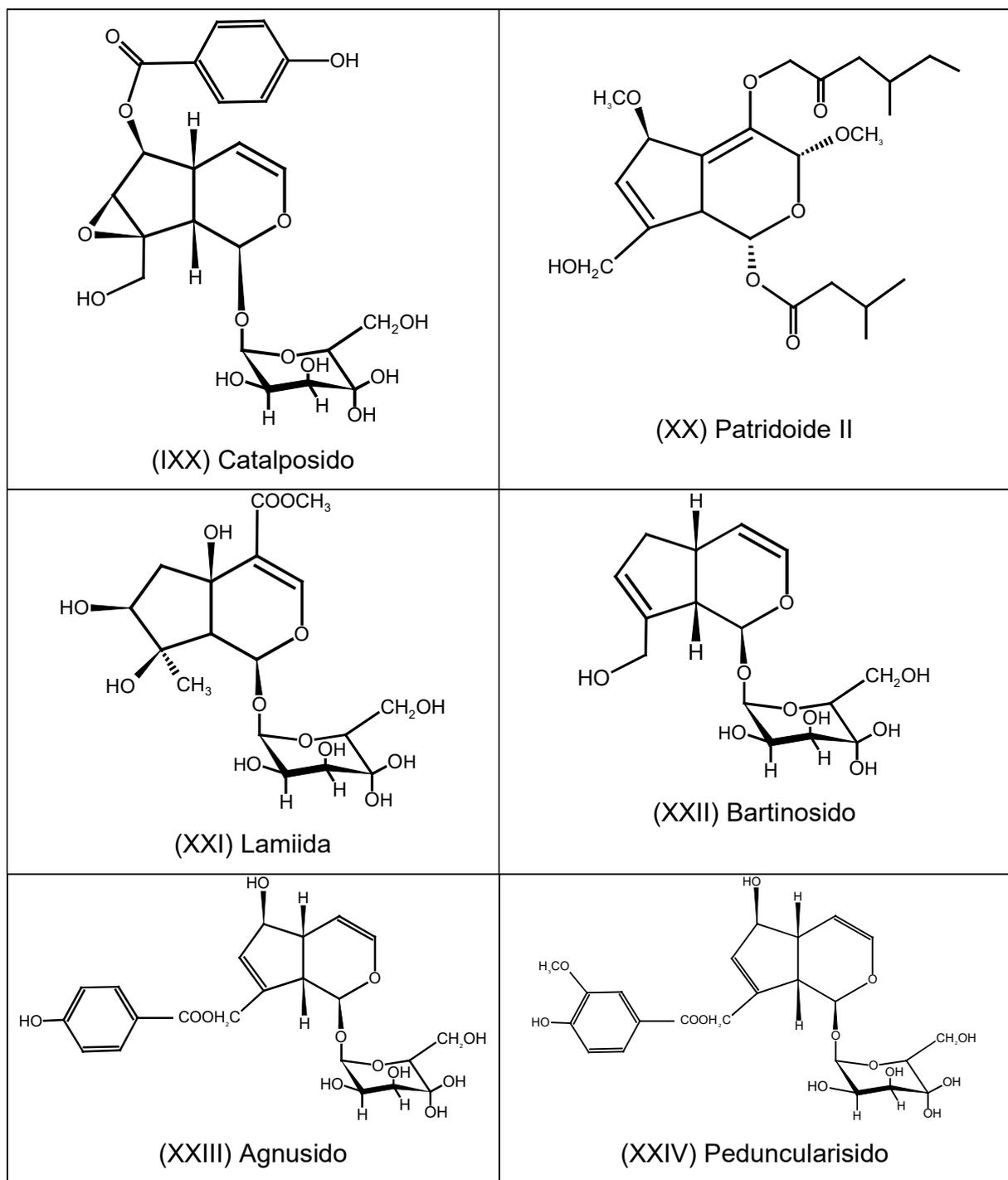


Figura 7. Estructura de iridoides con actividad antiinflamatoria o antioxidante.

2.3.4 Fenilpropanoides

Los fenilpropanoides representan un amplio grupo de productos de origen natural, los principales precursores son el ácido cinámico y el ácido *p*-hidroxicinámico, también conocido como ácido *p*-cumárico. En las plantas estos compuestos se forman a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, los cuales son sintetizados por la vía del ácido shikímico. Estos se pueden dividir en fenilpropanoides simples, lignanos y neolignanos, flavonoides y taninos (Robbers *et al.*, 1996). En cuanto a su distribución, las familias de las Asteraceae, Crassulaceae, Araliaceae, Scrophulariaceae, Salicaceae, Plantaginaceae, Thymelaeaceae, Lamiaceae y Oleaceae tienen especies ricas en este tipo de compuestos (Kurkin 2003).

Varias plantas empleadas en la medicina tradicional contienen grandes cantidades de estos compuestos. Algunos de estos fenilpropanoides glicosilados presentan actividades biológicas como antibacterianos (Didry *et al.*, 1999), antivirales como el leucosoptosido (XXIX) (Kim *et al.*, 2001), analgésicos, antiespasmódicos, neuroprotectivos, citostáticos inhibiendo la metástasis (Ohno *et al.*, 2002), antiinflamatorias y como atrapadores de radicales libres como son el ácido caféico (XXX) e hidroxitirosol (XXXI) (Aldioni *et al.*, 2006).

Uno de los compuestos tipo fenilpropanoides glicosilados más estudiados hasta el momento es el verbascósido (XXXII) conocido también como acteosido, este compuesto presenta actividad antioxidante en modelos tanto *in vivo* como *in vitro* (Aldioni *et al.*, 2006). A su vez, el verbascósido inhibe la producción de histamina (Lee *et al.*, 2006), la producción de PGE₂ (Díaz *et al.*, 2004), también es el principio activo de *Lippia tripillia* en la actividad analgésica (Nakamura *et al.*, 1997), presenta actividad antibacteriana (Didry *et al.*, 1999) y presenta actividad atrapadora del NO• al igual que el isoacteosido (XXXIII), tubulosido B (XXXIV) y 2'-O-acetilacteosido (XXXV) (Xiong *et al.*, 2000) (Figura 8).

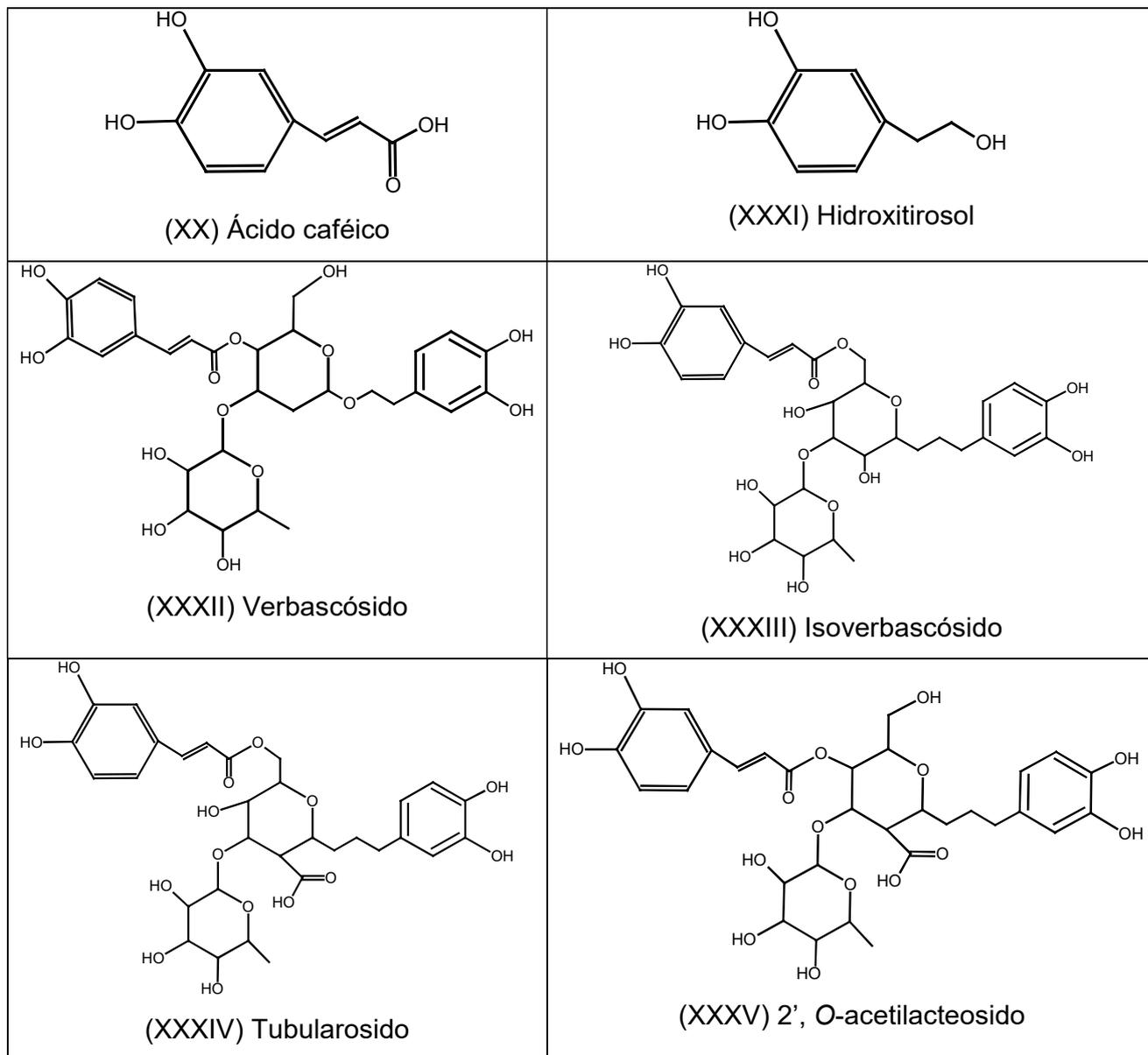


Figura 8. Estructura de iridoides con actividad antiinflamatoria o antioxidante.

En la figura 9 se muestra a que nivel del proceso inflamatorio actúan los compuestos mencionados.

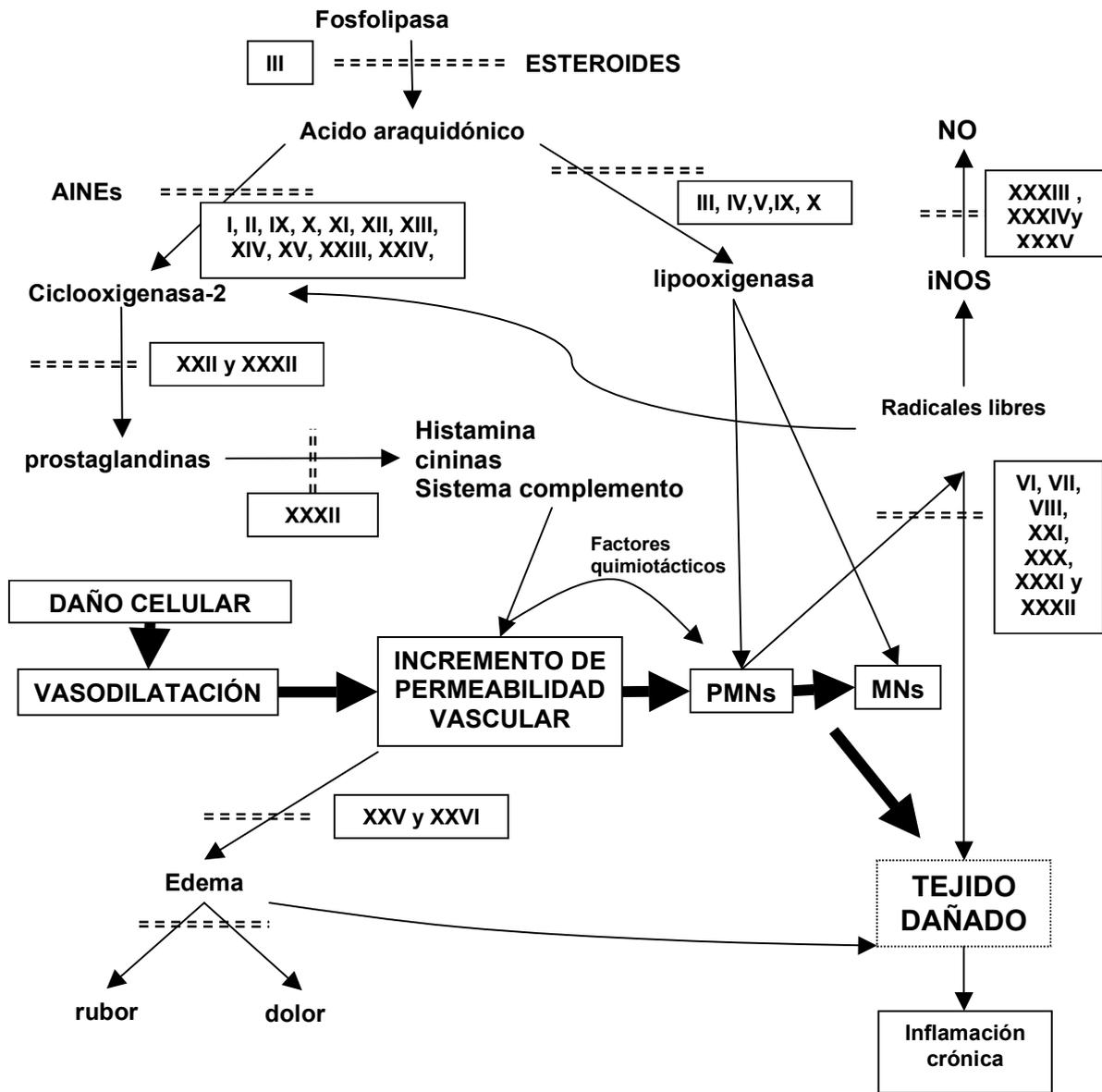


Figura 9. Actividad antiinflamatoria de algunos compuestos provenientes de plantas (los números romanos se refieren a los compuestos de las figuras anteriores) =====: sitio de actividad antiinflamatoria, AINEs: antiinflamatorios no esteroideos, PMN: células polimorfonucleares, MN: células mononucleares (modificado de Bonta *et al.*, 1987).

2.4 Especies vegetales

2.4.1 *Barkleyanthus salicifolius*

Nombre científico: *Barkleyanthus salicifolius* (H.B.K.) Rob. & Brettell. Antes *Senecio salignus* DC.

Nombre común: Jarilla, Jara.

Distribución: Ampliamente distribuida en la Cuenca de la Ciudad de México. Fuera de la Cuenca, se extiende desde el sur de Arizona hasta El Salvador y Honduras.

Hábitat: Desde los 2,250-3,650 msnm. En bosques de Pino, Encino y Oyamel, en matorrales xerófilos y praderas alpinas. Preferentemente en lugares perturbados y a orillas de caminos.

Usos: El cocimiento de las hojas se utiliza en la lavados como remedio contra las fiebres intermitentes, y en baños contra el reumatismo (Calderón y Rezedowski 2005), aplicación en el vientre para aminorar el calor que siente la persona que ha ingerido alcohol, para dar olor y humedad al pan de Malacachtepec Momoxco.
<http://cdi.gob.mx/index>

Clasificación:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta (plantas vasculares)

Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas)

División: Magnoliophyta (plantas con flores)

Clase Magnoliopsida (dicotiledoneas)

Subclase: Asteridae

Order: Asterales

Familia: Asteraceae

Genero *Barkleyanthus* (Kunth) H.E. Robins y Brett

Especie *Barkleyanthus salicifolius* (Kunth) H.E. Robins y Brett.

La especie *Barkleyanthus salicifolius* Kunth pertenece a la familia Asteraceae la cual esta comprendida por 1,100 géneros y 20,000 especies. El género más numeroso es *Senecio* (1,500), seguido por *Vernonia* (900), *Hieracium* (800), *Eupatorium* (600), *Centaurea* (600), *Coussinia* (600), *Helichrysum* (500), *Bacharis* (400) y *Artemisia* (400) (<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/ibc99/botanica/botanica/asterace.htm>).

La familia de las Asteraceae ha sido ampliamente empleada por las comunidades nativas y mestizas de México por sus propiedades medicinales. En México hasta 1994 se reconocía la existencia de 380 géneros pertenecientes a esta familia con 3,000 especies (Heinrich *et al.*, 1998).

Estudios etnobotánicos de *Barkleyanthus salicifolius* Kunth (Asteraceae) le atribuyen un uso popular en el tratamiento de diversos padecimientos inflamatorios (Martínez, 1967; Aguilar *et al.*, 1994), y de esta especie se han aislado compuestos de tipo furano eremofinalo (Figura 9) (Bholmann *et al.*, 1976).

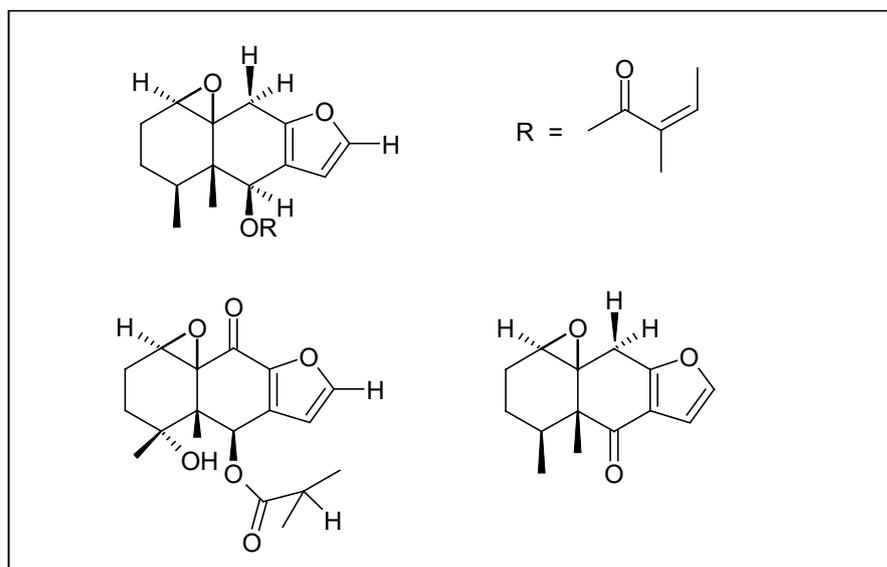


Figura 10. Furanos eremofilanos aislados de *Barkleyanthus salicifolius*.

2.4.2 *Penstemon gentianoides*

Nombre científico: *Penstemon gentianoides* H.B.K.

Nombre común: Jarritos, campanitas

Distribución: Ampliamente distribuida en la cuenca de la Ciudad de México. Tepeapulco; Iturbide a Tlalpan y Milpa Alta; Texcoco a Amecameca.

Hábitat: 3,000-4,200 msnm. Se le encuentra en las partes altas de las montañas, en bosques de pino y de oyamel, zacatonales alpinos, también en matorrales secundarios (Calderón y Rzedowski 2005)

Clasificación:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta (plantas vasculares)

Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas)

División: Magnoliophyta (plantas con flores)

Clase Magnoliopsida (dicotiledoneas)

Subclase: Asteridae

Order: Scrophulariales

Familia: Plantaginaceae

Genero: *Penstemon*

Especie *Penstemon gentianoides* H.B.K.

La especie *Penstemon gentianoides* H.B.K. pertenece a la familia Plantaginaceae (antes Scrophulariaceae; Judd *et al.*, 2002) la cual esta formada por 92 géneros y cuenta con aproximadamente 2,000 especies, este género en particular pertenece a la tribu Cheloneae (Albach *et al.*, 2005), esta especie no cuenta con antecedentes etnobotánicos escritos pero en referencias obtenidas en el poblado de San Bartolo Oxtotitlan, Municipio Jiquipilco, Toluca se argumenta su actividad antiinflamatoria, por otro lado se cuenta con una tesis de licenciatura en la cual se realizó un estudio fitoquímico (García, 1991).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con los antecedentes, el estrés oxidativo está involucrado a diferentes niveles en el proceso inflamatorio: 1) participa en vías de señalización intracelular para la traducción de moléculas pro-inflamatorias, 2) como mecanismo de defensa frente a patógenos, 3) en la producción de eicosanoides pro inflamatorios y 4) en la generación de daño a las membranas celulares. Por otro lado, se sabe que diversos compuestos de origen natural obtenidos particularmente de plantas, presentan actividad antiinflamatoria y antioxidante siendo esta una opción viable para la búsqueda de nuevos compuestos de origen natural con actividad biológica.

Con base en esta información, diferentes grupos de investigación proponen que la actividad antiinflamatoria de algunos compuestos se debe a su actividad antioxidante (Shaheen *et al.*, 2005; Goncalves *et al.*, 2005; Riaz *et al.*, 2004; Sala *et al.*, 2002). Es decir, existe una relación directa entre los mecanismos de actividad antioxidante y la respuesta antiinflamatoria, sin embargo, las evidencias no son concluyentes y es necesario continuar las investigaciones.

Tomando en cuenta que las evidencias obtenidas hasta el momento, no permiten plantear una conclusión general al respecto, mi objetivo en este trabajo fue determinar si las especies *P. gentianoides* y *B. salicifolius* poseen actividad antiinflamatoria y antioxidante, así como emplear un ensayo en el que se relacionaran ambas actividades y poder contribuir con ello al esclarecimiento de las investigaciones que involucran una relación directa entre la actividad antioxidante y antiinflamatoria.

4. HIPÓTESIS

Se sabe que las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno están involucrados en los procesos inflamatorios y hay evidencia de que las plantas *P. gentianoides* y *B. salicifolius* tienen actividad antiinflamatoria, por lo tanto se espera encontrar compuestos que presenten actividad antiinflamatoria y antioxidante así como alguna relación entre estas actividades.

5. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antiinflamatoria y antioxidante de diferentes extractos, fracciones y compuestos de *Barkleyanthus salicifolius* y *Penstemon gentianoides*, a través del fraccionamiento y purificación de los compuestos responsables de la actividad y utilizando diversos modelos experimentales.

5.1 Objetivos particulares

1. Identificación y clasificación de las especies *Barkleyanthus salicifolius* y *Penstemon gentianoides*.

2. Realizar la extracción de las plantas con diferentes solventes orgánicos: metanol (MeOH), n-hexano (n-Hex), diclorometano (CH₂Cl₂) y acetato de etilo (AcOEt), para obtener los extractos orgánicos correspondientes.

3. Determinar la actividad antiinflamatoria de los extractos orgánicos de *P. gentianoides* y *B. salicifolius* en el modelo de oreja de ratón empleando TPA como molécula inductora de la inflamación.

4. Determinar la actividad antioxidante de los extractos, particiones, fracciones y compuestos puros de *P. gentianoides* y *B. salicifolius* en los modelos de DPPH[•], TBARS, ORAC y FRAP.

5. Determinar los compuestos fenólicos totales de los extractos, particiones, fracciones y compuestos puros de *P. gentianoides* y *B. salicifolius* por el método de Folin-Ciocalteu.

6. Determinar la actividad antiinflamatoria de los extractos, particiones, fracciones y compuestos de *P. gentianoides* y *B. salicifolius* midiendo la expresión y la actividad de las enzimas COX-2 e iNOS en la línea celular RAW 264.7.

7. Realizar el fraccionamiento biodirigido de las muestras que presenten mayor actividad así como aislar y purificar el o los metabolitos secundarios responsables.

8. Caracterizar estructuralmente los metabolitos secundarios mediante técnicas espectroscópicas: resonancia magnética nuclear de H^1 y C^{13} (RMN H^1 y C^{13}), infra rojo (IR) y espectrométricas: espectrometría de masas (MS).

9. Evaluar los metabolitos secundarios aislados en pruebas de actividad antiinflamatoria y antioxidante.

Figura 11. Estrategia general

Para cumplir con los objetivos se realizó la siguiente estrategia general (Figura 11).

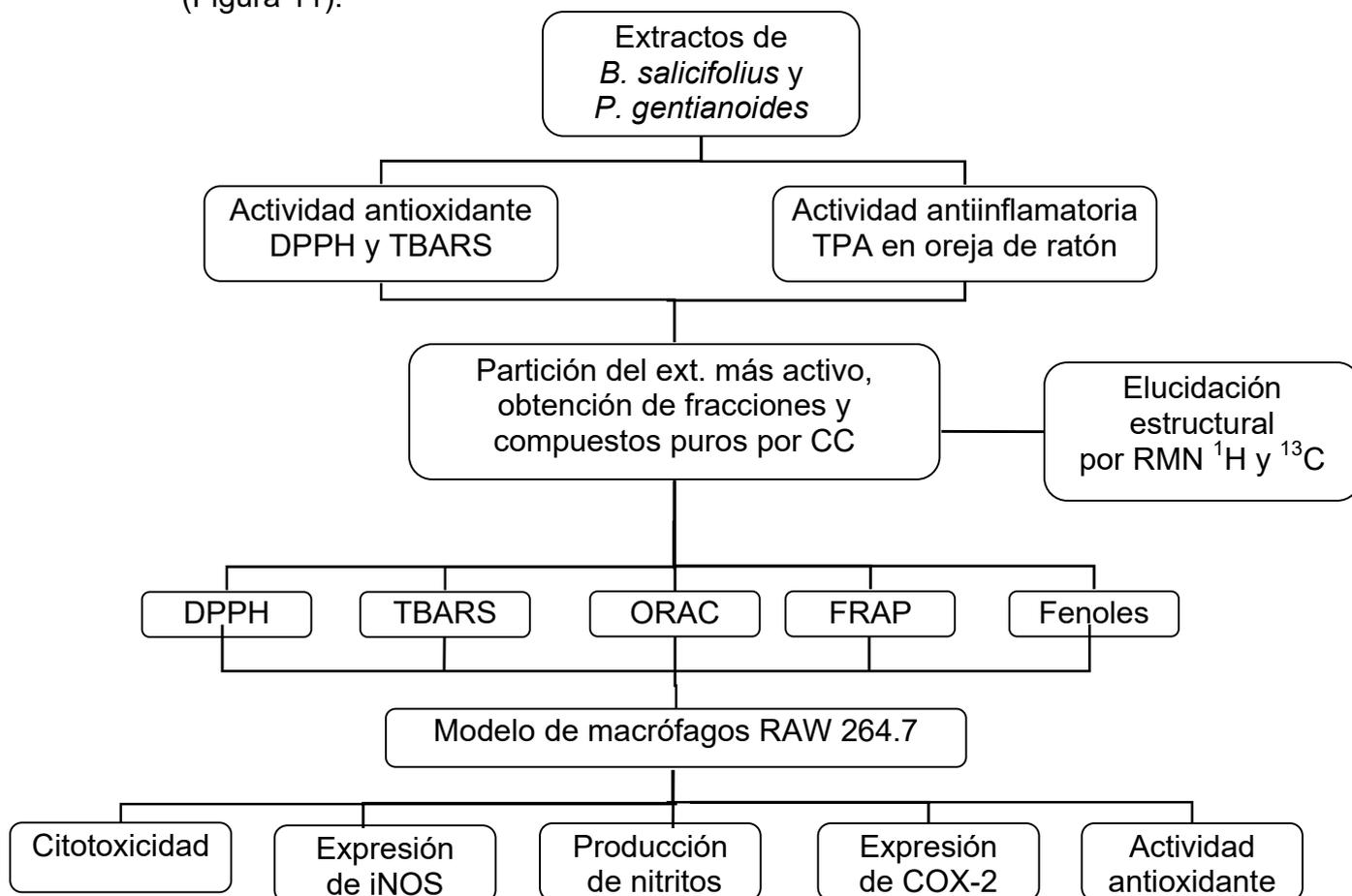


Figura 11. Estrategia general

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material Vegetal.

Los ejemplares de *Barkleyanthus salicifolius* fueron recolectados en la carretera México-Oaxtepec (Figura 12) y de *Penstemon gentianoides* en el parque Ecológico de los Dinamos D.F. (Figura 13). Una muestra de cada especie fue llevada al Instituto de Biología para comprobar su identidad taxonómica. Los vouchers de cada especie fueron identificados por el M. en C. Francisco Ramos, Depto. de Botánica, del Instituto de Biología UNAM.

Figura 12. Voucher *B. salicifolius*

	<p>Fam. Compositae (antes Asteraceae) Especie: <i>Barkleyanthus salicifolius</i> (Kunth) H. Rob & Brettell, (Ex. <i>Senecio salignus</i>) Hábitat: Arbusto abundante de 1.5 m en zonas perturbadas, orilla de carretera Méx.-Oaxtepec. Orilla Panteón "Jardines de la Quietud". Desviación a Juchitepec. Marzo del 2002. Vegetación Pino-Encino. Nombre vulgar: "jara" o "jarilla" Alt.: 2800-3000m Identificó: M. en C. Francisco Ramos, Herbario MEXUS, Instituto de Biología. UNAM</p>
--	---

Figura 13. Voucher *P. gentianoides*

	<p>Fam. Plantaginaceae Especie: <i>Penstemon gentianoides</i> (HBK) Hábitat: Bosque de Pino-Encino, Parque Ecológico "Los Dinamos", D.F. Alt. aprox. 3,000 m Septiembre 2002 Nombres vulgares: "jarro" ó "jarritos". Identificó: M. en C. Francisco Ramos, Herbario MEXUS, Instituto de Biología. UNAM Voucher MEXU, Gen: 7508, G-No. 7.</p>
---	--

6.2 Extractos Vegetales

De *B. salicifolius* se separaron hojas y flores y de *P. gentianoides* hojas, tallos y raíces; estas se secaron a temperatura ambiente y fragmentadas de

forma manual. De cada tejido se realizaron extractos orgánicos con los solventes MeOH, n-Hex, CH₂Cl₂ y AcOEt.

6.3 Actividad antioxidante

6.3.1 Método del radical DPPH[•].

La actividad antioxidante se midió empleando el reactivo 1,1-difenil-2 - picrilhidracil (DPPH[•]), este método se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes en atrapar el electrón libre del radical DPPH[•] (ver anexo 1). Para llevar a cabo la técnica, en tres pozos de una placa de 96 pozos se colocaron 50 µL de la solución problema y 150 µL de una solución etanólica de DPPH[•] (100 µM concentración final). La mezcla se incubó durante 30 min a 37°C con agitación y se leyó a 515 nm en un lector de placas (modelo ELX808 Ultra Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, INC). Este método fue modificado a partir de Céspedes *et al.*, 2001; Kubo *et al.*, 2002. El porcentaje de actividad antioxidante frente al radical DPPH[•] se obtuvo empleando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de inhibición} = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{problema}} / \text{Abs}_{\text{control}}) * 100$$

6.3.2 Ensayo ORAC

El ensayo ORAC (Capacidad atrapadora del radical oxígeno, sigla tomadas del inglés '*oxygen radical absorbance capacity*') consiste en medir la capacidad antioxidante de las muestras al inhibir la oxidación de la disodio fluoresceína el cual fluórese en presencia de un radical libre generado por el 2,2'azobis (2-propamidamida) dihidrocloro (AAPH) (ver anexo 1). En este ensayo el reactivo Trolox un análogo soluble de la vitamina E, es empleado como control estándar (1-7 µM), el ensayo se llevó acabo en placas oscuras de 96 pozos (Fisher Scientific, Hanover Park, IL) a 37°C empleando como sistema de dilución una solución amortiguadora de fosfatos (SAF, 75 mM, pH 7.4). Se adicionaron 20 µL tanto de las diluciones para la curva del control estándar Trolox como de las muestras a la concentración deseada, posteriormente se añadieron 120 µL de fluoresceína (70 nM, concentración final). La mezcla fue preincubada por 15 min a 37°C y posteriormente se adicionaron 60 µL de AAPH (concentración final de 12 mM). La placa de 96 pozos se colocó inmediatamente en un lector de fluorescencia Biotek Modelo

FLx800, midiendo cada minuto durante 120 min, empleando una excitación $\lambda = 485/20$ y una emisión $\lambda_e = 582/20$ nm. El resultado final fue calculado empleando la diferencia del área bajo la curva (ABC) usando el decaimiento de la fluorescencia entre el blanco y la muestra prueba, los resultados se expresaron en μmol de equivalentes de Trolox por gramo de muestra ($\mu\text{mol TE/g}$) (Cao *et al.*, 1999).

6.3.3 Ensayo FRAP

En el ensayo FRAP (capacidad antioxidante en la reducción de hierro, siglas tomadas del inglés '*ferric reducing antioxidant power*') se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes de donar un electrón al Fe^{3+} oxidado para pasar a Fe^{2+} reducido (ver anexo 1). En este ensayo se prepararon las siguientes soluciones: A) 300 mM de amortiguador de acetatos pH 3.6 (acetato de sodio trihidratado/ácido acético glacial) B) 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridol-s-triazina) en 40 mM de HCl y C) 20 mM FeCl_3 , estas soluciones se mezclaron en una relación A:B:C 10:1:1. Se empleó catequina como curva estándar a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 μM (todas las soluciones se disolvieron en amortiguador de acetato de sodio trihidratado/ácido acético glacial) se adicionaron en cada pozo 10 μL de la muestra prueba y/o estándar más 95 μL de la mezcla de reactivos en una placa de 96 pozos, se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se leyó a una absorbencia de 593 nm. El resultado final es expresado como μmol catequina equivalentes por gramo de muestra ($\mu\text{mol CatE/g}$) (Benzie *et al.*, 1999).

6.3.4 Determinación de fenoles con el ensayo Folin-Ciocalteu

El contenido total de polifenoles se determinó empleando el reactivo Folin-Ciocalteu (ver anexo 1). Se agregaron 10 μL de las muestras y de estándar de catequina, respectivamente (10-100 μM) y 150 μL de una dilución del reactivo Folin-Ciocalteu (1:15 mezclado con agua) a una placa de 96 pozos y se incubó por 3 min a temperatura ambiente. Después se añadieron 50 μL de carbonato de sodio (2 partes de solución saturada y 3 partes de agua) a cada pozo y se incubaron por 2 h, y finalmente se leyó a 725 nm. Los

resultados están expresados como μmol de catequina equivalentes por gramo de muestra ($\mu\text{mol CatE} / \text{g}$) (Singleton *et al.*, 1965).

6.3.5 Inhibición de la lipoperoxidación inducida con FeSO_4 , cuantificada por la técnica TBARS

Se utilizó una técnica modificada de TBARS (especies reactivas del ácido tiobarbitúrico, siglas tomadas del inglés '*tiobarbituric reactive species*') a partir de lo descrito por De las Heras *et al.* (1998) y Liu *et al.* (2000). El cerebro de una rata se homogenizó en amortiguador de fosfatos (SAF 9.5 mM, pH 7.4) y se centrifugó 10 min a 3,000 rpm; se determinó el contenido de proteína en el sobrenadante por el método $A_{280-205}$ y se ajustó a 2.3529 mg de proteína/mL. En tubos para micro centrifuga de 1.5 mL se colocaron 425 μL de sobrenadante, se agregaron 25 μL del compuesto a probar y se incubaron durante 30 min a 37°C con agitación; posteriormente se añadieron 50 μL de FeSO_4 100 μM (concentración final 10 μM), la mezcla se incubó a 37°C con agitación durante 60 min. Después se agregaron 50 μL de BHT (Butil hidroxitolueno, 0.06% p/v) y 500 μL de reactivo TBA (ácido tiobarbitúrico 1% y ácido trocloroacético 30 %, en proporción 1:1), y se incubó en baño de agua a 90°C por 30 min. Los tubos se enfriaron en baño de hielo y se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se tomaron 1,000 mL de sobrenadante y se midió la absorbencia del a 532 nm en un espectrofotómetro (Genesis 5, Spectronic Instruments), el valor obtenido se interpoló en una curva estándar de tetrametoxi propano (ver anexo 1) y el contenido de TBARS se expreso como nmoles de TBARS/mg de proteína. El porcentaje de inhibición de la peroxidación se calculó de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{nMoles TBARS}_{\text{control}} - \text{nMoles TBARS}_{\text{extracto}}) / \text{nMoles TBARS}_{\text{control}}}{\text{nMoles TBARS}_{\text{control}}} * 100$$

6.4 Actividad antiinflamatoria

6.4.1 Ensayo de actividad antiinflamatoria frente a edema inducido con TPA en oreja de ratón.

Se utilizaron grupos de 3 ratones hembra por compuesto prueba y para el control (Ratones CD-1 hembra de 18 a 20 g, obtenidas del Bioterio México). Los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico (3.5 mg/kg) y cinco minutos después, en la oreja derecha se aplicaron de forma tópica 10 µL de solución etanólica de TPA (13-acetato-12-*o*-tetradecanoilforbol; 2.5 µg / oreja) y en la oreja izquierda 10 µL del etanol. Después de diez minutos, en la oreja derecha se aplicaron de manera tópica 20 µL del compuesto a la concentración de prueba y en la oreja izquierda 20 µL del vehículo. Se repitió el mismo procedimiento con los ratones que se utilizaron como controles, usando únicamente el vehículo. Cuatro horas después, los animales se sacrificaron y con un sacabocado de 7 mm de diámetro se tomó una muestra de ambas orejas. El edema se calculó por diferencia de pesos entre ambas orejas. Se utilizó como control positivo indometacina. El porcentaje de actividad se obtuvo con la siguiente fórmula. (Pérez-Guerrero *et al.*, 2001; De Young *et al.*, 1989).

$\% \text{ de actividad} = (\text{mg oreja control} - \text{mg oreja prueba} / \text{mg oreja control}) * 100.$

6.4.2 Inducción de la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS en los macrófagos RAW 264.7.

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC). Esta línea celular ha sido ampliamente empleada para probar el efecto antiinflamatorio de varios agentes, estas células expresan las enzimas COX-2 e iNOS al estar en contacto con los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos (Reddy *et al* 1994; Phillips *et al.*, 1993).

Las células RAW 264.7 se sembraron en un frasco de cultivo con una densidad de 3×10^6 células / frasco en 5 mL de medio de cultivo Doubecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con 10% de SFB (Suero fetal bovino; inactivado con calor) y 100 unidades/mL de penicilina G y estreptomicina y se

incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ por 24 h. Posteriormente, se lavaron con SAF (pH 7.4) y el medio se reemplazó con 5 mL de DMEM con 10% de SFB, a las células empleada como control positivo y las tratadas con las muestras se les añadió 1 µg/mL de LPS (LPS de *E. coli* serotipo 0111:B4), para inducir la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS, y un control negativo (sin LPS), todos los frascos se incubaron por 12 h. Transcurrido este tiempo las células se lavaron dos veces con 5 mL de SAF posteriormente se recolectaron agregando 1 mL de SAF y raspando el fondo del frasco, este mL se pasó a un tubo para micro centrifuga de 1.5 mL, se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min/ tres veces lavando con 1 mL de SAF cada vez, se desechó el sobrenadante y se adicionaron 50 µL de amortiguador de lisis (250 mM NaCl, 50 mM HEPES, 5 mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 3 mM NaF, 0.5 mM ortovanadato, y 10 µL de cóctel inhibidor de proteasas). Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando reactivo Bio-Rad, utilizando una curva de albúmina sérica bovina.

Para medir la expresión de COX-2 e iNOS, primero se agregaron 40 µg de proteína por carril en un gel de poliacrilamida SDS al 7.5%, se llevó acabo la electroforesis a 100 mV por 1 h en un amortiguador Tris, glicina, SDS (amortiguador de corrimiento), posteriormente se realizó el Western blot (inmunoréplica) transfiriendo el gel a una membrana de nitrocelulosa en una cámara húmeda con un el amortiguador de TRIS más MeOH. Al finalizar, la membrana se boqueó con 1% de leche descremada en amortiguador Tris toda la noche a 4°C o 1 h a 37°C. A continuación, la membrana se incubó con la misma solución bloqueadora pero con los anticuerpos primarios policlonales anti-iNOS (1:200) y anti-β-actina 1:200 por 1 h a 37 °C. Después la membrana se lavó y se incubó con el anticuerpo secundario (1:25,000) por 1 h a 37°C. Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas empleando un sistema de quimioluminiscencia. La misma membrana se lavó para eliminar los anticuerpos adheridos y se repitió la técnica con (1:1,000) anti-COX-2 y anti-β-actina bajo las mismas condiciones. Las membranas fueron escaneadas y digitalizadas para su análisis con un software BIO-RAD.

6.4.3 Ensayo de toxicidad en los macrófagos RAW 264.7 empleando MTT.

Se utilizó el ensayo empleando MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] descrito por Mosmann en 1983, este ensayo está basado en la capacidad de la enzima mitocondrial dehidrogenasa de las células viables para romper el anillo tetrazolio que le confiere el color amarillo al MTT y formar cristales de formazan azul oscuro (ver anexo 1).

Se sembraron 80,000 células/pozo en una placa de 96 pozos bajo las mismas condiciones de expresión de las enzimas COX-2 e iNOS. Posteriormente, se agregaron a cada pozo 20 μ l de MTT (5 mg/mL en SAF), se incubaron a 37°C y una atmósfera de CO₂ durante 1.5 h. Se removió el medio y se adicionaron 200 μ L de DMSO por pozo, la placa se incubó por 15 min para solubilizar los cristales de formazan, se transfirió el DMSO a otra placa de 96 pozos y se midió a una absorbencia a 550 nm (Mosmann 1983).

6.4.4 Determinación de nitritos en macrófagos RAW 264.7.

Se sembraron 500,000 células/pozo en una placa de 96 pozos bajo las mismas condiciones de expresión de las enzimas COX-2 e iNOS. Se tomaron 50 μ L de medio de cultivo de cada pozo y se transfirieron a una placa limpia de 96 pozos, se añadió el mismo volumen del reactivo de Griess (1% de sulfanilamida en 5% de ácido fosfórico y 0.1% de N-naftil-etilenediamina en agua) (Ver anexo 1) y se dejó reaccionar por 10 min en la oscuridad, se midió la absorbencia a 550 nm. Para cuantificar la concentración de nitritos se realizó una curva estándar con nitrito de sodio, la concentración de nitritos se expresa en μ M.

6.4.5 Evaluación del estrés oxidativo en macrófagos RAW 264.7 empleando el reactivo DCFH-DA

La evaluación del estrés oxidativo empleando 2',7'-diclorofluorescein diacetato (DCFH) se basa en la inhibición de la conversión del compuesto no fluorescente al compuesto altamente fluorescente (ver anexo 1). La metodología consiste brevemente en: se sembraron 80,000 células/pozo en

una placa de 96 pozos bajo las mismas condiciones de expresión de las enzimas COX-2 e iNOS. Se desechó el medio y se añadieron 200 μ L de medio adicionado con 100 μ M de DCFH-DA, se dejó incubar durante 30 min. Posteriormente se lavaron los pozos dos veces con SAF y se añadieron 200 μ L de SAF, inmediatamente la placa se colocó en un lector de fluorescencia tomando lecturas cada minuto durante 120 min, utilizando una excitación de 480/20 nm y una emisión de 582/20 nm (Eberhardt *et al.*, 2005).

6.5 Cromatografía

Los extractos se separaron utilizando cromatografía en columna (CC) y en capa fina (CCF). Para la cromatografía en CC se utilizó sílica gel (70-230), para CCF se emplearon cromatoplasmas de sílica gel de 0.20 mm de espesor. Como eluyentes en ambas cromatografías se emplearon diferentes solventes orgánicos como n-Hex, MeOH, CH₂Cl₂ y AcOEt,

6.6 Instrumentación

Los compuestos aislados fueron analizados empleando técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Para las técnicas espectroscópicas de 1 dimensión se utilizaron: resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN¹H), resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN¹³C) y acrecentamiento sin distorsión por transferencia de polarización (DEPT); empleando un espectrómetro ECLIPSE JEOL 300 (300 Mhz), un UNITY INOVA 500 (500 Mhz) y un VARIAN COEMI 200 (200 Mhz)

Para realizar un mejor análisis de los compuestos se realizaron experimentos de 2 dimensiones tanto homonucleares como heteronucleares: espectrometría de correlación homonuclear 1H-1H bidimensional (COSY), como heteronucleares: espectroscopía de correlación heteronuclear ¹H-¹³C bidimensional (HMQC) y espectroscopía de correlación heteronuclear ¹H-¹³C bidimensional a larga distancia (HMBC).

El análisis de infra rojo (IR) se realizó en un espectrómetro Nicolet Magna-IR 750.

En el análisis espectrométrico, se realizó espectrometría de masas por impacto electrónico (EM-IE) en un equipo Hewlett-Packard 5985-B y espectrometría de masas mediante bombardeo rápido de átomos de alta resolución (EM-HR-FAB) en un equipo JOEL HX-110.

Los datos obtenidos mediante estos análisis fueron comparados con los reportados en la literatura correspondiente.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Actividad antioxidante y antiinflamatoria de los extractos de *P. gentianoides* y *B. salicifolius*

7.1.1 Actividad antioxidante de en el modelo de DPPH'

Para evaluar la actividad antioxidante de extractos y compuestos una de las técnicas empleadas es la capacidad de reducir el radical 1,1-Difenil-2-picrilhidracil (DPPH') (Niki, 1987), siendo un procedimiento efectivo para estimar si los compuestos en estudio presentan actividad atrapadora de radicales (actividad antioxidante).

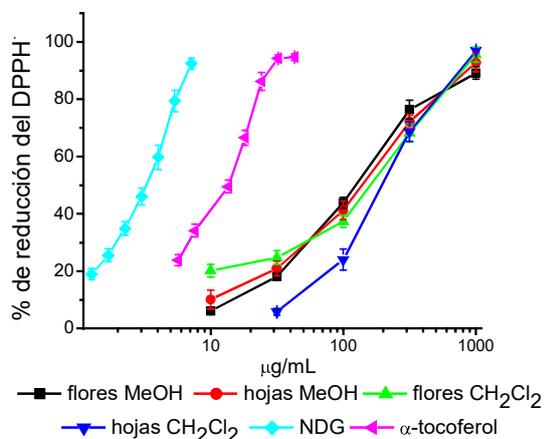
En el ensayo de actividad antioxidante se calculó la CI_{50} de *B. salicifolius* y *P. gentianoides* frente al radical DPPH', y se emplearon el ácido nordihidroguaiarético (NDG) y α -tocoferol como controles positivos.

Las curvas obtenidas con los extractos de las flores y las hojas de *B. salicifolius* no presentaron diferencia significativa a las concentraciones evaluadas con excepción de las hojas con CH_2Cl_2 a 31.5 y 100 $\mu g/mL$, lo anterior indica que tanto las flores y las hojas contienen compuestos similares de mediana y alta polaridad con actividad antioxidante como se observa en la Figura IA.

En el caso de los extractos de *P. gentianoides*, tanto las hojas, tallos y raíces extraídas con MeOH presentaron actividad reductora del radical DPPH' la cual no fue mostró diferencia significativa entre si, este resultado sugirió que las partes aéreas como las raíces contienen compuestos con actividad antioxidante similar frente al DPPH y que estos son polares, (Figura IB). Con respecto a los controles positivos el NDG tuvo la mayor actividad reductora frente al radical DPPH (95% a 9.6 $\mu g/mL$) que el α -tocoferol, el cual a una concentración de 46 $\mu g/mL$ tuvo el mismo efecto.

Con respecto a los extractos hexánicos de ambas especies no se realizaron curvas para calcular la CI_{50} , ya que en los ensayos preliminares no mostraron actividad significativa a 1000 $\mu g/mL$ (datos no mostrados).

I-A



I-B

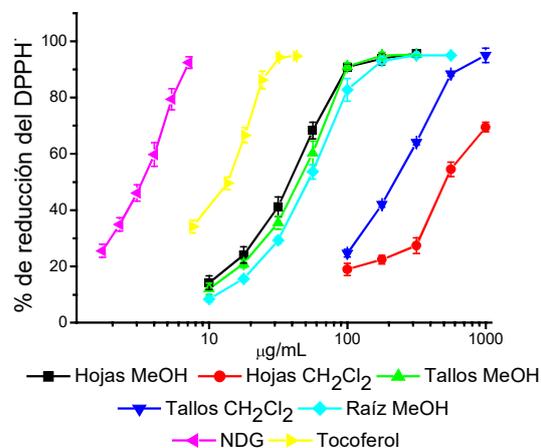


Figura I. Curvas de actividad antioxidante frente al radical DPPH', empleadas para calcular la CI_{50} de los extractos de *B. salicifolius* (I-A), flores con MeOH, hojas con MeOH, flores con CH_2Cl_2 y hojas con CH_2Cl_2 . *P. gentianoides* (I-B), hojas con MeOH, tallos con MeOH, hojas con CH_2Cl_2 , tallos con CH_2Cl_2 y raíz con MeOH. El porcentaje de reducción del DPPH' fue determinado como se describe en 'materiales y métodos'. Los datos están expresados como el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. NDG (ácido Nordihidroguaiaretico).

Las CI_{50} de los tejidos de *P. gentianoides* extraídos con MeOH mostraron mayor actividad reductora del radical DPPH en comparación con los extractos hexánicos y de CH_2Cl_2 , con valores para las hojas, tallos y raíces de 40.05, 46.28 y 55.41 $\mu g/mL$ respectivamente; también presentaron mayor actividad reductora que los extractos de *B. salicifolius* (Tabla I).

La CI_{50} de los tallos de *P. gentianoides* con CH_2Cl_2 ($CI_{50} = 259.28 \mu g/mL$) fue mayor actividad que la CI_{50} de las hojas y las raíces en el mismo solvente ($CI_{50} > a 500 \mu g/mL$). Resumiendo, los extractos de *P. gentianoides* con mayor actividad reductora del radical DPPH' fueron de alta polaridad (MeOH), mientras que los extractos con CH_2Cl_2 y n-Hex de *P. gentianoides* no se consideraron como buenos candidatos para su estudio fitoquímico enfocado al aislamiento de compuestos antioxidantes

Las CI_{50} obtenidas de *B. salicifolius* frente al radical DPPH[•] mostraron que los extractos metanólicos de hojas (CI_{50} 128.42 $\mu\text{g/mL}$) y flores (CI_{50} 124.17 $\mu\text{g/mL}$) tuvieron una actividad ligeramente superior a los extractos de los mismos tejidos con CH_2Cl_2 (hojas y flores CI_{50} 159.26 y 195.47 $\mu\text{g/mL}$). Por otro lado, al igual que para *P. gentianoides* los extractos hexánicos no presentaron actividad significativa.

En un estudio que realizaron con 39 especies vegetales empleando el mismo modelo del DPPH[•] Masuda *et al.* (1999), reportaron que los extractos con MeOH de *Exccecaria agallocha* L. (Euphorbiaceae) y *Terminalia catapa* L. (Combretaceae) presentaron una actividad del 72% y 78% a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, y 5 especies presentaron una reducción entre el 60 y 90% a 50 $\mu\text{g/mL}$, con base en estos resultados se consideró que la actividad del extracto metanólico de *P. gentianoides* era relevante.

Tabla I. CI_{50} [$\mu\text{g/mL}$] de los extractos de *B. salicifolius* y *P. gentianoides* frente al radical DPPH[•]. CI_{50} concentración inhibitoria que reduce el 50% del radical DPPH[•]. El porcentaje de reducción del DPPH[•] fue determinado como se describe en 'materiales y métodos'. Los datos están expresados como el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. NDG $CI_{50} = 10.82 \pm 0.73 \mu\text{M} = 3.27 \mu\text{g/mL}$, α -Tocoferol $CI_{50} = 27.46 \pm 0.51 \mu\text{M} = 11.82 \mu\text{g/mL}$.

Extractos	CI_{50} [$\mu\text{g/mL}$]		
	MeOH	CH_2Cl_2	n-Hex
<i>B. salicifolius</i>			
Hojas	128.42 \pm 1.92	195.47 \pm 1.21	> 1000
Flores	124.17 \pm 0.85	159.26 \pm 2.7	> 1000
<i>P. gentianoides</i>			
Hojas	40.05 \pm 2.13	> 500	> 1000
Tallos	46.28 \pm 2.66	259.28 \pm 1.57	> 1000
Raíz	55.41 \pm 1.71	> 1000	> 1000
NDG	3.27 \pm 0.17		
α -Tocoferol	11.82 \pm 1.04		

7.1.2 Inhibición de la lipoperoxidación

La mayoría de macromoléculas biológicas, como los carbohidratos, lípidos, proteínas y ADN pueden sufrir daño en presencia de ROS, siendo los lípidos de las membranas especialmente sensibles a la oxidación (Diplock *et al.*, 1998). Por esta razón, se evaluó la lipoperoxidación en un homogenado de cerebro de rata, el cual es rico en lípidos y por lo tanto sensible a sufrir peroxidación, la técnica que se empleó fue el ensayo TBARS. Por otro lado se sabe que las plantas contienen una amplia variedad de compuestos como flavonoides, lignanos y alcaloides con actividad antioxidante y que previenen lipoperoxidación (Ng *et al.*, 2000).

En la Tabla II se observa el porcentaje de inhibición de la peroxidación de lípidos de los extractos metanólico, CH₂Cl₂ y hexánico de los tejidos estudiados de *B. salicifolius* y *P. gentianoides* a las concentraciones de 50 y 200 µg/mL y 50 y 100 µg/mL, respectivamente.

Así mismo, los resultados mostraron que los extractos de flores con MeOH y CH₂Cl₂ de *B. salicifolius* tuvieron la máxima actividad a 200 µg/mL alcanzando un 88.18% y un 92.94% de inhibición de la lipoperoxidación, actividad seguida por las hojas con MeOH con un 80.36% de inhibición a la misma concentración. Por otro lado tanto las hojas como las flores a 50 µg/mL no alcanzaron una actividad mayor al 50% de inhibición. Los extractos en n-Hex tuvieron mínima actividad logrando el efecto máximo el extracto de flores con una inhibición del 22.02%.

Los tejidos de *P. gentianoides* extraídos con MeOH presentaron una actividad del 80% de inhibición a las dos concentraciones empleadas (50 y 100 µg/mL), actividad seguida por los tallos con CH₂Cl₂ a 100 µg/mL con una actividad del 50%, por otro lado las flores y las hojas presentaron una inhibición menor al 25% en el mismo solvente. En cuanto a los extractos en n-Hex solo la raíz presentó una inhibición del 21%.

Con base a estos resultados, se decidió obtener las CI₅₀ de los extractos que presentaron una actividad mayor al 60% a la concentración más alta, como fueron los extractos de hojas y flores con CH₂Cl₂ y MeOH de *B. salicifolius* y los de hojas, flores y raíces con MeOH de *P. gentianoides*. En la Figura II se observa el comportamiento de los extractos empleados para obtener las CI₅₀.

Tabla II. Inhibición de la peroxidación de lípidos de un homogenado de cerebro de rata evaluada por la técnica de TBARS con extractos de diferentes tejidos de *B. salicifolius* y *P. gentianoides*. La inhibición de la peroxidación fue determinada como se describe en ‘materiales y métodos’. Los datos están expresados como el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. NDG (ácido nordihidro guaiaretico). La concentración b se debió a que a más de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ los extractos de *P. gentianoides*, interferían con la longitud de onda empleada 532 nm.

Extracto	[$\mu\text{g}/\text{mL}$]	% de inhibición de la lipoperoxidación		
		MeOH	CH_2Cl_2	n-Hex
<i>B. salicifolius</i>				
Hojas	50	47.88 \pm 2.12	33.29 \pm 1.66	21.42 \pm 1.9
	200 ^a	80.36 \pm 1.91	68.21 \pm 2.21	14.64 \pm 1.94
Flores	50	40.7 \pm 1.87	32.17 \pm 1.32	21.14 \pm 2.96
	200 ^a	88.16 \pm 1.56	92.94 \pm 1.2	22.02 \pm 2.37
<i>P. gentianoides</i>				
Hojas	50	80.88 \pm 1.91	14.43 \pm 1.37	15.32 \pm 2.5
	100 ^b	80.18 \pm 1.64	17.83 \pm 1.71	16.96 \pm 2.39
Tallos	50	81.16 \pm 1.64	24.12 \pm 1.23	12.62 \pm 2.27
	100 ^b	80.56 \pm 1.72	50.25 \pm 1.24	15.51 \pm 1.18
Raíz	50	78.04 \pm 1.75	12.48 \pm 1.85	14.86 \pm 1.57
	100 ^b	82.84 \pm 2.16	25.06 \pm 1.33	21.86 \pm 2.48
NDG	50	98.32 \pm 1.21		

Las curvas empleadas para calcular la CI_{50} de los extractos metanólicos *P. gentianoides* (Figura II) mostraron un comportamiento dosis respuesta muy similar, en promedio los extractos de los tres tejidos tuvieron una menor actividad a 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (12%) y una actividad mayor a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (80%), de acuerdo con el comportamiento de estas curvas se sugiere que los compuestos con actividad inhibitoria de la peroxidación presentes en estos tejidos son similares y de naturaleza polar.

En el caso de *B. salicifolius*, las flores con MeOH y CH₂Cl₂ mostraron curvas muy similares con una actividad del 10% a 22.5 µg/mL y del 70% a 100 µg/mL, los extractos de hojas con MeOH y CH₂Cl₂ también mostraron un comportamiento similar, pero a concentraciones mayores, ya que a 50 µg/mL tuvieron una actividad del 20% y a 125 µg/mL del 75%. Lo cual sugiere que las flores tienen mayor cantidad de compuestos antioxidantes que las hojas y que tanto las flores como las hojas tienen compuestos polares y de mediana polaridad.

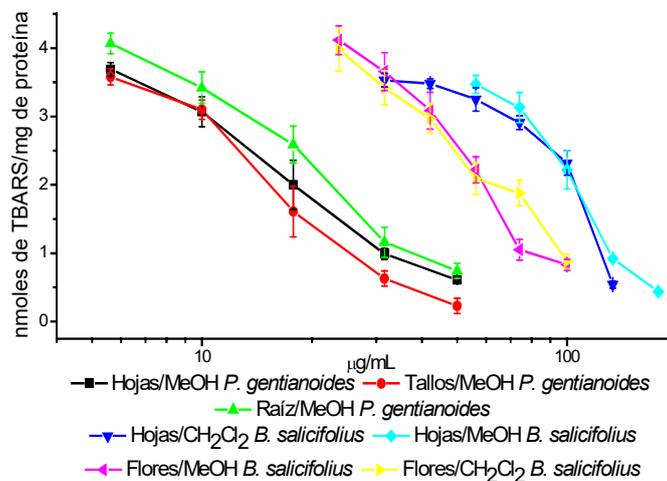


Figura II. Curvas de inhibición de la lipoperoxidación empleadas para calcular las CI_{50} de los extractos de *P. gentianoides* y *B. salicifolius* que presentan una actividad mayor al 60% a la concentración más alta utilizada. Los nmoles de MDA fueron determinados como se describe en ‘materiales y métodos’. Los datos están expresados como el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

Con base a su CI_{50} los extractos metanólicos de *P. gentianoides* fueron los más activos. La CI_{50} para tallos, hojas y raíces fue de 13.7, 19.72 y 23.6 µg/mL respectivamente (Tabla IV), esta actividad fue seguida por los extractos de las flores en MeOH y CH₂Cl₂ de *B. salicifolius* los cuales presentaron una CI_{50} de 44.81 y 67.11 µg/mL y finalmente las hojas tuvieron una CI_{50} de 96.23 y 105.92 µg/mL (Tabla III)

En otros estudios, Desmarchelier *et al.*, (1999), reportaron que los extractos de *Anadenanthera macrocarpa* B. (Fabaceae) y *Astronium urudeuva* E. (Aracardiaceae)

tuvieron una CI_{50} de 62 $\mu\text{g/ml}$ y 106 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. De las Heras *et al.*, (1998) reportan que la actividad inhibitoria de los extractos en etanol (EtOH) de las especies *Baccharis trinervis* P. (Asteraceae) y *Phytolacca rivinoides* K y B. (Phytolaccaceae), fue del $74.8 \pm 1.3\%$ y del $66.8 \pm 2.6\%$, respectivamente, a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados se tomaron como base para realizar la comparación de los resultados obtenidos a pesar de que se trata de especies diferentes al no haber datos reportados al respecto. Con base en estos estudios se consideró que los extractos en este estudio tuvieron buena actividad en la inhibición de la peroxidación de lípidos, y en especial el extracto metanólico de hojas de *P. gentianoides*.

Tablas III y IV. CI_{50} en la inhibición de la peroxidación de lípidos de los extractos de hojas y flores con MeOH y CH_2Cl_2 de *B. salicifolius* y CI_{50} de extracto de hojas, flores y raíces con MeOH de *P. gentianoides*. CI_{50} concentración Inhibitoria que reduce el 50% de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata. La inhibición de la peroxidación fue determinado como se describe en 'materiales y métodos'. Los datos están expresados como el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

Tabla III

<i>B. salicifolius</i>	CI_{50} $\mu\text{g/mL}$	
	MeOH	CH_2Cl_2
Hojas	96.23 ± 8.2	105.92 ± 3.92
Flores	44.81 ± 4.2	67.11 ± 5.12

Tabla IV

<i>P. gentianoides</i>	CI_{50} $\mu\text{g/mL}$
	MeOH
Hojas	19.72 ± 2.17
Flores	13.7 ± 2.08
Raíz	23.16 ± 2.1

7.1.3 Inhibición de la inflamación en el modelo de edema inducido por TPA en oreja de ratón.

En la Tabla V se muestran los resultados de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema en oreja de ratón inducido con TPA y expresados como porcentaje de inhibición de la inflamación de los diferentes extractos de *B. salicifolius* y *P. gentianoides*, a dos concentraciones diferentes 0.31 y 1 mg extracto/oreja.

El extracto con CH₂Cl₂ de hojas de *B. salicifolius* fue el que presentó mayor actividad antiinflamatoria a 1 mg de extracto/oreja (59%) seguido por el extracto de flores con MeOH (41%), los demás extractos de esta misma especie no presentaron actividad significativa en este modelo.

Con respecto a los extractos con CH₂Cl₂ de *P. gentianoides* a 0.31 y 1 mg/oreja las hojas tuvieron una actividad del 68% y 62%, los tallos de 57% y 73% y las raíces de 89% y 53% estas actividades fueron parecidas o mayores a la indometacina, la cual presentó un 58.7% de actividad a 0.31 mg extracto/oreja. Los extractos metanólicos de los diferentes tejidos de ambas especies no presentaron actividad significativa en la inhibición de la inflamación, excepto el extracto metanólico de las flores de *B. salicifolius*.

Comparando estos resultados con los reportados por García *et al.* (2000), en donde la máxima actividad de *Agave intermisa* (Agavaceae) fue de 56.55% de inhibición del edema a una concentración de 5 mg/oreja, se consideró que los extractos con CH₂Cl₂ de *P. gentianoides* eran buenos candidatos para obtener compuestos con actividad antiinflamatoria bajo este modelo.

Tabla V. Efecto de los extractos *B. salicifolius* y *P. gentianoides* sobre la inflamación inducida con TPA en oreja de ratones hembra CD-1. Los datos están expresados como el promedio \pm SD del peso en mg de las orejas, de al menos tres experimentos independientes *P < 0.05 diferencia significativa con respecto al control de cada experimento, prueba *t* de Student.

Extracto	mg /oreja	Edema (mg)		
		Metanol	CH ₂ Cl ₂	n-Hex
<i>B. salicifolius</i>	0.31 1	10.97 \pm 0.83	10.8 \pm 1.20	10.83 \pm 0.98
		10.53 \pm 1.56	5.7 \pm 1.3*	9.03 \pm 1.7*
Flores	0.31 1	14.3 \pm 1.2	13.8 \pm 1.42	12.73 \pm 0.35
		8.2 \pm 1.2	9.86 \pm 1.45	13.7 \pm 0.84
<i>P. gentianoides</i>	0.31 1	8.13 \pm 3.52	4.43 \pm 0.9 *	7.2 \pm 1.9 *
		8.63 \pm 1.4*	5.17 \pm 1.5 *	4.06 \pm 2.1 *
Tallos	0.31 1	10.86 \pm 2.57	6.0 \pm 1.11 *	1.63 \pm 0.47 ^{aa}
		9.76 \pm 3.79	3.75 \pm 0.75 *	7.66 \pm 2.7 *
Raíz	0.31 1	12.93 \pm 0.2	1.43 \pm 0.32 ^{aa}	10.16 \pm 2.3
		8.70 \pm 3.61	6.47 \pm 3.53 *	5.23 \pm 2.31 *
Indometacina	0.31	8.19 \pm 0.01*		
Control	-	13.96 \pm 1.06 ^b		

Con base a los resultados preliminares de actividad antiinflamatoria se realizó el estudio fitoquímico de los extractos de hojas con CH₂Cl₂ de *B. salicifolius* y *P. gentianoides*, pero no se pudieron aislar ni identificar compuestos responsables de dicha actividad.

De acuerdo a los resultados de actividad antioxidante en los modelos empleados se realizó el estudio fitoquímico del extracto con MeOH de *P. gentianoides* ya que fue el que presentó mayor actividad. A partir de este extracto se aislaron e identificaron dos compuestos conocidos; la diosmetina y el plantarenalósido siendo estos los compuestos mayoritarios obtenidos (Mabry *et al.*, 1970; Damtoft *et al.*, 1981; Armandodoriano *et al.*, 1982).

Estos compuestos se identificaron de acuerdo con sus datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de H^1 y C^{13} (RMN H^1 y C^{13}) así como de espectroscopía de masas (MS). Las estructuras se muestran en la Figura 14.

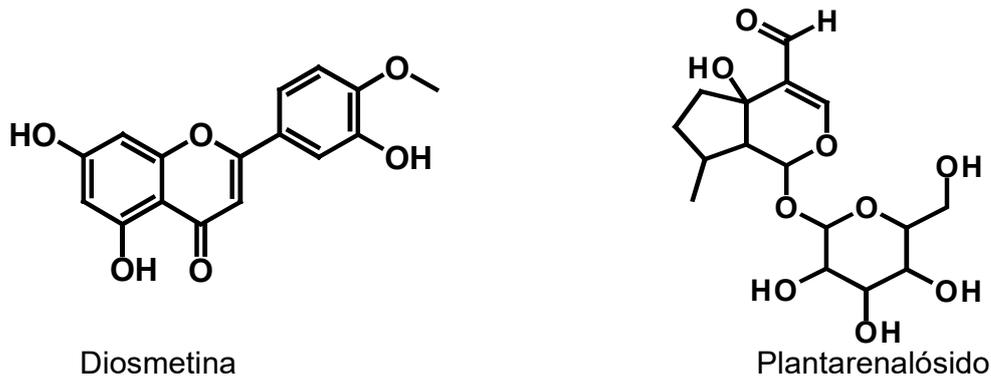


Figura 14. Estructura química de los compuestos diosmetina y plantarenalósido

7.1.4 Actividad de los compuestos diosmetina y plantarenalósido frente al radical DPPH' e inflamación en el modelo de TPA.

El flavonoide diosmetina presentó una mínima actividad frente al radical DPPH' con una CI_{50} de 205.38 $\mu\text{g/mL}$, esto se debió a que no tiene las características de los flavonoides con actividad antioxidante como la quercetina (Pietta, 2000). El iridoide plantarenalósido a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ solo presentó un 50% de actividad frente al radical DPPH' por lo cual no se consideró antioxidante.

En el modelo de inflamación, la diosmetina presentó una inhibición del edema del 21.82% estadísticamente significativa, mientras que el plantarenalósido presentó un efecto pro inflamatorio. Lo anterior contrasta con la actividad antiinflamatoria de otros iridoideos, como los reportados por Horwat *et al.* (2002).

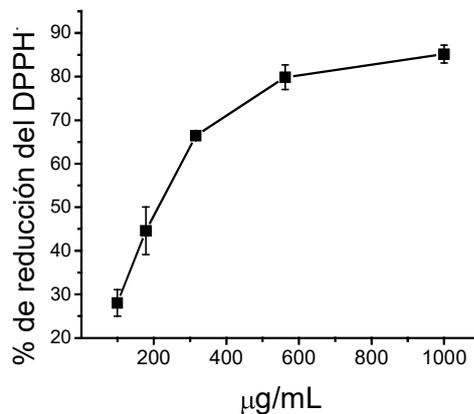


Figura III. Actividad la diosmetina frente al radical DPPH'. El porcentaje de reducción del radical DPPH' fue determinado como se describe en 'materiales y métodos'. Los datos están expresados como el promedio \pm SD de, al menos, tres experimentos independientes. Diosmetina $CI_{50} = 202.38 \pm 3.93 \mu\text{g/mL}$ ($675.68 \mu\text{M}$), plantarenalósido $CI_{50} =$ no determinada (ND).

Tabla VI. Efecto de los compuestos plantarenalósido y diosmetina sobre la inflamación inducida con TPA en oreja de ratones hembra CD-1. Los datos están expresados como el promedio \pm SD del peso en mg de las orejas, de al menos tres experimentos independientes * $P < 0.05$ diferencia significativa con respecto al control de cada experimento, prueba t de Student.

Muestra	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg)	% de inhibición
Control	2.5 μg / oreja	15.3 \pm 0.93	-
Plantarenalósido Vehículo: MeOH	0.31 mg / oreja	16.67 \pm 0.98	-8.46
Diosmetina Vehículo: CH ₂ Cl ₂ :Acetona (1:1)	0.31 mg / oreja	12.57 \pm 0.87*	21.82

Debido a que los compuestos aislados e identificados no presentaron la actividad buscada y tomando como base los resultados en donde el extracto metanólico de la especie *P. gentianoides* mostró una fuerte actividad antioxidante se decidió emplear otra estrategia para llevar a cabo el estudio fitoquímico biodirigido, por lo que se realizó un extracto metanólico total de las hojas (A), este extracto se redisolvió con una solución MeOH/H₂O (B) y con este último se hicieron particiones por polaridad con, n-Hex (C), CH₂Cl₂ (D) y AcOEt (E) (Figura 15), por otro lado se decidió continuar con el estudio del extracto metanólico de las flores (F).

En el caso de *B. salicifolius* se siguieron estudiando los extractos metanólicos de hojas (G), y flores (H).

Con estos extractos se realizaron las pruebas los ensayos de DPPH[•], TBARS y se incluyeron los ensayos de actividad antioxidante ORAC, FRAP, y se determinó la cantidad de compuestos fenólicos por la técnica de Folin-Ciocalteu.

Diagrama de partición del extracto con MeOH de hojas de *P. gentianoides*:

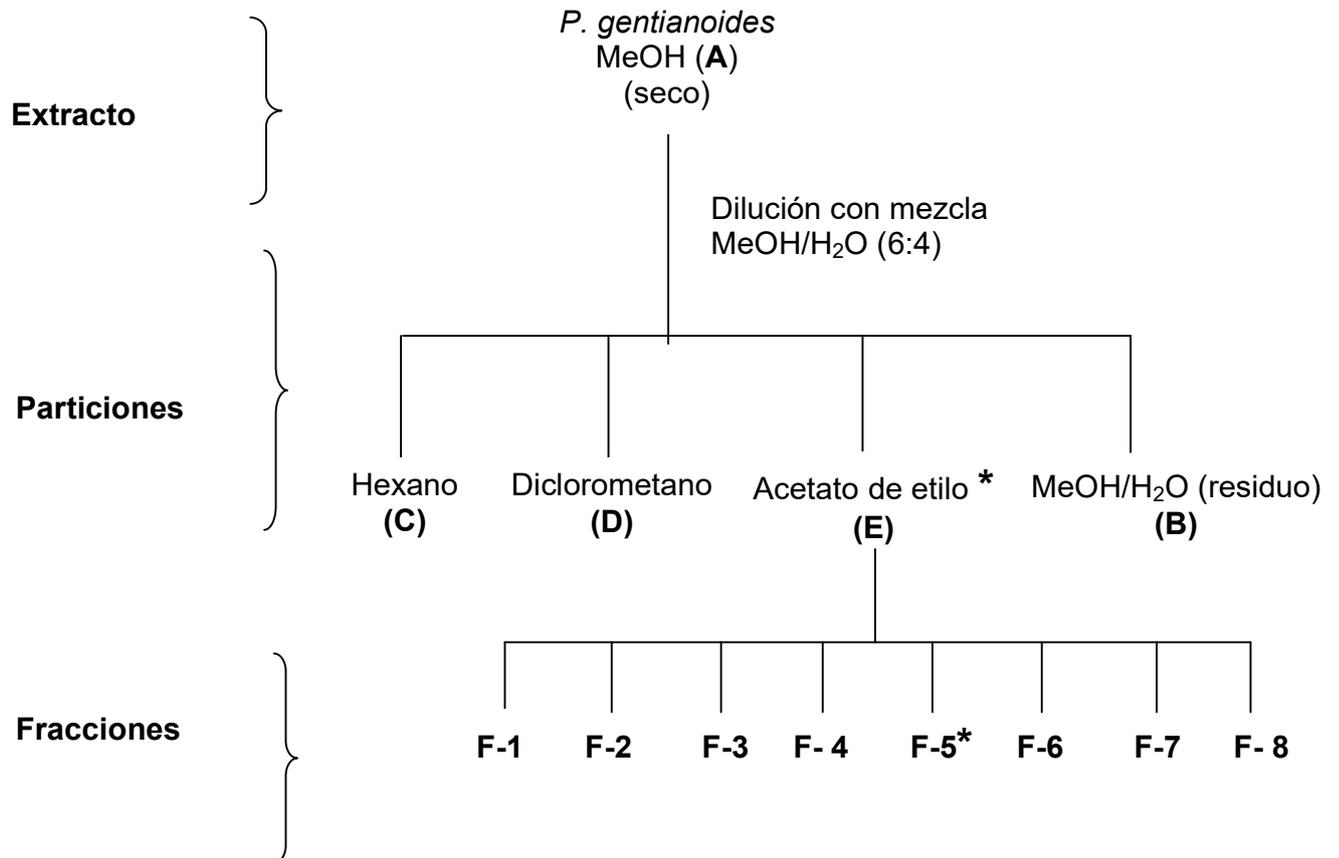


Figura 15. Procedimiento para la obtención de particiones (n-Hex: C; CH₂Cl₂: D; AcOEt: E y MeOH/H₂O B) del extracto de hojas de *P. gentianoides* con MeOH (A) y de las fracciones de la partición E (F-1, F-2, F-3, F-4, F-5, F-6, F-7 y F-8). Partición E* y F-5*, fueron los que presentaron mayor actividad antioxidante en los ensayos DPPH[•], TBARS, ORAC, FRAP y contenido de fenoles por Folin-Ciocalteu.

7.2. Actividad antioxidante de *P. gentianoides* y de *B. salicifolius* en los modelos de DPPH[•], TBARS, ORAC, FRAP y determinación de compuestos fenólicos por Folin-Ciocalteu.

7.2.1 Actividad en los modelos de DPPH[•] y TBARS.

En el ensayo de actividad reductora del radical DPPH[•] se observó que la partición soluble en acetato de etilo E (Tabla VII) tuvo la mayor actividad inhibitoria frente al radical DPPH[•] con una Cl_{50} de 14.1 $\mu\text{g/mL}$. En el caso de los extractos A y F y de las particiones B y D de *P. gentianoides* las Cl_{50} fueron de 21.4, 30.6, 19.9 y 47.9 $\mu\text{g/mL}$ las cuales se consideraron altas, con respecto a los extractos G y H de *B. salicifolius* (la Cl_{50} fue de 164.7 y 300.7 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente). Estos resultados indican que la actividad de *B. salicifolius* para reducir el radical DPPH[•] fue significativamente menor a la de *P. gentianoides*.

Como ya se mencionó los lípidos de las membranas son susceptibles a la oxidación, y la lipoperoxidación es un evento particularmente involucrado en muchos procesos patológicos, además de ser una de las reacciones inducidas por el estrés oxidativo; para evaluar este mecanismo se siguió empleando el ensayo TBARS

En el ensayo de inhibición de la lipoperoxidación la partición E de *P. gentianoides* fue la más efectiva, con una Cl_{50} de 18.5 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con los otros extractos y particiones de los cuales se obtuvieron Cl_{50} de 29.3, 27.0, 42.4, 96.2 y 44.8 $\mu\text{g/mL}$ para A, B, D, G y H, respectivamente (Tabla VII). Siendo la partición E la más activa al igual que en el ensayo con DPPH[•].

Tabla VII. Cl_{50} de la actividad antioxidante de *P. gentianoides* y *B. salicifolius* en los modelos de DPPH \cdot y TBARS. A: hojas con MeOH; B: partición con MeOH/H $_2$ O; C: partición en n-Hex; D: partición con CH $_2$ Cl $_2$; E: partición con AcOEt y F: flores con MeOH, de *P. gentianoides*. G: hojas con MeOH; H: flores con MeOH de *B. salicifolius*. Cl_{50} concentración inhibitoria que reduce el 50% del radical DPPH \cdot . Los datos están expresados como el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Diferentes letras muestran diferencia significativa a $P \leq 0.05$ empleando la prueba de Duncan.

Especie	Muestra	DPPH \cdot	TBARS
		Cl_{50} [μ g/mL]	
<i>P. gentianoides</i>	A	21.4 \pm 1.9b	29.3 \pm 2.1b
	B	19.9 \pm 1.3b	27.0 \pm 3.2b
	C	273.7 \pm 17.9c	>1000
	D	47.9 \pm 3.1a	42.4 \pm 2.7c
	E	14.1 \pm 1.3d	18.5 \pm 1.2a
	F	30.6 \pm 2.5e	n.d.
<i>B. salicifolius</i>	G	164.7 \pm 12.9b	96.2 \pm 4.1d
	H	300.7 \pm 21.7b	44.8 \pm 2.9c

7.2.2 Actividad antioxidante en los modelos ORAC y FRAP.

La capacidad de un compuesto para atrapar radicales peroxilo generado por descomposición espontánea del AAPH fue estimada en términos de unidades de trolox equivalentes, empleando el ensayo ORAC (Cao *et al.*, 1999) y la capacidad reductora de los compuestos antioxidantes se estimó en unidades de catequina equivalentes empleando el ensayo FRAP (Benzie *et al.*, 1999)

Una amplia variedad de compuestos de origen vegetal, han presentado actividad en estos ensayos, incluyendo alcaloides, cumarinas, flavonoides, fenilpropanoides, terpenoides y ácidos fenólicos (Ng *et al.*, 2000; Rice-Evans *et al.*, 1995; Auroma, 2003). Las muestras de las plantas estudiadas en este trabajo empleando estos ensayos, tuvieron valores de actividad en el rango de 1,500-3,500 μ mol de TE/g para el ensayo ORAC y de 50 a 400 μ mol de Cat E/g para el ensayo FRAP. (Tabla VIII). Al igual que

en los ensayos de DPPH[·] y TBARS la partición E presentó la mayor actividad, con valores de 3,524.8 μmol de TE/g en el ensayo ORAC y 377.9 μmol CatE/g en el ensayo FRAP (Tabla VIII). Los otros extractos y particiones presentaron valores de actividad intermedia, entre 1,500 y 1,800 μmol de TE/g en el ensayo ORAC sin una diferencia significativa ($P < 0.05$), con excepción de la partición C, que tuvo un valor de 156.6 μmol TE/g el cual no fue significativo. En el ensayo FRAP se observaron diferencias entre los valores obtenidos; el extracto A y las particiones B, D y F presentan valores de 250.0, 236.3, 125.3 y 161.3 μmol CatE/g, respectivamente, mientras que la partición C y los extractos G y H presentan valores menores a 90 μmol CatE/g.

Tabla VIII. Capacidad antioxidante de *P. gentianoides* y *B. salicifolius* en los modelos de ORAC y FRAP de A: hojas con MeOH; B: partición MeOH/H₂O; C: partición Hex; D: partición CH₂Cl₂; E: partición AcOEt; F: flores con MeOH, de *P. gentianoides*. G: hojas MeOH; H: flores MeOH de *B. salicifolius*. Los datos están expresados como el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Diferentes letras muestran diferencia significativa a $P \leq 0.05$ empleando una prueba de Duncan.

Especie	Muestra ^a	[$\mu\text{g/mL}$]	ORAC $\mu\text{mol TE/g}$	[$\mu\text{g/mL}$]	FRAP $\mu\text{mol CatE/g}$
<i>P. gentianoides</i>	A	2.5	1,813.5 \pm 148.5a	100	250.0 \pm 15.5a
	B	2.5	1,874.2 \pm 43.5a	100	236.3 \pm 12.4a
	C	2.5	156.6 \pm 25.7c	100	57.1 \pm 4.9c
	D	2.5	1,808.4 \pm 17.0a	200	125.3 \pm 5.3b
	E	1.0	3,524.8 \pm 429.1b	50	377.9 \pm 16.7d
	F	2.5	1,552.4 \pm 90.3a	100	161.3 \pm 4.1b
<i>B. salicifolius</i>	G	2.5	1,797.7 \pm 168.4a	200	83.1 \pm 2.3c
	H	2.5	1,563.9 \pm 170.9d	200	78.8 \pm 2.7c

7.2.3 Determinación de compuestos por Folin-Ciocalteu.

Halliwell (1990), define como antioxidante una sustancia que presente en mínima concentración disminuye o previene el daño oxidativo a ADN, proteínas, lípidos o carbohidratos debido a la presencia de especies reactivas. Estas especies reactivas pueden llevar a cabo una reacción redox con los compuestos fenólicos y se sugiere que los compuestos fenólicos son las sustancias antioxidantes más activas de origen natural (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Por otro lado, se ha reportado que la actividad antioxidante de muchos compuestos de origen vegetal es proporcional al contenido de compuestos fenólicos (Rice-Evans *et al.*, 1997), lo cual sugiere una relación entre ambas variables (Veglioglu *et al.*, 1998).

Tomando como base esta información se midió el contenido de fenoles empleando el reactivo Folin-Ciocalteu y los valores fueron expresados como μmol de CatE/g de cada uno de los extractos, particiones y fracciones

La partición E la cual tuvo la mayor actividad en los experimentos DPPH', TBARS, ORAC y FRAP también mostró un contenido significativo de compuestos fenólicos (Figura IV) comparado con las otras muestras analizadas que tuvieron un valor de 591.8 μmol Cat E/g, seguido por las particiones B y F y el extracto H con valores de 378.8, 447.6 y 371.0 μmol Cat E/g.

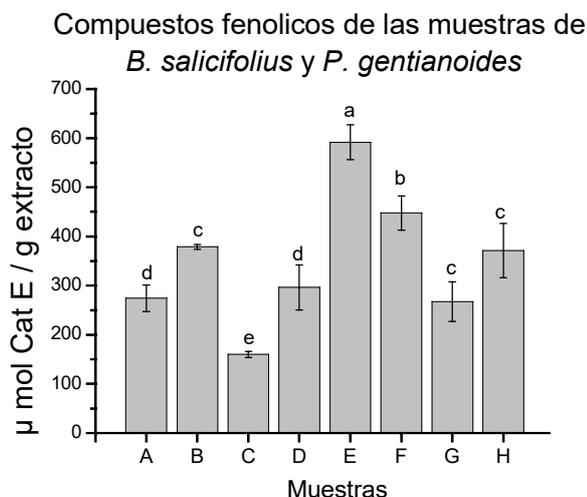


Figura IV.- Compuestos fenólicos totales de *P. gentianoides* y *B. salicifolius* evaluados por la técnica de Folin-Ciocalteu. A: hojas con MeOH; B: partición MeOH/H₂O; C: partición n-Hex; D: partición CH₂Cl₂; E: partición AcOEt; F: flores con MeOH, de *P. gentianoides*. G: hojas con MeOH; H: flores con MeOH de *B. salicifolius*. Expresados como µmol CatE/g. Los datos están expresados como el promedio ± SD de al menos tres experimentos independientes. Diferentes letras muestran diferencia significativa a $P \leq 0.05$ empleando la prueba de Duncan.

7.2.4 Actividad antioxidante de las fracciones en los modelos de actividad antioxidante DPPH' y TBARS.

Puesto que la partición E mostró mayor actividad antioxidante y mayor contenido de compuestos fenólicos se fraccionó por cromatografía en una columna abierta de sílica gel, empleando un sistema de elución con polaridad creciente n-Hex: AcOEt – AcOEt: MeOH se colectaron ocho fracciones principales (F1-F8; esquema 1). En la Tabla IX se muestra la actividad con el ensayo DPPH' de las fracciones obtenidas de la partición E, las F-3, F-4, F-5 y F-6, mostraron la mayor actividad en el atrapamiento del radical con Cl_{50} de 20.1, 23.6, 26.0 y 12.7 µg/mL, respectivamente, dichas fracciones presentaron un fuerte efecto inhibitorio frente a la peroxidación de lípidos evaluado por en ensayo TBARS, en particular la F-6 con una Cl_{50} de 12.7 µg/mL, seguido por las F-3, F-4 y F-5 con Cl_{50} de 20.1, 23.6, y 26.0 µg/mL.

Tabla IX. Cl_{50} de la actividad antioxidante de las fracciones del extracto E (Fracciones F-1 a F-8) de *P. gentianoides* en los ensayos de DPPH^{*} y TBARS. Cl_{50} concentración inhibitoria que reduce el 50% del radical DPPH^{*}. Los datos están expresados como el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Diferentes letras muestran diferencia significativa a $P < 0.05$ empleando la prueba de Duncan.

Fracción	DPPH [*]	TBARS
	Cl_{50} [μ g/mL]	
F-1	> 1000	N.D.
F-2	57.4 \pm 3.2a	30.0 \pm 0.997a
F-3	45.3 \pm 3.8b	20.1 \pm 1.790b
F-4	45.2 \pm 2.9b	23.6 \pm 1.011b
F-5	38.6 \pm 2.7b	26.0 \pm 2.186b
F-6	41.8 \pm 3.2b	12.7 \pm 1.661c
F-7	52.3 \pm 4.0a	30.3 \pm 2.165a
F-8	65.8 \pm 3.7c	28.2 \pm 3.149a

7.2.5 Actividad antioxidante de las fracciones en los modelos de actividad antioxidante ORAC y FRAP.

En el ensayo ORAC las fracciones F-3, F-4, F-5 y F-6 fueron las que presentaron mayor actividad antioxidante con 5,556.5, 6,165.7, 15,1501.8 y 5,627.7 μ mol de TE/g (Tabla X). Estos datos correlacionan bien con los valores del ensayo FRAP; en el cual las fracciones F-4, F-5 y F-6 mostraron las mejores actividades 1,066.1, 1,235.0 y 1,086.0 μ mol de CatE/g como se observa en la Tabla X.

Tabla X. Actividad antioxidante de las fracciones (F-1 a F-8) de la partición E de *P. gentianoides* en los modelos de ORAC y FRAP. Los datos están expresados como el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Diferentes letras muestran diferencia significativa a $P < 0.05$ empleando la prueba de Duncan.

Fracción	[$\mu\text{g/mL}$]	ORAC $\mu\text{mol TE / g}$ fracción	[$\mu\text{g/mL}$]	FRAP $\mu\text{mol Cat E / g}$ fracción
F-1	1.0	563.8 \pm 40.3a	200	48.7 \pm 1.8a
F-2	1.0	4,116.9 \pm 183.6b	50	271.4 \pm 10.9b
F-3	1.0	5,556.5 \pm 379.7c	50	476.2 \pm 14.3c
F-4	1.0	6,165.7 \pm 636.2c	25	1,066.1 \pm 57.3d
F-5	0.5	1,5501.8 \pm 591.8d	25	1,235.0 \pm 38.7d
F-6	1.0	5,627.7 \pm 193.7c	25	1,086.0 \pm 23.5d
F-7	1.0	2,592.0 \pm 262e	50	453.0 \pm 16.9c
F-8	1.0	3,069.8 \pm 164f	50	415.5 \pm 28.1c

7.2.6 Compuestos fenólicos de las fracciones por Folin-Ciocalteu.

En la Figura V se muestra el contenido de compuestos fenólicos, se observó que de la F-1 a la F-5 se incremento gradualmente de la concentración de fenoles (F-5, 4,931.31 μmol de Cat E/g) seguida por una disminución gradual de la concentración hasta la F-8. Estos resultados fueron similares al ensayo DPPH' donde la F-5 presentó la mayor actividad mientras que la F-6 mostró la mayor actividad en el ensayo TBARS, con lo que se observa una relación de los compuesto fenólicos con la actividad antioxidante.

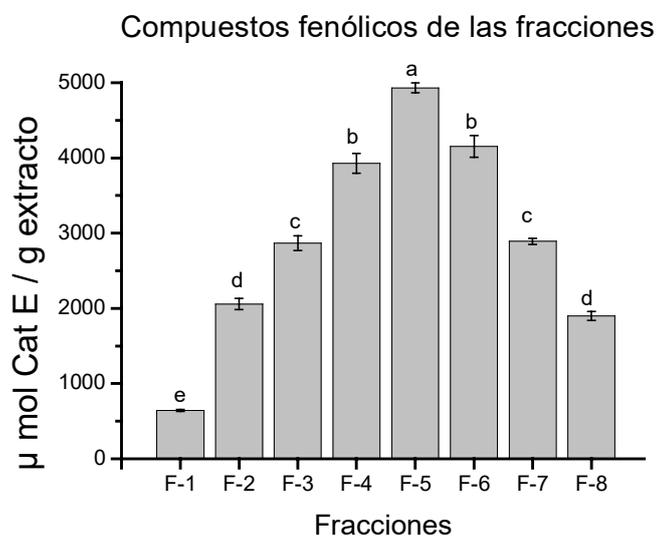


Figura V. Compuestos fenólicos totales de las fracciones (F-1 a F-8) de la partición E de *P. gentianoides* evaluados por Folin-Ciocalteu. Expresados como $\mu\text{mol CatE/g}$ (μmol de catequina Equivalentes / g). Los datos están expresados como el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Diferentes letras muestran diferencia significativa a $P < 0.05$ empleando una prueba de Duncan.

7.3 Estudio fitoquímico de la partición en acetato de etilo (E) de *P. gentianoides*

Para llevar a cabo el estudio fitoquímico, el extracto de hojas en metanol fue sometido a una partición líquido-líquido en una solución MeOH/H₂O (6:4) y posteriormente particionada en n-hex (C), CH₂Cl₂ (D) y AcOEt (E), dejando un residuo MeOH/H₂O (B). De acuerdo a los resultados mostrados la partición con acetato de etilo (E) presentó la mayor actividad antioxidante y fue fraccionada por cromatografía en columna empleando sílica gel como fase sólida, con un sistema de elusión n-Hex: AcOEt y AcOEt: MeOH en diferentes proporciones aumentando la polaridad gradualmente y terminando con 100% de MeOH. Se recolectaron 48 fracciones principales, las cuales se analizaron por TLC, se visualizaron con luz UV λ a 254 y 366 y se revelaron empleando sulfato cérico; de acuerdo a la similitud de sus componentes se obtuvieron ocho fracciones principales, estas fracciones fueron sometidas a

diferentes ensayos de actividad antioxidante presentando la mayor actividad la fracción F-5.

La fracción F-5 fue sometida nuevamente a una cc usando sílica gel G 10-40 μ empleando un sistema de elusión CH_2Cl_2 -MeOH (9:1) de esta fracción se identificó el compuesto **6** (martinósido; 40 mg) aislado del sistema CH_2Cl_2 -MeOH (8:2) y el compuesto **7** (verbascósido; 60 mg) del sistema CH_2Cl_2 -MeOH (7:3) el cual fue purificado por CCF empleando el mismo sistema de elusión.

La fracción F-3 fue fraccionada en cc nuevamente en columna usando n-Hex, AcOEt, y MeOH como solventes con un incremento gradual de la polaridad, se obtuvieron siete sub-fracciones; aquellas eluidas con un sistema n-Hex-AcOEt 1:1 presentaron un precipitado amarillo, del cual se obtuvieron los compuestos **1** (luteolina; 19 mg) y el compuesto **2** (diosmetina; 200 mg). Ambos compuestos fueron separados por cromatografía en columna con vacío utilizando sílica gel G 10-40 μ y eluyendo con CH_2Cl_2 : Acetona (6:4). De la misma fracción F-3 se obtuvo el compuesto **5** (penstemínósido; 48.5 mg) el cual se obtuvo del sistema de elusión AcOEt-MeOH (8:2) y precipito con acetona fría. La fracción F-4 fue separada en una columna de sephadex LH-20 en un sistema n-hexano- CH_2Cl_2 -MeOH 2:1:1 obteniéndose el compuesto **3** (globularicisina; 110 mg).

El compuesto **4** (plantarenalósido; 121 mg) se aisló del extracto crudo de MeOH de una columna cromatografía eluída con un sistema AcOEt-MeOH (8:2).

Todos los compuestos fueron elucidados empleando RMN de 1D y 2D, IR, UV y espectrometría de masas (Ver anexo 2), las estructuras se muestran en la figura 16.

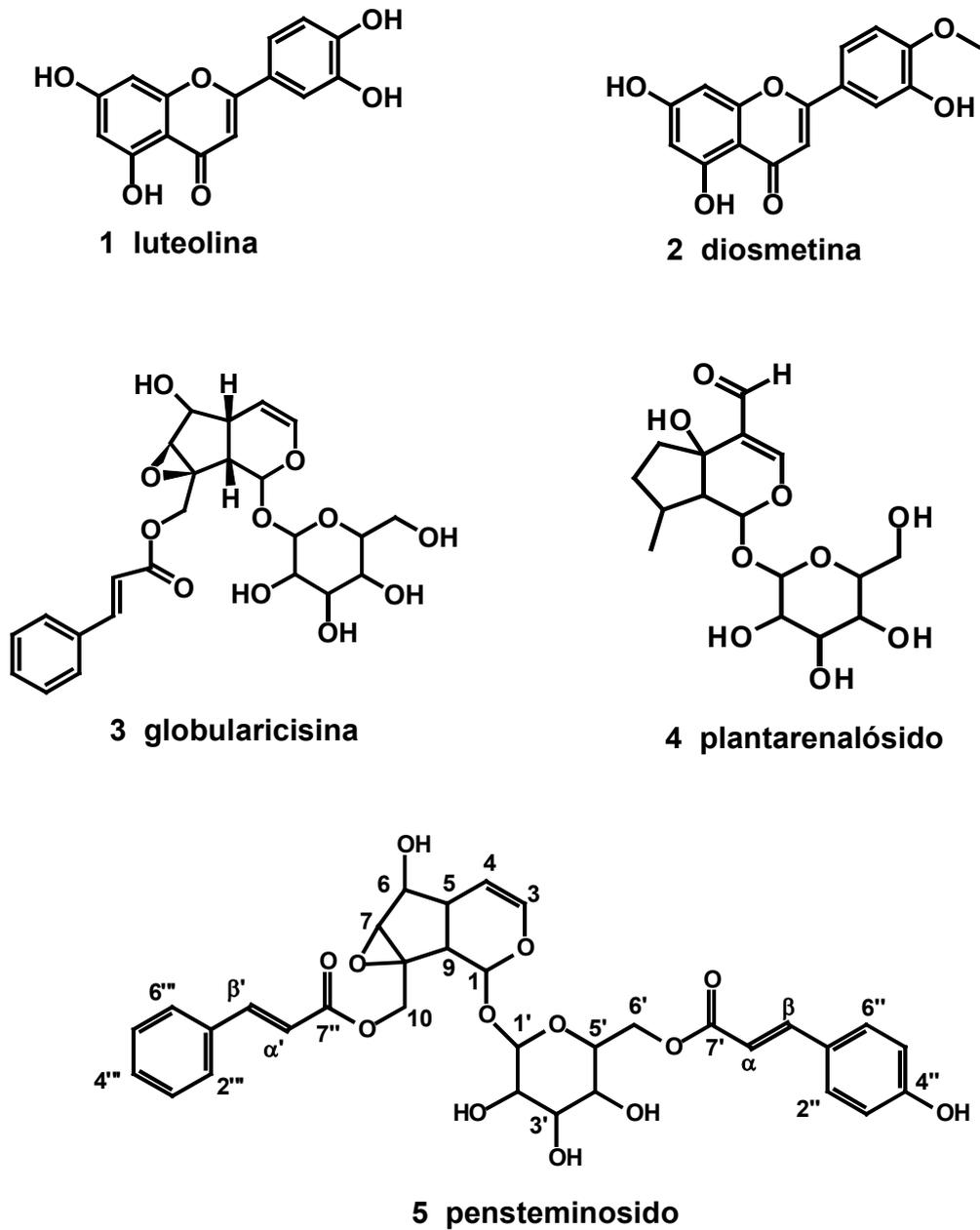
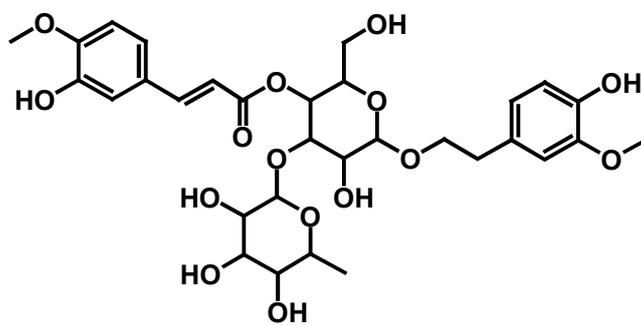
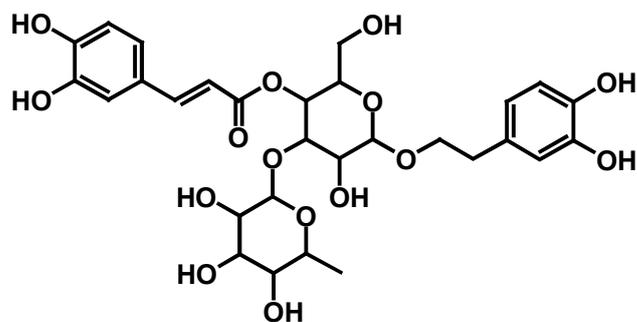


Figura 16. Estructuras químicas de 1) luteolina, 2) diosmetina, 3) globularicisina, 4) plantarenalósido y 5) pensteminosido



6 martinósido



7 verbascósido

Figura 16 (continuación). Estructuras químicas de 6) martinósido y 7) verbascósido.

7.3.1 Elucidación estructural del compuesto pensteminósido (5) 8-O-trans-cinamoil, 6 hidroxil, 1 – [β -D- glucopiranosido-6'-O-(4''-hidroxil-cinamoil)]-catalpol

El nuevo iridoide tipo catalpol llamado pensteminósido se aisló como un polvo café muy higroscópico. El espectro UV mostró bandas de absorción características de un sistema iridoide y cromóforos cinamoilo (Nguyen *et al.*, 2005; Calis *et al.*, 2001). El espectro IR reveló la presencia de un grupo hidroxilo (3,263 y 3,207 cm^{-1}), señales de C-H insaturados (2,935 – 2,561 cm^{-1}) y aromáticos. La fórmula molecular $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{O}_{13}$ se determinó con base en los datos obtenidos en el experimento FAB MS M+1 (m/z 639) y los datos obtenidos en las RMN de ^1H y ^{13}C .

Los datos de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C fueron consistentes con un iridoide C-10 unido a un glicósido. La asignación completa de todos los protones y carbonos fue basada en los experimentos COSY, HETCOR, FLOCK, COLOC y NOESY (Tabla XI).

El análisis del espectro de RMN de ^1H (Acetona- d_6 500, Mhz) mostró una señal doble a δ_{H} 4.78 (H1, *d*, $J = 8$ Hz, H-1') característica de un protón anomérico, sugiriendo la presencia de una unidad β -glucopiranosil. Por otra parte el acoplamiento de los protones olefínicos en δ_{H} 6.32 (1H, *dd*, $J = 1.5, 6$ Hz) y δ_{H} 5.02 (1H, *dd*, $J = 5, 6$ Hz) fue asignado a H-3 y H-4, respectivamente, señales típicas de un iridoide con una unidad catalpol, adicionalmente los desplazamientos a δ_{H} 2.24 (1H, *dddd*, $J = 2, 5, 7.5$ Hz, H-5) y δ_{H} 2.52 (1H, *dd*, $J = 7.5, 10$ Hz, H-9) mostraron que el anillo está fusionado en posición *cis*, lo cual fue confirmado con el experimento NOESY.

En el experimento DEPT C^{13} RMN (Tabla XI) el compuesto 5 mostró señales de dos metilenos (δ_{C} 63.74 C-10, δ_{C} 63.49 C-6'), diez metinos; dos de ellos característicos de carbonos de iridoide tipo catalpol δ_{C} 38.88 y δ_{C} 43.29 (C-5 y C-9); un carbono anomérico δ_{C} 100.00 (C-1'); seis carbonos oxigenados (C-2', C-3', C-4', C-5', C-6 y C-7) y un carbono soportando una glucosa con un desplazamiento δ_{C} 95.25 (C-1), cuatro carbonos cuaternarios incluyendo un aromático hidroxilado (C-1'', C-1''', C-4'' y C-8) y dos ésteres de carbonilo, seis carbonos olefínicos (C-3, C-4, C- α , C- β , C- α' y C- β') y nueve carbonos aromáticos (δ_{C} 129.81 -116.78 ppm, Tabla XI).

Un análisis adicional mostró dos sistemas AB para cuatro protones olefínicos *trans* de acuerdo con sus constantes de acoplamiento, el primero de estos sistemas en δ_H 6.50 y δ_H 7.67 (2H, *d*, $J = 16$ Hz, C- α' y C- β') y el otro en δ_H 6.38 y δ_H 7.63 (2H, *d*, $J = 16$ Hz, C- α y C- β), perteneciendo estos a dos grupos cinamoil lo cual se confirmó con las señales remanentes que corresponde a nueve protones aromáticos entre δ_H 6.83 y δ_H 7.62. Cuatro protones aromáticos δ_H 7.54 *d* y δ_H 6.83 *d* (2H, sistema AA'BB' cada uno con una constante $J = 8.5$ Hz, H-2'', H-6'', H-3'' y H-5'') fueron característicos de un grupo 4-hidroxi cinamoil, corroborando el carbonilo por un desplazamiento en δ_C 160.62 en el espectro de RMN de ^{13}C (C-4''), Tabla XI). Adicionalmente, en el experimento FLOCK este carbono (C-4''), presentó un acoplamiento con δ_H 6.83 (2H, *d*, $J = 8.5$, H-3'' y H-5'') y 7.54 (*d*, $J = 8.5$, H-2'' y H-6''). Además δ_C 127.0 (C-1''), mostró un acoplamiento con δ_H 6.83 (*d*, $J = 8.5$, H-3'' y H-5'') y 6.38 (*d*, $J = 16$ Hz, H- α) lo cual confirmó la posición del grupo 4''-hidroxi. Los cinco protones aromáticos adicionales δ_H 7.40 (3H, *m*, H-3''', H-4''' y H-5''') y 7.62 (2H, *dd*, $J = 2.5, 6$ Hz, H-2''' y H-6'') nos permitieron corroborar la presencia del otro grupo cinamoilo.

La localización de la unidad β -gluco*Piranosil, 4''- hidroxi cinamoil y cinamoil fueron determinados usando los experimentos COLOC y FLOCK (Figura 17). La posición del azúcar unido a la aglicona fue establecida en el C-1 de la unidad catalpol por un acoplamiento a larga distancia entre δ_C 95.25 y la señal del protón a δ_H 4.78 (H-1'). En el experimento COLOC se observaron correlaciones entre el grupo carbonilo ester (δ_C 167.5, C-7') y el protón olefínico a δ_H 7.63 (*d*, $J = 16$ Hz, H- β , 1H), con el grupo metileno de la glucosa a δ_H 4.57 (2H, *dd*, $J = 3, 8.5$, H-6') definiendo la acilación de 4''-hidroxi-*trans*-cinamoil a C-6'.

El grupo carbonilo a δ_C 166.74 (C-7'') del *trans*-cinamoil presentó en el experimento COLOC una correlación a larga distancia con el doblete a δ_H 7.67 (1H, *d*, $J = 16$ Hz, H- β'), así como con los dos protones metilenos a δ_H 4.13 y δ_H 5.07 (2H, *d*, $J = 12.5$ Hz, 10-Ha y 10-Hb). Así mismo, esta fue una interacción entre el metileno H-10 y el carbono con un desplazamiento a δ_C 62.7 indicando que el sitio de esterificación de este fragmento es con la unidad catalpol en el C-8.

Así este compuesto fue identificado como 8-O-trans-cinamoil, 6 hidroxí, 1-[β -D-glucopiranosido-6'-O-(4''-hidroxí-cinamoil)]-catalpol (5) del cual no se tiene reportes previos en la literatura.

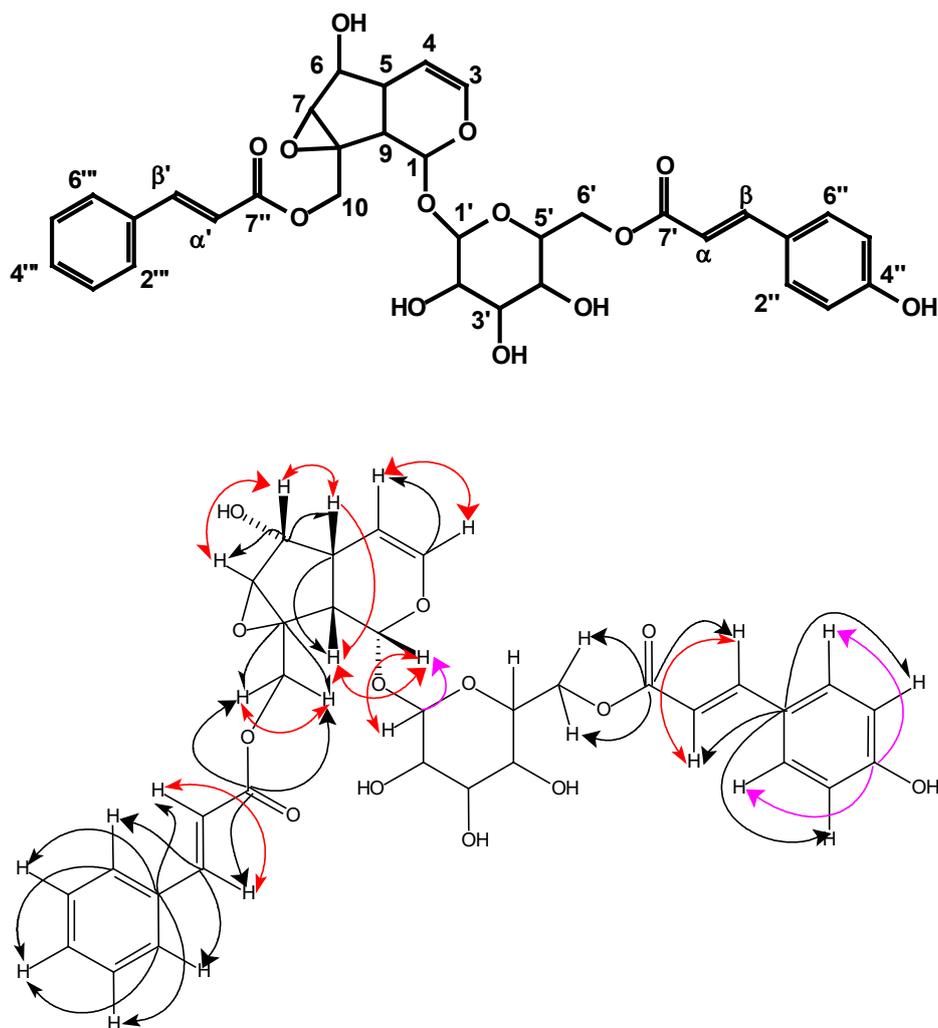


Figura 17. Estructura química del nuevo iridoide tipo catalpol, nombrado Pensteminosido: 8-O-trans-cinamoil, 6-hidroxi, 1-[β -D-glucopiranosido-6'-O-(4''-hidroxí-cinamoil)]-catalpol. Se muestran las correlaciones en los diferentes experimentos que se observaron para determinar la estructura química. COLOC (\longrightarrow), FLOCK (\longrightarrow) y NOESY (\longrightarrow)

Tabla XI. RMN¹H y ¹³C datos espectroscópicos del pensteminósido (nuevo iridoide tipo catalpol)

Asignaciones	C	δ C ¹³ (ppm) 125 MHz	δ H ¹ (ppm) <i>J</i> (Hz) 500 MHz	COLOC	FLOCK	NOESY
Aglicona	1	95.25	4.95 <i>d</i> 10		H-9, H-1'	H-1', H-9, H-5
	3	141.53	6.32 <i>dd</i> 1.5, 6	H-4	H-4	H-4
	4	103.89	5.02 <i>dd</i> 5, 6		H-5, H-6	H-3, H-9, H-5
	5	38.88	2.24 <i>dddd</i> 2 3.5, 5, 7.5	H-9		H-9
	6	79.33	3.89 <i>d</i> 8.5	H-5, H-7	H-9, H-7	H-5, H-7
	7	62.01	3.46 <i>m</i>			H-6
	8	62.77		H-10		
	9	43.29	2.52 <i>dd</i> 7.5, 10	H-5		H-5, H-1
	10	63.74	a 4.13, b 5.07 <i>d</i> 12.5			H-10
Glucosil	1'	100.00	4.78 <i>d</i> 8		H-2', H-1	H-2'
	2'	74.64	3.29 <i>t</i> 8.5	H-4'		
	3'	77.66	3.46 <i>m</i>	H-5', H-4'	H-2', H-4'	
	4'	70.96	3.46 <i>m</i>			
	5'	75.33	3.58 <i>m</i>			
	6'	63.49	4.45 <i>dd</i> 3, 8.5			
Hidroxicinamoil	1''	127.07	-	α , H3'', H-5''	α , H3'', H-5''	
	2''	131.10	7.54 <i>d</i> 8.5		β	
	3''	116.78	6.83 <i>d</i> 8.5			
	4''	160.62	-		H-6'', H-2'', H-3'', H-5''.	
	5''	116.78	6.83 <i>d</i> 8.5			
	6''	131.10	7.54 <i>d</i> 8.5		β	
	α	115.61	6.38 <i>d</i> 16		β	H- β
	β	145.62	7.63 <i>d</i> 16	H-2'', H-6''		H- α
	COO 7'	167.55	-	β , H-6'	β'	
Cinamoil	1'''	135.53	-	α' , 5''', 3'''		
	2'''	129.81	7.62 <i>dd</i> 2.5, 6	H-4'''		
	3'''	129.13	7.40 <i>m</i>	β'		
	4'''	131.10	7.40 <i>m</i>			
	5'''	129.13	7.40 <i>m</i>	β'		
	6'''	129.81	7.62 <i>dd</i> 2.5, 6	H-4'''		
	α'	119.07	6.50 <i>d</i> 16		β'	H- β'
	β'	145.53	7.67 <i>d</i> 16	H2''', H6'''		H- α'
	COO 7''	166.74	-	β' H-10a, H-10b		

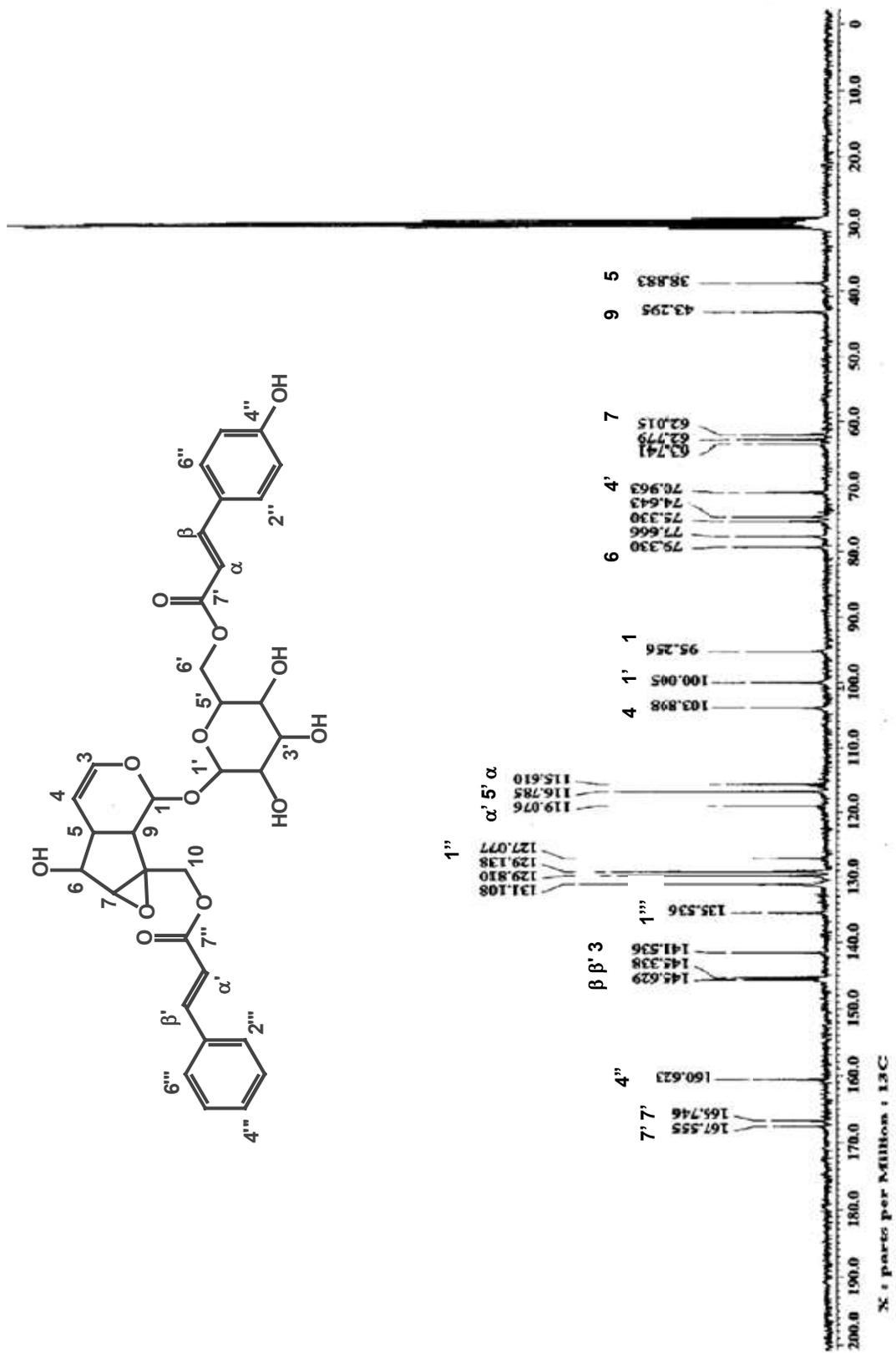


Figura 18. Espectro de RNM ^{13}C del Pensteminósido (5).

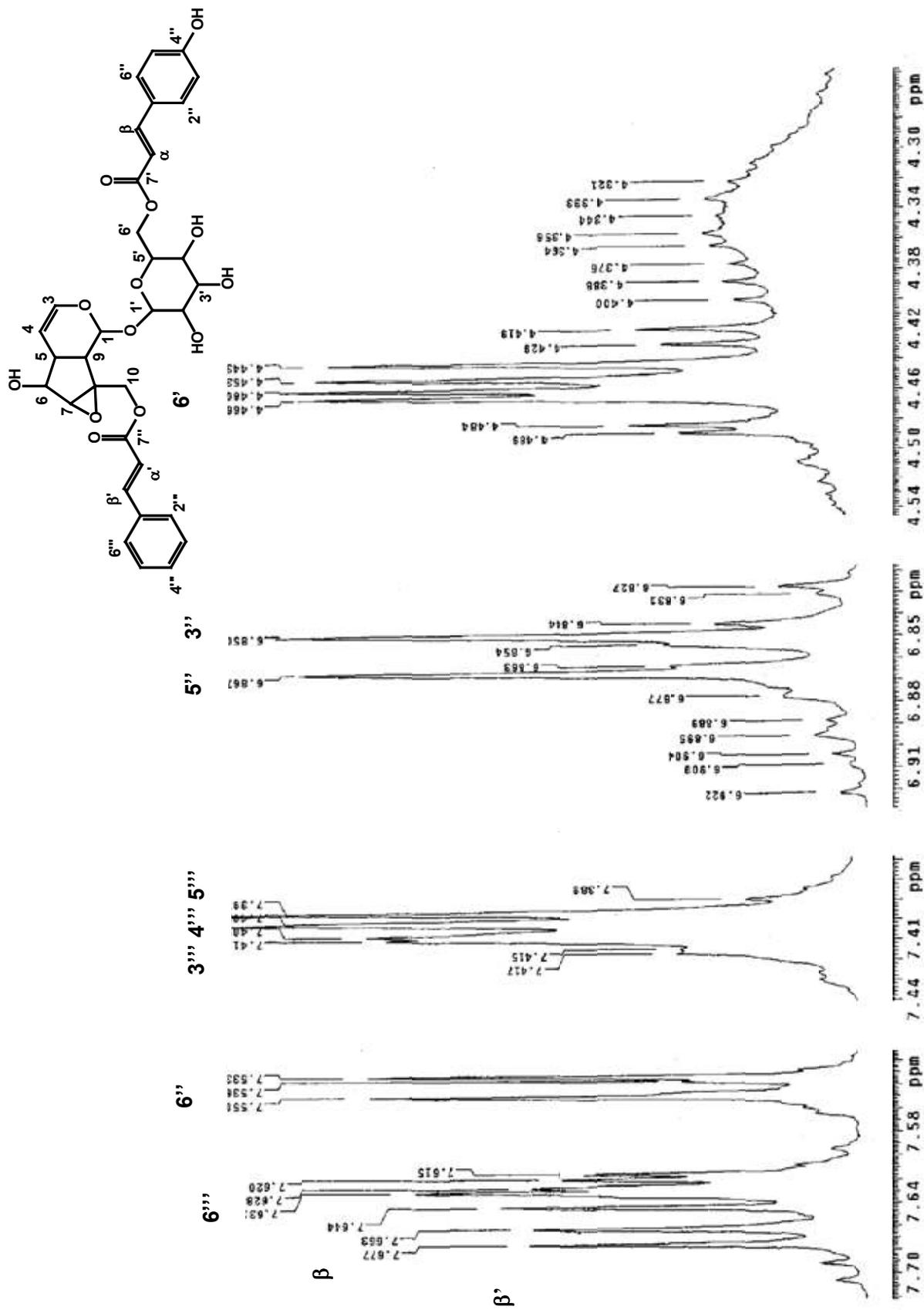


Figura 20. Espectro RMN ^1H del Pensteminosido (5).

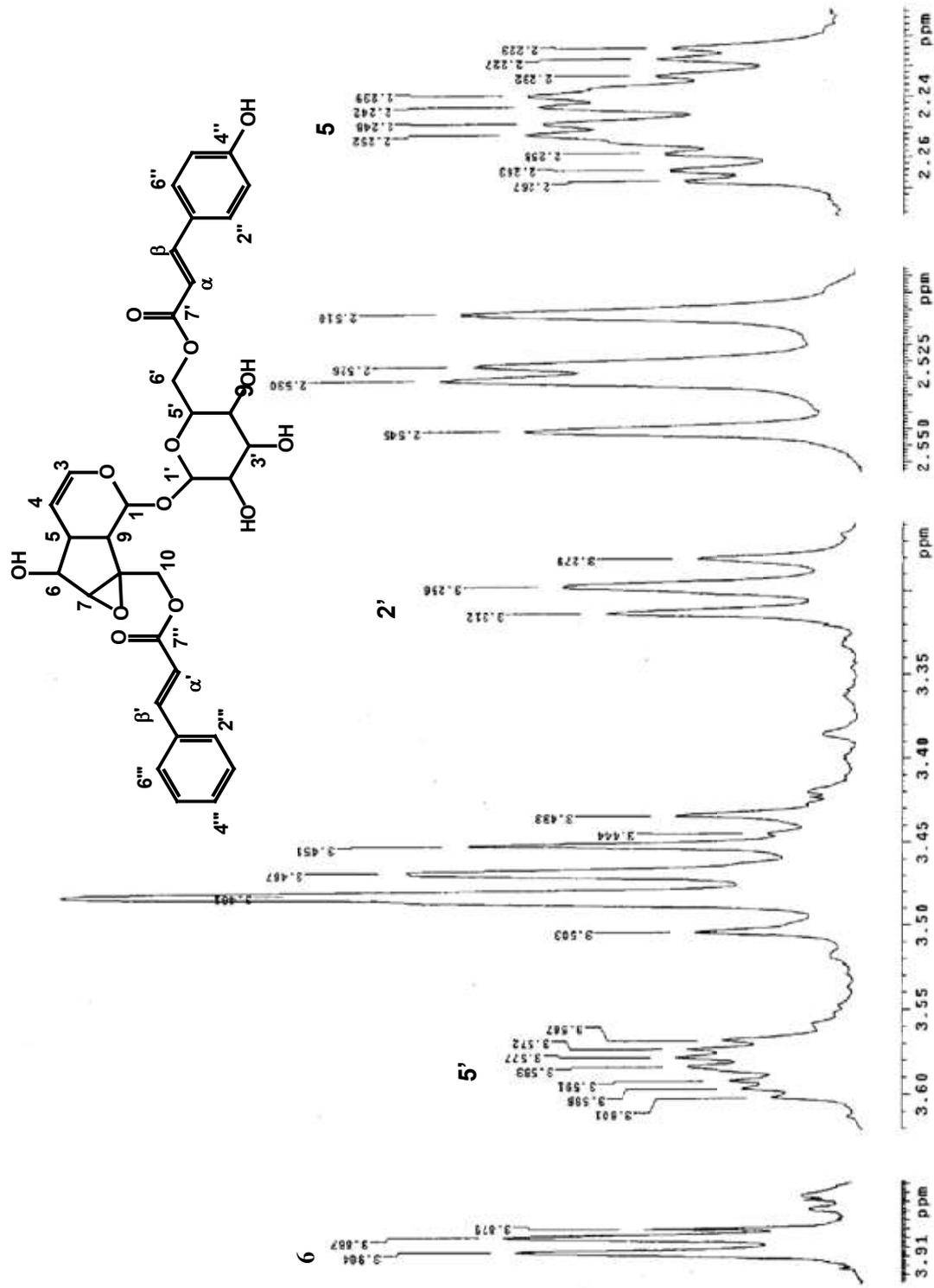


Figura 21. Espectro RMN ^1H del Pensteminósido (5).

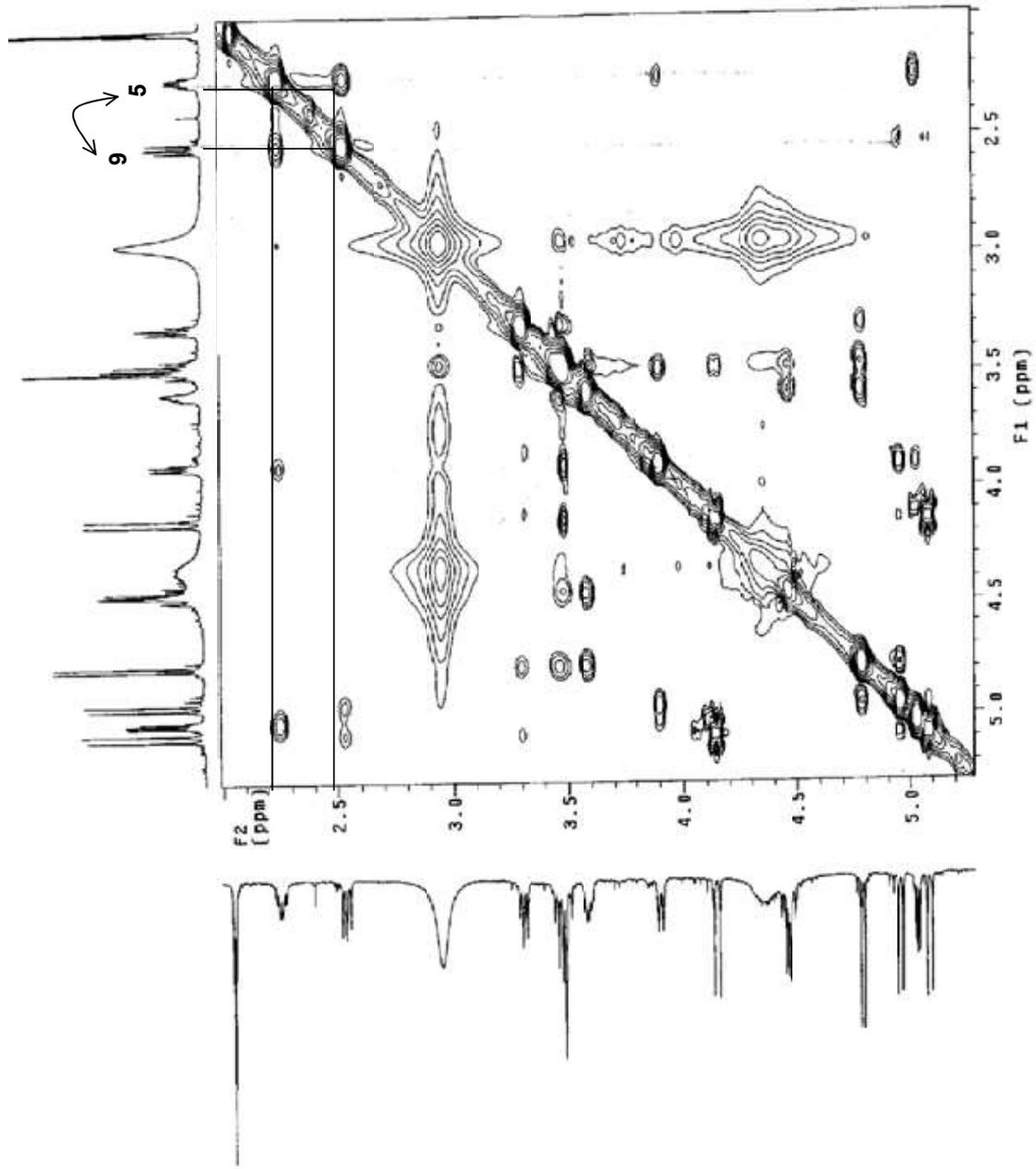


Figura 22. Espectro del experimento NOESY Penstemoninósido (5).

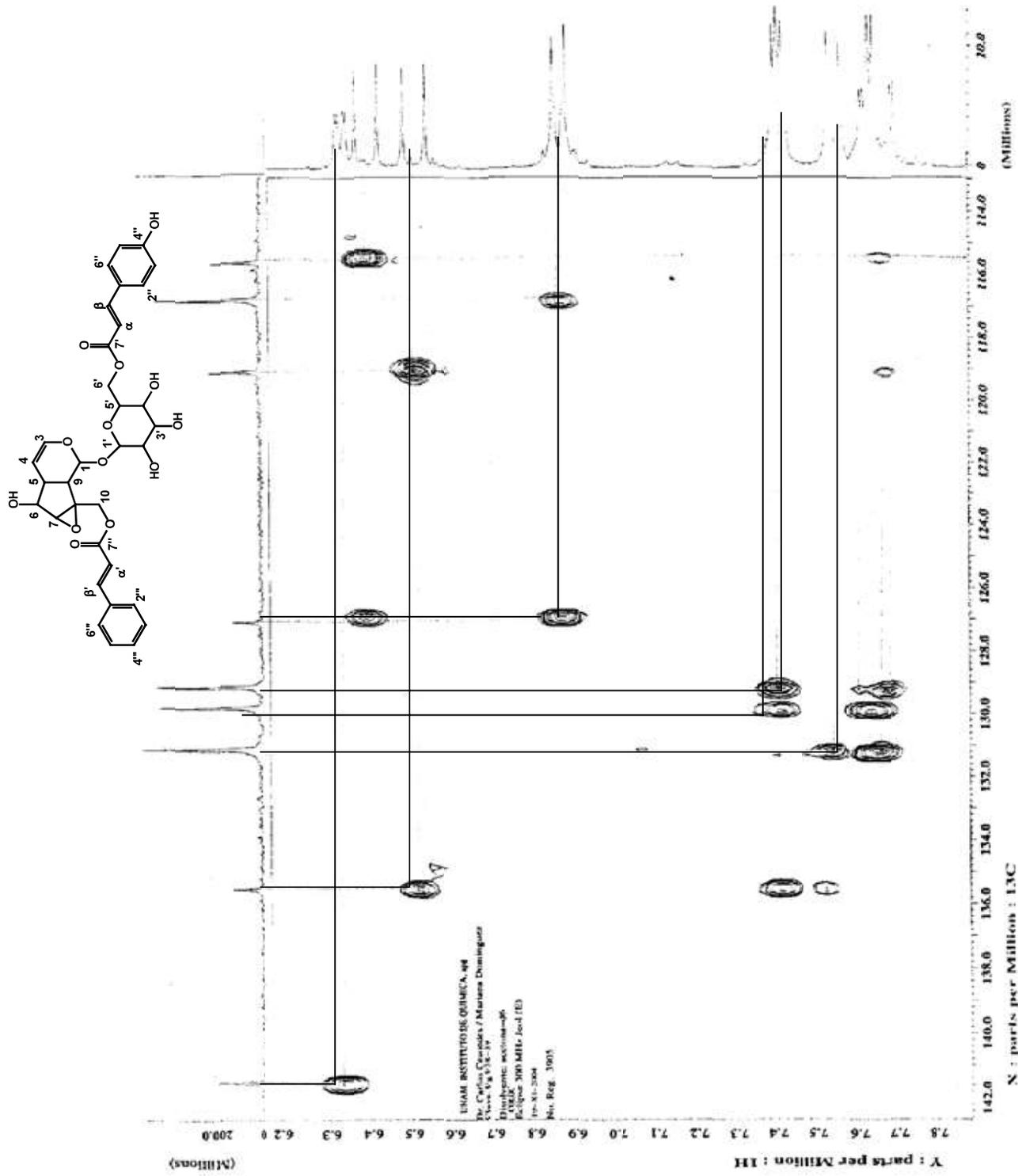


Figura 23. Espectro del experimento COLOC Penstemínosido (5).

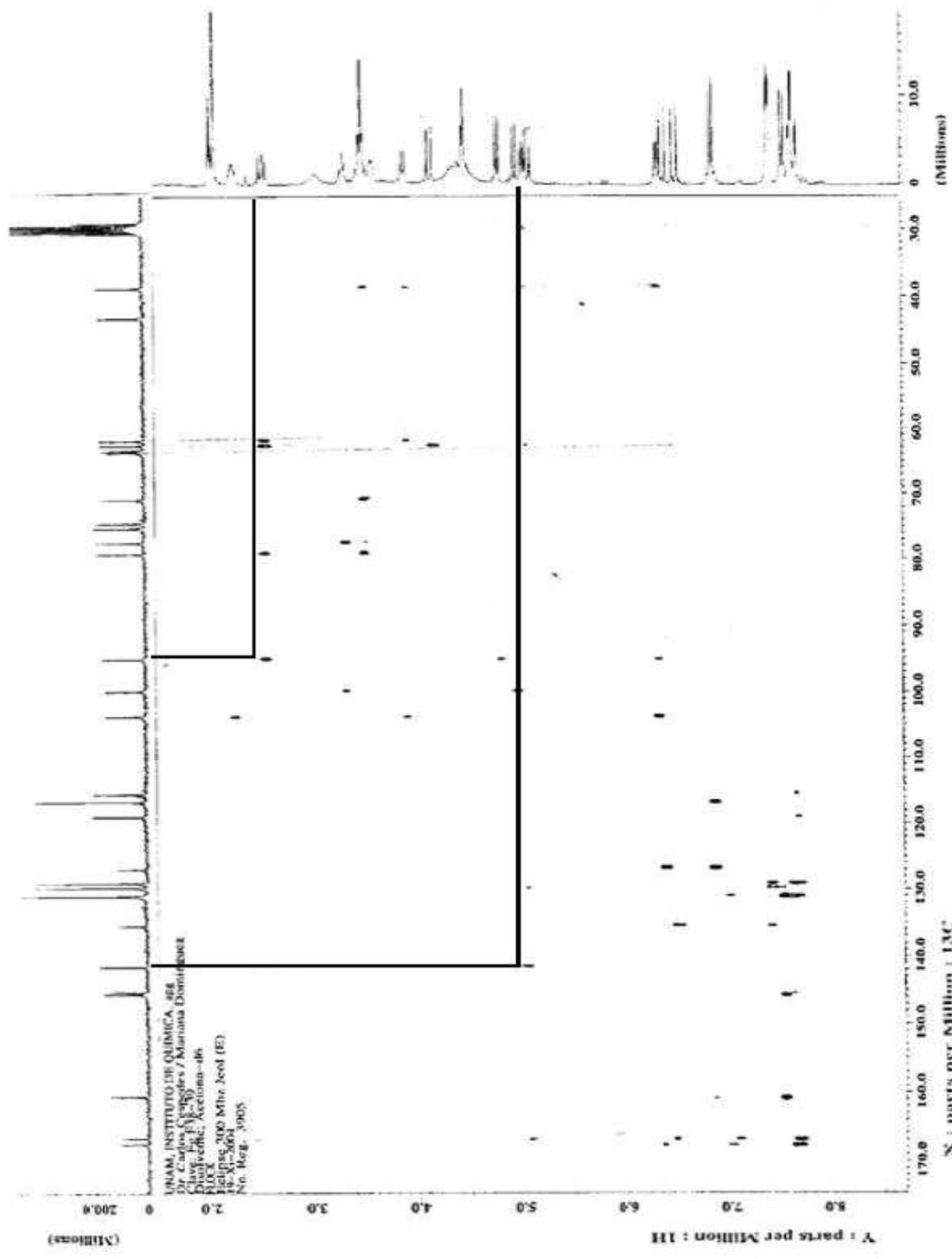


Figura 24. Espectro del experimento FLOCK Penstemínosido (5).

7.3.2 Constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos aislados de *P. gentianoides*.

Los otros seis compuestos se dilucidaron de la misma forma que el penstemínosido (5) empleando los experimentos ^1H RMN, ^{13}C RMN, y 2D RMN, y se confirmaron dichas estructuras comparando los datos obtenidos con los datos citados en la literatura.

1 Luteolina (Nissler *et al.*, 2004)

Polvo amorfo color amarillo. MS: (EI) (m/z): 286 [M^+] ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$). RMN ^1H (Acetona d_6 300 MHz) δ (ppm) 7.5 (1H, *d*, $J = 2.3$ Hz, H-2'), 7.45 (1H, *dd*, $J = 2.3, 9$ Hz, H-6'), 6.99 (1H, *d*, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.56 (1H, *s*, H-3), 6.53 (1H, *d*, $J = 2.3$ Hz, H-8), 6.24 (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-6). RMN ^{13}C , (75 MHz) δ (ppm) 183.07 (C-4), 165.16 (C-7), 164.82 (C-2), 163.37 (C-5), 158.04 (C-9), 150.18 (C-4'), 146.49 (C-3'), 123.71 (C-1'), 120.0 (C-6'), 116.74 (C-5'), 114.23 (C-2'), 104.15 (C-3 y C-10), 99.69 (C-6), 94.67 (C-8).

2 Diosmetina (Mabry *et al.*, 1970)

Polvo amorfo color amarillo. MS: (EI) (m/z): 300 [M^+] ($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$). ^1H - RMN (DMSO, 300 MHz) δ (ppm) 7.53 (1H, *d*, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.49 (1H, *dd*, $J = 2.1, 7.5$ Hz, H-6'), 6.88 (1H, *s*, H-3), 6.92 (1H, *d*, $J = 9$ Hz, H-5'), 6.49 (1H, *d*, $J = 2.1$ Hz, H-8) 6.18 (1H, *d*, $J = 2.1$ Hz, H-6) 3.88 (3H, *s*, OMe). RMN ^{13}C con MeOH, (75 MHz) δ (ppm) 181.78 (C-4), 164.13 (C-7), 163.65 (C-2), 161.42 (C-5), 157.31 (C-9), 150.71 (C-4'), 148.01 (C-6), 121.5 (C-1'), 120.33 (C-6'), 115.75 (C-5'), 110.18 (C-2'), 103.68 (C-10), 103.19 (C-3), 98.8 (C-3), 94.02 (C-8), 55.94 (OMe).

3 Globularicisina (Chaudhuri *et al.*, 1981)

^1H RMN (Acetona d_6 300 MHz): δ ppm 7.72 (1H, *d*, $J = 16$ Hz, H- α), 7.42-7.68 (5H, H-2', 3', 4', 5', 6'), 6.57 (1H, *d*, $J = 16$ Hz, H- β), 6.35 (1H, *dd*, $J = 1.8, 5.7$ Hz, H-3), 5.02 (1H, *dd*, $J = 4.8, 6$ Hz, H-4), 5.04 (1H, *d*, $J = 9$ Hz, H-1), 4.79 (1H, *d*, $J = 8.1$ Hz, H-1'), 4.34, 4.98 (2H, *d*, $J = 12.5$ Hz, H-10a y H-10b), 3.50 (1H, *s grueso*, H-7), 2.58 (1H, *dd*, $J = 7.8, 9.3$, H-6), 2.29 (1H, *dddd*, $J = 1.8, 3, 4.8, 7.8$, H-5). ^{13}C RMN (MeOH 300

MHz): δ ppm 167.19 (C=O), 145.69 (C- β), 141.18 (C-3), 135.23 (C-1''), 131.12 (C-4''), 129.69 (C-2''), 129.04 (C-3'', 5'' and 6''), 118.65 (C- α), 103.70 (C-4), 100.19 (C-1'), 95.32 (C-1), 78.86 (C-6), 77.63 (C-3'), 77.40 (C-5'), 74.43 (C-2'), 70.70 (C-4'), 63.57 (C-10), 62.76 (C-8), 62.47 (C-7), 62.06 (C-6'), 43.09 (C-9), 38.58 (C-5).

4 Plantarenalósido (Damtoft *et al.*, 1981; Armandodoriano *et al.*, 1982)

UV λ (MeOH d_6) nm: 212, 235 and 279. $[\alpha_D]$: -0.052 (582 nm), 30.0 mg/mL. IR (cm^{-1}): 3385, 2934, 2870, 1668, 1626, 1253, 1072, 853, 756. MS: (FAB) (m/z): 360.35 $[M^+]$, 361 $[M^+ + H]$, ($\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_9$). RMN - ^1H (MeOH d_6 300 MHz) δ (ppm): 9.24 (1H, s, H-11), 7.39 (1H, s, H-3), 5.86 (1H, *d*, $J = 1.56$ Hz, H-1), 4.60 (1H, *d*, $J = 8.1$ Hz, H-1'), 3.92 – 3.88 (2H, AX *dd*, $J = 2.1, 12$ Hz, H-6'), 2.4 (2H, *dd*, $J = 1.5, 9.9$ Hz, H-9), 2.28 – 1.97, 2H, *m*, H-6), 1.11 (2H, *m*, H-7), 0.94 (3H, *d*, $J = 6.9$ Hz, H-10). RMN ^{13}C con MeOH, (75 MHz) δ (ppm) 192.55 (C-11), 164.21 (C-3), 126.38 (C-4), 99.87 (C-1'), 96.84 (C-1), 78.51 (C-5'), 77.51 (C-3'), 74.39 (C-2'), 73.47 (C-5), 71.71 (C-4'), 62.85 (C-6'), 52.64 (C-9), 38.90 (C-6), 35.18 (C-8), 33.00 (C-7), 16.36 (C-10).

5 Pensteminósido

UV λ (MeOH) nm: 216, 231 y 277. $[\alpha_D]$: -0.058 (582 nm), 35.0 mg/mL. IR (cm^{-1}): 3263, 3207, 2935, 2561, 1457, 1024, 712 624. MS: (FAB) (HRMS) (m/z): 639 $[M^+]$ ($\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{O}_{13}$), 613, 569, 525, 481, 437, 393, 391, 349, 307 (25%), 289 (15%), 273, 242, 165, 154 (100%), 139 (67%), 107 (20%), 89 (19%), 77 (18%), 55, 39. ^1H NMR y ^{13}C NMR datos en Tabla X. HR ESI-MS m/z: 661.19035 $[M+\text{Na}]^+$.

6 Martinósido (Teboring y Junior, 1989; Calis *et al.*, 1984).

UV (λ , nm, Acetona d_6): 325, 262 y 218. $[\alpha_D]$: -1.742 (582 nm), 23.0 mg/mL. IR (cm^{-1}): 3382, 3314, 1656, 1601, 1496, 1447, 1260, 1073, 843, 629. ^1H - RMN (MeOH, 300 MHz): δ ppm 7.64 (1H, *d*, $J = 16$ Hz, H- β'), 7.33 (1H, *d*, $J = 2.1$ Hz, H-2'''), 7.14 (1H, *dd*, $J = 1.8, 8.1$ Hz, H-6'''), 6.87 (1H, *d*, $J = 11.1$ Hz, H-5'''), 6.83 (1H, *d*, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.77 (1H, *d*, $J = 1.8$, H-2), 6.68 (1H, *dd*, $J = 2.1, 8.1$ Hz, H-6), 6.41 (1H, *d*, $J = 16$ Hz, H- α'), 5.30 (1H, s, *grueso*, H-1''), 4.91 (1H, *t*, $J = 9$ Hz, H-4'), 4.44 (1H, *d*, $J = 7.5$, H-1'), 4.01, 3.71 (2H, *m*, H- α). 3.91 (3H, s, OCH_3'''), 3.86 (1H, *m*, H-3'), 3.79 (3H, s, OMe),

3.62 (1H, *m*, H-5''), 3.45 (1H, *t*, *J* = 8.4 Hz, H-2'), 3.34 (1H, *t*, *J* = 9.5 Hz, H-4''), 2.79 (1H, *t*, *J* = 7.2, H-β). ¹³C RMN (MeOH 300 MHz): δ ppm 167.22 (C=O), 150.32 (C-3''' and C-4'''), 148.85 (C-3), 147.41 (C-5), 146.84 (C-β), 132.72 (C-1), 127.54 (C-1'''), 124.31 (C-6'''), 120.79 (C-6), 116.80 (C-5), 116.15 (C-5'''), 111.42 (C-2'''), 103.96 (C-1'), 101.91 (C-1''), 79.61 (C-3'), 76.35 (C-2'), 76.06 (C-5'), 73.71 (C-4''), 72.26 (C-3''), 72.09 (C-2''), 71.51 (C-α), 70.35 (C-4'), 69.54 (C-5''), 62.47 (C-6'), 56.42 (2 OCH₃), 36.31 (C-β), 18.58 (C-6'').

7 Verbascósido (Arciniegas *et al.*, 1997; Pardo *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Akdemir *et al.*, 2004)

UV (λ, nm, MeOH): 331, 266, 217, 213 y 209. [α_D]: -0.062 (582 nm), 23.0 mg/mL. ¹H - RMN (MeOH *d*₆, 500 MHz): δ ppm 7.58 (1H, *d*, *J* = 16 Hz, H-β'), 7.04 (1H, *d*, *J* = 2 Hz, H-2'''), 6.94 (1H, *dd*, *J* = 2, 8 Hz, H-6'''), 6.76 (1H, *d*, *J* = 8 Hz, H-5'''), 6.68 (1H, *d*, *J* = 2 Hz, H-2), 6.64 (1H, *d*, *J* = 8 Hz, H-5), 6.55 (1H, *dd*, *J* = 2, 8 Hz, H-6), 6.26 (1H, *d*, *J* = 16 Hz, H-α'), 5.17 (1H, *d*, *J* = 1.5 Hz, H-1''), 4.04, 3.71, (2H, *m*, H-α) 4.91 (1H, *m*, H-4') 3.50 (1H, *m* H-5'), 4.37 (1H, *d*, *J* = 8 Hz, H-1'), 3.90 (1H, *dd*, *J* = 1.5, 3, H-2''), 3.80 (1H, *t*, *J* = 9.5 Hz 3'), 3.61 – 3.52 *m*, H-6'), 3.56 (1H, *dd*, *J* = 3, 9.5 Hz, H-3''), 3.38 (1H, *dd*, *J* = 8, 9.5 H-2'), 3.31 (1H, *m*, H-4''), 2.78 (2H, *ddd*, *J* = 3.5, 7.5, 11 Hz, H-β), 1.08 (3H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-6''). ¹³C RMN (MeOH 300 MHz): δ ppm 168.36 (C=O), 149.68 (C-4'''), 148.03 (β'), 146.70 (C3'''), 145.97 (C-3), 144.52 (C-4), 131.45 (C-1), 127.56 (C-1'''), 123.24 (C-6'''), 121.28 (C-6), 117.12 (C-2), 116.54 (C-5'''), 116.3 3 (C-5), 115.25 (C-2'''), 114.60 (C-α'), 104.04 (C-1'), 102.95 (C-1''), 81.69 (C-3'), 76.11 (C-2'), 75.80 (C-5'), 73.70 (C-4''), 72.23 (C-2''), 72.19 (C-α), 71.95 (C-3'') 70.59 C-4'), 70.41 (C-5''), 62.2 (C-6'), 36.5 (C-β), 18.40 (C-6'').

7.4 Ensayos de viabilidad, actividad antiinflamatoria y antioxidante en la línea celular macrófagos RAW 264.7 con el extracto (A), particiones, fracciones y compuestos puros obtenidos de *P. gentianoides*.

Como modelo de actividad biológica para determinar la actividad antiinflamatoria y antioxidante de *P. gentianoides* se empleó la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS, en la cual se evaluó la viabilidad de las células en presencia de las muestras, la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS, la producción de nitritos así como el estrés oxidativo.

7.4.1 Viabilidad de los macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS.

El ensayo de citotoxicidad empleado el MTT descrito por Mosmann en 1983, está basado en la capacidad de la enzima mitocondrial dehidrogenasa de las células viables para romper el anillo tetrazolio que le confiere el color amarillo al MTT y formar cristales de formazan de color azul oscuro. El número de células sobrevivientes es directamente proporcional a los niveles de formazan producidos y por lo tanto refleja la viabilidad de las células en presencia de un compuesto prueba, así como la citotoxicidad del compuesto. Para comprobar la efectividad del ensayo se realizaron pruebas de toxicidad con peróxido de hidrógeno a 10 μM , bajo estas condiciones se observó un viabilidad menor al 5% (datos no mostrados), con base a estos resultados se determinó que el ensayo de viabilidad de los macrófagos RAW 264.7 empleando MTT era apropiado.

En las figuras VI y VII se observa que el extracto y las particiones no presentaron actividad citotóxica a 100 $\mu\text{g/mL}$, por lo cual se decidió emplear esta concentración para realizar los otros ensayos biológicos empleando los macrófagos RAW 264.7. Con respecto a las fracciones únicamente las células tratadas con la fracción F-8 presentaron un porcentaje de viabilidad menor al 76% con respecto al control, por lo cual se decidió no realizar los demás experimentos con esta fracción (Figura IX).

Figura VI

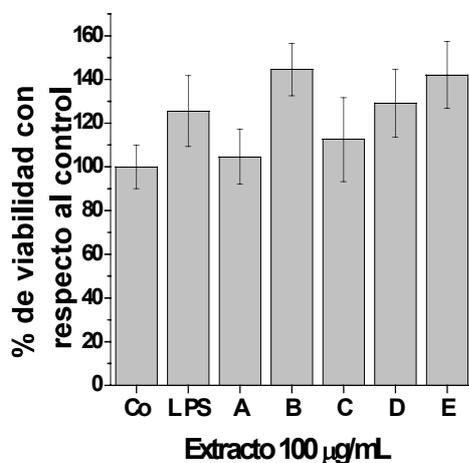
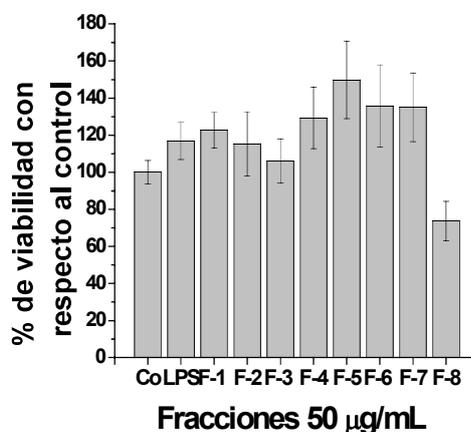


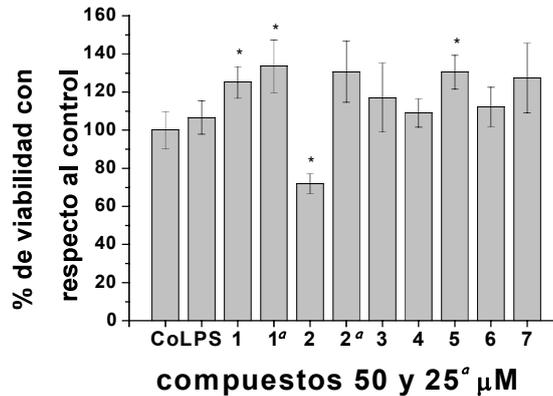
Figura VII



Figuras VI y VII. Viabilidad de los macrófagos RAW 264.7 tratados con LPS (1 µg/mL) en presencia y ausencia de las muestras de *P. gentianoides* (100 µg/mL) A: hojas con MeOH; B: partición MeOH/H₂O; C: partición n-Hex; D: partición CH₂Cl₂; E: partición AcOEt y las fracciones F1- F7 (50 µg/mL;) obtenidas de la partición E. La viabilidad celular fue determinada por la reducción mitocondrial de MTT ensayo descrito en 'materiales y métodos'. Co = control, LPS = lipopolisacárido. Los datos están expresados como el promedio ± SD de al menos tres experimentos independientes. La viabilidad de las células sin LPS fue referida como el 100%. *P < 0.05 representa una diferencia significativa comparada con los valores obtenidos con las células sin LPS.

El compuesto diosmetina (2) tuvo actividad citotóxica a 50 µM y se decidió emplear una concentración de 25 µM al igual que para la luteolina (Figura VIII), a esta concentración la diosmetina no mostró un efecto citotóxico; por lo cual se decidió emplearla como concentración máxima para realizar los ensayos siguientes. Se observó que las células tratadas con LPS presentaron un aparente incremento en la viabilidad, para explicar este efecto se sugirió que los macrófagos al ser estimulados con LPS incrementaron la actividad de su maquinaria celular produciendo la ruptura del anillo tetrazolio de más moléculas de MTT aumentando de esta manera la coloración azul en comparación a las células empleadas como control negativo, de igual forma las

células tratadas con las muestras y el LPS mostraron un aparente de aumento de la viabilidad.



Figuras VIII. Viabilidad de los macrófagos RAW 264.7 tratados con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia y ausencia de los compuestos obtenidos de *P. gentianoides* 1) luteolina, 2) diosmetina, 3) globularicisina, 4) plantarenalósido 5) penstemínósido 6) martinósido y 7) verbascósido (50 y ^a25 μM). La viabilidad celular fue determinada por la reducción mitocondrial de MTT ensayo descrito en 'materiales y métodos'. Co = control, LPS = lipopolisacárido. Los datos están expresados como el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. La viabilidad de las células sin LPS fue referida como el 100%. *P < 0.05 representa una diferencia significativa comparada con los valores obtenidos con las células sin LPS.

7.4.2 Expresión de las enzimas COX-2 e iNOS en los macrófagos RAW 264.7.

Como se mencionó en los antecedentes, los macrófagos son células que se encuentran estrechamente relacionadas con la respuesta inflamatoria, estas células llegan al sitio de inflamación y se inicia una serie de eventos y señalizaciones desencadenadas en primer lugar por los neutrófilos, también se sabe que los macrófagos pueden secretar proteasas, eicosanoides, citocinas, ERO y ERN (Nathan, 2002).

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 fue obtenida por primera vez de un tumor inducido por el virus de leucemia murino Albeston (Ralph *et al.*, 1977). Esta línea celular ha sido ampliamente empleada para determinar el efecto antiinflamatorio de varios compuestos, ya que estas células expresan las enzimas COX-2 e iNOS mediante el estímulo con LPS bacteriano (Reddy *et al.*, 1994; Phillips *et al.*, 1993). La expresión de COX-2 e iNOS en los macrófagos RAW 264.7 tratados con la muestras, fue estudiada por la técnica de inmunoreplica o Western blot, mediante la cual se analizó la inhibición o la inducción de la expresión de ambas enzimas con respecto a un control (Tsao *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2000).

En esta técnica fue muy importante que las células y el sistema para detectar la expresión de las enzimas iNOS y COX-2, se encontrara en óptimas condiciones, es decir, que las células empleadas como controles negativos no presentaran expresión de las enzimas y que al estar en contacto con la sustancia estimuladora en este caso 1 µg/mL de LPS por 12 h, mostraran una evidente expresión en las condiciones de electroforesis y Western Blot empleadas.

Para validar el ensayo con la línea celular RAW 264.7 se empleó como control positivo el compuesto sulforafano (SFN) el cual se ha reportado que inhibe la expresión de las enzimas COX e iNOS a nivel transcripcional, inhibiendo la unión del DNA y del NFκB (Heiss *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos con el extracto y las particiones (Figura IX), mostraron que el extracto A no presentó actividad en la expresión de las enzimas iNOS y COX-2 con ninguna de las concentraciones empleadas 100 y 50 µg/mL. La partición B mostró una ligera inhibición en la expresión de la enzima iNOS a 100 µg/mL, inhibición que se perdió totalmente a 50 µg/mL; en la expresión de la enzima COX-2, la partición B no mostró una actividad evidente a las dos concentraciones empleadas. Por otro lado, la partición C no presentó inhibición en la expresión de la enzima iNOS a las concentraciones empleadas, pero a 100 µg/mL inhibió casi totalmente la expresión de COX-2, perdiendo la actividad a 50 µg/mL, esto pudo deberse a que la partición C a 100 µg/mL contiene compuestos que inhiben la expresión de COX-2, de manera independiente a la expresión de iNOS. La partición D, no tuvo inhibición en la expresión de ambas enzimas a las concentraciones empleadas al igual que el extracto A. Con

respecto a la partición E, esta fue la que presentó mayor actividad en la inhibición de la expresión de la enzima iNOS a 100 µg/mL, y al igual que la partición B la actividad se perdió a 50 µg/mL, con respecto a la expresión de COX-2, la partición E a 100 µg/mL no mostró actividad, pero a 50 µg/mL se observó un incremento en la expresión de COX-2.

Estos resultados concuerdan con la evidencia que sugiere que el NF-κB no es el único factor de transcripción activado por LPS involucrado en la expresión de COX-2 e iNOS ya que al igual que los resultados obtenidos se observa una expresión de COX-2 independiente de iNOS y por lo tanto de NF-κB (Djoko *et al.*, 2007).

De acuerdo a los resultados logrados en las pruebas de actividad antioxidante se decidió fraccionar la partición E obtenida con acetato de etilo, de manera interesante esta fue la partición que presentó mayor actividad en la inhibición de la expresión de la enzima iNOS; con las fracciones obtenidas de esta partición, también se realizaron pruebas para examinar su efecto en la expresión de las enzimas estudiadas.

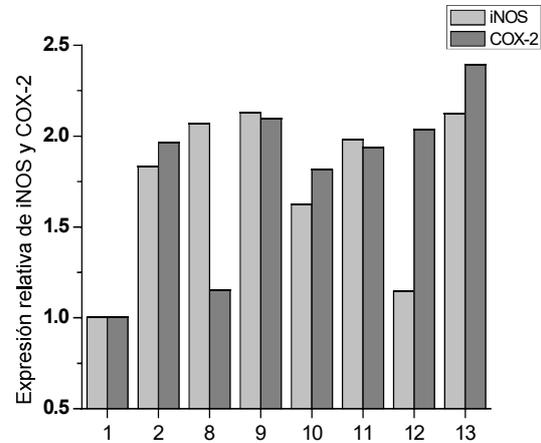
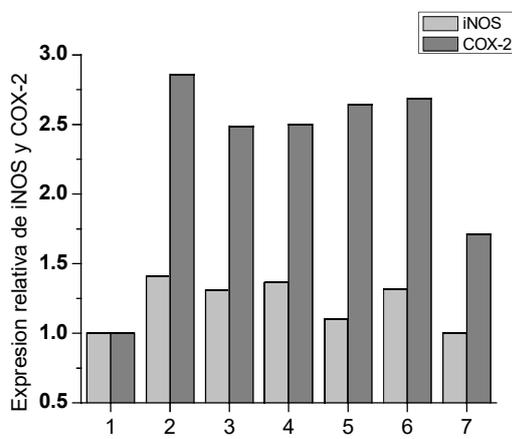
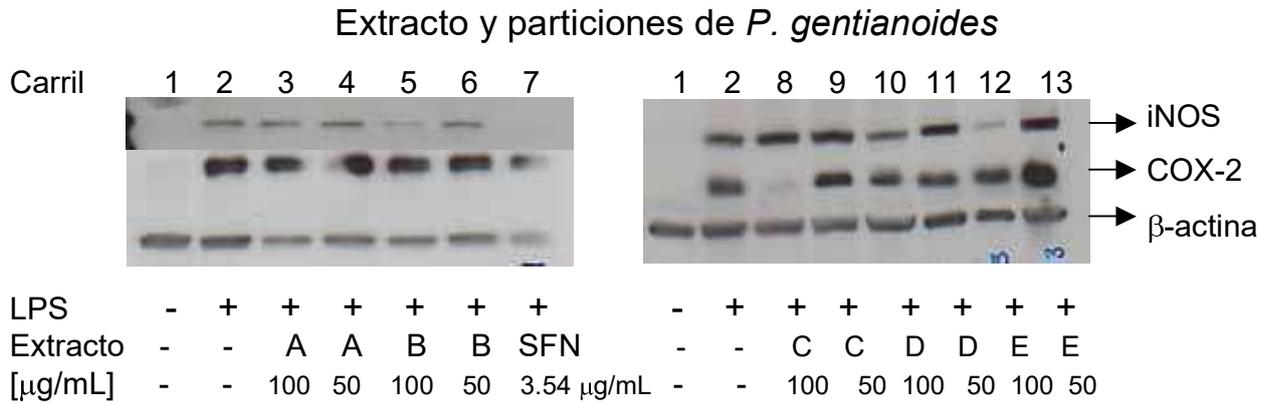


Figura IX. Efecto de las muestras de *P. gentianoides* (100 y 50 $\mu\text{g/mL}$; A: hojas con MeOH; B: partición MeOH/ H_2O ; C: partición n-Hex; D: partición CH_2Cl_2 ; E: partición AcOEt) en la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS en los macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). Las células fueron tratadas como se describe en 'materiales y métodos'. Cantidades iguales de proteína (40 $\mu\text{g/carril}$) se separaron en un gel de acrilamida SDS al 7.5%, y la expresión de COX-2, iNOS y β -actina fue detectada por Western Blot empleando los anticuerpos específicos. La proteína β -actina fue usada como control interno. La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó por densitometría (BIO-RAD Digital Imaging System) COX-2/ β -actina y iNOS/ β -actina.

En la figura X se observó que las fracciones F-1, F-2 y F-3, fueron las que inhibieron la expresión de la enzima iNOS observando la mayor actividad a 50 µg/mL sin perderla a 10 µg/mL, contrario a lo observado en la expresión de COX-2 ya que a una concentración de 50 µg/mL se observó un aumento de la expresión de la enzima y a una concentración menor de 10 µg/mL se observó una inhibición en la expresión. Esto se pudo deber a que en esas fracciones se encuentran compuestos que a altas concentraciones estimulan la expresión de la enzima COX-2 de manera independiente al factor NF-κB. Por otro lado se sabe que el NO[•] producto de síntesis de la iNOS, y los productos intermediarios como el ONOO⁻ están involucrados en la estimulación de la expresión y actividad de COX-2, por lo tanto se especula que efecto inhibitorio de estas fracciones a 10 µg/mL en la expresión de COX-2 es de manera independiente a los productos de síntesis de iNOS.

En el caso de la fracción F-4 al realizar el análisis de densitometría de la membrana se observó que esta fracción a 10 µg/mL fue la que presentó mayor actividad en la inhibición de la enzima COX-2, y que no presentó actividad en la expresión de iNOS a las concentraciones empleadas. Con la fracción F-5 se observó un comportamiento diferente en comparación a F-1, F-2 y F-3 en la expresión de la enzima COX-2, a una concentración de 50 µg/mL no se observó un efecto significativo de la expresión, sin embargo a 10 µg/mL se observó un aumento en la expresión de dicha enzima, y contrario al efecto de las mismas fracciones no se observó un efecto en la enzima iNOS.

Fracciones F-1 a la-F-5 de la partición E de *P. gentianoides*

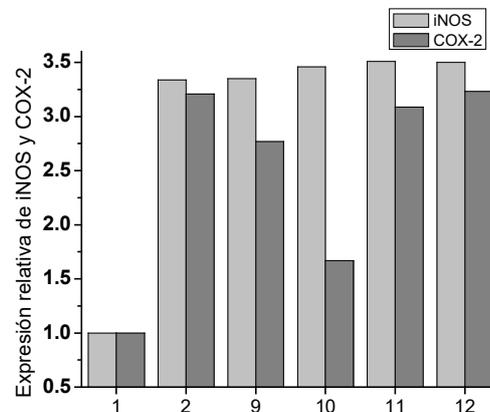
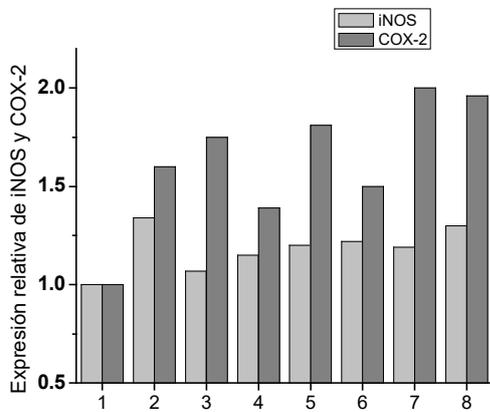
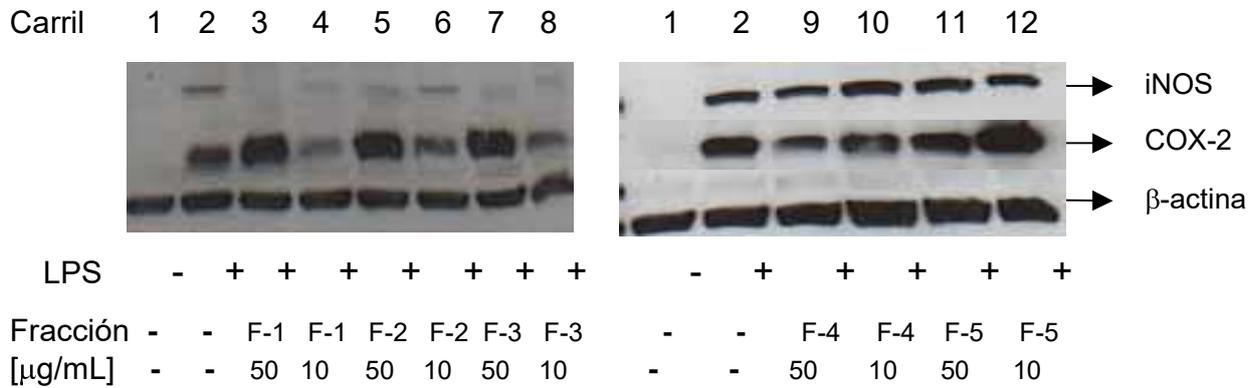


Figura X. Efecto de las fracciones F-1 a la F-5 (50 y 10 $\mu\text{g/mL}$) de la partición E de *P. gentianoides* en la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS en los macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). Las células fueron tratadas como se describe en 'materiales y métodos'. Cantidades iguales de proteína (40 $\mu\text{g/carril}$) se separaron en un gel de acrilamida SDS al 7.5%, y la expresión de COX-2, iNOS y β -actina fue detectada por Western Blot empleando los anticuerpos específicos. La proteína β -actina fue usada como control interno. La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó por densitometría (BIO-RAD Digital Imaging System) COX-2/ β -actina y iNOS/ β -actina.

En la figura XI se observa que la fracción F-6 presentó una inhibición en la expresión de COX-2 a 10 $\mu\text{g/mL}$, pero contrario a F-1, F-2 y F-3 las que tuvieron un efecto similar a la misma concentración; por otro lado, la F-6 no presentó ninguna actividad a 50 $\mu\text{g/mL}$ en la expresión de COX-2 y con respecto a la expresión de iNOS esta fracción no tuvo presentó una actividad significativa. En el caso de la F-7, no se observó actividad en la expresión de iNOS y COX-2.

Fracciones F-6 y F-7 de la partición E de *P. gentianoides*

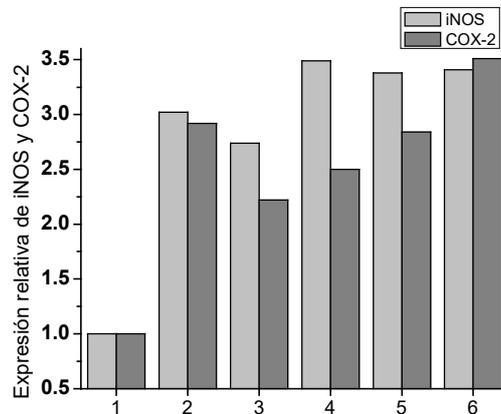
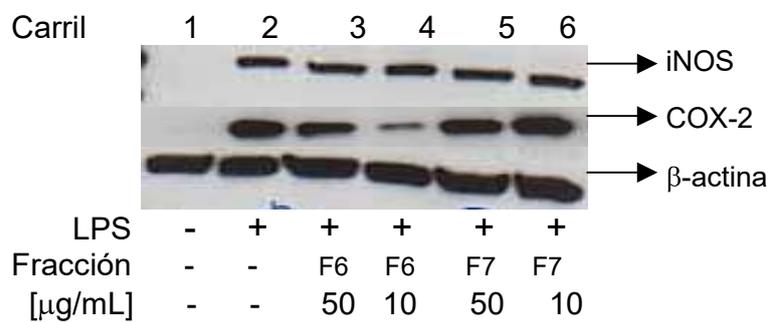


Figura XI. Efecto de las fracciones F-6 y F-7 (50 y 10 $\mu\text{g/mL}$) de la partición E de *P. gentianoides* en la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS en los macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). Las células fueron tratadas como se describe en 'materiales y métodos'. Cantidades iguales de proteína (40 $\mu\text{g/carril}$) se separaron en un gel de acrilamida SDS al 7.5%, y la expresión de COX-2, iNOS y β -actina fue detectada por Western Blot empleando los anticuerpos específicos. La proteína β -actina fue usada como control interno. La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó por densitometría (BIO-RAD Digital Imaging System) COX-2/ β -actina y iNOS/ β -actina.

En la figura XII-A se observa que el compuesto luteolina (1) tuvo una actividad inhibitoria de la expresión de la enzima iNOS, presentando la mayor actividad a 50 μM y perdiendo casi totalmente la actividad a 10 μM . En el caso de la expresión de la enzima COX-2 se observó un efecto similar aunque menor, este resultado concuerda con los reportados en otros artículos en donde se muestra la actividad inhibitoria de este compuesto (Matsuda 2003), por lo tanto se consideró a la luteolina como un control positivo de este ensayo.

El compuesto diosmetina (2), presentó un comportamiento similar, en la expresión de la enzima iNOS a la concentración máxima 25 μM , pero en el caso de COX-2 el efecto fue menor que el encontrado con la luteolina a la misma concentración de 10 μM .

El mismo experimento fue llevado a cabo con los otros compuestos globularicisina (3), plantarenalósido (4) penstemínósido (5) martinósido (6) y verbascósido (7) a las mismas concentraciones (50 y 10 μM) sin observar efecto significativo en la expresión de ambas enzimas (Figura XII-B).

Compuestos puros

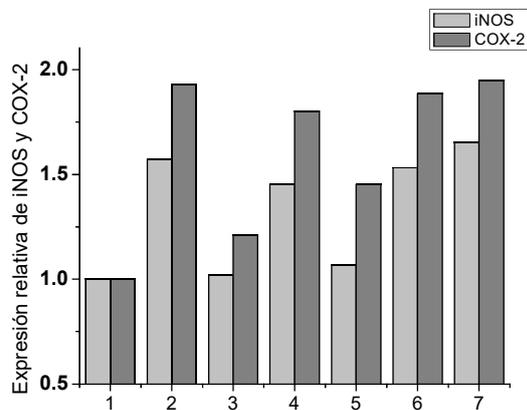
Línea 1 2 3 4 5 6 7 1 2 8 9 10 11 12 13 14 15



LPS	-	+	+	+	+	+	+
CP	-	-	1	1	2	2	3
[μ M]	-	-	50	10	25	10	50

-	+	+	+	+	+	+	+	+
-	+	4	4	5	5	6	6	7
-	-	50	10	50	10	50	10	50

A



B

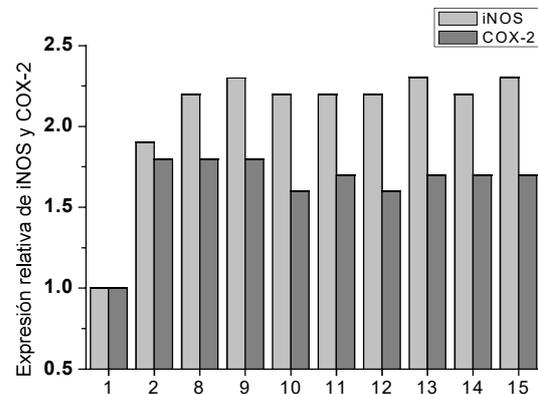
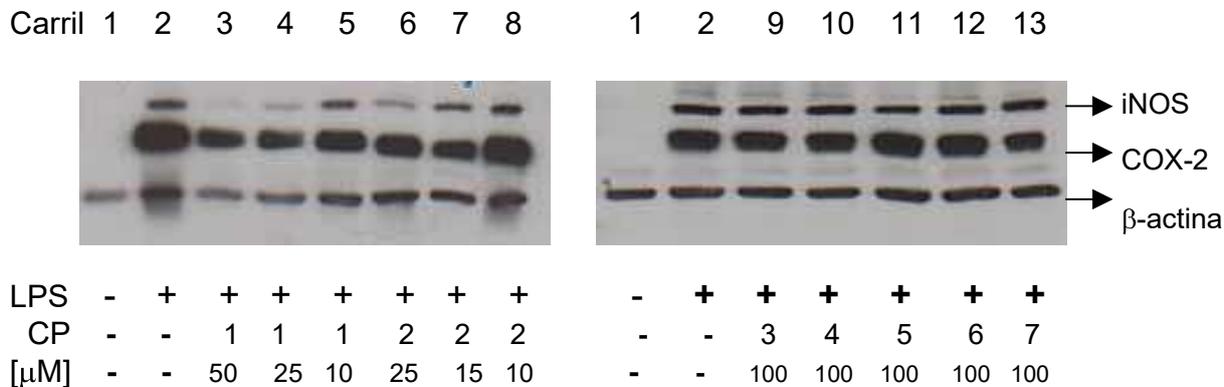


Figura XII. Efecto de los compuesto puros (50 y 10 μ M) obtenidos de *P. gentianoides* 1) luteolina, 2) diosmetina, 3) globularicisina, 4) plantarenalósido 5) pensteminósido 6) martinósido y 7) verbascósido en la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS en los macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS (1 μ g/mL). Las células fueron tratadas como se describe en 'materiales y métodos'. Cantidades iguales de proteína (40 μ g/carril) se separaron en un gel de acrilamida SDS al 7.5%, y la expresión de COX-2, iNOS y β -actina fue detectada por Western blot empleando los anticuerpos específicos. La proteína β -actina fue usada como control interno. La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó por densitometría (BIO-RAD Digital Imaging System) COX-2/ β -actina y iNOS/ β -actina.

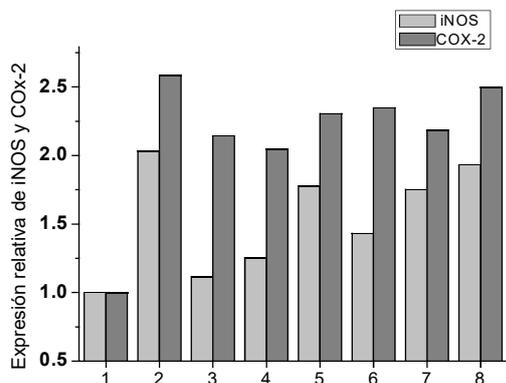
Para corroborar el efecto de los compuestos luteolina (1) y diosmetina (2) se realizó un experimento a dosis respuesta (50, 25 y 10 μM y 25, 15 y 10 μM respectivamente) (Figura XIII-A), el flavonoide luteolina presentó mayor actividad inhibitoria de la expresión de la enzima iNOS, con respecto a la diosmetina. En el caso de la enzima COX-2 se observó un comportamiento similar con la luteolina aunque el efecto fue menor que en la expresión de la iNOS, la diosmetina no presentó un efecto significativo en la expresión de COX-2 y parecido a la partición E a la menor concentración 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó una ligera estimulación.

Para confirmar que los demás compuestos no presentaran actividad se decidió utilizar una concentración de 100 μM (Figura XIII-B) y no se observó un efecto en la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS ni en la inhibición, ni en el incremento.

Compuestos puros



A



B

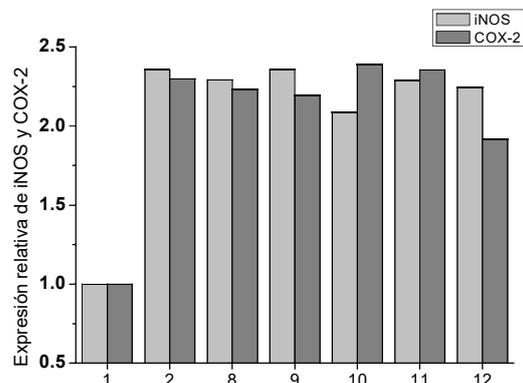


Figura XIII. Efecto de los compuesto puros 1) luteolina (50, 25 y 10 μM), 2) diosmetina (25, 15 y 10 μM) (A), 3) globularicisina, 4) plantarenalósido 5) pensteminósido 6) martinósido y 7) verbascósido (100 μM) (B) obtenidos de *P. gentianoides* en la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS en los macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las células fueron tratadas como se describe en 'materiales y métodos'. Cantidades iguales de proteína (40 $\mu\text{g}/\text{carril}$) se separaron en un gel SDS al 7.5%, y la expresión de COX-2, iNOS y β -actina fue detectada por Western Blot empleando los anticuerpos específicos. La proteína β -actina fue usada como control interno. La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó por densitometría (BIO-RAD Digital Imaging System) COX-2/ β -actina y iNOS/ β -actina.

7.4.3 Producción de nitritos en los macrófagos RAW 264.7.

La cuantificación de la producción de nitritos es una técnica indirecta empleada para determinar la producción de NO[•] en los macrófagos, los cuales se sabe que pueden llegar a producir 4×10^6 moléculas de NO[•] por célula a partir de la enzima iNOS (Dedon *et al.*, 2004). Esta determinación es comúnmente realizada utilizando el ensayo de Griess.

En los ensayos realizados para la evaluación de la producción de nitritos se observó un aumento significativo en la producción de estos en las células RAW 264.7 al ser estimuladas con 1 µg/mL de LPS con respecto al control, aumentando aproximadamente cinco veces.

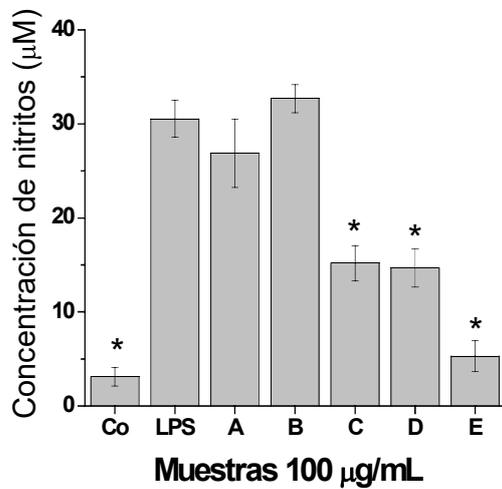
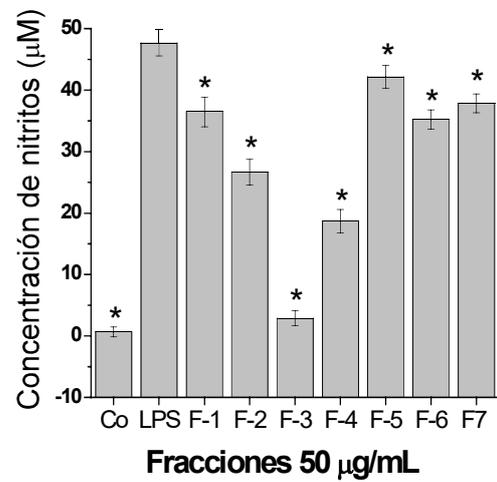
En la figura XIV se observa que los extractos A y B, no presentaron actividad en la inhibición de la producción de nitritos, al comparar estos resultados con la expresión de la enzima iNOS (Figura XI), los resultados concuerdan con el extracto A, pero no con la partición B, ya que con esta partición se esperaba una inhibición en la producción de nitritos la cual no se observó. Con respecto a la partición E esta fue la que presentó la mayor actividad inhibitoria en la producción de nitritos (aproximadamente del 80%) lo cual concordó con la inhibición de la expresión de la enzima iNOS. La inhibición de la producción fue seguida por las particiones C y D las que presentaron actividad del 50%. Sin embargo la partición C no presentó un efecto inhibitorio de la enzima iNOS, y la partición D mostró una baja inhibición de su expresión, este efecto se pudo deber a que son una mezcla muy compleja de compuestos, y que estos no actúen directamente sobre la expresión de la enzima iNOS, pero si en su actividad, así como en la producción de NO[•]; ya que algunos compuestos puedan atrapar en NO[•] e inhibir la producción de nitritos y de otras especies reactivas del nitrógeno lo cual los hace buenos candidatos para prevenir el estrés oxidativo producido por especies reactivas de nitrógeno.

En la figura XV se observa que la fracción F-3 fue la que presentó mayor inhibición en la producción de nitritos con una actividad mayor al 95%, esto concordó con la inhibición de la expresión de la enzima iNOS y contrario a lo que se observó con las fracciones F-1 y F-2 (27 y 47% de inhibición respectivamente) las cuales tuvieron un

efecto similar a la F-3 en la inhibición de iNOS, pero en la producción de nitritos, a pesar de que presentaron una actividad significativa esta fue menor a la fracción F-3. Con respecto a la fracción F-4 ocurrió algo interesante, ya que no mostró inhibición en la expresión de iNOS pero si en la producción de nitritos (60%), estos resultados sugieren que la fracción F-4 contiene compuestos que no actúan directamente sobre la expresión de la enzima iNOS, pero si sobre su actividad, o que contiene compuestos que pueden atrapar el NO^{*} o sus intermediarios. En el caso de las fracciones F-5, F-6 y F-7 estas presentaran menor actividad en la inhibición de la producción de nitritos, lo cual concuerda con la casi nula actividad en la expresión de iNOS.

Comparando con los resultados obtenidos en el trabajo presentado por Houde (2006) en el cual el extracto etanólico de semillas de uva tuvo una actividad inhibitoria del 40% en la producción de nitritos, y una inhibición en la expresión de la enzima iNOS mayor al 70%, y el estudio realizado por Hong *et al.* (2002) en donde se estudiaron 170 extractos metanólicos de diferentes especies pertenecientes a diferentes familias y de estos únicamente ocho extractos inhibieron la producción de prostaglandinas, seis la producción de nitritos (con 70% de actividad) y de estos solo dos extractos de la misma especie tuvieron ambas actividades, se corrobora lo señalado por Salvemini, (2001) quien menciona que los mecanismos de acción de los compuestos ocurren a diferentes niveles.

Es importante mencionar que la fracción que presentó la mayor actividad antioxidante en los modelos empleados fue la F-5, sin embargo no presentó actividad en la inhibición de iNOS y COX-2, ni en la producción de nitritos. En este caso no se encontró una relación directa entre la actividad antioxidante en los modelos químicos empleados así como una actividad antiinflamatoria reflejada en la inhibición de la expresión de las enzimas estudiadas y la producción de nitritos.

XIV**XV**

Figuras XIV y XV. Efecto de las muestras de *P. gentianoides* (100 µg/mL) A: hojas con MeOH; B: partición MeOH/H₂O; C: partición n-Hex; D: partición CH₂Cl₂; E: partición AcOEt (Figura XI) y de las fracciones (F-1 a F-7) obtenidas de la partición E (Figura XII) en la producción de nitritos en los macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS (1 µg/mL). Los nitritos fueron determinados por la reacción de Griess descrita en 'materiales y métodos' Co = control, LPS = lipopolisacárido. Los datos están expresados como el promedio ± SD de al menos tres experimentos independientes. *+P < 0.05 representa una diferencia significativa comparada con los valores obtenidos con las células tratadas con LPS.

Al realizar el ensayo con los compuestos puros se observó que los compuestos luteolina (1) y diosmetina (2) fueron los que presentaron mayor inhibición en la producción de nitritos a las concentraciones máximas empleadas (50 y 25 µM respectivamente) (Figura XVI) y que los otros compuestos no mostraron efecto lo cual coincide con los resultados obtenidos en la expresión de la enzima iNOS (Figuras XII-A y XIII-B).

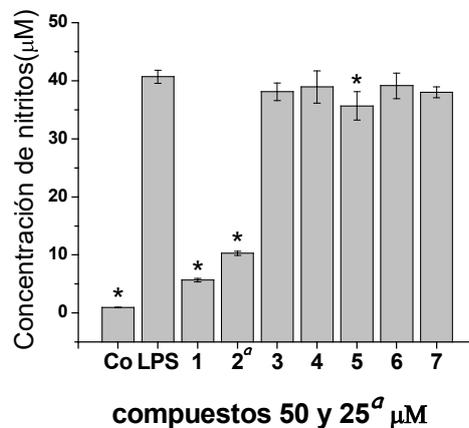


Figura XVI. Efecto de los compuesto puros 1) luteolina, 2) diosmetina, 3) globularicisina, 4) plantarenalósido 5) penstemínósido 6) martinósido y 7) verbascósido (50 y 25 µM) obtenidos de *P. gentianoides* en la producción de nitritos en los macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS (1 µg/mL). Los nitritos fueron determinados por la reacción de Griess descrita en ‘materiales y métodos’. Co = control, LPS = lipopolisacárido. Los datos están expresados como el promedio ± SD de al menos tres experimentos independientes. *P < 0.05 representa una diferencia significativa comparada con los valores obtenidos con las células tratadas con LPS.

Para comprobar el efecto de los compuestos luteolina (1) y diosmetina (2) se realizó un experimento a diferentes concentraciones (50, 25 y 10 µM y 25, 15 y 10 respectivamente) (Figura XVII), al igual que en la expresión de la enzima iNOS, se observó una cinética dosis respuesta en la que el flavonoide luteolina mostró mayor actividad inhibitoria de la producción de nitritos, con respecto a la diosmetina, estos datos concuerdan con la inhibición de la expresión de la enzima COX-2, y la enzima iNOS, ya que se sabe que la producción de nitritos esta estrechamente relacionada con la expresión de COX-2. Por otro lado de acuerdo a un ensayo realizado por Kim *et al.*, (2004) estos flavonoides tipo flavonas cumplen con las características estructurales necesarias para inhibir la producción de nitritos, las cuales son: un anillo A, C-5,7 dihidroxi sustituido, y un anillo B C-2', 3' dihidroxi sustituido en el caso de la luteolina y

un anillo B C-2'hidroxi, C-3'metoxi sustituido para la diosmetina cuya sustitución metoxilada le proporciona menor actividad como se muestra en los ensayos realizados

En el trabajo de Houde (2002), se emplearon dos compuestos fenólicos, los cuales están presentes en el extracto de semillas de uva, esto son ácido gálico (AG) y galato de epigallocatequina (GE), en dicho artículo los autores muestran que el AG no inhibió la expresión de la enzima iNOS, comparado con el GE. En el caso de la producción de nitritos se observó que el AG presentó la mayor inhibición, corroborando los resultados de las muestras en estudio donde se obtuvieron resultados similares.

Por otro lado se observó que los compuestos verbascósido y martinósido obtenidos de la fracción F-5, la cual presentó la mayor actividad antioxidante en los modelos químicos empleados no inhibieron la expresión de iNOS ni la producción de nitritos y por el contrario los compuestos luteolina y diosmetina obtenidos de la fracción F-3 la cual no presentó actividad antioxidante, presentaron mayor actividad en la inhibición de iNOS y en la producción de nitritos. Con base a estos resultados se comprobó la importancia de la realización de las pruebas biológicas de todas las muestras, ya que de solo haber estudiado las muestras con actividad antioxidante, no se hubieran encontrado los compuestos responsables de la inhibición de la expresión de las enzimas.

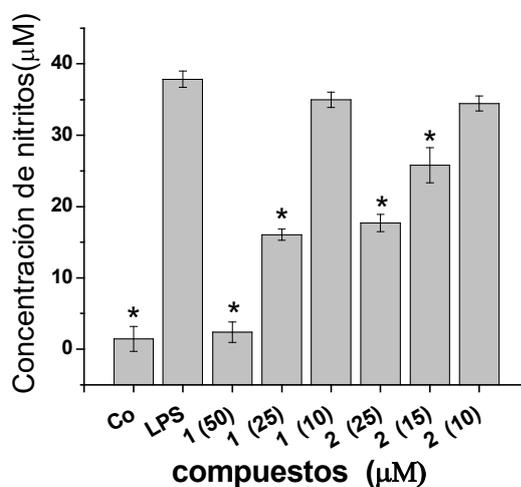


Figura XVII. Efecto de los compuestos puros 1) luteolina y 2) diosmetina en un ensayo dosis respuesta (50, 25 y 10 μM y 25, 15 y 10 μM respectivamente) en la producción de nitritos en los macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los nitritos fueron determinados por la reacción de Griess descrita en ‘materiales y métodos’. Co = control, LPS = lipopolisacárido. Los datos están expresados como el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ representa una diferencia significativa comparada con los valores obtenidos con las células tratadas con LPS.

7.4.4 Ensayo de actividad antioxidante en la línea celular RAW 264.7 evaluada con DCFH

El estrés oxidativo fue estudiado midiendo la oxidación intracelular del reactivo fluorescente DCFH en las células RAW 264.7, el cual se ha demostrado que refleja la producción intracelular de ERO, se ha sugerido que la oxidación del DCFH es causado principalmente por H_2O_2 (Schmidt *et al.*, 1995; Fraga *et al.*, 1987). Nuestros resultados mostraron que en el control negativo (sin LPS) hubo una generación de especies radicales basal la cual aumenta más de tres veces al tratar las células con LPS, esto indicó que el tratamiento con LPS aumenta el estrés oxidativo, a través de la estimulación de $\text{TNF-}\alpha$ ya que se conoce que esta citocina estimula la producción de ERO apoyando los antecedentes ya mencionados que involucran a los radicales en la respuesta inflamatoria.

En la figura XVIII se muestra el ensayo de actividad antioxidante en las células RAW 264.7 empleando DCFH, se observó que las particiones que presentaron mayor efecto fueron la partición D y E con un 49.48 y 52.3% de inhibición respectivamente, en el caso del extracto E los resultados concuerdan con los ensayos de actividad antioxidante DPPH', TBARS, ORAC y FRAP contrario a lo que se obtuvo con la partición D la cual no presentó un fuerte efecto antioxidante en los modelos empleados y si en el ensayo con las células. Estos resultados nos muestran, que la partición D tiene compuestos que pueden tener un efecto antioxidante en un sistema biológico como son las células y no en sistemas químicos, por lo tanto es importante tomar en cuenta los ensayos biológicos para determinar si se continua, o no, con el estudio fitoquímico. Con respecto al extracto A y a las particiones B y C no presentaron actividad antioxidante.

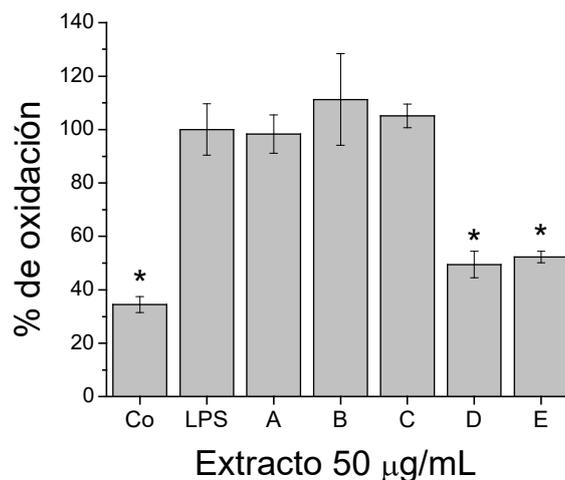


Figura XVIII. Actividad antioxidante de las muestras de *P. gentianoides* (50 µg/mL; A: hojas con MeOH; B: partición MeOH/H₂O; C: partición n-Hex; D: partición CH₂Cl₂; E: partición AcOEt) en la línea celular RAW 264.7 estimulados con LPS (1 µg/mL) evaluada con DCFH. El ensayo fue realizado como se describe en 'materiales y métodos'. Co = control, LPS = lipopolisacárido. Los datos están expresados como el promedio ± SD de al menos tres experimentos independientes. El porcentaje de oxidación obtenida con LPS es referida como el 100% de oxidación. *P < 0.05 representa una diferencia significativa comparada con los valores obtenidos con las células sin LPS.

En la figura XIX se observa que la fracción F-3 fue la que presentó mayor actividad inhibitoria del estrés oxidativo (46%), la fracción F-5 que fue la más activa en los ensayos químicos no mostró actividad en la línea celular, como ya se mencionó, a partir de la fracción F-3 se obtuvieron los compuestos luteolina y diosmetina y de la fracción F-5 el verbascósido y el martinósido.

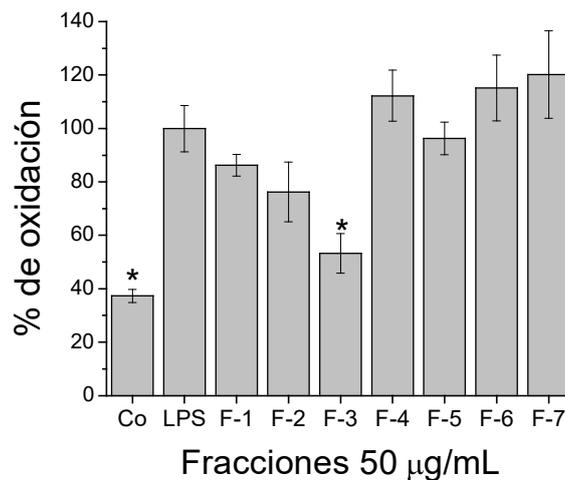


Figura XIX. Actividad antioxidante de las fracciones (50 µg/mL; F1- F7) obtenidas de la partición **E** de *P. gentianoides* en la línea celular RAW 264.7 estimulados con LPS (1 µg/mL) evaluada con DCFH. El ensayo fue realizado como se describe en 'materiales y métodos'. Co = control, LPS = lipopolisacárido. Los datos están expresados como el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. La oxidación obtenida con LPS es referida como el 100% de oxidación. * $P < 0.05$ representa una diferencia significativa comparada con los valores obtenidos con las células sin LPS.

En la figura XX se observa que el compuesto luteolina (1) presentó actividad protectora frente al estrés oxidativo, lo cual nos llevó a concluir que la actividad inhibitoria de la expresión de iNOS y en la producción de nitritos fue favorecida por la actividad antioxidante, de acuerdo a los antecedentes el estrés oxidativo esta involucrado en diferentes niveles en la respuesta inflamatoria estimulando la actividad del NF- κ B y también la producción de diferentes mediadores como la IL-1, IL-6, TNF- α ,

IFN- γ , así como en la señalización celular, por lo tanto es posible que la luteolina por medio de su actividad antioxidante haya disminuido los factores estudiados los cuales están involucrados en la respuesta inflamatoria.

Con respecto a la diosmetina a pesar de presentar una ligera actividad prooxidante también inhibió de la expresión de iNOS y COX-2, así como en la producción de nitritos, por lo que sugerimos que su mecanismo de acción es independiente de la producción de especies reactivas.

En el caso de los demás compuestos estos no presentaron actividad antioxidante, incluso el pensteminósido y el verbascósido, presentaron un aparente aumento del estrés oxidativo, al igual que la diosmetina. El resultado obtenido con el verbascósido no concuerda con las actividades antioxidantes reportadas en la literatura (Aldioni *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2000).

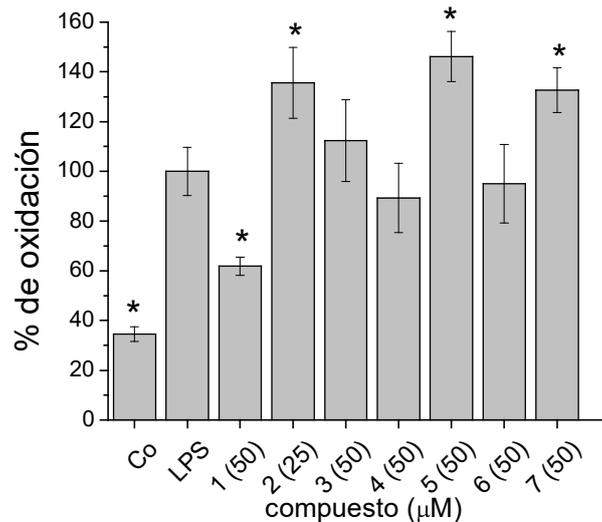


Figura XX. Actividad antioxidante de los compuestos puros 1) luteolina, 2) diosmetina, 3) globularicisina, 4) plantarenalósido 5) pensteminósido 6) martinósido y 7) verbascósido obtenidos de *P. gentianoides* en la línea celular RAW 264.7 estimulados con LPS (1 µg/mL) evaluada con DCFH. El ensayo fue realizado como se describe en 'materiales y métodos'. Co= control, LPS= lipopolisacárido. Los datos están expresados como el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. La oxidación obtenida con LPS es referida como el 100% de oxidación. * $P < 0.05$ representa una diferencia significativa comparada con los valores obtenidos con las células sin LPS.

7.4.5 Actividad antioxidante de los compuestos de *P. gentianoides* frente al radical DPPH' y peroxidación de lípidos.

En la tabla XII se observa la actividad antioxidante de los compuestos aislados de *P. gentianoides* a una concentración de 50 μ M. Se observa que el compuesto verbascósido fue el que presentó mayor reducción del radical DPPH' con una actividad del 87.25%, actividad seguida por la luteolina con un 66.2%. Los compuestos martinósido y diosmetina mostraron menor reducción del radical DPPH' con una actividad del 58.13% y 22.48% respectivamente, en cuanto a la globularicisina, el plantarenalósido y el penstemínósido estos no presentaron actividad a esta concentración. Una actividad similar se observó en el ensayo TBARS en donde la luteolina y el verbascósido presentaron la mayor inhibición en la peroxidación de lípidos (93.28% y 87.53% respectivamente), seguidos por la diosmetina (34.29 %) y el martinósido (28.52%). Con base a estos resultados se pudo justificar la fuerte actividad antioxidante de la fracción F-5, de donde se obtuvieron los compuestos verbascósido y martinósido, en el caso particular del verbascósido se sabe que este compuesto presenta una fuerte actividad antioxidante la cual se vio reflejada en los ensayos DPPH' y TBARS, pero no así en el ensayo de actividad antioxidante en los macrófagos RAW 264.7, esto se pudo deber a las propiedades hidrofílicas que le confieren los grupos hidroxilo tanto de los anillos aromáticos como los azúcares y que no le permiten atravesar las membranas lipídicas y ejercer su efecto antioxidante, por las mismas razones es posible que no hayan presentado efecto en la inhibición de la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS. Con estos datos se pone de manifiesto la variabilidad de los resultados obtenidos en diferentes ensayos encaminados a medir el mismo efecto.

Tabla XII. Actividad antioxidante de los compuestos puros 1) luteolina, 2) diosmetina, 6) martinósido y 7) verbascósido obtenidos de *P. gentianoides* en los modelos de reducción del radical DPPH' e inhibición de la peroxidación de lípidos a una concentración de 50 µM. Los datos están expresados como el promedio ± SD de al menos tres experimentos independientes. 3) globularicisina, 4) plantarenalósido y 5) pensteminósido no mostraron actividad a la concentración empleada.

Compuesto (50 µM)	% de reducción del DPPH'	% de inhibición de la peroxidación de lípidos
1) luteolina,	66.2 ± 10.34	93.28 ± 0.82
2) diosmetina,	22.48 ± 0.87	34.29 ± 6.87
6) martinósido	58.13 ± 1.24	28.52 ± 3.28
7) verbascósido	87.25 ± 1.34	87.53 ± 1.4

Por otro lado, los compuestos luteolina y diosmetina, los cuales fueron aislados de la fracción F-3 y que no presentó actividad antioxidante significativa en los modelos empleados, presentaron actividad antioxidante en los ensayos DPPH' y TBARS. La luteolina, es un flavonoide reportado con actividad antioxidante por su sustitución *orto* di-hidroxi en el anillo B, por lo tanto la baja actividad antioxidante de la fracción F-3 pudo deberse a que la luteolina se encontró en muy baja cantidad en esta fracción para ejercer el efecto antioxidante.

La inhibición en la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS por la luteolina y la diosmetina, así como la producción de nitritos no es nuevo, ya que se conoce que la luteolina interfiere con cascadas de señales en las que se estimula con LPS la línea celular RAW 264.7, bloqueando principalmente las moléculas pro-inflamatorias como el TNF- α (Xagorari *et al.*, 2002), sin embargo, no se tienen reportes de la actividad antioxidante de estos compuestos en macrófagos RAW 264.7 empleando DCFH.

Una de las principales contribuciones de este trabajo fueron los resultados obtenidos empleando los macrófagos RAW 264.7, en donde se observó que solo la luteolina tuvo actividad en la inhibición del estrés oxidativo, lo cual puede favorecer la inhibición de la expresión de las enzimas en estudio, en comparación con la

diosmetina, que no presenta actividad antioxidante, la luteolina presenta mayor efecto en la expresión.

De acuerdo a estos resultados se sugiere que no todos los compuestos que presentan actividad antioxidante en modelos químicos la presentarán en modelos biológicos en donde se encuentran presentes una mayor cantidad de factores, los cuales pueden influir en la actividad, y que la actividad antioxidante puede ser un factor que favorezca la inhibición de la expresión de algunas enzimas.

En la figura 25 se resume la obtención de los compuestos puros, así como los principales resultados obtenidos. Se observa que el extracto metanólico A, a pesar de ser un extracto total no presentó actividad en los ensayos realizados empleando la línea celular, y si en los modelos de actividad antioxidante químicos, mostrando el efecto que puede tener el estudiar extractos completos, ya que por la mezcla de compuestos que se obtienen es posible que estos enmascaren la actividad en sistemas biológicos. Se observa que las muestras no presentaron actividad citotóxica en las células utilizadas con excepción de la fracción F-8.

Como ya se mencionó la partición E fue la que presentó mejor actividad tanto en los modelos químicos de actividad antioxidante como en la inhibición de la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS, de las fracciones obtenidas de esta partición la F-1, F-2 y F-3 inhibieron la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS así como la producción de nitritos, pero de estas tres, solo la fracción F-3 tuvo actividad antioxidante en la línea celular, así como mayor actividad antioxidante en los modelos químicos.

De los siete compuestos aislados únicamente la luteolina y la diosmetina tuvieron actividad en la línea celular empleada, así como actividad antioxidante en los modelos DPPH' y TBARS al igual que el verbascósido y el martinósio. También es importante mencionar que la diosmetina presentó una baja pero significativa actividad en la inhibición de la inflamación en oreja de ratón.

En la figura 25 se muestra el esquema que se realizó para la obtención de los compuestos puros, así como los principales resultados obtenidos.

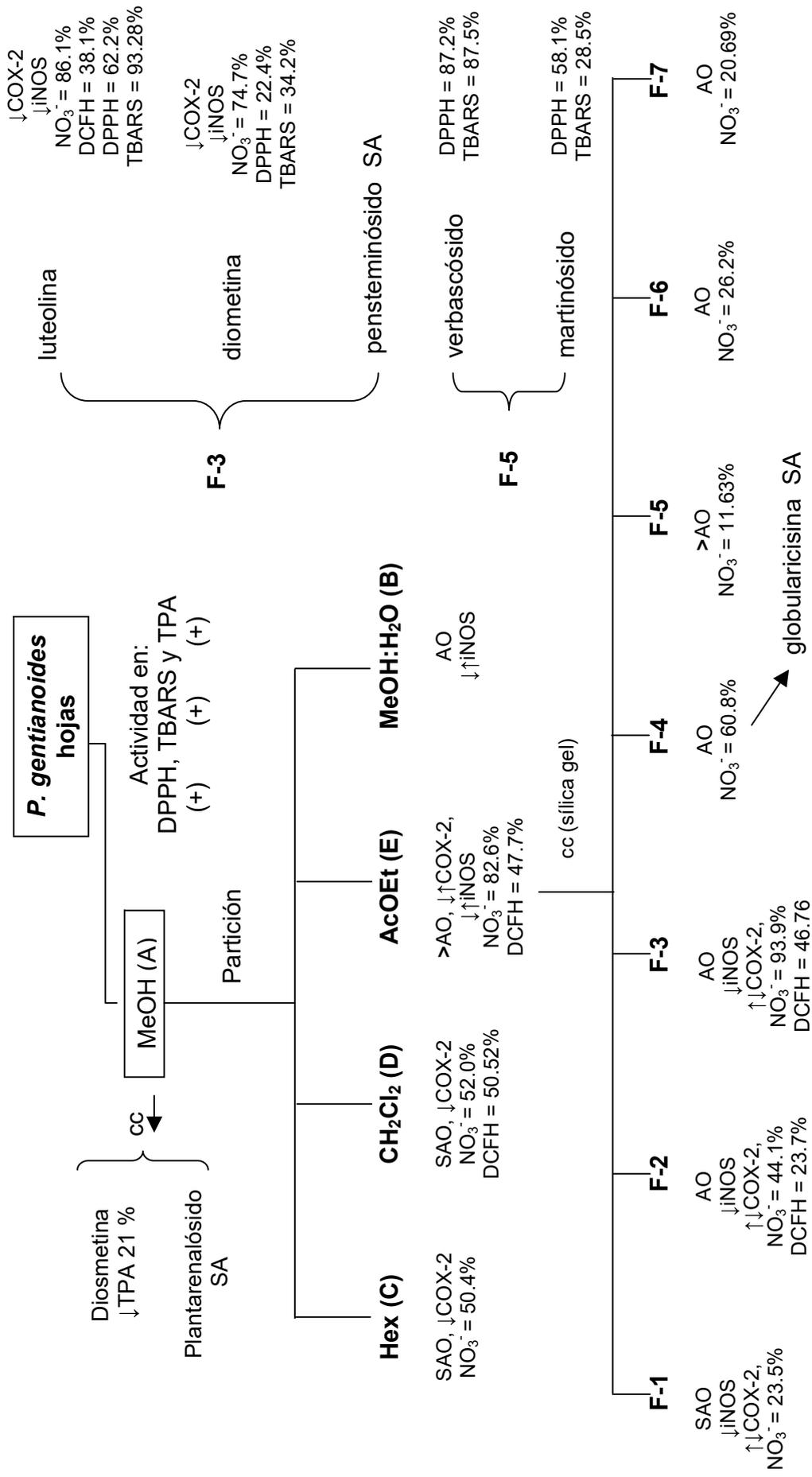


Figura 25. Fraccionamiento del extracto metanólico de las hojas de *P. gentianoides*. AO = actividad antioxidante, >AO mayor actividad antioxidante, SA = sin actividad, SAO = sin actividad antioxidante, NO₃⁻ = % de inhibición de la producción de nitritos, ↓ = disminución de la expresión, ↓↑ = disminución de la expresión a la mayor concentración y aumento de la expresión a la menor concentración, ↑↑ = aumento de la expresión a la mayor concentración y disminución de la expresión a la menor concentración.

8. CONCLUSIONES

La utilización de remedios herbolarios se ha incrementado en años recientes, lo cual justifica el interés de realizar estudios fitoquímicos encaminados al descubrimiento de compuestos novedosos con diversas actividades biológicas, así como conocer su mecanismo de acción.

Las principales conclusiones de este estudio se resumen en:

1.- Los extractos de *P. gentianoides* tuvieron una mayor actividad antioxidante y antiinflamatoria que los extractos de *B. salicifolius*.

2.- La partición en acetato de etilo (E) de *P. gentianoides* fue la más activa en los estudios de actividad antioxidante y presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos, inhibió la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS, y la producción de nitritos en los macrófagos RAW 264.7.

3.- De la partición E se aislaron e identificaron siete compuestos: dos flavonoides: 1) luteolina, 2) diosmetina; tres iridoideas: 3) globularicisina, 4) plantarenalósido, 5) penstemínósido (nuevo iridoide tipo catalpol); y dos fenilpropanoides: 6) martinósido y 7) verbascósido.

4.- La fracción F-5 fue la que presentó mayor actividad antioxidante en los ensayos DPPH', TBARS, ORAC y FRAP, pero no inhibió del estrés oxidativo, la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS, ni la producción de nitritos en los macrófagos RAW 264.7.

5.- De la fracción F-5 se aislaron los compuestos verbascósido y martinósido ambos presentaron actividad antioxidante en los ensayos DPPH' y TBARS.

6.- La fracción F-3, no presentó actividad antioxidante en los ensayos DPPH', TBARS, ORAC y FRAP, pero si inhibió el estrés oxidativo, la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS y la producción de nitritos en los macrófagos RAW 264.7.

7.- De la fracción F-3 se aislaron los compuestos luteolina y diosmetina ambos presentaron actividad antioxidante únicamente en los ensayos DPPH' y TBARS,

8.- La luteolina y la diosmetina son flavonoides conocidos, los cuales inhiben la producción de nitritos en macrófagos de peritoneo de ratón al igual que la diosmetina (Matsuda *et al.*, 2003), datos que se corroboraron en las condiciones experimentales empleadas en este estudio, ya que ambos inhibieron la expresión de COX-2 e iNOS al igual que la producción de nitritos.

9.- En el modelo de actividad antioxidante en los macrófagos RAW 264.7 empleando DCFH se observó que la luteolina tuvo un efecto en la inhibición de la producción de especies radicales, por lo que podemos concluir que el mecanismo antioxidante favorece los mecanismos de respuesta antiinflamatorios.

10.- La diosmetina inhibió la expresión de iNOS y COX-2 así como la producción de nitritos en los macrófagos RAW 264.7, por otro lado no inhibió en el estrés oxidativo en el mismo sistema, por lo que podemos concluir que la actividad antiinflamatoria de la diosmetina es independiente a la producción de radicales

11.- El verbascósido no presentó una actividad antioxidante, ni efecto antiinflamatorio en los macrófagos RAW 264.7 resultados contrarios a lo reportado en la literatura en donde se emplean otros modelos, con lo cual se pone de manifiesto la variabilidad de los resultados obtenidos en diferentes ensayos encaminados a medir el mismo efecto.

12.- Como resultado complementario la diosmetina presentó una ligera actividad antiinflamatoria en el modelo de TPA hecho que aunado a los resultados obtenidos puede justificar el uso de *P. gentianoides* en la medicina tradicional para contrarrestar padecimientos en los que se encuentre involucrada la respuesta inflamatoria.

13.- De acuerdo los resultados obtenidos, la actividad antioxidante en los modelos químicos empleados no siempre se relaciona con la actividad antioxidante en los modelos biológicos, ni con la inhibición de la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS, las cuales están involucradas en la respuesta inflamatoria, esto resalta la importancia de medir la actividad antioxidante y antiinflamatoria en un mismo modelo y bajo las mismas condiciones para evidenciar una posible relación entre ambas actividades.

9. ANEXO

I FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS

I. I Capacidad atrapadora del radical DPPH'

El DPPH' (1,1-Difenil-2-picrilhidracil) es una especie radical estable empleado para evaluar la actividad atrapadora de radicales de diversas muestras (Niki, 1987), como son extractos, liofilizados, compuestos puros de origen natural así como sintéticos, este radical en solución tiene un color violeta intenso que absorbe a 515 nm, al reaccionar con un compuesto antioxidante, pasa al estado reducido tornando la solución a color amarillo (Blois, 1958). La reacción general del radical DPPH' con una especie antioxidante se muestra en la figura i.

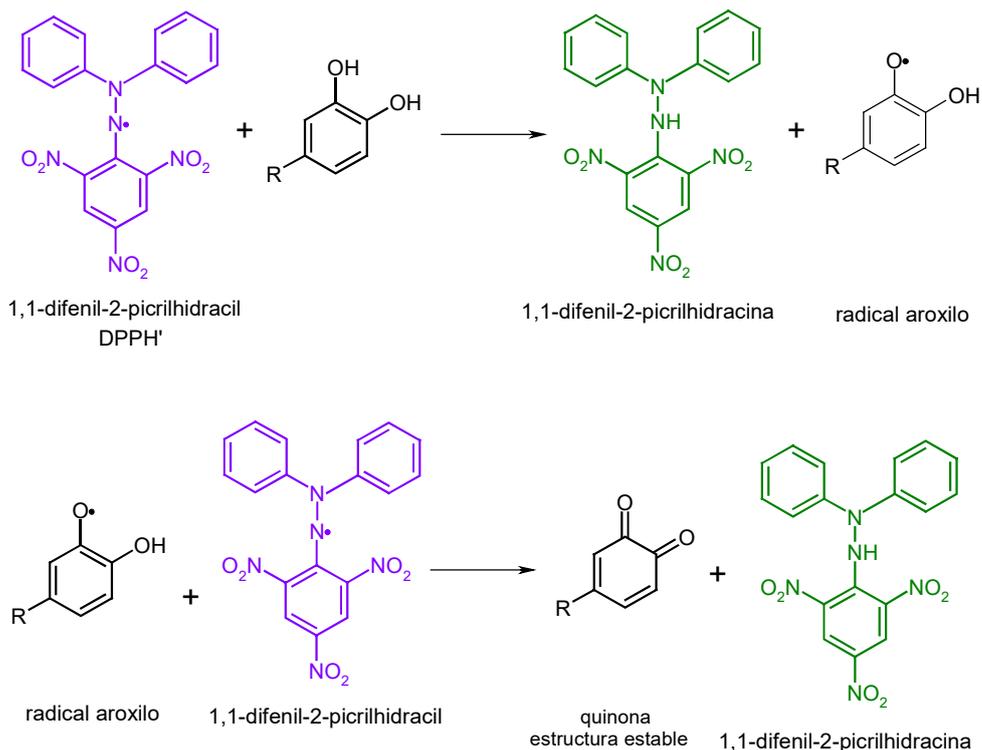
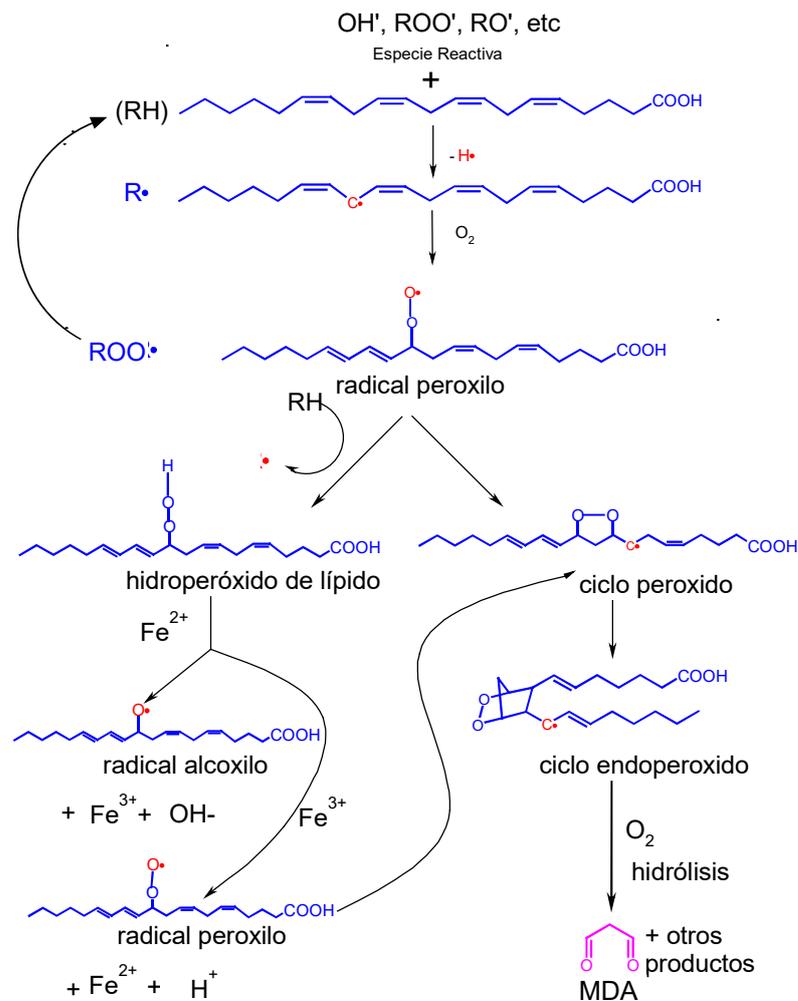


Figura i. Reacción general del paso de DPPH' radical a DPPH reducido.

I. II Inhibición de la lipoperoxidación

Las ERO juegan un papel importante en el desarrollo del daño celular al atacar las membranas lipídicas ricas en ácidos grasos poli-insaturados generando de esta manera eventos patológicos, entre otros mecanismos (Halliwell y Gutteridge 1989, Auroma 1998). La medición de la inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata inducida por el ion Fe^{2+} evaluada por la técnica de TBARS, es ampliamente utilizada por el alto contenido de ácidos grasos poli-insaturados contenidos en el cerebro, estos ácido al ser peroxidados generan malondialdehído entre otros productos, el cual forma un complejo colorido al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) el cual es cuantificado a 532 nm (Halliwell 1990) la reacción general se muestra en la figura ii.



I. III Capacidad atrapadora del radical oxígeno (ORAC)

En el ensayo ORAC se mide la capacidad antioxidante frente al radical peroxilo inducido con 2,2'azobis (2-propamidamida) dihidrocloro (AAPH), el cual se descompone produciendo nitrógeno molecular y dos carbono radicales. Los carbono radicales pueden reaccionar con oxígeno molecular para generar radical peroxilo el cual reacciona con la fluoresceína, reactivo que pierde fluorescencia al ser atacada por un radical libre (Ou. B *et al.*, 2001). El efecto protector de un antioxidante es medido siguiendo el decaimiento de la fluorescencia empleando el área bajo la curva (ABC) de las muestras, comparada con el blanco. El ensayo ORAC provee una medición directa para antioxidantes hidrofílicos frente al radical peroxilo. Figura iii.

I. IV Capacidad antioxidante en la reducción de hierro (FRAP)

En el ensayo FRAP, se emplea el Fe^{3+} presente en un exceso estequiométrico formando el complejo tripiriditriazina férrico (Fe^{3+} -TPTZ). A un pH bajo frente a un agente reductor (antioxidante) se produce la donación de electrones al complejo color amarillo, generándose la forma ferrosa de color azul intenso que se lee a 593 nm (Benzie *et al.*, 1999).



En presencia de una sustancia polifenólica:



I. V Determinación de fenoles por la técnica Folin Ciocalteu

El reactivo Folin-Ciocalteu consiste en una mezcla de ácidos heteropolares, fosfomolibdico y silico-tungstico, en el cual el molibdeno y el tungsteno se encuentran el estado de oxidación 6^{+} . La reducción con ciertos agentes reductores genera la formación del molibdeno y tungsteno con un promedio de estado de oxidación entre 5^{+} y 6^{+} , formando una solución azul que se lee a 725 nm, Su reacción con los aminoácidos aromáticos tirosina y triptofano es la base del método de Lowry para la determinación

colorimétrica de proteínas y es ampliamente usado para la determinación de compuestos polifenólicos en alimentos, plantas entre otros (Singleton y Rossi, 1965).

I. VI Análisis fluorescente del estrés oxidativo empleando DCFH-DA

La conversión del compuesto no fluorescente 2'7'diclorofluorescein diacetato (DCFH –DA) al compuesto altamente fluorescente pasa en diferentes pasos (Figura iv). Primero el DCFH-DA es transportado a través de la membrana y diacetilado por esterasas intracelulares, para formar el compuesto no fluorescente 2'7'diclorofluoresceina (DCFH). Este compuesto es atrapado dentro de la célula y al reaccionar con las ERO es convertido a DCF compuesto fluorescente el cual se cuantifica usando una excitación 480/20 y una emisión 582/20 (LeBel *et al.*, 1992).

I. VII TPA e inflamación en oreja de ratón

La inducción del edema en oreja de ratón con 13-acetato-12-O-tetradecanoil-forbol (TPA), es ampliamente utilizada para comprobar la actividad antiinflamatoria de diversas sustancias. La activación fisiológica de la proteína cinasa C (PKC) por el diacilglicerol (DAG) puede ser imitada por ésteres de forbol promotores de tumores como TPA y 13-acetato-12-miristrato forbol (PMA). La inducción de señales de transducción dependientes de PKC resulta en un número de respuestas celulares que contribuyen a la patogénesis de algunas enfermedades inflamatorias. Esta respuesta incluye la producción de radicales libres (Smith *et al.*, 1988; Dewald *et al.*, 1989), la expresión de moléculas de adhesión (Renkonen *et al.*, 1990; Mattila *et al.*, 1992), degranulación (Baggiolini y Wymann 1990; Ozawa *et al.*, 1993), activación de fosfolipasa A₂ (PLA₂) (Parker *et al.*, 1987; Feinstein y Halenda, 1988; Zor *et al.*, 1990; Conquer y Mahadevappa, 1991), biosíntesis de prostaglandinas (Raz *et al.*, 1989), secreción de citocinas (Bakouche *et al.*, 1992) y endocitosis (Moraru *et al.*, 1990).

I. VIII Actividad citotóxica en las células RAW 264.7 empleando la técnica de MTT.

El ensayo MTT bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio descrito por Mosmann en 1983, se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial dehidrogenasa de las células viables para romper el anillo tetrazolio que le confiere el color amarillo al MTT y formar cristales de formazan azul oscuro los cuales son impermeable a la membrana celular. La permeabilidad de la membrana celular resulta por la adición de un detergente que a su vez solubiliza los critales de formazan, ya en solución la absorbancia se mide a 550 nm. El número de células sobrevivientes es directamente proporcional a los niveles de formazan producidos. El color es cuantificado usando un ensayo calorimétrico (Figura v).

I. IX Determinación de nitritos por la técnica de Griess

La reacción de Griess fue descrita en 1879, por su simplicidad, ha sido empleada ampliamente en el análisis de diversas muestras biológicas incluyendo plasma, orina, saliva y medio de cultivo celular. En este método, el nitrito producido reacciona con sulfanilamida (SA), en medio ácido para formar una sal temporal de diazonio. Este intermediario reacciona con un agente acoplante N-naftil-etilenedaimina (NED), para formar un compuesto azo estable. La absorbancia de este aducto a 540 nm es linealmente proporcional a la concentración de nitritos en al muestra (Sun *et al.*, 2003). La reacción general se muestra en la figura vi.

I. X Expresión de las enzimas COX-2 e iNOS en las células RAW

264.7

La línea celular macrófagos murinos RAW 264.7 fue obtenida de tumor inducido con el virus de leucemia murino Albeston (Ralph *et al.*, 1977) Esta línea celular ha sido ampliamente empleada para probar el efecto antiinflamatorio de varios agentes ya que se sabe que estas células expresan COX-2 e iNOS al estar en contacto con LPS bacteriano (Reddy *et al* 1994; Phillips *et al.*, 1993); estas enzimas son estudiadas por la técnica de western blot, en la cual se puede comparar con respecto a un control la inhibición o la inducción de las enzimas al estar en tratamiento las células con los compuestos prueba. Varios experimentos en reportes previos emplean el tratamiento simultaneo de LPS con el compuesto de prueba o pretratan con el compuesto antes de estimular con LPS (Tsao *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2000).

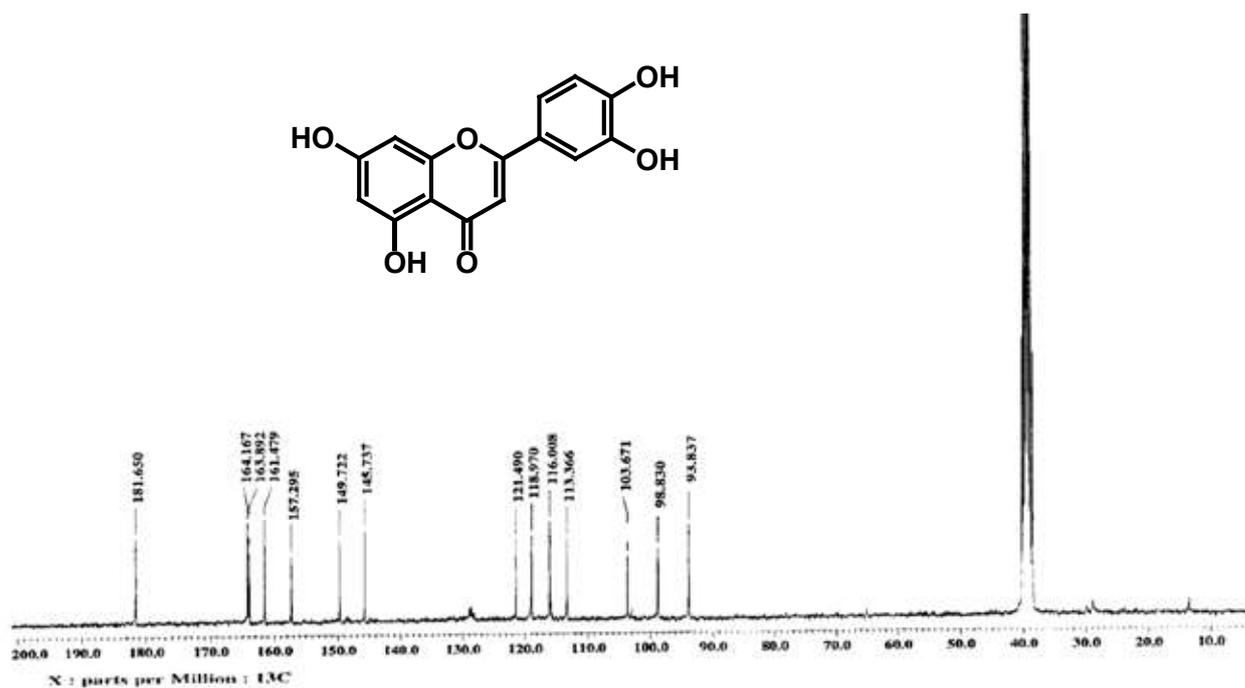


Figura vii. Espectro de RMN ^{13}C compuestos 1.

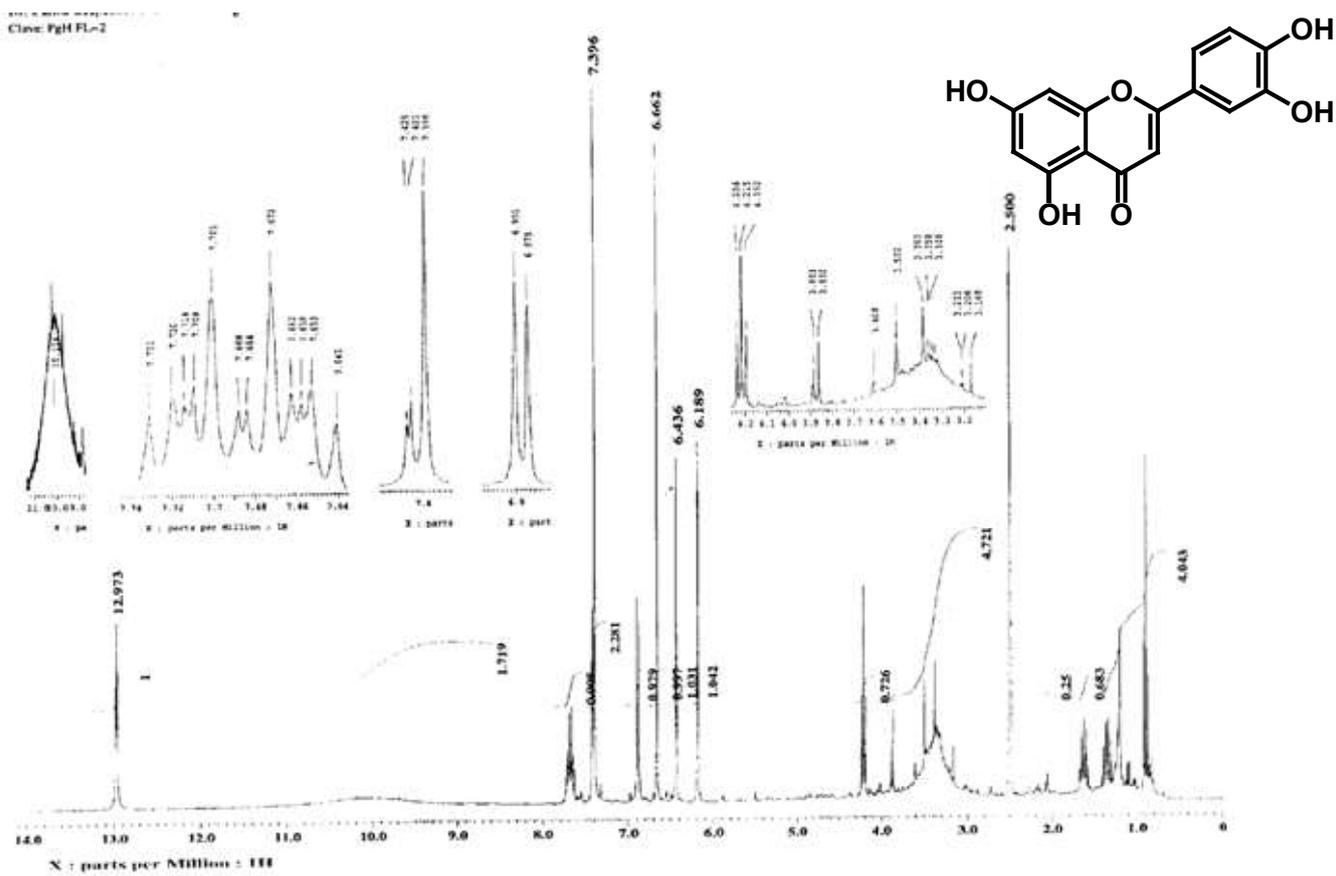


Figura viii. Espectro de RMN ^1H compuesto 1.

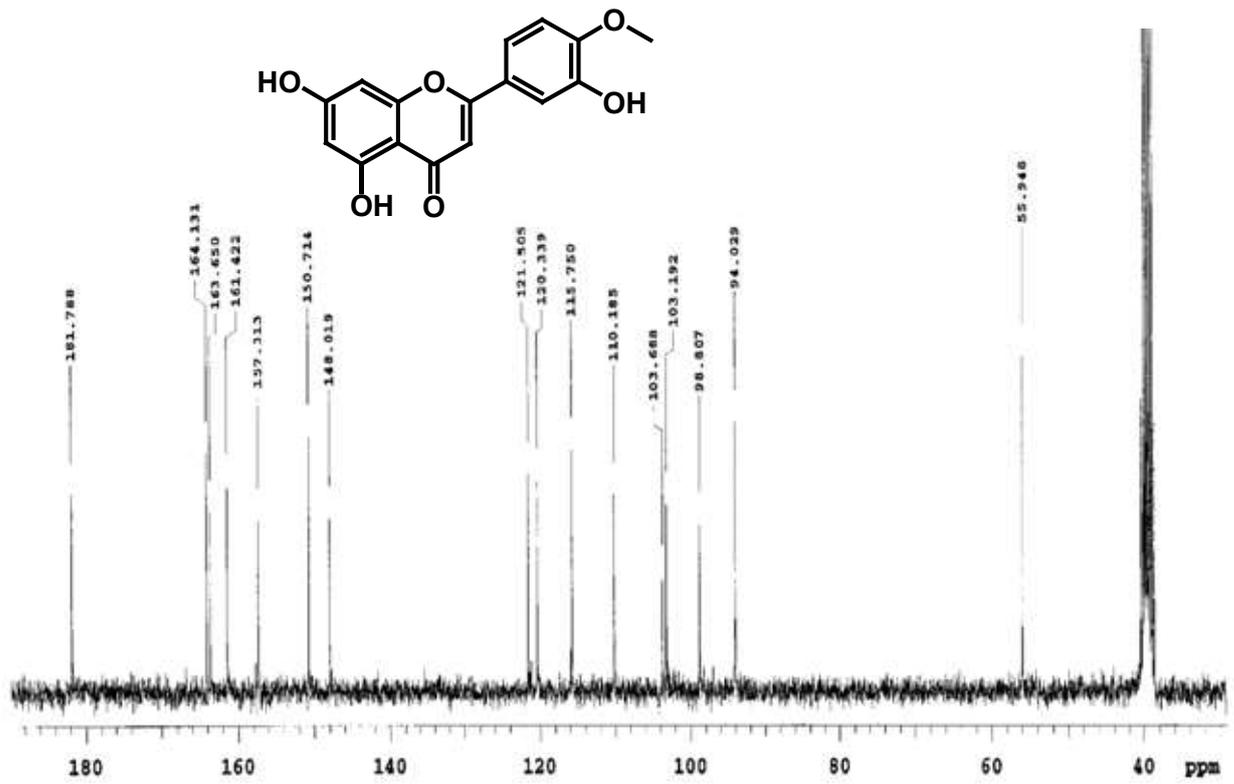


Figura ix. Espectro de RMN ^{13}C compuestos 2.

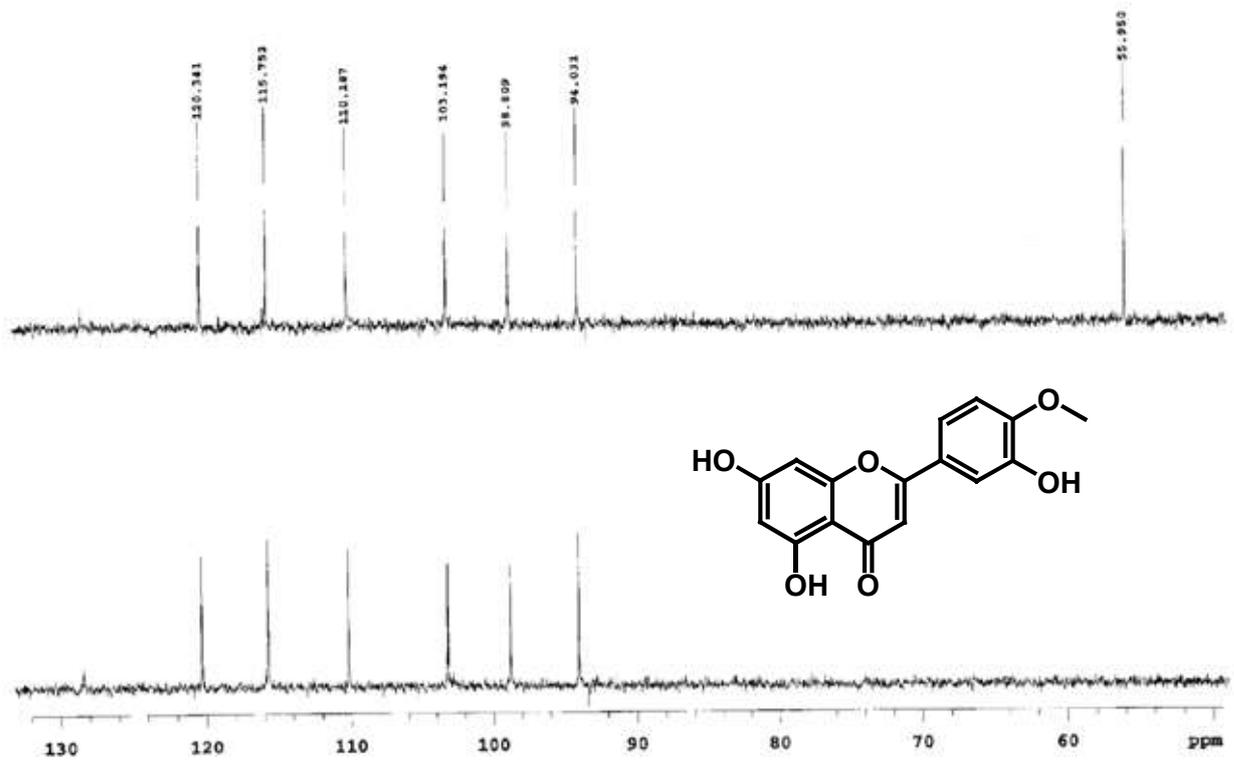


Figura x. Espectro del experimento DEPT compuesto 2.

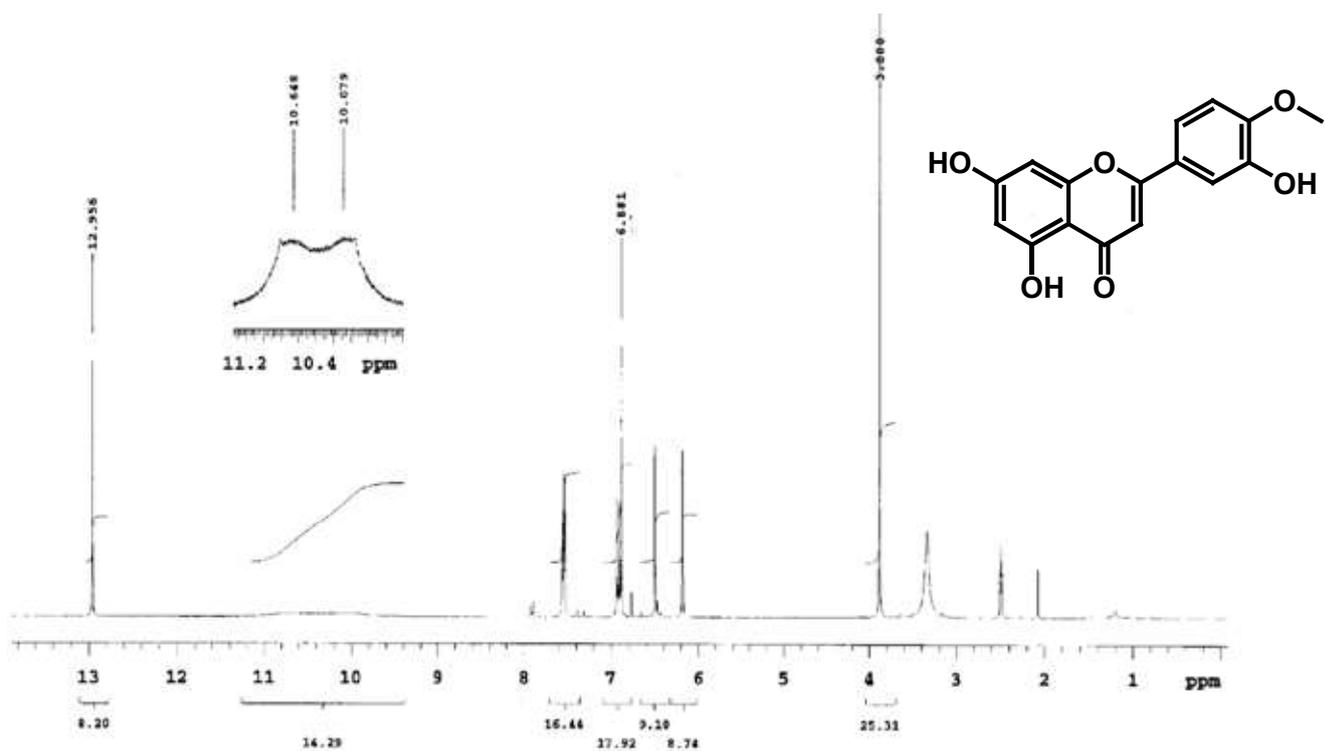


Figura xi. Espectro de RMN ^1H compuesto 2.

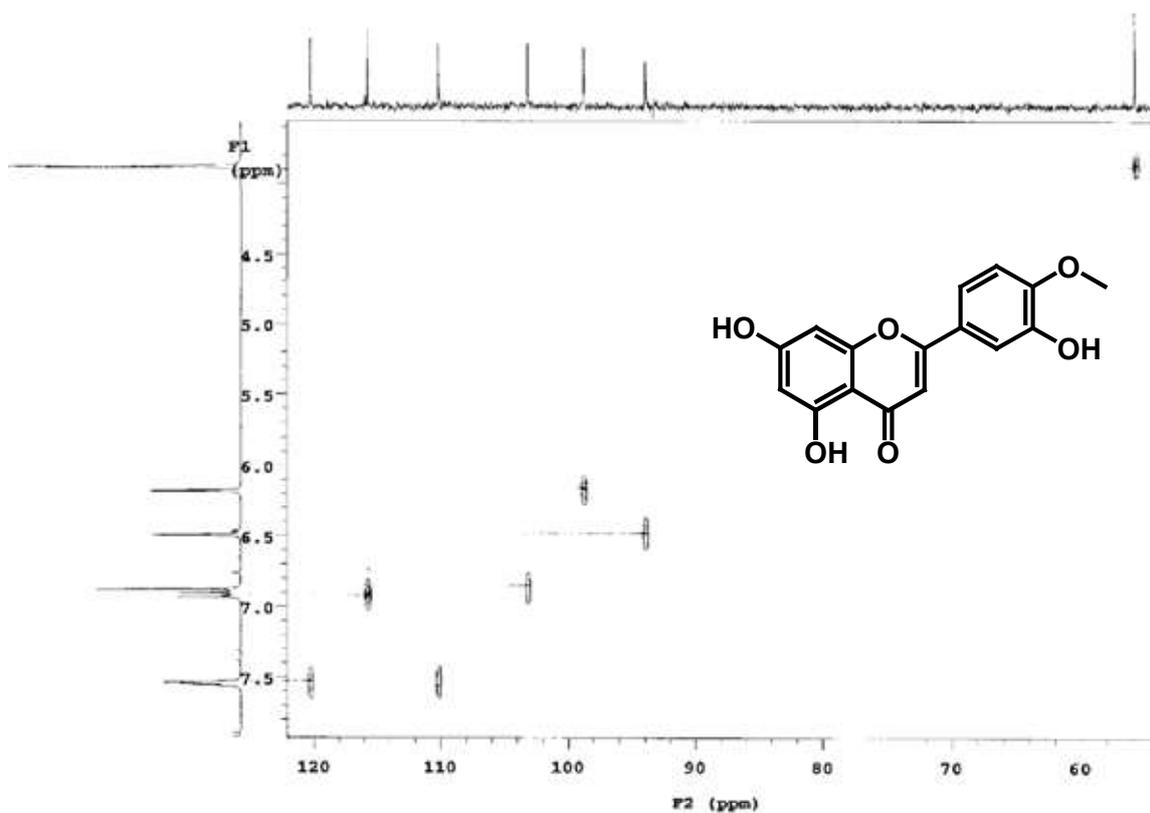


Figura xii. Espectro del experimento HETCOR del compuesto 2.

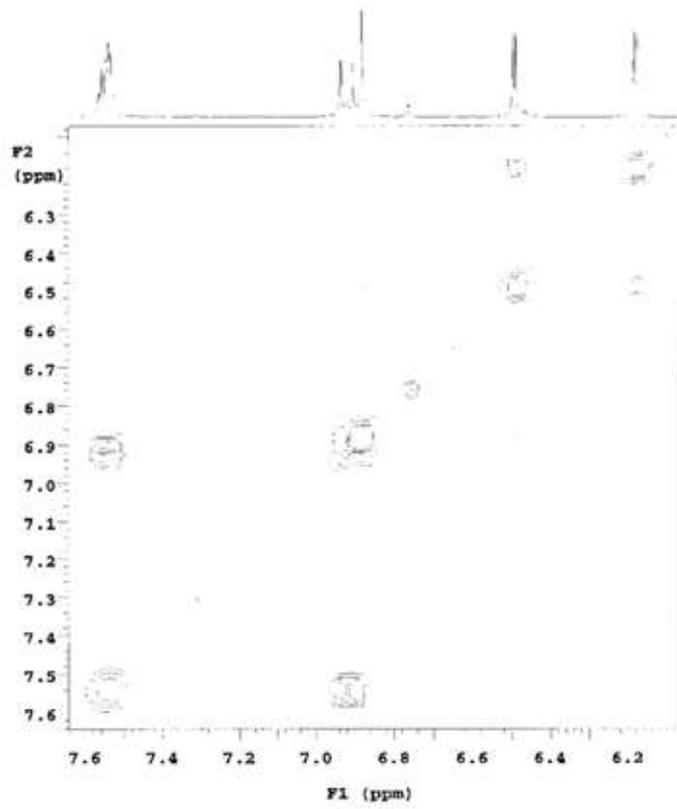
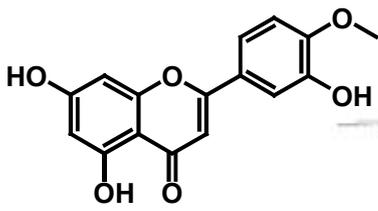


Figura xiii. Espectro del experimento COSY del compuesto 2.

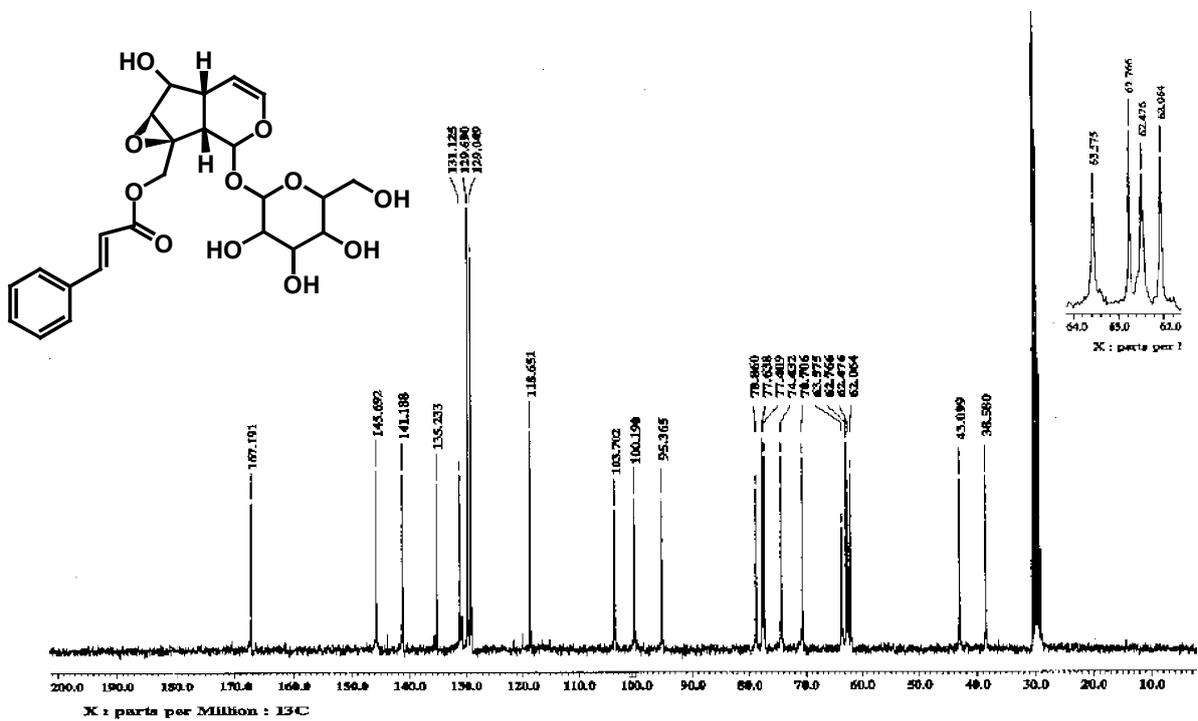


Figura xiv. Espectro de RMN ^{13}C compuestos 3.

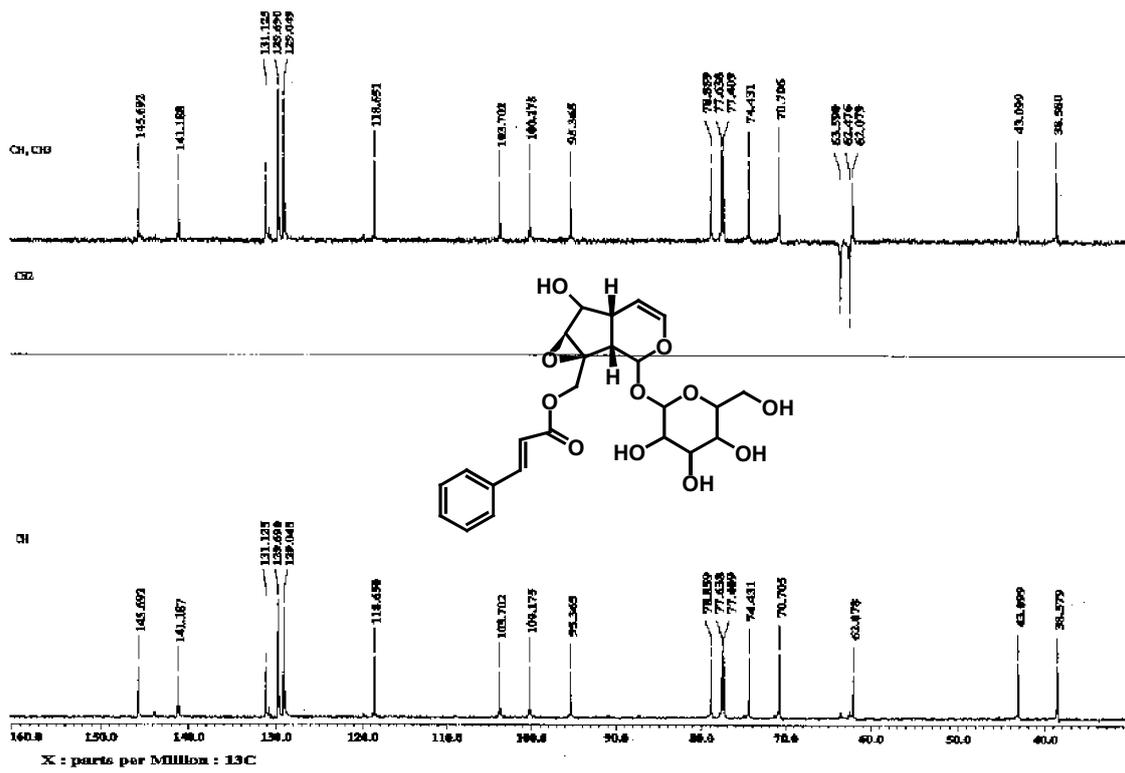


Figura xv. Espectro del experimento DEPT compuesto 3.

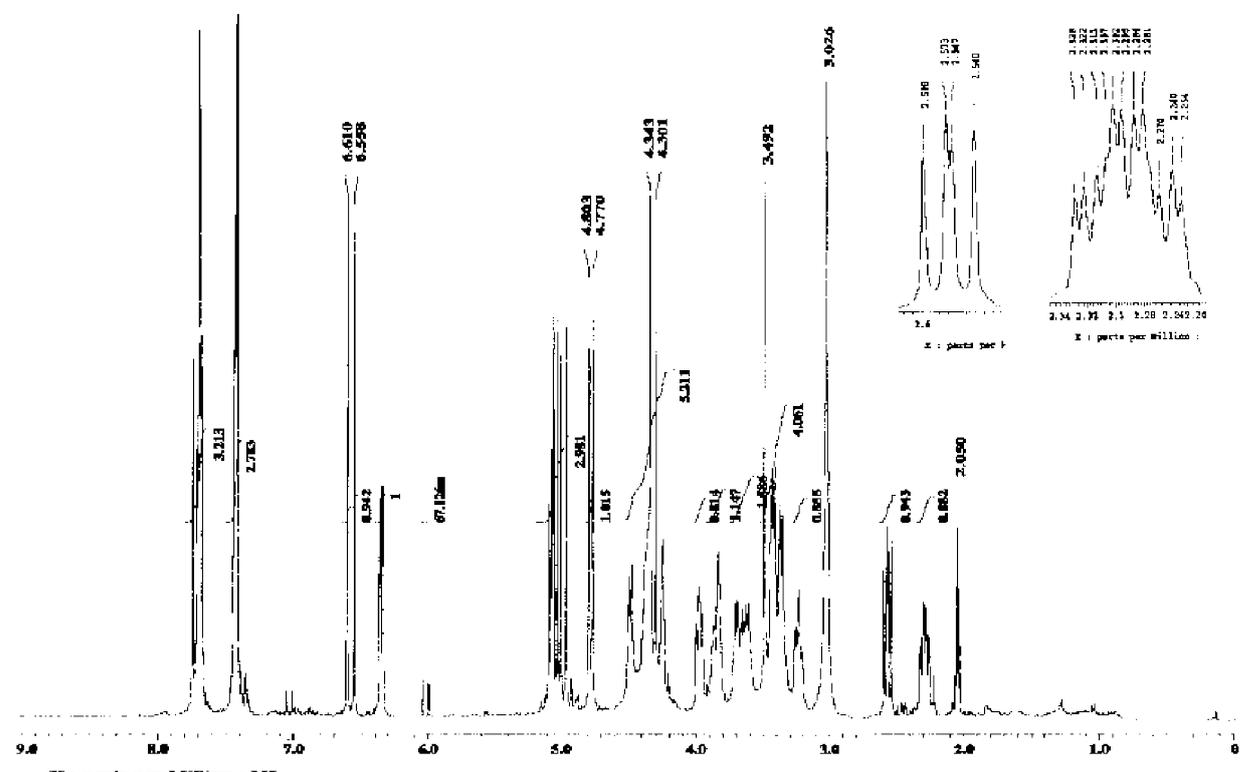


Figura xvi. Espectro de RMN ^1H del compuesto 3.

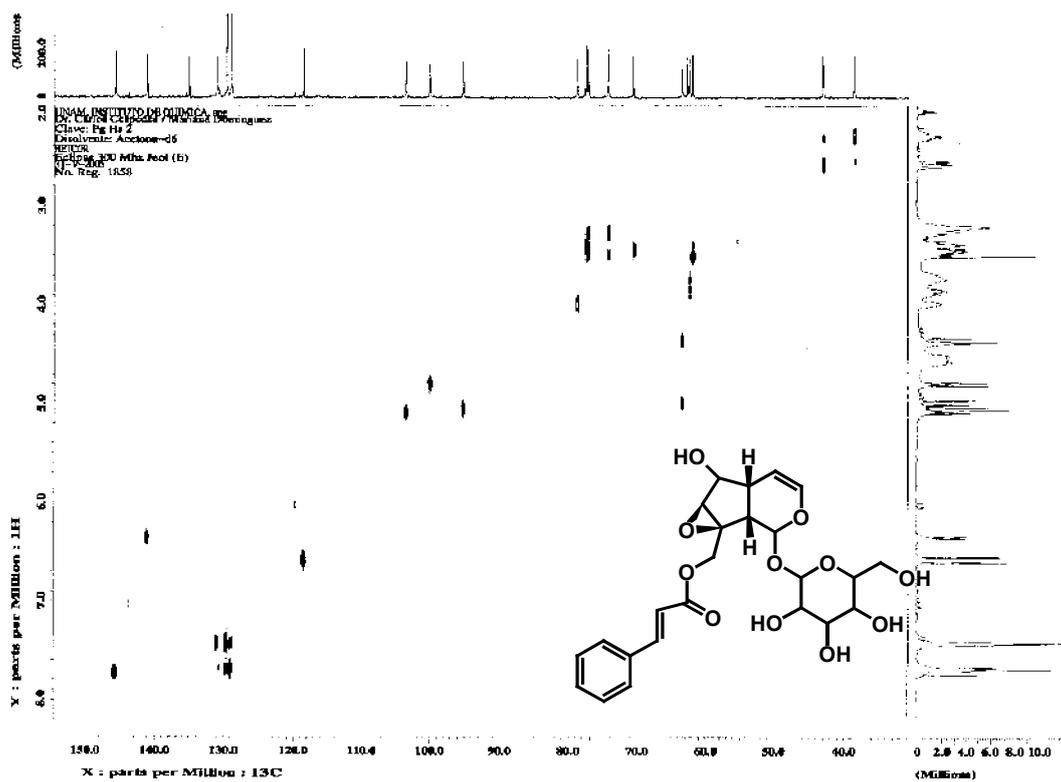


Figura xvii. Experimento HETCOR compuesto 3.

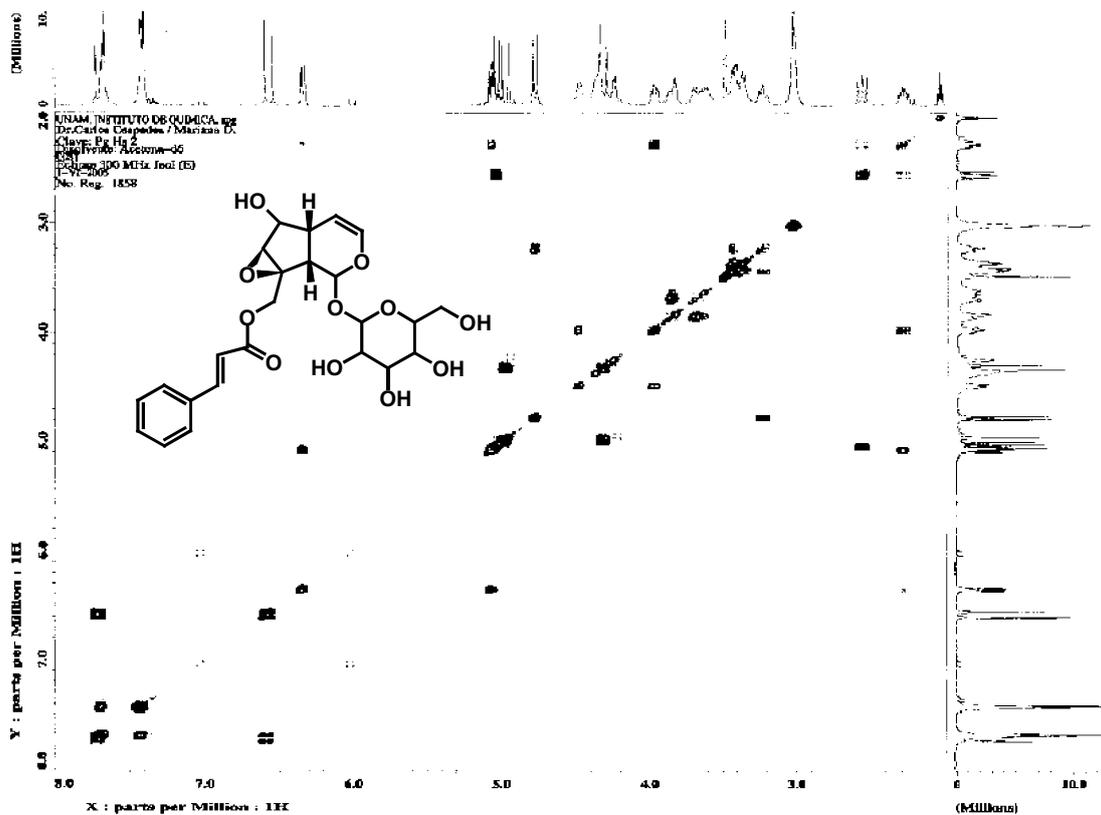


Figura xviii. Experimento COSY del compuesto 3.

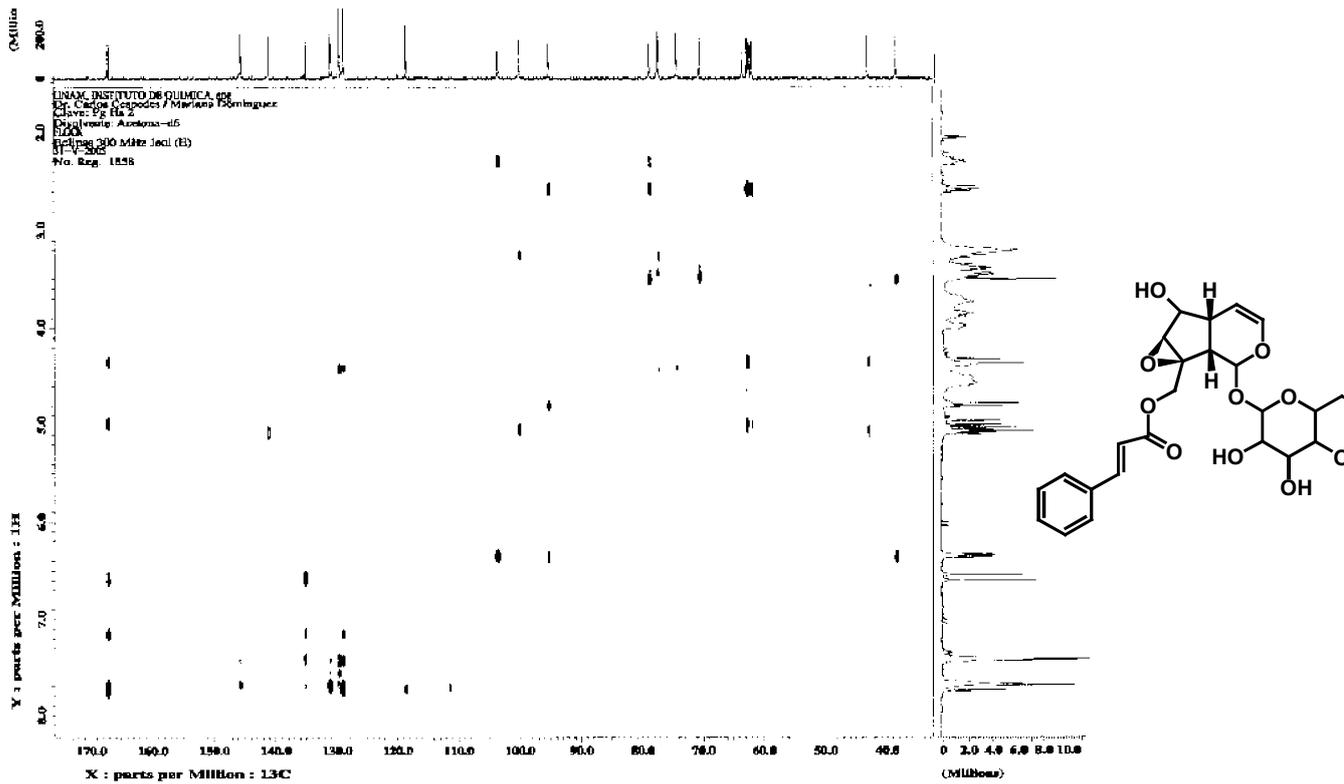


Figura xix. Espectro del experimento FLOCK compuesto 3.

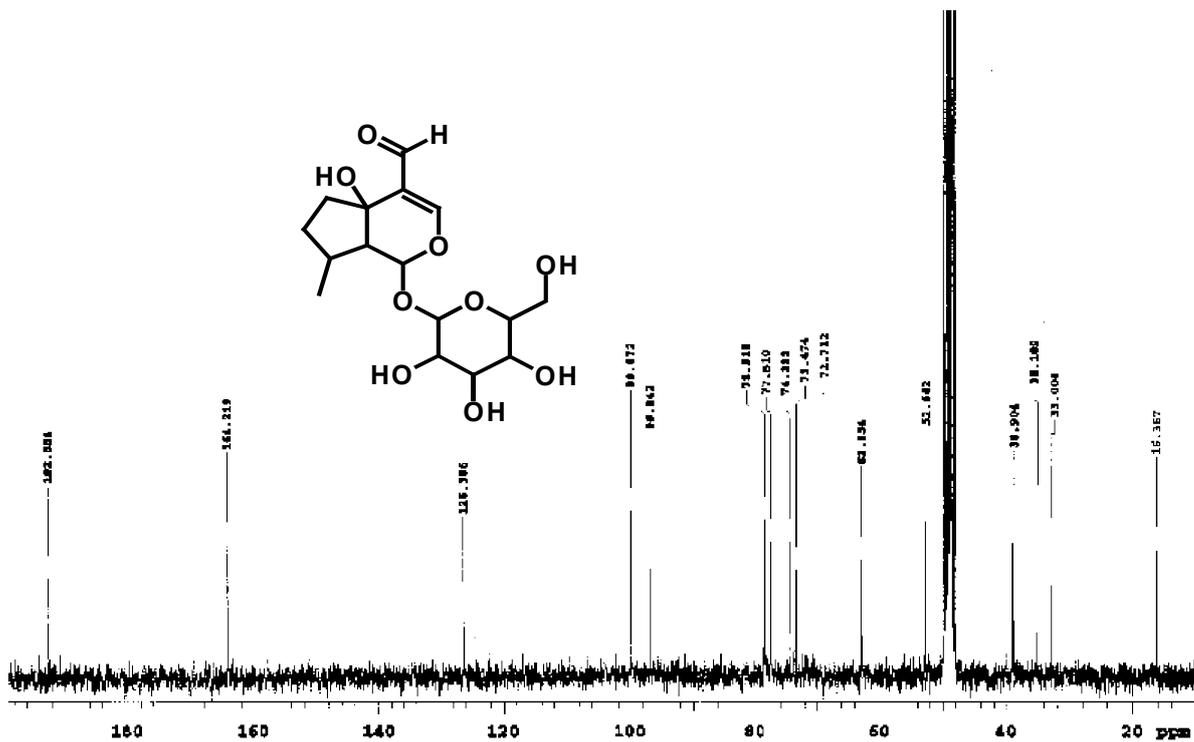


Figura xx. Espectro de RMN ¹³C compuesto 4.

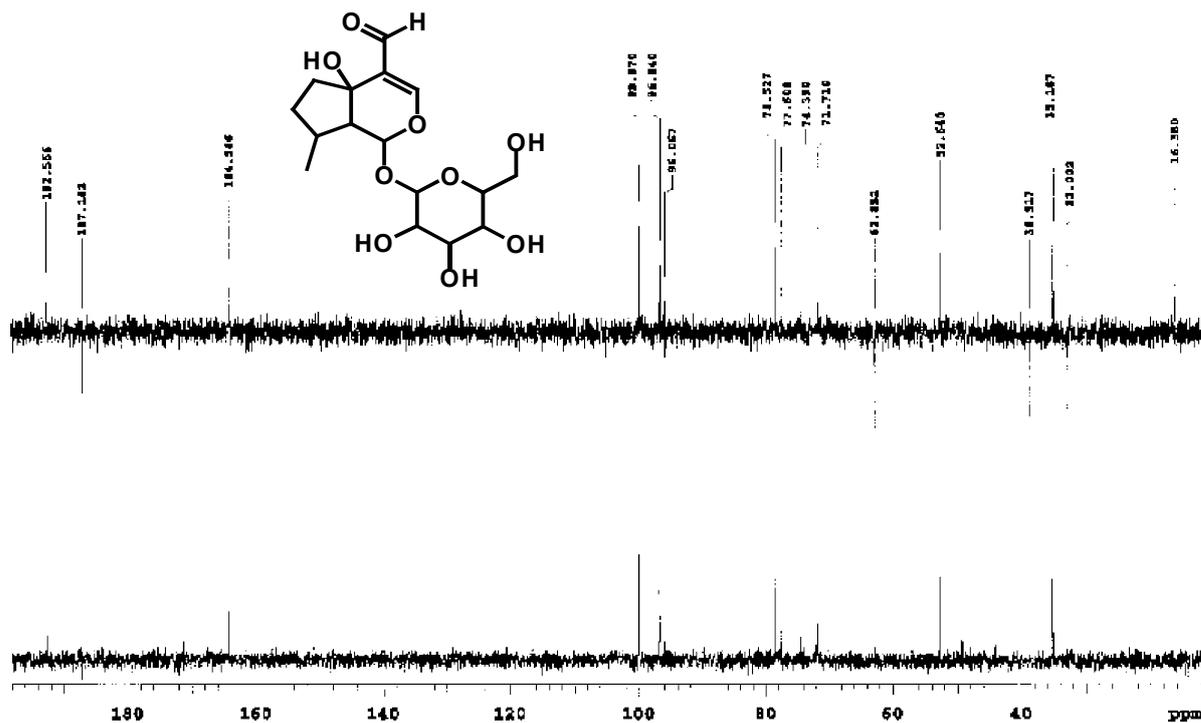


Figura xxi. Espectro del experimento DEPT compuesto 4.

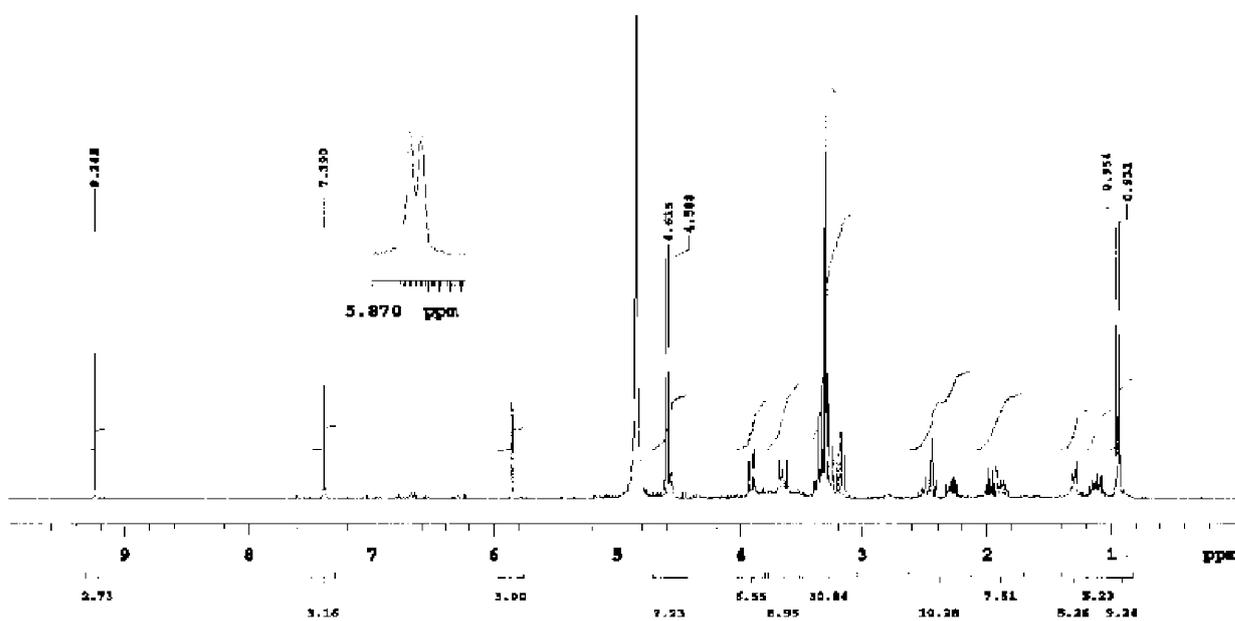


Figura xxii. Espectro de RMN ^1H compuesto 4.

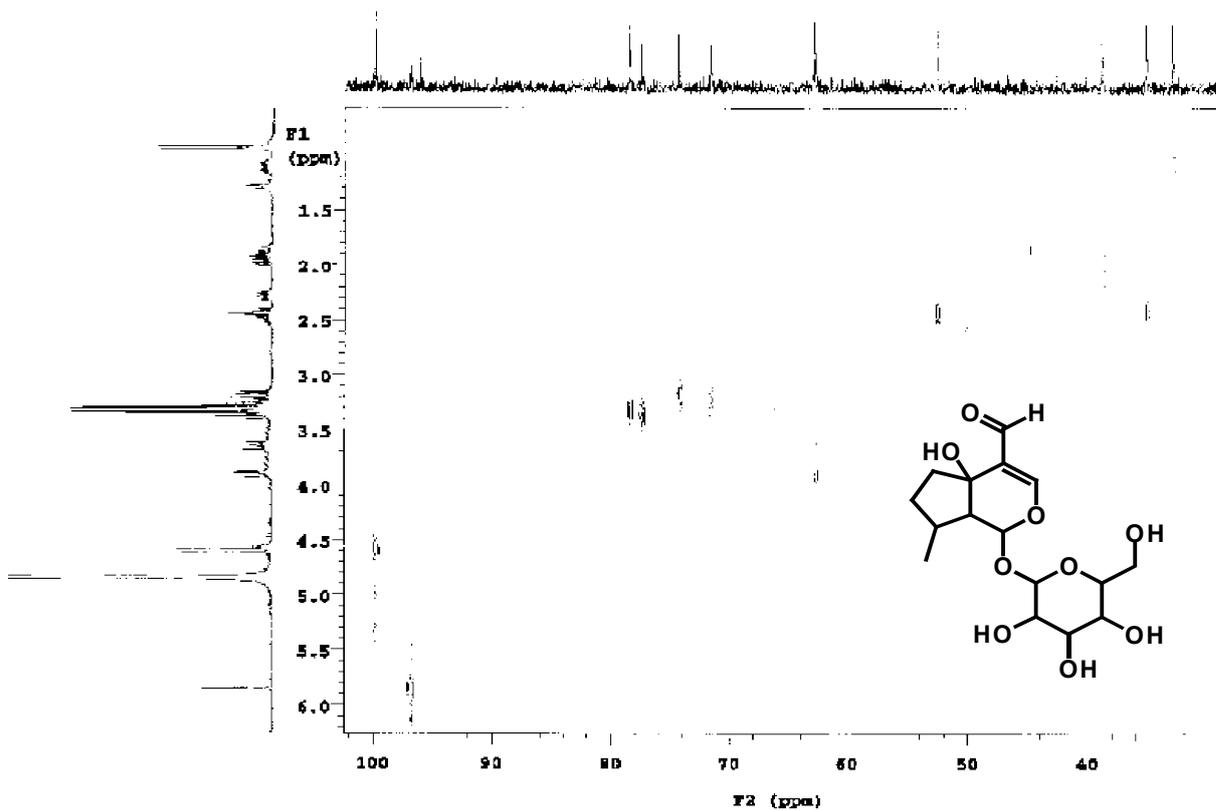


Figura xxiii. Espectro del experimento HETCOR compuesto 4.

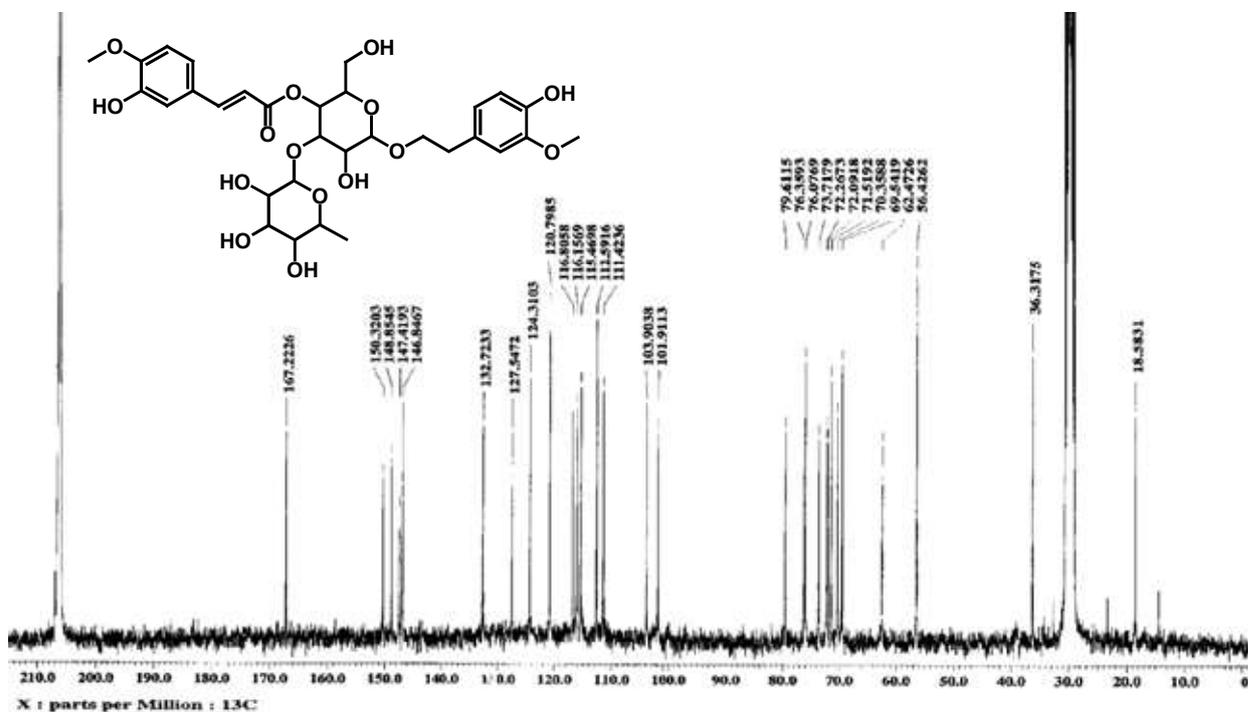


Figura xxiv. Espectro del RMN ¹³C compuestos 6.

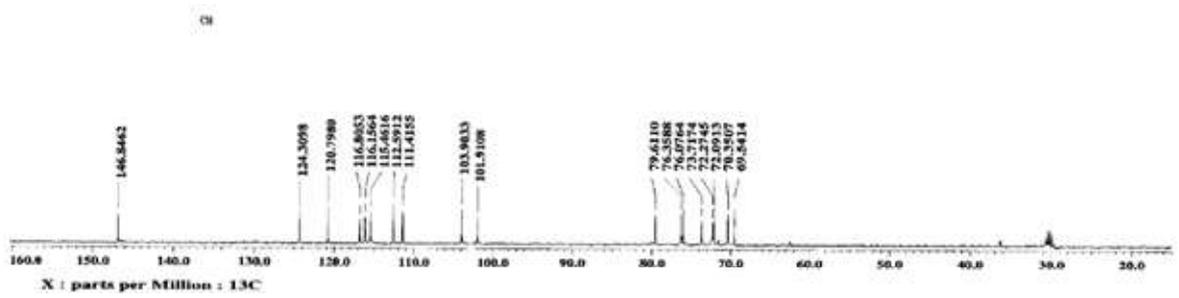
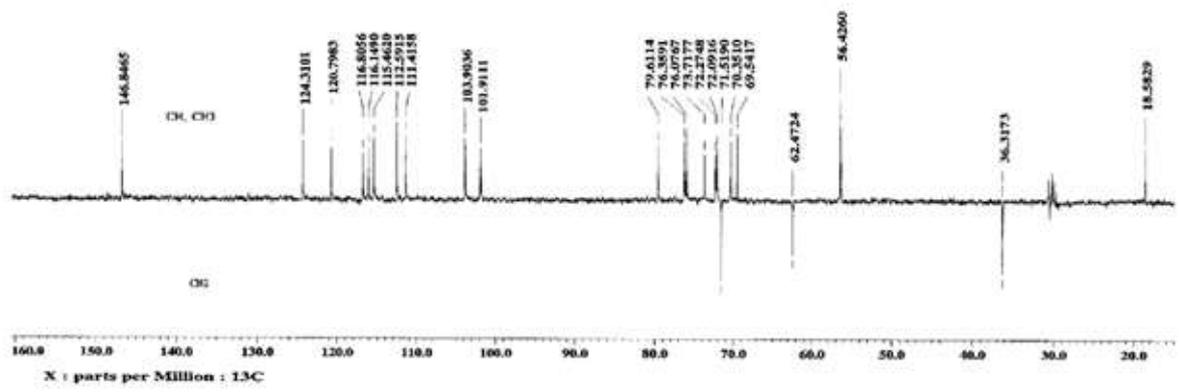


Figura xxv. Espectro del experimento DEPT compuesto 6.

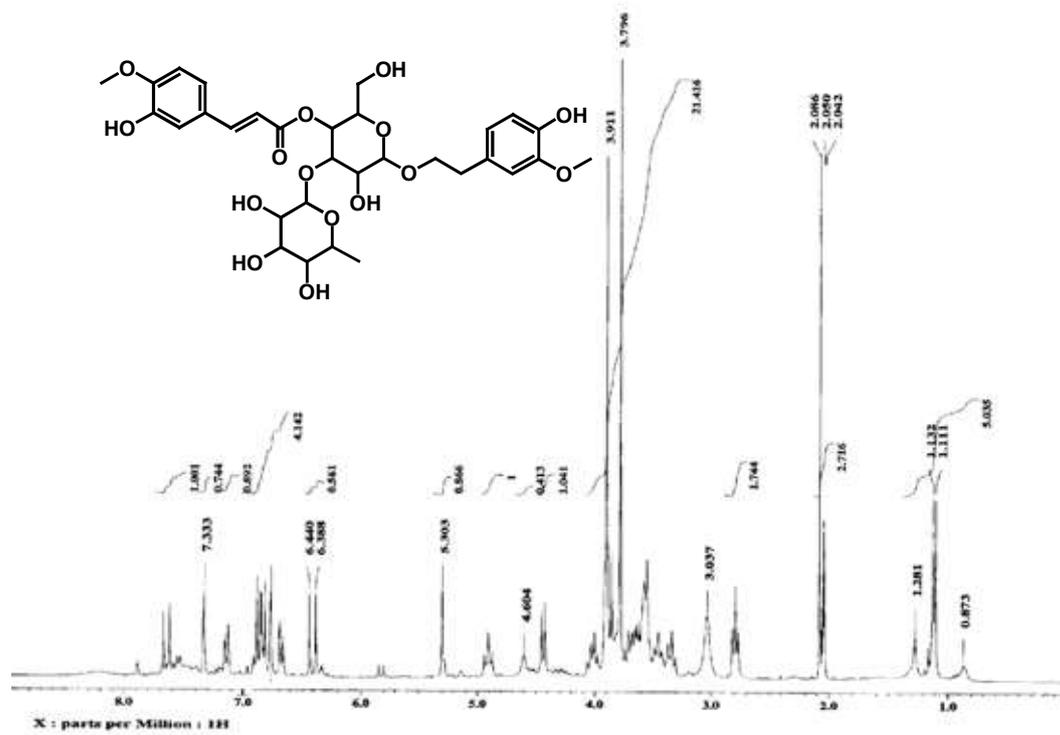


Figura xxvi. Espectro de RMN¹H compuesto 6.

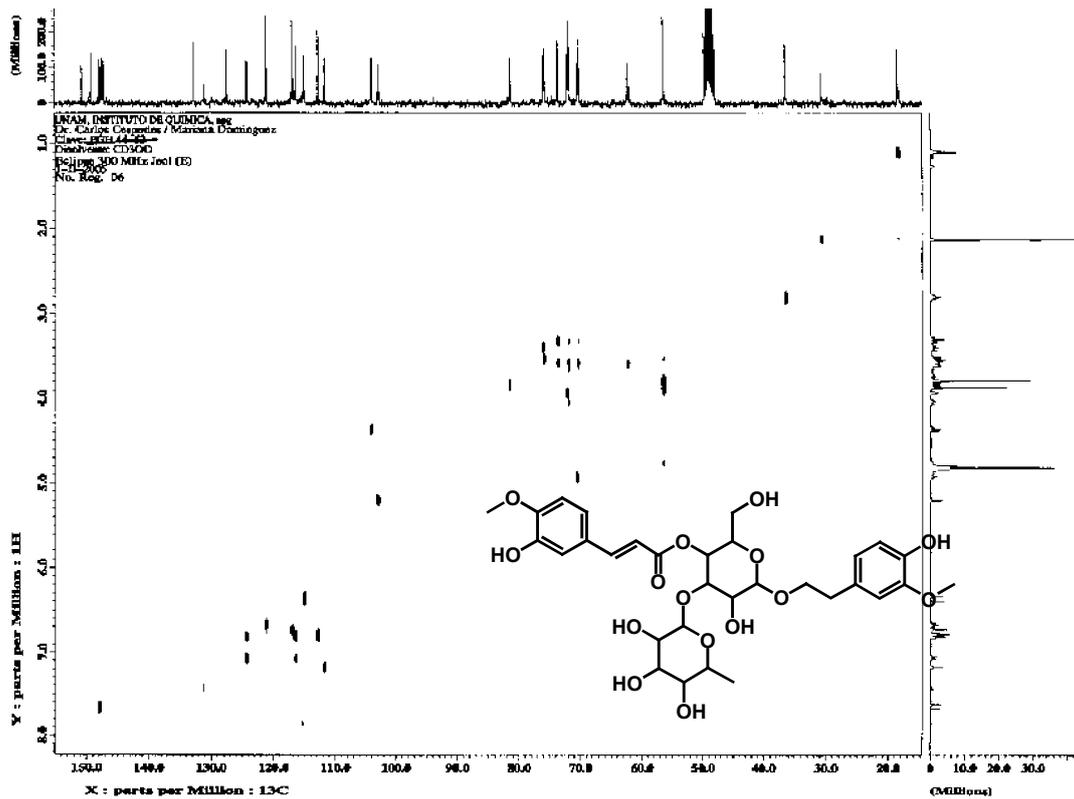


Figura xxvii. Experimento HETCOR compuesto 6.

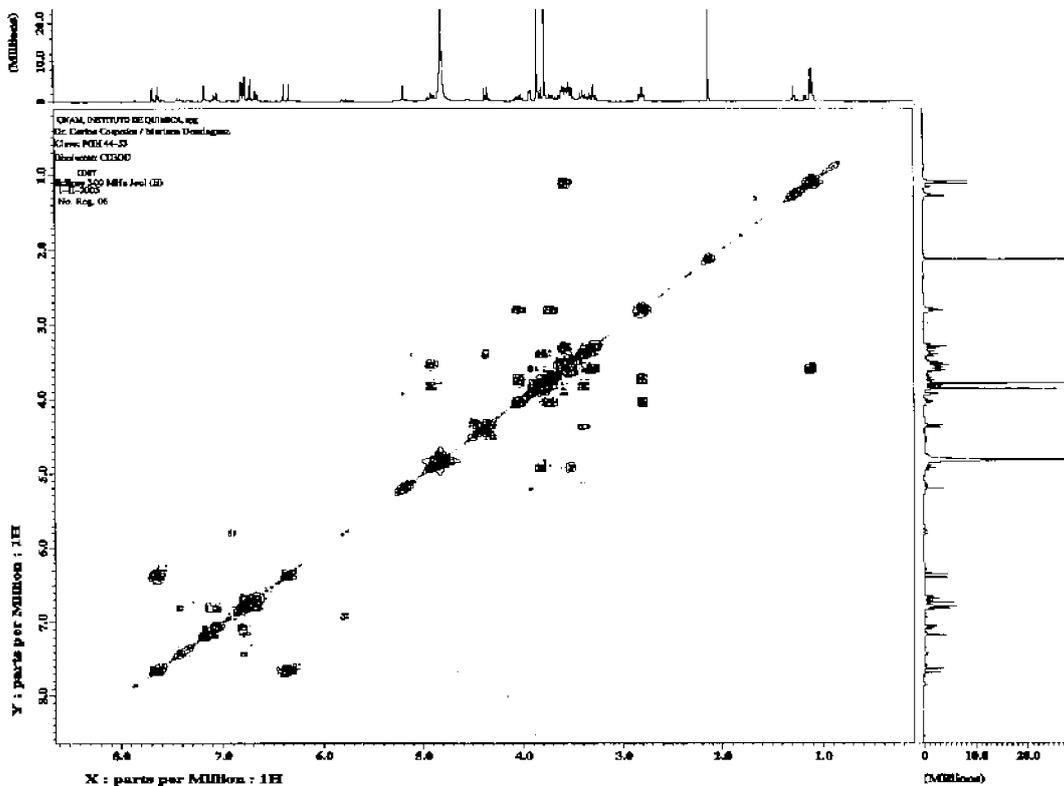


Figura xxviii. Experimento COSY compuesto 6.

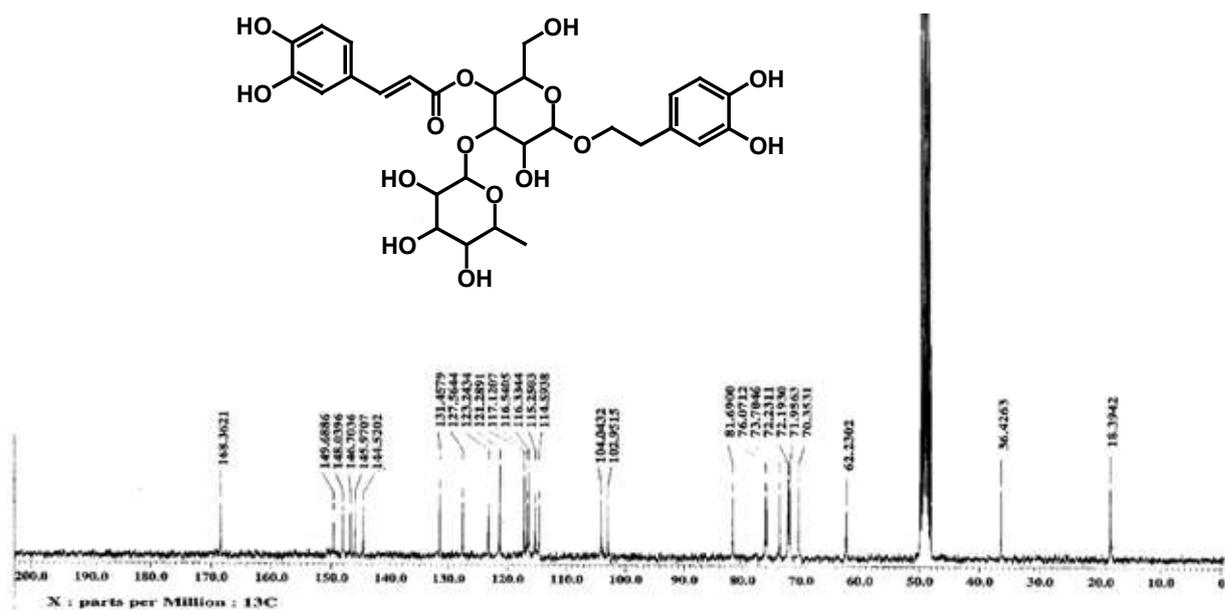


Figura xxix. Espectro del RMN ^{13}C compuesto 7.

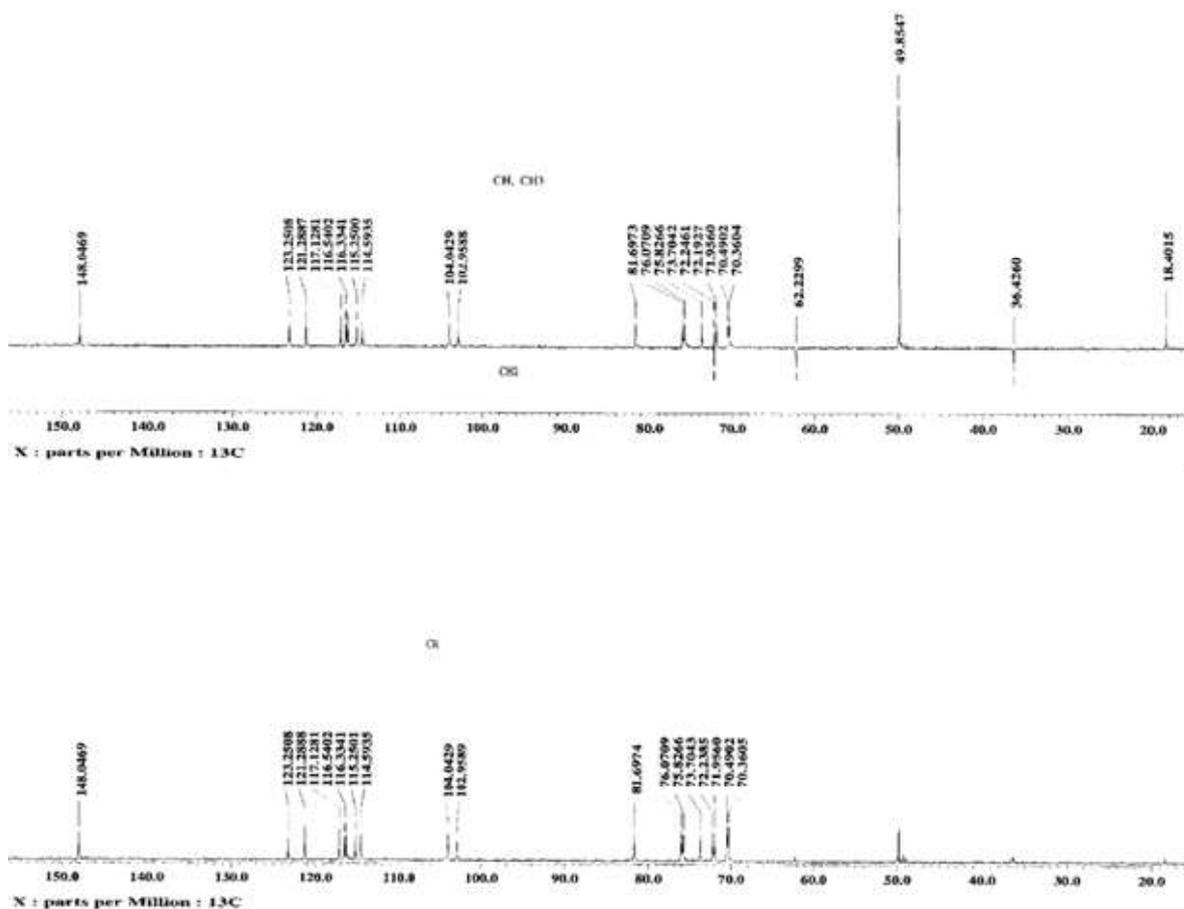


Figura xxx. Espectro del experimento DEPT compuesto 7

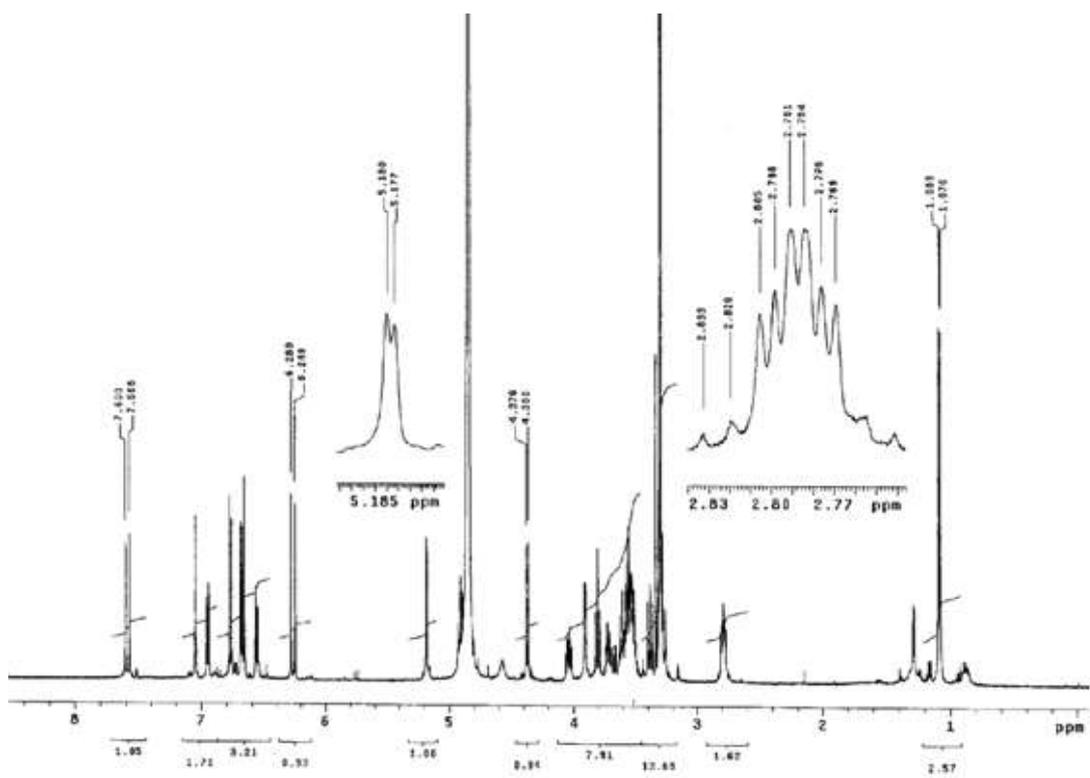


Figura xxxi. Espectro de RMN ^1H compuesto 7

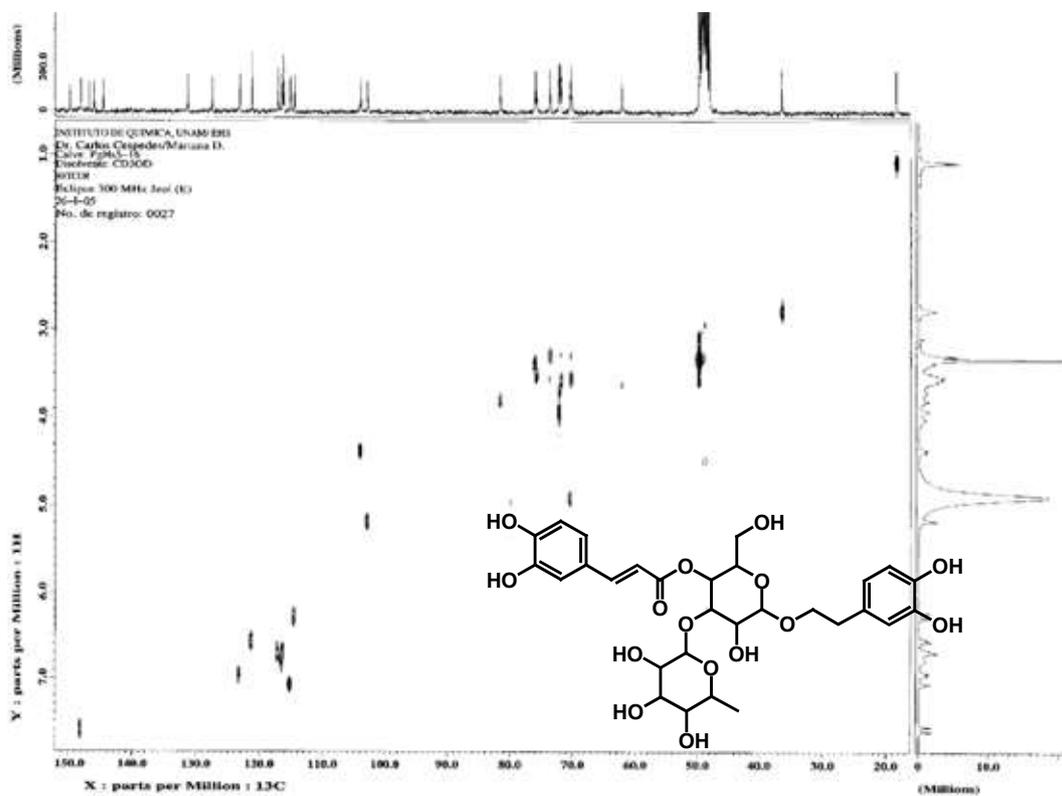


Figura xxxii. Espectro del experimento HETCOR compuesto 7.

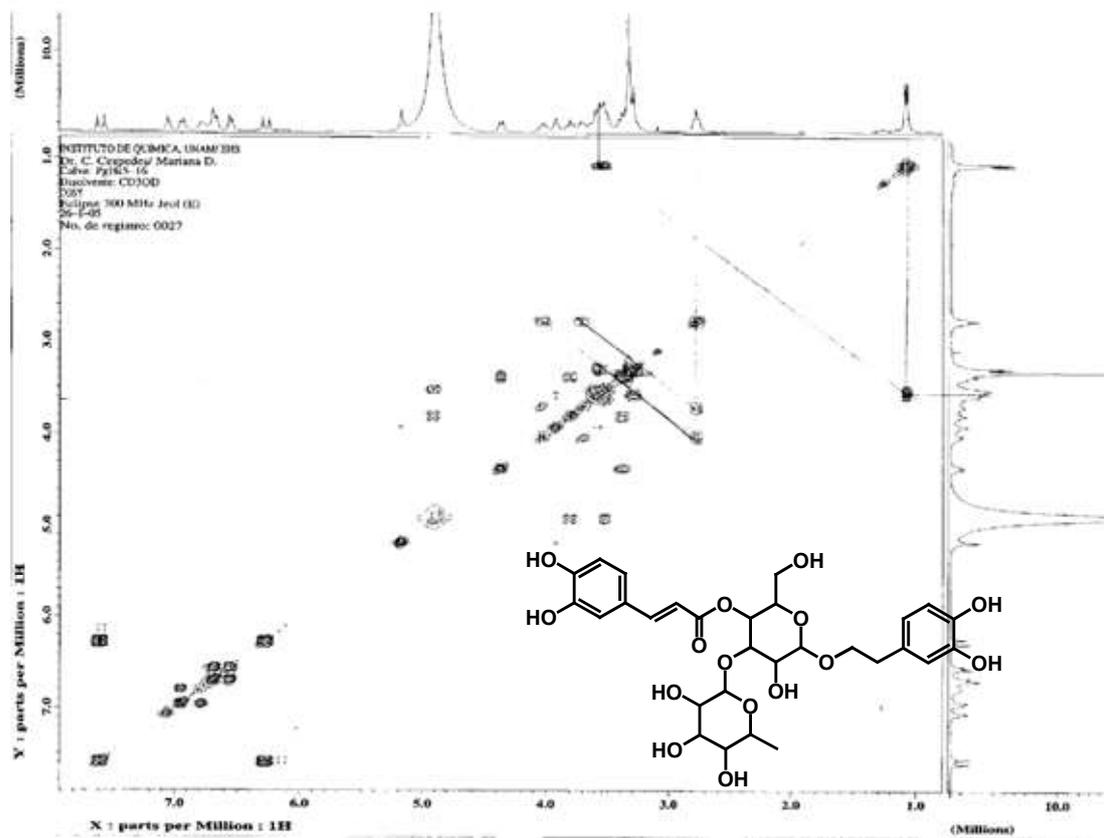


Figura xxxiii. Espectro del experimento COSY compuesto 7.

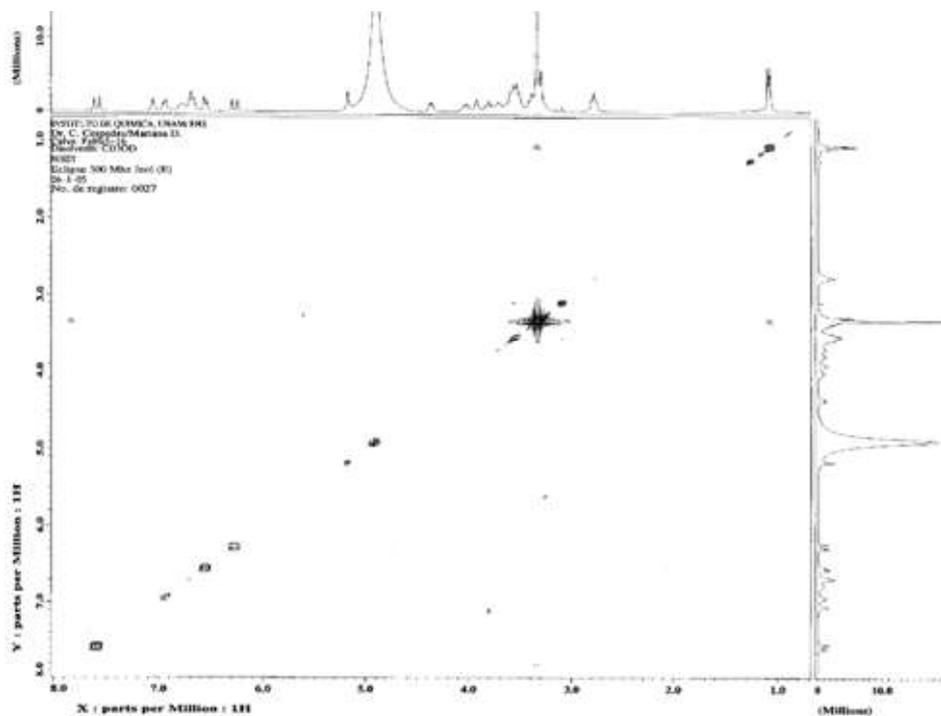


Figura xxxiv. Experimento NOESY compuesto 7.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar Abigaíl. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. 1° ed. México 1994.
- Akamatsu H., Komura J., Asada Y., Niwa Y. Mechanism of anti-inflammatory action of Glycyhizin: Effect on neutrophil functions including reactive oxygen species generation. *Planta Medica* 57, 119-121 (1991).
- Akdemir Z., Tatli I., Bedir E., Khan I. Iridoid and pheylethanoid glycosides from *Verbascum lasianthum*. *Turkish Journal of Chemistry* 28, 227-234 (2004).
- Akihisa T., Yasukawa K., Oinuma H., Kasahara Y., Yamamouchi S., Takido M., Kumaki K., Tamura T. Triterpene alcohol from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry* 43, 103-105 (1999).
- Albach D., Meudt H., Oxelman B. Piecing together the "New" Plantaginaceae. *American Journal of Botany* 92, 297-315 (2005).
- Arciniegas A., Avendaño A., Pérez-Castorena A., Romode Vivar A. Flavonoids from *Budleja parviflora*. *Biochemical Systematics and Ecology* 25, 185-186 (1997).
- Armandodoriano B., Guiso M., Iavarone C., Massa M., Trogolo C. Isolation of stansioside, a new iridoid glucoside from *Tecoma stans*, and reassignment of the stereochemistry of the C (8) centre of tecomoside. *Gazzetta Chimica Italiana* 112 (1982).
- Auroma O.I. Free radical, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 75, 199-212 (1998).
- Aruoma O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research* 9-20, 523-524 (2003).
- Babior B., Kipnes R., Carnutte J. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of Clinical Investigation* 52, 741-744 (1973).
- Baeuerle P., Baltimore D. NF- κ B: ten years after. *Cell* 87, 13-20 (1996).
- Baggiolini M., Wymann M. Turning on the respiratory burst. *Trends in Biochemical Sciences* 15, 69-72 (1990).
- Bakouche O., Moreau J., Lachman L. Secretion of IL-1: Role for protein kinase C. *The Journal of Immunology* 148, 84-91 (1992).
- Balandrin A., Kinghorn N., Farnsworth. En: Human Medicinal Agents from Plants (A.D. Kinghorn y M.F. Balandrin, eds.), Symposium Series No. 534, *American Chemical Society*, Washington, D.C. 2-12 (1993).
- Barnes P., Karin M. Nuclear factor- κ B a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine* 336 (15), (1997).
- Bauman J., Bruchhausen F., Wurm G. Flavonoids and arachidonic acid metabolism.

Flavonoids and bioflavonoids. *Studies in Organic Chemistry*, 11. Elsevier, Oxford, 411-419. (1982).

- Beckman J., Beckman T., Chen J., Marshall P., Freeman B. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87, 1620-1624.
- Bermejo P., Diaz A., Silvan A., De Santos J., Fernandez L., Sanz, A., Abad M. Effects of some iridoids from plant origin on arachidonic acid metabolism in cellular systems. *Panta Medica* 66, 324-328 (2000).
- Benzie I., Strain J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymology* 299, 15-27 (1999).
- Bholmann F., Zdero Ch. Neue Furanoeremophilane aus mexikanischen Senecio-Arten, *Chemische Berichte* 109, 819-825 (1976).
- Blois M. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199-1200 (1958).
- Bodamyali T., Stevens C., Blake D., Winyard P. Reactive oxygen/nitrogen species and acute inflammation: A physiological process. En: *Free Radicals and Inflammation*. Winyard P. Blake D. y Evans eds. Berlin págs. 11-16 (2000).
- Bonta J., Bray M., Parnham M. The pharmacology of inflammation. *Handbook of inflammation*. Elsevier, Vol 5. Netherlands. págs. 27-39 1987.
- Boros C., Stermitz F. Iridoids. An updated review. Part I. *Journal of Natural Products* 53, 1055-1147. (1990).
- Calis I., Kirmizibekmez H., Sticher O. Iridoid glycosides from *Globularia trichosantha*. *Journal of Natural Products* 64, 60-64 (2001).
- Calderón G. de R., Rzedowski J. Flora fanerogámica del Valle de México. 2 ed. Instituto de Ecología y CONABIO, 1ª reimpresión. págs. 693-4, 946 (2005).
- Calis I., Lahloub M., Rogenmorser E., Sticher O. Isomartynoside, a phenylpropanoid glycoside from *Galeopsis pubescens*. *Phytochemistry* 23, 2313-2315 (1984).
- Campbell W., Halushka P. Lipid-Derived autacoids, eicosanoids and platelet-activity factor. En: *Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9 ed. International Edition, Mc Graw-Hill. págs. 601-610 (1996).
- Cao G., Prior R.L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymology* 299, 50-62. (1999).
- Céspedes A., Salazar, J. Los flavonoides en el Instituto de Química una relación histórica. En: *Química de la flora mexicana*. A. Romo de Vivar Romo. Ed, págs.63-65 (2006).

- Céspedes C., Hoeneisen M., Bittner M., Becerra J., Silva M. Comparative Study of Ovatifolin Antioxidant and Growth Inhibition Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 4243 – 4251 (2001).
- Chaudhuri R., Sticher O. New iridoid glucosides and a lignan diglucoside from *Globularia alypum* L. *Helvetica Chimica Acta* 64 3 – 15 (1981).
- Cohn Z. The macrophage-versatile element of inflammation. *Harvey Lectures* 77, 63-80 (1983).
- Cordell G. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry* 40, 1585-1612 (1995).
- Cruse J., Lewis R. Atlas of Immunology. 2 ed. CRC Press. Págs. 69. 2004
- Cuzzocrea S., McDonald M.C., Mazzon E., Siriwardena D., Costantino G., Fulia F., Cucinotta G., Gitto E., Cordaro S., Barberi I., De Sarro A., Caputi A., Thiemermann C. Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a gerbil model of brain injury. *Brain Research. Elsevier Science, Netherlands* 875, 96-106 (2000).
- D'Acquisto F., Iuvone T., Rombola L., Sautebin L., Dirosa M., Carnuccio R. Involvement of NF- κ B in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. *Federation of European Biochemical Societies Letter* 418, 175–178 (1997).
- Damtoft S., Rosendal J., Juhl N. ¹³C and ¹H Spectroscopy as tool in the configuration analysis of iridoid glucosides. *Phytochemistry* 20 2717-2732. (1981).
- Dedon P., Tannenbaum R. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Archives of biochemistry and Biophysics* 423, 12-22 (2004).
- De las Heras B., Slowing K., Benedi J., Carretero E., Ortega T., Toledo C., Bermejo P., Iglesias I., Abad M. Anti-inflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology* 61, 161-166 (1998).
- De Leo F., Ulman K., Davis A., Jutila K., Quinn M. Assembly of the human NADPH oxidase involves binding of p67phox and flavocytochrome b to a common functional domain in p47phox. *Journal of Biological Chemistry* 271, 17013-17020 (1996).
- De Young L., Kheifets J., Ballaron S., Young J.M. Oedema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ears are temporally separated and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* 26, 341-355 (1989).
- Desmarchelier C., Lisboa R., Coussio J., Ciccia G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 67, 69-77 (1999).
- Dewald B., Thelen M., Wymann M., Baggiolini M. Staurosporine inhibits the respiratory burst and induces exocytosis in human neutrophils. *Journal of Biochemistry* 264, 879-884 (1989).

- DeWitt D. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochimica et Biophysica Acta* 1083, 121-134 (1991).
- Díaz A., Abad M., Lidia Fernández L., Silva A., De Santos J., Bermejo P. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia*: *In vitro* anti-inflammatory activity. *Life Sciences* 74, 2515–2526 (2004)
- Didry N., Seidel V., Dubrenil L., Tillequin F., Bailleul F. Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra*. *Journal of Ethnopharmacology* 67, 197–202 (1999)
- Diplock A., Charleux J., Crozier-Willi G., Kok F., Rice-Evans C., Robefroid M., Stahl W., Vin˜a-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition* 80 (Suppl. 1), S77-S112 (1998).
- Djoko B., Chiou R., Shee J-J., Liu Y. Characterization of Immunological Activities of Peanut Stilbenoids, Arachidin-1, Piceatannol, and Resveratrol on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation of RAW 264.7 Macrophages. *Journal of Agriculture Food and Chemistry* 55, 2376-2383 (2007).
- Duke J. Handbook of biologically active phytochemicals and their activities. CRC Press, Inc. USA, 1-183, 1992.
- Eberhardt M. Reactive oxygen metabolites; chemistry and medical consequences. Boca Raton CRC Press U.S. págs. 117-164 (2001).
- Eberhardt M., Kobira K., Keck A-S., Juvik J., Jeffery E. Correlation Analyses of Phytochemical Composition, Chemical, and Cellular Measures of Antioxidant Activity of Brócoli (*Brassica oleracea L. Var. italica*) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7421-7431 (2005).
- Feinstein M., Halenda S. Arachidonic acid mobilization in platelets: The possible role of protein kinase C and G-proteins. *Experientia* 44,101-104 (1988).
- Flohé L., Beckmann R., Giertz H., Loschen G. Oxygen centered free radicals as mediators of inflammation. In "Oxidative Stress" (H. Sies, ed.), Academic Press, Orlando, Florida. págs.. 403-435 (1985).
- Fraga C., Martino V., Ferraro G., Coussio J., Boveris A. Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence. *Biochemical Pharmacology* 36, 717–20 (1987).
- Frei, B. Natural Antioxidant in Human Health and Disease. Harvard School of Public Health San Diego, C.A. Academic Press. págs. 47-48 (1994).
- García Gallegos Maurino Getulio. Estudio fitoquímico de *Penstemon gentianoides*. Director de tesis Dr. M. Jiménez Estrada. Mèx. D.F. Facultad de Química págs. 61 1991.
- Geronikaki A., Gavalas. A.M. Antioxidants and Inflammatory Disease: Synthetic and Natural Antioxidants with Anti-Inflammatory Activity *Combinatorial Chemistry & High Throughput*

Screening 9, 425-442 (2006).

- Goncalves C., Dinis T., Batista M. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry* 66 89–98 (2005).
- Gordon S. Macrophages and immune response: En *Fundamental Immunology*. William E. Paul ed Lippicott-Raven págs. 533-545 (1999).
- Grisham M., Granger D. Neutrophil-mediated mucosal injury. *Digestive Diseases and Sciences* 53, 6S-15S (1988).
- Gupta M., Nath R., Shanker K., Kishor K., Bhargava K. Antiinflammatory and antipyretic activities of β -sitosterol. *Planta Medica* 39,157-163 (1980).
- Halliwell B., Gutteridge J. Lipid peroxidation, oxygen radicals; cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* 1396-1397 (1984).
- Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radicals Research. Communication* 9, 1-32. (1990).
- Halliwell B., Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine* 2° ed. Published in the United States by Oxford University Press Inc., New York págs. 416 - 469 (1989).
- Harborne J. y Baxter H. *The handbook of natural flavonoids*. John Wiley & Sons: New York, Vols. 1 y 2 (2000).
- Hatano T., Edamatsu R., Hiramatsu M., Mori A., Fujita Y., Yasuhara T., Yoshida T., Okuda T. Effects of the interaction of tannins whit co-existing substances VI. Effects of tannins an related polyphenols on superoxide anion radical, and on DPPH radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 37, 2016-2021 (1989).
- Heinrich M., Robles M., West J., Ortiz de Montellano B., Rodríguez E. Ethnopharmacology of mexican Asteraceae (Compositae). *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 38, 539–65 (1998).
- Heiss E., Herhaus C., Klimo K., Bartsch H., Gerhauser C. Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *Journal of Biologycal Chemistry* 24, 32008-15 (2001).
- Hemnani T., Parihar M. Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 42, 440-452 (1998).
- Henderson L., Chappel J. NADPH oxidase of neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta* 1973, 87-107 (1996).
- Hibbs Jr., Taintor R., Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235, 473–476 (1987).
- Hirose K., Longo D., Oppenheim J., Matsushima K. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promote the survival of tumor cell expose to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation, *FASEB* 7, 361-

368 (1993).

- Hollman P., Katan M. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 51, 305-310 (1997).
- Hong C., Hur S., Oh O., Kim S, Nam S., Lee S. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology* 83, 153- 159 (2002).
- Hooper D., Ohnishi S., Kean R., Numagami Y., Dietzschold B., Koprowski H. Local nitric oxide production in viral and autoimmune diseases of the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 92, 5312-5361 (1995).
- Houde V., Grenier D., Chandad F. Protective Effects of Grape Seed Proanthocyanidins Against Oxidative Stress Induced by Lipopolysaccharides of Periodontopathogens *Journal of Periodontology* 77 (8), 1371-1379 (2006).
- Horwat D., Martínez S., Cuellar C., Giuliani A., Polozzo J. Anti-inflammatory activity and lipid peroxidation inhibition of iridoid lamiide isolated from *Bouchea fluminensis* (Vell). Mold. (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 82, 127-130 (2002).
- Hurst J., Barrette W. Leukocytic oxygen activation and microbicidal oxidative toxins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 24, 271-328 (1989).
- Ju H., Moon T., Lee E., Baek R-B., Bae K., So K., Kim H., Kang S., Lee S., Son J., Chang H. Inhibitory effects of new iridoid patridoid II and its isomers, on Nitric Oxide and TNF- α production in cultured murine macrophages. *Planta Medica* 69, 950-953 (2003).
- Judd W., Campbell C., Kellogg E., Stevens P., Donoghue M. Plant Systematics—Phylogenetic approach. 2nd ed., Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, págs. 576. (2002).
- Kang J., Yoon Y., Cho I., Han M., Lee C., Park S., Kim H. Glabridin, an isoflavan from licorice root, inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and improves survival of mice in experimental model of septic shock. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics* 312, 1187-94 (2005).
- Kim H., Woo E., Shin C., Hwang D., Park H., Lee Y. HIV-1 integrase inhibitory phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum*. *Archives of Pharmacal Research* 24, 286-291 (2001).
- Kim H., Pham H., Ziboh V. Flavonoids differentially inhibit guinea pig epidermal cytosolic phospholipase A2. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 65, 281-6. (2001).
- Kim S., Park H., Kim H. Inhibition of Nitric Oxide Production from lipopolysaccharide-Treated RAW 264.7 Cells by Synthetic Flavones: Structure-Activity Relationship and Action Mechanism. *Archives of Pharmacal Research* 27, 937-943, (2004).
- Kopp E., Ghosh S. NF- κ B and rel proteins in innate immunity. *Advances in Immunology*,

58, 1-27 (1995).

- Kubo I., Msouka N., Xiao P., Haraguchi H. Antioxidant activity of Dodecyl Gallate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 3533-3539 (2002).
- Kurkin V. A. Phenylpropanoids from medicinal plants: distribution, classification, structural analysis, and biological activity. *Chemistry of Natural Compounds* 39 (2) (2003).
- Lee J., Burckart G. Nuclear Factor Kappa B: Important Transcription Factor and Therapeutic Target. *Journal of Clinical Pharmacology* 38, 981-993 (1998).
- Lee J., Kang H., Jeong C., Moon H., Whang W., Kim C., Sim S. The effect of acteoside on histamine release and arachidonic acid release in RBL-2H3 mast cells. *Archives of Pharmacal Research* 29 (6) 508-513 (2006)
- LeBel C., Ischiropoulos H., Bondys S. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chemical Research Toxicology* 5, 227-231 (1992).
- Liu Y., Wagner H., Bauer R. Phenylpropanoids and flavonoid glycosides from *Lysionotus pauciflorus*. *Phytochemistry* 48 (2), 339-343 (1998).
- Lloyd R., Hanna P., Mason R. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radical Biology and Medicine* 22, 885-888 (1997).
- Mabry T., Markham K., Thomas M. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York págs. 286-287 (1970).
- Mackay A., Sedgwick A., Dunn C. Fleming W., Willoughby D. The transition from acute to chronic inflammation. *British Journal of Dermatology* 113, Supplement 28, 34-48. (1985).
- Mahato S., Nandy A., Roy G. Triterpenoids. *Phytochemistry*. 31, 2199-2249 (1992).
- Martínez M. Las plantas medicinales en México, 6° ed. Ediciones Botas México 1967.
- Martínez-Vazquez M., Ramírez A., Lazcano M., Bye R. Antiinflammatory active compounds form the n-hexane extract of *Euphorbia hirta*. *Revista de la Sociedad Química de México*, 43, 1255-1260 (1999).
- Masuda T., Yomenori S., Oyama Y., Takeda Y., Tanaka T., Andoh T., Shinohara A., Nakata M. Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants. *Journal of agriculture Food Chemistry* 47,1749-54 (1999).
- Masuda T., Yonemori S., Oyama Y., Takeda Y., Tanaka T., Andoh T., Shinohara A., Matsuda H., Morikawa T., Ando S., Toguchida I., Yoshikawa M. Structural Requirements of Flavonoids for Nitric Oxide Production Inhibitory Activity and Mechanism of Action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11, 1995–2000 (2003).
- Mattila P., Majuri M., Matilla P., Renkonen R. TNF- α induced expression of endothelial adhesion molecules, ICAM-1 y VICAM-1, is linked to protein kinase C activation. *Scand. Journal of Immunology* 36, 159-165 (1992).

- Michel F., Mercklein L., Rey R., Crastes de Paulet A. Comparative effects of some flavonoids on cyclooxygenase and lipooxygenase activities in different cell systems or subfractions. En: *Studies in Organic Chemistry* 23. Flavonoids and bioflavonoids, ed. Farkas L., Gábor M., Kallay F., Elsevier, Oxford. Págs. 389-401 (1985).
- Middleton E., Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity and cancer. En: *The flavonoids: Advances in research since 1986*, ed. Harborne, J. B., Chapman & Hall, London. Págs. 619-552 (1994).
- Moncada S., Palmer R., Higgs E. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 43, 109-142 (1991).
- Moraru I, Laky M., Stanescu T., Buzila L., Popescu L. Protein kinase C controls Fcγ receptor-mediated endocytosis in human neutrophils. *Federation of European Biochemical Societies Letter* 274, 93-95 (1990).
- Morrow J., Hill K., Burk R., Nammour T. Badr K., Roberts L. II. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in human by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 87, 9383-9387 (1990).
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65(1-2), 55-63 (1983).
- Musher D., Cohen M., Baker C. Immune responses to extracellular bacteria. En: Rich R., Fleisher T., Schwartz B., Shearer W., Strober W. eds *Clinical immunology Vol. I* St. Louis: Mosby-Year Book, págs. 59-63 (1996).
- Nakamura T., Okuyama E., Tsukada A., Yamazaki M., Satoke M., Nishibe, S., Deyama T., Moriya A., Maruno M., Nishimura H. Acteoside as the analgesic principle of Cedron (*Lippia triphylla*) a Peruvian medicinal plant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 45 (7), 499–504 (1997).
- Nathan C., Xie, Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78, 915-8 (1994).
- Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 420(19/26), 846-852 (2002).
- Needleman P., Turk J., Jakschik A., Morrison A., Lefkwith J. Arachidonic acid. Metabolism. *Annual Review of Biochemistry* 55, 69-102 (1986).
- Ng T., Liu F., Wang Z. Antioxidative Activity of Natural Products from Plants. *Life Sciences* 66 (8), 709-723 (2000).
- Nguyen A-T., Fontaine J., Malonne H., Claeys M., Luhmer M., Duez P. A sugar ester and an iridoid glycoside from *Scrophularia ningpoensis*. *Phytochemistry* 66, 1186-1191. (2005).
- Niki E. Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipid.* 44, 227-253 (1987).
- Nissler L., Gebhardt R., Berger S. Flavonoid binding to a multi-drug-resistance transporter

protein: an STD-NMR study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379, 1045–1049 (2004).

- Oh H., Pae H-O., Oh G-O., Lee S., Chai K-Y., Song C., Kwon T-O., Chung H-T., Lee H-S. Inhibition of inducible nitric oxide synthesis by catalposide from *Catalpa ovata*. *Planta Medica* 68, 685-689 (2002).
- Ohno T., Inoue M., Ogihara Y., Saracoglu I. Antimetastatic activity of acteoside, a phenylethanoid glycoside. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25, 666–668 (2002).
- Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4619-4626 (2001).
- Ozawa K., Szallasi Z., Kazanietz M., Blumberg P., Mischak H., Mushinski J., Bean M. Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent isozymes of protein kinase C mediate exocytosis in antigen-stimulated rat basophilic RLB-2H3 cells. Reconstitution of secretory response with Ca^{2+} and purified isozymes in washed permeabilized cells. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 1749-1756 (1993).
- Palmer R., Ashton D., Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664–666 (1988).
- Pan M., Lin-Shiau S., Ho, C., Lin J., Lin J. Suppression of lipopolysaccharide-induced nuclear factor-kappa B activity by theaflavin-3,3'-digallate 19 from black tea and other polyphenols through down-regulation of Ikappa B kinase activity in macrophages. *Biochemical Pharmacology* 59, 357-67 (2000).
- Pardo F., Perich F., Villarreal L., Torres R. Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 39(3), 221-222 (1993).
- Parker J., Daniel L. W. y Waite M. Evidence of protein kinase C involvement in phorbol diester-stimulated arachidonic acid release in prostaglandin synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 5385-5393 (1987).
- Pathak D., Pathak K., Signal A. Flavonoids as medicinal agents. *Recent advances Fitoterapia* LXII, 371-389 (1991).
- Pérez-Guerrero C., Herrera M., Ortiz R., Álvarez M., Fernández M. A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. *Journal Ethnopharmacology* 76, 279–284 (2001).
- Phillips T., Kujubu D., MacKay R., Herschman H. y Russell S. *Journal of Leukocyte Biology*, 53, 411–19 (1993).
- Pietta P. Flavonoids as Antioxidant. Review. *Journal of Natural Products* 63, 1035-1042. 2000.
- Ralph P., Nakoinz I. Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by

macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS. *Journal of Immunology* 119, 950-954 (1977).

- Ramasarma T. Some radical queries. *Toxicology* 148, 85-91 (2000).
- Raz A., Wyche A., Needleman P. Temporal pharmacological division of fibroblast cyclooxygenase expression into transcriptional and translational phases. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 86, 1657-1661 (1989).
- Recio M., Giner R., Mañéz S., Ríos. Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Medica* 60, 232-234 (1994).
- Reddy S., Herschman H. Ligand-induced prostaglandin synthesis requires expression of the TIS10/PGS-2 prostaglandin synthase gene in murine fibroblasts and macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 269: 15473–80 (1994).
- Renkonen R., Mennander A., Ustinov J., Mattila P. Activation of protein kinase-C is crucial in the regulation of ICAM-1 expression on endothelial cells by interferon- γ . *Internal Immunology* 2 (8), 719-724 (1990).
- Riaz N., Malik A., Rehman A., Ahmed Z., Mamad P., Ahmad A., Siddiqui J., Choudhary M. Lipooxygenase inhibiting and antioxidant oligostilbene and monoterpene galactoside from *Paeonia emodi*. *Phytochemistry* 65 1129–1135 (2004).
- Rice-Evans C., Burdon R. Free Radical-Lipid Interactions and their Pathological consequences. *Progress in Lipid Research* 32 71-110 (1993).
- Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2, 152-159 (1997).
- Rice-Evans C., Miller N., Bolwell P., Bramley P., Pridham J. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 22, 375-383 (1995).
- Robbers J., Speedie M., Tyler Varro. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. Williams & Wilkins págs. 131 –143 (1996).
- Roberts II L., Morrow J. Isoprostanes as markers of lipid peroxidation in atherosclerosis. En: Charles N. Serhan, Peter A. Ward. Molecular and cellular basis of inflammation Humana Press. págs. 141-163 (1999).
- Rosenberg H., Gallin J. Inflammation. En: Fundamental Immunology. 4ed, William E. Paul. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, págs. 1050-1088, (1999).
- Rosendal S., Nielsen B., Dahlgreen R. Use of chemistry in plant classification. *Revista Latinoamericana de Química Supple* 1. 66-89 (1989).
- Safayhi H. y Sailer R. Antiinflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Medica* 63, 487-493 (1997).
- Sala A., Recio M., Giner M., Mañéz S., Tournier H., Schinella G., Rios J. Anti-inflammatory

and antioxidant properties of *Helichrysum italicu*. *Journal of pharmacy and pharmacology* 54, 365–371 2002.

- Salvemini D., Billar T., Vodovotz Y. Nitric oxide and inflammation. Berlin págs. 41-57. 2001.
- Salvemini D., Misko T., Masferrer J., Seibert K., Currie M., Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 90, 7240-7244 (1993).
- Schmidt H. y Walter, U. NO at work. *Cell*, 78, 919-925 (1994).
- Schmidt K., Traenckner E., Meier B., Baeuerle P. Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF-kappaB. *The Journal of Biological Chemistry* 270(45):27136–42 (1995).
- Schreck R., Rieber P., Baeuerle P. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-κB transcription factor and HIV-1. *European Molecular Biology Organization Journal* 10, 2247-58 (1991).
- Schreck R., Baeuerle P. Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-κB. *Methods in Enzymology* 234, 151-153 (1994).
- Schulze-Osthoff K., Bakker A., Vanhaesebroeck B., Beyaert R., Jacob W., Fiers W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. *Journal of Biological Chemistry* 267, 5317-5323 (1992).
- Sedgwick A., Willoughby D. Initiation of the inflammatory response and its prevention. En: *Handbook of Inflammation Vol. 5. The pharmacology of inflammation*, Bonta I., Bray M., Parnham M. publicaciones Elsevier Science B.V. págs. 465 (1985).
- Shaheen F., Ahmad M., Hassan M., Jalil S., Ejaz A., Sultankhodjaev M., Arfan M., Choudhary M., Atta-ur-Rahman. Alkaloids of *Aconitum laeve* and their anti-inflammatory, antioxidant and tyrosinase inhibition activities. *Phytochemistry* 66 935–940 (2005)
- Singleton V., Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 144-153 (1965).
- Smith W., DeWitt D., Garavito M. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annual Review of Biochemistry* 69, 45–82 (2000).
- Smith R., Justen J., Sam L. Function and stimulus-specific effects of phorbol 12-myristate 13-acetate on human polymorphonuclear neutrophils: Autoregulatory role for protein kinase C in signal transduction. *Inflammation* 12, 597-611 (1988).
- Summer J. *The natural history of medicinal plants*. Timer Press, Portland Oregon págs 37 (2000).
- Suksamran A., Kumpum, S., Kirtikara, B., Yingyongnarongkul S. Iridoids with anti-inflammatory activity from *Vitex peduncularis*. *Planta Medica* 68 (1), 72-73 (2002).
- Sun J., Zhang X., Broderick M., Fein H. Measurement of Nitric Oxide Production in

Biological Systems by Using Griess Reaction. *Assay Sensors* 3, 276-284 (2003).

- Surh Y., Chun K., Cha H., Han S., Keum Y., Park K., Lee S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutation Research* 480–481, 243–268 (2001).
- Teboring D., Junior P. Martynoside and novel dimeric open-chain monoterpene glucoside digipenstroside from *Penstemon digitalis*. *Planta medic*, 55, 474-476 (1989).
- Testa B., Fuhrer W., Kyborz E., Giger R. (Eds). Perspectives in medicinal chemistry. Verlag *Helvetica Chimica Acta*. Switzerland, cap 30, págs. 475-487 (1993).
- Tsao L., Lin C., Wang J. Justicidin A inhibits the transport of tumor necrosis factor-alpha to cell surface in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Molecular Pharmacology* 65, 1063-9 (2004).
- Valdes Y., Bilbao M., León J. Origen e importancia de la fosfolipasa A2 de secreción. *Revista Cubana de Farmacia* 36, 121-128 (2002).
- Vapaatalo H. Free radicals and anti-inflammatory drugs. *Medical Biology* 64, 1-7 (1986).
- Veglioglu Y., Mazza G., Gao L., Omah B. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4113-4117 (1998).
- Wasternack C., Atzorn R., Blume B., Leopold J., Parthier B. Ursolic acid inhibits synthesis of jasmonate-induced proteins in barley leaves. *Phytochemistry* 35, 49-54 (1994).
- Weiss S. Tissue destruction by neutrophils. *New England Journal of Medicine* 320, 365-376 (1989).
- Williams D. Nitrosation reactions and the chemistry of nitric oxide, Elsevier págs. 171-186 (2004).
- Wong G., Elwell J., Oberley L., Goeddel D. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 58, 923-931 (1989).
- Wu K. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Advances in Pharmacology*, 33, 179-207 (1995).
- Wynn T., Cheever A. Cytoquine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Current Opinion in Immunology* 7, 505-511 (1995).
- Xagorari A., Roussos C., Papapetropoulos A. Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin. *British Journal of Pharmacology* 136, 1058 – 1064 (2002).
- Xie Q., Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *Journal of Leukocyt. Biology* 56, 576-82 (1994).
- Xiong Q., Tezuka Y., Kaneko T., Li H., Tran L. Q., Hase K., Namba T., Kadota S. Inhibition

of nitric oxide by phenylethanoids in activated macrophages. *European Journal of Pharmacology* 400, 137–144 (2000).

- Yoshikawa T., Tanaka H., Yoshida N., Seto O., Sugino N., Kondo M. Adjuvant arthritis lipid peroxide protection by superoxide dismutase. *Lipid Peroxide Research* 7, 108-110. (1983).
- Yuda Y., Tanaka J., Hirano F., Igarani K., Satch T. Participation of lipid peroxidation in rat pertussis vaccine pleurisy. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 39, 505 – 506 (1991).
- Zor U., Her E., Harell T., Fischer G., Naor Z., Braquet P., Ferber E., Reiss N. Arachidonic acid release by basophilic leukemia cells and macrophages stimulated by Ca^{2+} ionophores, antigen and diacylglycerol: Essential role for protein kinase C and prevention by glucocorticosteroids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1091, 385-392 (1990).