

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA.
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CARRERA: QUÍMICA-FARMACÉUTICA

MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA FARMACÉUTICA



“Correlación entre la actividad antioxidante y la concentración de polifenoles de tres variedades de albahaca *Ocimum basilicum*, por el método de Folin – Ciocalteu y del radical DPPH en el Laboratorio de Biociencia de la UNAN-Managua. Octubre 2011- Marzo 2012”

Autoras:

Br. Karina Auxiliadora Brenes Argüello

Br. Giselle Alejandra García cruz

Tutor:

Msc. Iván Marín Argüello

Managua, Marzo 2012

Dedicatoria

A Dios gracias infinitamente por haberme permitido culminar esta importante etapa en mi vida, por darme la fortaleza y el coraje para salir adelante.

A mis padres con mucho amor, especialmente a mi madre bella por haber confiado siempre en mí y apoyarme incondicionalmente en todos los momentos.

A mi abuela Chepis por su gran amor y cariño que siempre me ha demostrado.

Al Lic. Guillermo Lovo por todas sus palabras de ánimo en los momentos difíciles, su amor, cariño y comprensión.

A todos mis familiares porque de una u otra manera estuvieron presentes en este largo camino.

Guiselle Alejandra García Cruz

Dedicatoria

A Dios, por que muchas veces no supe a donde ir en momentos de incertidumbre, confié en él y me dio paz.

A mis adorados Abuelitos Tavo y Mayin por mostrarme los desafíos en el camino de la vida enseñándome a enfrentar mis temores y confiar en mi misma.

A mis Padres, en especial a mi Madre, Auxiliadora Argüello por su amor incondicional, por ser mi fortaleza y por hacerme mejor humano cada día, te amo Madre.

A mi hermano Oscar Brenes Argüello, por ser mi fiel compañero a lo largo de mi vida.

A todos mis seres queridos, que de una u otra forma han sido partícipes en la culminación de esta etapa.

Karina Auxiliadora Brenes Argüello

Agradecimientos

Agradecemos de corazón a nuestro tutor Msc. Iván Marín Arguello, por todo su apoyo en la realización de este trabajo.

A nuestro querido PhD. Rene Silva por su excelencia y dedicación en este arduo trabajo.

A la Lic. Sara Negaresh, un agradecimiento especial por haber compartido toda su experiencia, paciencia y dedicación para con nosotras en este proyecto.

A la Lic. Modesta Guiselle López por ser tan generosa y compartir su conocimiento con nosotras.

A la Msc. Natalia Gutiérrez por sus sabios consejos, que hicieron parte en la culminación de este estudio.

Al Lic. Rogelio José Machado Cantillano por su actitud y sus deseos de ayudarnos bajo cualquier circunstancia.

Al PhD. Jorge Pitty por su incondicionalidad y compartir con nosotras sus conocimientos.

Al Dr. Gamaliel Gutiérrez por sus válidos aportes y sugerencias en la realización de este trabajo.

A todas aquellas personas que colaboraron y nos brindaron su apoyo incondicional



Hacia la Acreditación Universitaria
Managua, 19 de marzo del 2012

Sra. Rosa María González Tapia
Directora Departamento de Química
UNAN-Managua

Estimada Sra. González:

Por medio de la presente hago constar que las observaciones y recomendaciones realizadas al tema monográfico “Correlación entre la actividad antioxidante y la concentración de polifenoles de tres variedades de albahaca *Ocimum basilicum*, por el método de Folin-ciocalteau y del radical DPPH en el laboratorio de Biociencia de la UNAN-Managua. Octubre 2011-Marzo 2012”, desarrollada por las autoras Br. Karina Auxiliadora Brenes Argüello, Br. Giselle Alejandra García Cruz, ya fueron totalmente incorporadas.

Atentamente

Sr. Iván Marín
Docente / Investigador
Facultad de Ciencias e Ingenierías
UNAN-Managua

Cc: Bra. Karina Brenes Arguello
Bra. Giselle García Cruz



Hacia la Acreditación Universitaria
Managua, 19 de marzo del 2012

Sra. Rosa María González Tapia
Directora Departamento de Química
UNAN-Managua

Estimada Sra. González:

Por medio de la presente hago constar que el tema monográfico "Correlación entre la actividad antioxidante y la concentración de polifenoles de tres variedades de albahaca *Ocimum basilicum*, por el método de Folin-ciocalteau y del radical DPPH en el laboratorio de Biociencia de la UNAN-Managua. Octubre 2011-Marzo 2012", desarrollada por las autoras Br. Karina Auxiliadora Brenes Argüello, Br. Giselle Alejandra García Cruz presenta varios aspectos positivos entre estos:

1. Es un tema vinculado a la salud humana por la utilización de los antioxidantes naturales y su impacto en procesos degenerativos.
2. Está asociado a la seguridad alimentaria por el uso de la albahaca en el hábito culinario y el enriquecimiento de los alimentos con antioxidantes.
3. Se implementó en la universidad una metodología de detección sencilla y de bajo costo.
4. Se capacitó técnica y metodológicamente a dos estudiantes de la UNAN-Managua en la conceptualización de un tema de investigación y habilidades investigativas.

Atentamente

Sr. Iván Marín
Docente / Investigador
Facultad de Ciencias e Ingenierías
UNAN-Managua

Cc: Bra. Karina Brenes Arguello
Bra. Giselle García Cruz

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	
GENERALIDADES	1
1.1 INTRODUCCION	1
1.2 ANTECEDENTES	2
1.3 JUSTIFICACIÓN	3
1.4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.5 OBJETIVOS	5
II. HIPÓTESIS	6
III. MARCO TEÓRICO	7
3.1 Albahaca	7
3.2 Radicales libres	13
3.3 Antioxidantes	25
3.4. Estrés oxidativo	31
3.5. Polifenoles.	34
IV. DISEÑO METODOLÓGICO	41
4.1 Tipo de estudio	41
4.2 Área y tiempo de estudio.	41
4.3 Población de estudio	41
4.4 Tamaño de la muestra	41
4.5 Muestreo	41
4.6 Criterios de selección	42
4.7 Tipo de fuente de información, recolección y procesamiento de datos	42
4.8 Variables según los objetivos	43
4.9 Operacionalización de variables	44
4.10 Control de sesgos de información y selección	45
4.11 Plan de Análisis	45

4.12. Métodos a utilizar	46
V. RESULTADOS OBTENIDOS	50
VI. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56
VII. CONCLUSIONES	60
VIII. RECOMENDACIONES	61
IX. BIBLIOGRAFÍA	62
X. GLOSARIO	67
ANEXOS	

RESUMEN



RESUMEN

En el presente estudio se hizo una correlación entre la actividad antioxidante y la concentración de polifenoles libres y solubles in vitro, de tres variedades de albahaca; *Ocimum basilicum crispum*, *Ocimum basilicum sanctum*, *Ocimum basilicum minimum*, esto con el objetivo de demostrar si la actividad antioxidante depende directamente de la concentración de polifenoles a través de la aplicación de la técnica estadística de correlación de Pearson R^2 , buscando con ello dar una respuesta con bases científicas a la población que consume esta planta con fines terapéuticos o culinarios.

Para determinar la concentración de polifenoles libres y solubles se estandarizó el método de Folin-Ciocalteu expresando los resultados en $\mu\text{g/ml}$ de ácido gálico equivalente (AGE) y conjuntamente para la actividad antioxidante el método de decoloración del radical 2, 2-difenil, 1-picrilhidracilo (DPPH), expresado en porcentaje de decoloración.

Las subespecies de albahaca analizadas demostraron un alto contenido de actividad antioxidante y concentración de polifenoles libres y solubles. Los valores más altos de la actividad antioxidante fueron de 94.07% para la subespecie *Ocimum basilicum minimum*, en relación a las otras subespecies de albahaca, para la concentración de polifenoles libres y solubles nos indica un valor de 448.66 $\mu\text{g/ml}$ de AGE para la subespecie *Ocimum basilicum minimum*.

Con el análisis de estos resultados de acuerdo a la determinación del coeficiente de correlación de Pearson, se destaca que no existe ninguna relación entre la actividad antioxidante y la concentración de polifenoles libres y solubles, ya que muchos de estos polifenoles presentes en la albahaca no poseen tanta actividad antioxidante.

I. GENERALIDADES



1.1 INTRODUCCION

Desde la década de los años setenta se ha producido una explosión en las áreas de investigación y clínica relativas a los radicales libres y los antioxidantes. Existen plantas que según los reportes populares presentan acción de este tipo, todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para la generación de energía liberan radicales libres, lo que es incompatible con la vida a menos que existan mecanismos de defensa contra estas especies (*García Bacallao, et al., 2001*).

El consumo de antioxidantes por su alta capacidad de secuestro de radicales libres ha sido asociado con la prevención del estrés oxidativo, estos antioxidantes actúan principalmente en reacciones de terminación de cadenas de radicales libres, impidiendo la oxidación de lípidos y otras moléculas cediendo átomos de hidrogeno de forma que cortan o inhiben la formación de radicales libres (*Casadevall, 2009*).

En Nicaragua el consumo de estos productos como la albahaca, son parte de la dieta diaria y de la ingesta de las familias por sus propiedades y usos medicinales, sin saber realmente su potencial antioxidante, que son capaces de captar radicales libres, que están asociados a la prevención de diversas enfermedades, como digestivas, respiratorias, cancerígenas entre otras.

Los estudios alimenticios han indicado que la albahaca es una buena fuente de carbohidratos, proteínas, minerales y vitaminas. Otros estudios demuestran la demanda que tiene la albahaca como planta medicinal, tales como limpiadores de sangre e inductor de contracciones uterinas. Asimismo, también se cree que esta planta desempeña un papel vital en la baja incidencia del cáncer, así como el control del envejecimiento y de las enfermedades relativas a la edad (*Norhanom, et al., 1999*).



1.2 ANTECEDENTES

Para el inicio de este estudio se tomaron en cuenta trabajos de investigación realizados bajo el marco internacional encontrados de fuentes autorizadas y certificadas como son las revistas científicas, que demuestran las propiedades antioxidantes de los polifenoles, presentes en la albahaca, contra agentes tóxicos como los radicales libres en la generación de patologías. Cuyos resultados sirvieron para la estandarización y análisis de resultados del presente trabajo investigativo.

Las influencias de la variedad en la composición fenólica y las propiedades antioxidantes de 15 variedades de albahaca cultivadas en este estudio, de la Universidad Ave Georgetown, Estados Unidos, tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre los niveles de compuestos fenólicos ($p < 0.001$) y las concentraciones de antocianinas ($p < 0.001$).

El análisis de las plantas de albahaca cultivadas, también tuvo un impacto significativo en el férrico poder reductor antioxidante (FRAP), $p = 0.007$ y 2, 2- Difenil, 1- picril hidrazil (DPPH), $p = 0.004$ en las capacidades antioxidantes. Para las variedades de albahaca en este estudio, la composición fenólica resulto ser un factor importante que influye en la capacidad antioxidante medida (*Eileen M. et al., 2011*).

En Nicaragua no se han realizado investigaciones relacionadas con las propiedades antioxidantes de la albahaca, por lo que se puede afirmar que este es el primer trabajo realizado en el país que se desarrolla, en el laboratorio de Biociencia de la UNAN-Managua.



1.3 JUSTIFICACIÓN

El estudio científico de las plantas medicinales ha contribuido en gran medida a un mejor conocimiento de las propiedades químicas, físicas y biológicas que estas poseen, permitiendo determinar las concentraciones adecuadas o los componentes directamente responsables de la funcionalidad evidenciada en medicina, industria farmacéutica o alimentaria.

Muchos de estos productos de origen natural además de ser beneficiosos para la salud por sus propiedades medicinales, contienen grandes cantidades de antioxidantes que los posicionan como aliados contra enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y cánceres.

El propósito de este trabajo es relacionar la actividad antioxidante con la concentración de polifenoles de extractos orgánicos de tres especies de albahaca cultivadas en el Centro experimental Campos Azules Masaya, de Nicaragua, buscando con ello encontrar fundamentación científica que asegure su aplicabilidad.

Es por tal razón que para su determinación, se hizo la cuantificación de polifenoles libres y solubles, por el método de Folin-Ciocalteu y la determinación de la actividad antioxidante, por decoloración del 2, 2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), a diferentes variedades de albahaca con dichas propiedades para comprobar entre ellas cual es la que posee mayor actividad, en que concentración y porcentaje, recurriendo al método de espectrofotometría (UV).



1.4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el mercado en general hay una gran variedad de productos beneficiosos para la salud obtenidos a partir de metabolitos secundarios de plantas, este es un campo de estudio que en los últimos años ha tomado un interés de alto valor creciente a nivel científico e industrial, es por tal razón que es fundamental su estudio ya que desde tiempos remotos las plantas han sido utilizadas por las personas con fines terapéuticos por sus propiedades medicinales que ellos mismo han venido atribuyendo sin fundamentos científicos.

Los antioxidantes son agentes preventivos contra diversas enfermedades neurodegenerativas como el cáncer, aterosclerosis, diabetes, entre otras. Hasta el momento estudios realizados para determinar las propiedades antiradicalarias y antitumorales de los antioxidantes provenientes de metabolitos secundarios de las plantas, han demostrado una efectiva actividad secuestradora de radicales libres y protectora contra éstas.

La albahaca es una fuente rica de antioxidantes que podrían ayudar en la prevención de estas enfermedades, el consumo de esta planta tanto culinario como terapéutico es de gran importancia para la población porque se pretende demostrar con bases y fundamentos científicos su potencial antioxidante, a través de la estandarización del método de Folin Ciocalteu y del radical DPPH, en el laboratorio de Biociencia de la UNAN-Managua, durante octubre 2011 a marzo 2012.

¿Cual es correlación entre la actividad antioxidante y la concentración de polifenoles de tres variedades de albahaca *Ocimum basilicum*, por el método de Folin – Ciocalteu y del radical DPPH?



1.5 OBJETIVOS

Objetivo general

Correlacionar la actividad antioxidante y la concentración de polifenoles de tres variedades de albahaca *Ocimum basilicum*, por el método de Folin – Ciocalteu y del radical DPPH en el Laboratorio de Biociencia de la UNAN-Managua.

Objetivos específicos

1. Cuantificar las concentraciones de polifenoles libres y solubles, de tres variedades de albahaca por medio del método de Folin-ciocalteu.
2. Determinar la actividad antioxidante de las tres variedades de albahaca, a través del método de decoloración del radical DPPH.
3. Correlacionar la concentración de polifenoles con la actividad antioxidante de las variedades de albahaca.

II. HIPÓTESIS



II. HIPÓTESIS

La actividad antioxidante en subespecies de Albahaca provenientes del Centro experimental campos azules; Masatepe, depende directamente de la concentración de polifenoles libres y solubles, presentes en estas.

III.MARCO TEÓRICO



III. MARCO TEÓRICO

3.1 Albahaca

La albahaca, *Ocimum basilicum*, es una planta aromática originaria de la India que simboliza al dios hinduista Vishnu, siendo los griegos los que introdujeron la especia en Europa hace más de 2.000 años. Esta planta, a la que también se le da el nombre de basilico, proviene del término griego basilikon o Basileus (rey) cuyo significado es real o regio.

El vocablo castellano albahaca proviene del árabe al-habak, cultura que lo emplea abundantemente en su cocina tradicional dejando numerosas huellas en la gastronomía murciana. En el medievo la albahaca era una planta empleada para tratar males como la depresión, las verrugas, el resfriado común o mitigar los dolores de parto tal como recoge el ilustre alquimista, conocido medico de reyes y papas, Arnau de Vilanova

Popularmente atraía el mal de ojo, ya que quien quisiera demostrar su enemistad a alguien le ofrecía públicamente un ramillete de esta planta. En contraposición mantiene su asociación con el amor, por lo que las doncellas colocaban un ramillete en la ventana con el fin de atraer a sus enamorados.

Los sacerdotes cristianos emplean la albahaca junto con otras hierbas aromáticas mediterráneas para bendiciones en romerías y procesiones de muchas localidades del sureste español. En la Región de Murcia es conocida por el nombre popular de alhábega, procedente del catalán alfàbrega o alfàbega, voz recogida en el primer diccionario de la Lengua Castellana (1726) por el académico murciano Padre Bartolomé de Alcázar.

Ocimum Basilicum denominada como albahaca o alhábega, es una hierba aromática anual de la familia de las lamiaceas, nativa de Irán, India y otras regiones tropicales de Asia, que lleva siendo cultivada más de 5000 años.

3.1.1 Cultivo

Esta planta es muy sensible a las heladas. Se cultiva únicamente por semillas, que se pueden sembrar en semilleros o macetas en un invernadero a principios o mediados de la



primavera. Requiere una posición soleada, aunque en climas de veranos muy calurosos agradece algo de sombra y suelos fértiles, permeables y húmedos.

En cuanto a su conservación y recolección las hojas y sumidades florales deben de recogerse en verano. Deberán de secarse a la sombra y guardarlas en un recipiente de vidrio bien cerrado. Es una Hierba anual, cultivada como perenne en climas tropicales, de crecimiento bajo (entre 30-130 cm), con hojas opuestas de un verde lustroso, ovales u ovadas, dentadas y de textura sedosa, que miden de 3 a 11 cm de largo por 1 a 6 cm de ancho.

Emite espigas florales terminales, con flores tubulares de color blanco o violáceo las cuales, a diferencia de las del resto de la familia, tienen los cuatro estambres y el pistilo apoyados sobre el labio inferior, de la corola. Tras la polinización entomófila, la corola se desprende y se desarrollan cuatro aquenios redondos en el interior del cáliz bilabiado.

Existen 40 tipos de Albahaca, pero los más conocidos son: Albahaca Anís (*O. b. anise*): sabe a anís un poco amargo. Se usa en el Sudeste Asiático, Albahaca Africana (*O. b. african blue*): sabe a pimienta y regaliz. Se usa con verduras, platos de arroz y guisos, Albahaca Alcanforada (*O. b. kilimand scharicum*) sabe a alcanfor y se combina con otras, por ejemplo con la Anís, Albahaca Canela (*O. b. cinnamom*) sabe a dulce.

Se lleva muy bien con las alubias, Albahaca Cítrica (*O. b. citriodorum*) sabe a limón. Se usa en ensaladas y pescados, Albahaca común (*O. basilicum*): sabe a clavo un poco picante y con un deje de regaliz y menta. Es la más usada, sobre todo en occidente, Albahaca Crespa (*O. b. crispum*): sabe igual que la común y como tiene las hojas grandes, se usan para envolver comida en ellas.

Albahaca de hoja pequeña (*O. b. minimum*) huelen mucho a pimienta. Va muy bien con cereales y con el arroz, Albahaca de Tailandia (*O. b. orapha*) sabe a anís y a pimienta. Se parece a la Albahaca Anís, Albahaca Tulsi (*O. sanctum*) sabe a clavo, pimienta, menta, un poco amarga. Se usa en la cocina tailandesa, albahaca violeta (*O. b. purpurascens*) deja un color rosado en la comida. Es ideal para las salsas de cremas y en las ensaladas verdes, albahaca violeta crespa (*O. b. purpleruffles*) sabe como la albahaca común.



3. 1.2 Taxonomía y morfología

En el presente estudio se utilizaron tres variedades de albahaca, las cuales difieren en sus propiedades por lo que a continuación se caracteriza cada una de ellas.

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnolipsida.

Subclase: asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Subfamilia: Nepetoideae

Tribu: Ocimeae

Genero: *Ocimum*

Especie: *Basilicum*

Subespecies: *Minimum*

Características: Es una hierba de aproximadamente 60 cm de largo, con ramas ramificadas y opuestas en el tallo. Posee aceites aromáticos que caracterizan a esta hierba entre las otras variedades, entre los aceites esenciales que se encuentran están el metilcavicol, linalol, cineol y eugenol. Posee un tallo cuadrado y hojas opuestas simples. Sus nervaduras son pinnadas y reticuladas, cada hoja posee cuatro nervaduras. Sus hojas son de base redondeada, ovadas o elípticas, estas miden entre 1 a 2 cm de largo y de 7 mm a 1.5 cm de ancho y no poseen pubescencia en sus hojas, son plantas hermafroditas (*Imagen 1, Anexos 1*).

Sus hojas son de color verde uniforme y su tallo es de color café amaderado cerca de la raíz, mientras que en la parte de sus hojas sus ramas se tornan de color verde. Estas esencias le confieren a la planta propiedades aperitivas, digestivas, espasmolíticas, carminativas, por ello están especialmente indicadas en desnutrición, digestiones lentas y pesadas, y en espasmos del aparato digestivo.



Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
División: Magnoliphyta
Clase: Magnolipsida.
Subclase: asteridae
Orden: Lamiales
Familia: Lamiaceae
Subfamilia: Nepetoideae
Tribu: Ocimeae
Genero: *Ocimum*
Especie: *Basilicum*
Subespecies: *Sanctum*

Características: se clasifica como una hierba, es una planta mucho mas frondosa que la anterior, 65 metros de altura, posee raíces fibrosas, su cambicum vascular no esta organizado sino disperso a través del tallo, o el xilema y el florema. Posee cuatro nervaduras en sus hojas, no posee pubescencia en sus hojas, es una planta glabra, su lápiz es obtuso, de base redondeada, es ovada o elíptica, y sus hojas están opuestas de manera simple, estas tienen un ancho de 8mm a 1.3 cm y un largo de 12 a 15 cm (*Imagen 2, Anexos 1*).

Posee un tallo cuadrado, con una ramificación de manera opuesta. En la parte superior de la planta o la parte mas joven posee un color morado, y los últimos 12 a 15 cm las ramas terminales tienen un aspecto de color morado.

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
División: Magnoliphyta
Clase: Magnolipsida.
Subclase: asteridae
Orden: Lamiales
Familia: Lamiaceae



Subfamilia: Nepetoideae

Tribu: Ocimeae

Genero: *Ocimum*

Especie: *Basilicum*

Subespecies: *Crispum*

Características: posee una altura entre 50 y 60 cm, es una planta mucho más frondosa que las anteriores, posee un olor característico mucho más fuerte en comparación con las otras, sus hojas son simples y opuestas, con 4 nervaduras están pinnadas y poseen una base redondeada de manera desigual y asimétrica. El borde de la hoja es irregular o ligeramente acerrado y poseen un tamaño de 3.5 cm a 6 cm de largo y de 1.3 a 3.5 de ancho. Su peciolo es de 8 mm a 1 cm, contiene un lápiz agudo donde cuyo nervio central es agudo y pronunciado (*Imagen 3, Anexos 2*).

Emite espigas florales terminales, con flores tubulares de color blanco o violáceo las cuales, a diferencia de las del resto de la familia, tienen los cuatro estambres y el pistilo apoyados sobre el labio inferior de la corola. Tras la polinización entomofílica (por insectos), la corola se desprende y se desarrollan cuatro aquenios redondos en el interior del cáliz bilabiado

3.1.3 Propiedades medicinales de la albahaca.

Si bien la albahaca es reconocida a nivel etnobotánico en el tratamiento de enfermedades respiratorias, problemas intestinales, mareos, náuseas y flatulencias, esta hierba es una fuente de minerales como hierro, calcio y potasio, así mismo reduce la capacidad de síntesis de colesterol. Este tipo de familias de *Ocimum* poseen propiedades citotóxicas hacia microorganismos como la salmonella, por lo que este estudio se fundamenta en que a través de diferentes aplicaciones científicas se permitan hallar alternativas de uso biotecnológico.

Estudios recientes indican que la albahaca es una fuente de carbohidratos, proteínas y minerales, que son utilizados en la prevención o curación de dolencias tales como la diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, artritis, fiebre y tos.



Los valores medicinales de las especies pertenecientes al género *Ocimum*, se deben a la presencia de importantes compuestos fitoquímicos que producen acciones fisiológicas que defienden al cuerpo humano, cuyos compuestos son los alcaloides, taninos, flavonoides y compuestos fenólicos.

En cuanto a sus propiedades antioxidantes que caracterizan esta planta, son muchos sus atributos que permiten utilizarla con diferentes orígenes terapéuticos tales como:

Digestiva: favorece la digestión y evita los espasmos gástricos, siendo muy útil en los casos de gastritis, de hernia del hiato.

Estimulante digestivo y láctico: la esencia de la planta abre el apetito y estimula la producción de leche en las mujeres.

Antimovitiva: en caso de tener sensación de vómitos o malestar estomacal.

Problemas nerviosos: refuerza el sistema nervioso y tranquiliza sus manifestaciones adversas en el estomago.

Mal de altura: su contenido en eugenol le otorga propiedades anticoagulantes, muy adecuada para mejorar la circulación sanguínea. Esta propiedad puede ser aprovechada para evitar el mal de altura o mejorar los síntomas ya que un mayor riego celular permite un mayor aporte de oxígeno a las células y una mayor limpieza de las toxinas.

Este tipo de planta también se puede utilizar para uso externo debido a que posee propiedades antiinflamatorias y relajantes, como son para procesos inflamatorios producidos a nivel bucal, tanto llagas como mal aliento.

También se utiliza para quistes de ovario ya que puede utilizar como aceite esencial para masajes abdominales.

Según un informe de la unión europea, la albahaca al igual que es rica en antioxidantes esta posee una amplia variedad de aceites esenciales mencionados con anterioridad, cuyos aceites como el estragol cuyo nombre químico es el p-alilanol chavicol metilo, el cual es un fenilpropeno de origen natural compuesto por un grupo Metoxi y un grupo propenilo, es un



isómero de doble enlace que se sospecha puede ser carcinógeno y genotóxico, por lo que se recomienda no consumir grandes cantidades de esta planta ya que aun no se comprueba su toxicidad.

Sin embargo una manera fácil de identificar si una planta de albahaca o de otro tipo de hierba puede ser hepatotóxica, es a través del polen, es decir que si este posee tres estrías, contiene un alto contenido de sesquiterpeno, mientras que si el grano de polen posee 6 estrías son rico en fenoles o alcoholes con alto rendimiento, por lo que las hierbas de albahaca con un alto rendimiento de aceites esenciales posee alto contenido de metilcavinol.

3.2 Radicales libres

Los radicales libres (RL), son especies químicas que tienen un único electrón sin su par en una órbita externa. La energía creada por esta configuración inestable se libera a través de reacciones con moléculas adyacentes, tales como productos químicos inorgánicos u orgánicos (proteínas, lípidos e hidratos de carbono), particularmente con moléculas clave en las membranas y ácidos nucleicos, además los radicales libres inician reacciones auto catalíticas, en las cuales las moléculas con las que reaccionan se convierten a su vez en radicales libres, propagando el daño en cadena (*Kumar, et al., 2007*).

La generación de RL no se ha de relacionar siempre con su toxicidad, debido a que la función que desarrollan presenta dos caras opuestas, por un lado actúan como mediadores y reguladores a concentraciones fisiológicas, mientras que a concentraciones elevadas pueden actuar como potentes oxidantes citotóxicos.

En los sistemas vivos se generan muchos tipos de radicales libres, siendo los más conocidos los radicales del oxígeno. Se utiliza el término de Especies Reactivas del Oxígeno (reactive oxygen species, ROS), incluyendo tanto los derivados radicales como los no radicales, que son agentes oxidantes y fácilmente convertibles en radicales. De forma análoga existen especies reactivas del nitrógeno (RNS), del cloro (RCIS), y del bromo (RBrS) (*Tabla 1, Anexos 3*).



3.2.1 Fuentes de radicales libres

3.2.1.1. Fuentes biológicas o endógenas de RL

En el transcurso normal de la respiración aeróbica, las mitocondrias consumen O_2 , reduciéndolo en varias etapas a H_2O (*Figura 1, Anexo 3*), inevitablemente a lo largo de este proceso aparecen subproductos como el O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$. Este fenómeno se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, que es la última etapa de producción de protones de alta energía, y cuyo pasaje a través de la membrana interna mitocondrial, genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar el ATP o adenosina trifosfato (*Casadevall, 2009*).

En este proceso de fosforilación oxidativa, el oxígeno actúa como aceptor final de electrones, adquiriendo en más del 95 % de estas reacciones, con un total de 4 electrones de moléculas con producción de 2 moléculas de agua. Una consecuencia directa de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas puede entregar 1 ó 2 electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los RL.

Otras fuentes son las peroxisomas, organelas del citosol muy ricas en oxidasas y que generan H_2O_2 , el cual es depurado por enzimas específicas (catalasas) y transformado en agua.

Los leucocitos polimorfos nucleares constituyen una fuente importante, cuando se activan por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos (complemento, interleucinas, etc.). Los leucocitos poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa (Nicotina Adenin Dinucleotido fosfato en estado oxidado), generadora de O_2^- , que en presencia de hierro (Fe), se transforma en iones Hidroxilo (OH^-), altamente tóxico. Esta situación se da particularmente en los procesos inflamatorios.

La enzima xantina deshidrogenasa predomina en los endotelios, normalmente depura las xantinas generadoras de O_2^- .

Las enzimas del complejo citocromo P450, son las principales responsables del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. La inducción de estas enzimas previene los efectos



de toxicidad aguda, de agentes extraños al organismo, pero también produce subproductos oxidantes que pueden dañar al ADN (Zangar, 2004).

3.2.1.2 Fuentes exógenas de radicales libres:

Entre las principales fuentes exógenas de radicales libres se destacan:

Los óxidos de Nitrógeno (NO_x) del humo del tabaco

Las sales de hierro y cobre que promueven la generación de radicales libres, a partir de peróxidos (Fenton, 1894) (Figura 1, Anexo 3).

Los alimentos que ingerimos a través de la dieta, especialmente los de origen vegetal, que se oxidan a mayor o menor grado, generando diferentes tipos de oxidantes como peróxidos, aldehídos y ácidos grasos oxidados y metales de transición (Ames, 1990) (Tabla 2, anexo 4).

Se puede apreciar, por lo tanto, que los RL se forman en condiciones fisiológicas en proporciones controlables, por los mecanismos defensivos celulares. En situación patológica, esta producción se incrementa sustancialmente, ingresándose al estado de estrés oxidativo.

Los radicales libres pueden iniciarse dentro de las células de diferentes maneras:

Absorción de la energía radiante (luz ultravioleta, rayos X): por ejemplo la radiación ionizante puede hidrolizar el agua en radicales libres hidroxilo (OH) e hidrogeno (H).

Metabolismo enzimático de agentes químicos o fármacos exógenos: por ejemplo tetracloruro de carbono (CCl_4) que pueden generar CCl_3 .

Las reacciones de reducción-oxidación, que ocurren durante los procesos metabólicos normales; durante la respiración normal, el oxígeno molecular se reduce secuencialmente mediante la adición de cuatro electrones para generar agua. Tal conversión tiene lugar mediante enzimas oxidativas, en el retículo endoplasmático, citosol, mitocondrias, peroxisomas y lisosomas. En este proceso se producen pequeñas cantidades de intermediarios tóxicos; estos incluyen el radical anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), e iones hidroxilo (OH^-).



Durante la inflamación, ocurren estallidos rápidos de producción de superóxido, en los leucocitos polimorfos nucleares activados. Esto ocurre por una reacción muy precisamente controlada en un complejo multiproteína de la membrana plasmática, que utiliza NADPH oxidasa para la reacción redox.

Metales de transición tales como hierro y cobre, donan o aceptan electrones libres durante las reacciones intracelulares y catalizan la formación de radicales libres.

El óxido nítrico, el cual es un mediador químico importante, generado por las células endoteliales, macrófagos, neuronas y otros tipos celulares (*Kumar, et al., 2007*).

3.2.2 Daños perjudiciales por los radicales libres: ¿Por qué son tan perjudiciales?

Cuando el organismo se ve desbordado por un exceso de RS, prácticamente cualquier estructura biológica que lo ingiera (ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos), puede convertirse en diana de la acción de estas especies reactivas y resultar dañadas. El daño causado por el ataque de ROS y RNS puede originar lesiones en el ADN, pérdida de la función de enzimas, incremento de la permeabilidad celular, disrupción de la señalización de la célula y, en ocasiones, muerte celular por necrosis y apoptosis (*Diplock At Charleux, et al., 1998; Kim, et al., 2006*).

Por este motivo, es común relacionar el daño provocado por las diversas especies reactivas, con la fisiopatología de varias enfermedades como el cáncer, la diabetes y enfermedades pulmonares, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la sarcodosis (*MacNee, 2001*).

Es importante destacar que no todas las especies reactivas presentan la misma capacidad de reacción o son igual de reactivas. Ciertos compuestos como el H_2O_2 , O_2 , NO, reaccionan de forma relativamente selectiva con solo ciertas moléculas biológicas in vivo, mientras que el radical OH^\cdot es altamente reactivo, ya que reacciona instantáneamente con cualquier molécula que encuentra (*Kohen & Nyska, 2002*).

Otra característica que diferencia los ROS, es el sitio donde actúan; los radicales libres reaccionan casi al instante en el lugar de su formación. Debido a su elevada reactividad, mientras



que los ROS no radicalarios, como el H_2O_2 , pueden atravesar membranas biológicas y extender así su campo de acción y su posible toxicidad a zonas alejadas de su lugar de formación y durante periodos de tiempo más largos (*Sawyer & Valentine, 1981; Kohen R, 2002*) (*Figura 3, anexos 5*).

3.2.3 Mecanismo de acción y principales dianas de radicales libres y especies reactivas: lípidos de membrana, proteínas y ADN

El mecanismo de ataque a las estructuras biológicas se inicia cuando el RL, le sustrae un átomo de hidrogeno o alternativamente un electrón a la molécula diana, lo que la convertirá al electrón no apareado del radical, en un par de electrones más estables. Dado que desde un punto de vista electroquímico la molécula pierde el hidrogeno o el electrón se oxida, los RL y RS se conocen como pro-oxidantes (*Figura 4, Anexo 6*).

Una de las principales dianas de los procesos de oxidación inducidos por los radicales libres son los ácidos grasos polinsaturados presentes, mayoritariamente, en las membranas celulares. El daño a los lípidos consta de tres etapas, iniciación, propagación y terminación (*Halliwell, 1993*).

La reacción de oxidación, se inicia cuando el ácido graso diana pierde un átomo de hidrogeno, convirtiéndose así en un radical lipídico. Este nuevo radical se reorganiza molecularmente para incrementar la estabilidad y reacciona rápidamente con el oxígeno, creando un radical peroxilo (ROO^{\cdot}).

Este radical peróxilo dará lugar a un hiperóxido lipídico y un nuevo radical lipídico por sustracción de un átomo de hidrogeno de un segundo ácido graso y así sucesivamente en lo que constituye la etapa de propagación. Esta cadena de reacción se conoce como peroxidación lipídica (LPO) y se va prolongando por el paso continuo de un electrón desapareado de una molécula a otra (*Figura 5, Anexo 6*).

La reacción en cadena finalizara cuando se cumpla alguna de las siguientes condiciones:

Se consuma una de las moléculas reactivas, es decir, los ácidos grasos o el oxígeno,



Se forme un radical relativamente poco reactivo o,

Dos radicales al reaccionar forman un par no radical.

Entre los productos formados durante la peroxidación lipídica se incluyen entre otros, el 4-hidroxi-2-alquenal y el Malonaldehído (MDA); este último presenta una elevada capacidad de reaccionar con las bases de ADN, por lo que puede causar lesiones mutagénicas, que pueden estar implicadas en la patogenia de varias enfermedades (*Spiteller, 2001*).

Como consecuencia, pueden aparecer pérdidas de actividad enzimática, alteraciones de funciones celulares como la producción de energía, interferencias con la creación de potenciales de membrana y cambios en el tipo y nivel de proteínas celulares. El ADN por su parte, aunque se considera una molécula bien protegida, tampoco escapa del ataque de los ROS, especialmente del radical hidroxilo (OH^\cdot) (*Kohen & Nyska, 2002*).

Los daños pueden presentarse en forma de modificaciones de las bases o roturas en las cadenas del ADN, pérdida de purinas, daños en la desoxirribosa, cruces entre proteínas y ADN y alteraciones en los sistemas de reparación de esta molécula, cuanto más estable sea un radical libre más fácilmente se forma (*Dizdaroglu, et al., 2002; Waris G, 2006*).

Los efectos de estas especies reactivas son de un rango amplio, pero tres reacciones son particularmente relevantes en la lesión celular:

Peroxidación lipídica de membranas: los radicales libres en presencia de oxígeno pueden producir peroxidación de lípidos dentro del plasma y de las membranas de las organelas. El daño oxidativo se inicia cuando los enlaces dobles de los ácidos grasos insaturados de los lípidos de membrana, son atacados por radicales libres derivados del oxígeno, particularmente el OH^\cdot .

Modificación oxidativa de proteínas: los radicales favorecen la oxidación de las cadenas laterales de los residuos de aminoácido, formación de enlaces cruzados proteína-proteína (por ejemplo, enlaces disulfuro), y oxidación del esqueleto proteico, dando lugar a la fragmentación proteica crítica mediante el complejo multicatalítico proteosoma, causando estragos en la célula.



Lesiones en el ADN: las reacciones con la timina en el ADN nuclear y mitocondrial producen roturas de una cadena del ADN. Este daño en el ADN se ha implicado en el envejecimiento celular y en la transformación neoplásica de las células.

Las células han desarrollado múltiples mecanismos para eliminar los radicales libres y por lo tanto, para minimizar la lesión. Los radicales libres son inherentemente inestables y en general, se degradan espontáneamente. Por ejemplo, el superóxido es inestable y se degrada espontáneamente en oxígeno y agua oxigenada en presencia de agua. Sin embargo, existen varios sistemas no enzimáticos y enzimáticos que contribuyen, a la inactivación de las reacciones por radicales libres las cuales son:

Los antioxidantes, los cuales bloquean el inicio de la formación del radical libre o lo inactivan, cuya función es inhibir la formación de radicales libres y detener el daño celular.

El hierro y el cobre pueden catalizar la formación de especies de oxígeno reactivo. Los niveles de estas formas reactivas se minimizan. Mediante la unión de iones a las proteínas de almacenamiento y de transporte, minimizando con ello la formación de OH.

Una serie de enzimas actúan como sistemas de eliminación de radicales libres y descomponen el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido. Estas enzimas se localizan cerca de los sitios de generación de estos antioxidantes e incluyen las siguientes:

Catalasas, presente en peroximasas, que descomponen el H_2O_2 en O_2 y H_2O .

Superóxido dismutasas, que se encuentran en muchos tipos celulares y convierten el superóxido en H_2O_2 ($2 O_2^- + 2 H \rightarrow H_2O_2 + O_2$). Este grupo incluye el magnesio-superóxido dismutasas, que se localiza en la mitocondria y la cobre-zinc-superóxido dismutasas, que se encuentra en el citosol.

Glutación peroxidasa, protege también contra la lesión al catalizar la descomposición de radicales libres. La proporción intracelular de glutación oxidado (GSSG), respecto al glutación reducido (GSH), es un reflejo del estado oxidativo de la célula y es un aspecto importante de la capacidad celular para desintoxicar.



Los RL son producidos continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de atrapamiento). Son componentes normales de células y tejidos, existiendo una poza de RL particular en cada estirpe celular y en algunos tipos celulares permiten la mejor adaptación a su hábitat. Al elevarse o disminuir las concentraciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno (ERO) puede acarrear importantes alteraciones funcionales (*Kumar, et al., 2007*).

3.2.4. Reacciones de oxidación mediadas por radicales libres

Todos estos intermediarios están implicados en las siguientes reacciones:

Daño de la célula endotelial, con el resultante aumento de la permeabilidad vascular. Los neutrófilos adherentes, cuando se activan, producen no solamente sus propias especies tóxicas, sino también estimulan la oxidación de xantina en las mismas células endoteliales, produciendo así más superóxido.

Inactivación de anti-proteasas, tales como α_1 - antitripsina. Esto da lugar a una actividad proteasa sin oposición, con destrucción aumentada de la matriz extracelular.

El suero, los líquidos tisulares y las células del huésped, poseen mecanismos antioxidantes que protegen contra estos radicales derivados de oxígeno, potencialmente dañinos. Estos antioxidantes incluyen; la proteína sérica que contiene cobre, ceruloplasmina, la fracción de suero sin hierro, o puede ser activada en varios tipos de células, la enzima catalasa, que desintoxica H_2O_2 , la glutatión peroxidasa otro poderoso desintoxicador del peróxido de hidrógeno (*Kumar, et al., 2007*).

3.2.5. Patologías relacionadas con los radicales libres.

3.2.5.1 Lesión celular

Si se sobrepasan los límites de la respuesta adaptiva a un estímulo, o en ciertas situaciones cuando la célula está expuesta a un agente lesivo o estrés, se sucede una secuencia de acontecimientos que se denomina inconcretamente lesión celular. La lesión celular es reversible hasta cierto punto, pero si el estímulo persiste o es lo bastante intenso desde el principio la célula



alcanza un “punto de no retorno” y sufre lesión celular irreversible y finalmente muerte celular (*Kumar, et al., 2007*).

La adaptación, lesión reversible y muerte celular pueden considerarse estadios de deterioro progresivo de la función y estructura normales de la célula, ya sean por respuesta al aumento de las cargas hemodinámicas (*Esquema 1, Anexo 7*).

3.2.5.2 Muerte celular

La muerte celular, es el resultado último del daño celular, es uno de los acontecimientos más cruciales en la evolución de la enfermedad de cualquier tejido u órgano. Es el resultado de diversas causas, incluyendo isquemia (falta de riego sanguíneo), infección, toxinas y reacciones inmunitarias. Además la muerte celular es una parte normal y esencial de la embriogénesis, el desarrollo y mantenimiento de la homeostasia y es el objetivo de la terapéutica contra el cáncer.

Hay dos patrones principales de muerte celular; la necrosis y la apoptosis. Diferentes tipos de estrés pueden inducir a cambios celulares y tisulares distintos de la adaptación, lesión celular y muerte.

3.2.5.3. Acumulación de radicales libres derivados de oxígeno “Estrés Oxidativo”

Las células generan energía reduciendo el oxígeno molecular a agua. Durante este proceso, se producen pequeñas cantidades de formas reactivas de oxígeno, parcialmente reducidas como un subproducto inevitable de la respiración mitocondrial. Algunas de estas formas son radicales libres que pueden dañar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Son referidos como especies de oxígenos no reactivos.

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre los sistemas generadores y limpiadores de radicales libres que dan lugar al estrés oxidativo, lo cual es una situación que se ha asociado con la lesión celular observada en muchas afecciones patológicas (*Vinay Kumar, 2007*).

El daño mediado por radicales libres, contribuyen a procesos diversos como la lesión química y por radiación, la lesión de isquemia-reperfusion (inducida por la restauración del riego sanguíneo en el tejido isquémico), el envejecimiento celular y la muerte microbiana.



3.2.5.4. Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias grandes e intermedias en la que surgen depósitos de grasas llamados placas ateromatosas, en las superficies internas de las paredes vasculares. La arterioesclerosis, en cambio, es un término general que alude al engrosamiento y rigidez de los vasos sanguíneos de cualquier tamaño (*Guyton & Hall, 2006*).

Estas a su vez aumentan la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y reduce su capacidad para liberar óxido nítrico y otras sustancias que ayudan a evitar la adhesión de macromoléculas, plaquetas y monocitos al endotelio.

Los monocitos atraviesan el endotelio, pasan a la íntima de la pared vascular y se diferencian a macrófagos, que posteriormente ingieren y oxidan lipoproteínas acumuladas. Estas células espumosas macrófagas, se agregan a paredes vasculares y forman una estría grasa visible, la cual crece y coalesce. Además los macrófagos liberan sustancias inflamatorias que inducen a una mayor proliferación del músculo liso y el tejido fibroso en la cara interna de la pared arterial (*Guyton & Hall, 2006*).

Un importante factor que provoca la aterosclerosis, es el incremento de la concentración plasmática de colesterol en forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL). La concentración plasmática de estas lipoproteínas de baja densidad, ricas en colesterol, aumentan distintas circunstancias como cuando se ingiere grasa muy saturada, con la alimentación diaria y en casos de obesidad e inactividad física.

Las medidas más importantes para evitar la aparición de aterosclerosis y su progresión hacia enfermedades vasculares graves comprenden: mantener un peso sano, realizar ejercicio físico y tomar una alimentación que contenga sobre todo grasa insaturada con bajo contenido de colesterol y evitar la hipertensión (HTA), con una dieta saludable.

La enfermedad aterosclerótica sintomática, afecta más frecuentemente a las arterias que irrigan el corazón, el encéfalo, los riñones y las extremidades inferiores. El infarto al miocardio (ataque cardíaco), el infarto cerebral (ictus), aneurismas aórticos y vasculopatías periféricas (gangrena) son las principales consecuencias de la aterosclerosis (*Kumar, et al., 2007*).



Según la clasificación de la American Heart Association, divide las lesiones ateroscleróticas en seis tipos, desde las células espumosas aisladas, llamadas “puntos grasos” a través de las fases de estrías grasas, ateromas y fibroateromas, hasta las lesiones complicadas. La historia natural, las características morfológicas y los principales acontecimientos patogénicos de la aterosclerosis.

3.2.5.5. Parkinson

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad degenerativa de los ganglios basales y del tronco, que se caracteriza por una disminución de la expresión facial, una postura inclinada, con lentitud de los movimientos voluntarios, una marcha festinante, rigidez y temblor.

Esta enfermedad también conocida como parálisis agitante, deriva de la destrucción extensa de aquella sustancia negra (la porción compacta) que envía fibras nerviosas secretoras de dopamina hacia el núcleo caudado (*Guyton & Hall, 2006*).

Se caracteriza por: rigidez de gran parte de la musculatura corporal, temblor involuntario de las zonas afectadas a un ritmo fijo de 3 a 6 ciclos por segundos incluso cuando la persona está en reposo, problemas serios para iniciar el movimiento, lo que se denomina acinesia.

3.2.5.6. Alzheimer

Una hipótesis unificada propone que los procesos oxidativos intervienen, a nivel individual o sinérgico, en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. La evidencia de estrés oxidativo en cerebro de estos enfermos procede de estudios que demuestran peroxidación lipídica, elevación de carbonilos proteicos y oxidación del DNA mitocondrial. El estrés oxidativo da lugar a compuestos reactivos derivados de los lipoperóxidos, tales como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE), los cuales inducen un espectro de modificaciones en las proteínas por entrecruzamiento o no.

El estrés oxidativo interviene en la formación de las neurofibrillas, ya que se han encontrado proteínas oxidadas en dichas formaciones intracelulares. Las pruebas evidentes de estrés oxidativo en la enfermedad de Alzheimer se basan en los siguientes aspectos.



Elevada vulnerabilidad del cerebro a la oxidación debido al elevado requerimiento de oxígeno y a los bajos niveles de GSH.

Evidencias post mortem en zonas cerebrales de enfermos de Alzheimer de elevada concentración de productos finales de oxidación, elevados niveles de proteínas modificadas por oxidación (AGE), de aumentos en la oxidación del DNA y de lípidos de membrana y modificaciones oxidativas en las marañas neurofibrilares. Procesos inflamatorios en áreas del cerebro afectadas por enfermedad de Alzheimer. Generación directa o indirecta de ROS por los agregados de β -amiloide.

3.2.6. Toxicidad de los RL

En 1954 una investigadora argentina, Rebeca Gerschman, sugirió por primera vez que los RL eran agentes tóxicos y generadores de enfermedades.

Por la alta inestabilidad atómica de los RL, colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola, perdiendo de esta manera su función específica en la célula. Si se trata de los lípidos (ácidos grasos polinsaturados), se dañan las estructuras ricas en ellas como las membranas celulares y las lipoproteínas. En las primeras se altera la permeabilidad conduciendo al edema y la muerte celular y en la segunda, la oxidación de la LDL, promueve la génesis de la placa ateromatosa.

Las características de la oxidación lipídica por los RL, tratan de una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse, se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina.

Este proceso es conocido como peroxidación lipídica, genera numerosos subproductos, muchos de ellos como el malondialdehído (MDA), cuya determinación en tejidos, plasma u orina es uno de los métodos de evaluar el estrés oxidativo.

En caso de las proteínas, se oxidan preferentemente los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina) y como consecuencia se forman entre cruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos e impiden el



normal desarrollo de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc.).

3.3 Antioxidantes

3.3.1. ¿Qué es un antioxidante?

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación, pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación, oxidándose ellos mismos. Debido a esto, es que los antioxidantes son a menudo agentes reductores tales como tioles o polifenoles.

Los antioxidantes se clasifican en dos amplios grupos, dependiendo de si son solubles en agua (hidrofilicos) o en lípidos (hidrofóbicos). En general los antioxidantes solubles en agua reaccionan con los oxidantes en el citoplasma celular y el plasma sanguíneo, mientras que los antioxidantes liposolubles protegen las membranas de la célula contra la peroxidación de lípidos.

3.3.2. Actividad Antioxidante

Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción (*Halliwell & Gutteridge, 1999*). Para que un antioxidante (AH) tenga actividad antiradicalaria debe cumplir una característica básica que es generar un radical más estable y menos dañino (RH) después de reaccionar con la especie radical (R^{\cdot}) (*Bruyne, et al., 2003*).

Esta reacción se basa en una transición redox en la que está implicada la donación de un electrón o un átomo de hidrogeno a la especie radicalaria (*Figura 6, Anexo 7*). Como resultado de esta transferencia, se formara un radical derivado del antioxidante (A^{\cdot}) que puede tener carácter inerte, estable o presentar cierta reactividad (*Cadenas, 1997*).



3.3.3. Caracterización de la actividad antioxidante

La importancia relativa de los antioxidantes que entran en escena cuando se generan ROS in vivo, depende del tipo de ROS que se forma: como, donde y que clase de daño se evalúa.

Para caracterizar la acción antioxidante de un compuesto, lo primero que se debe concretar es como el antioxidante ejerce su actividad, que si actúa directamente, es decir que si mediante el secuestro de ROS o inhibiendo su generación, o está actuando de forma indirecta es decir, por “up-regulation” de las defensas antioxidantes endógenas. Para evaluar la acción directa de los antioxidantes, que probablemente la más común in vivo, es importante plantearse y responder ciertas preguntas (*Halliwel, 1995*).

¿A que biomolécula está protegiendo el antioxidante? y ¿Es suficiente la cantidad de antioxidante que alcanza a esa diana in vivo?

¿Cómo ejerce su actividad protectora el antioxidante, por el secuestro de ROS, previniendo su formación, o reparando el daño que han producido?

Si el mecanismo de actuación del antioxidante es por secuestro de ROS ¿es posible que los radicales derivados de la actividad del propio antioxidante causen algún tipo de daño por si mismos?

Otros dos puntos importantes en la evaluación de la actividad antioxidantes son:

Que el compuesto debe utilizarse en concentraciones “reales”, es decir alcanzables in vivo.

Que se deben usar ROS biológicamente relevantes como anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot), radicales peroxilo (ROO^\cdot) y el oxígeno singlete ($^1\Delta O_2$).

3.3.4. Sistemas de defensa antioxidantes del organismo

Los sistemas antioxidante o mecanismos de defensa que ha desarrollado el organismo para protegerse de diversos “ataques” oxidativos, se clasifican en función de su origen en



sistemas antioxidantes endógenos, enzimáticos y no enzimáticos, y sistemas antioxidantes exógenos, que se adquieren a través de la dieta. Estos mecanismos incluyen modos de actuación tanto directos (interacción directa con los ROS) como indirectos (control de la producción endógena ROS, reparación de moléculas dañadas, defensa física de las dianas biológicas como las membranas, etc.).

3.3.5. Sistemas de defensa antioxidantes endógenos

3.3.5.1. Sistemas enzimáticos

Los antioxidantes enzimáticos constituyen la primera línea de defensa antioxidante y previenen el daño oxidativo interaccionando directamente con los ROS. Reaccionan con las diversas especies reactivas, cantidades para que ejerzan su protección y son reciclados eficientemente después de su actuación (*Boots, et al., 2008*). Las enzimas que forman este sistema antioxidante enzimático y las reacciones que catalizan se detallan a continuación (*Kohen & Nyska, 2002; Lozano, 2005; Halliwell, 2006*).

Superóxido dismutasa (SOD): es una metalo-enzima presente en todos los organismos aerobios que cataliza la conversión del radical superóxido en peróxido de hidrogeno, que posteriormente será convertido en agua por la catalasa (*Figura 7, Anexo 8*).

Catalasa (CAT): es una enzima ampliamente distribuida en bacterias aerobias, plantas y animales, localizada en los peroximasas y que reacciona con el peróxido de hidrogeno, para formar agua y oxígeno molecular, con donadores de hidrogeno como metanos, etanol y fenoles presentan actividad peroxidasa (*Figura 8, Anexo 8*).

Glutación peroxidasa (GPx): es una enzima dependiente de selenio que cataliza la reducción de hidroperóxidos (ROOH y H₂O₂), utilizando el glutati6n (GSH) como donador de electrones. El glutati6n oxidado que se genera (GSSG) puede ser reducido a GSH por acci6n de una glutati6n-reductasa (GRed) dependiente de NADPH (*Figura 9, Anexo 8*).



3.3.5.2. Sistemas no enzimáticos

El sistema antioxidante no enzimático constituye la segunda línea de defensa y está constituido básicamente por antioxidantes de bajo peso molecular que forman un numeroso conjunto de compuestos capaces de prevenir el daño oxidativo por interacción directa o indirecta con los ROS (*Halliwell, 1999*).

El mecanismo de acción indirecto implica principalmente la quelación de metales de transición, para evitar su participación en reacciones tipo Fenton o Haber-Weiss. Entre los compuestos que actúan por esta vía, encontramos proteínas como la ceruloplasmina, la transferrina y la lactoferrina, la haptoglobina y la albumina (*Kehrer, 2000; Vertuani, et al., 2004*).

Las moléculas que actúan de forma directa sobre las especies reactivas, lo hacen por medio de la transferencia de electrones o por medio del secuestro de radicales, evitando así que ataquen las moléculas diana. Además, suelen poseer también capacidad de quelación de metales. Por su pequeño tamaño, pueden atravesar las membranas celulares y localizarse cerca de las posibles dianas biológicas; además, la propia célula puede regenerarlas y regular sus concentraciones. Estas moléculas, aunque normalmente actúan como antioxidantes, desarrollan otras funciones biológicas en la célula. Entre estas moléculas destacan:

El tripeptido glutatión (GSH), en su forma reducida, es el antioxidante que se encuentra en mayor concentración dentro de la célula. Actúa como cofactor de la Glutatión peroxidasa (GPx), para detoxificar peróxido y es capaz de interactuar directamente con ROS como OH^\cdot , ROO^\cdot , RO^\cdot , HClO^\cdot y O_2 . También actúa como agente quelante y en diversos procesos metabólicos, como la comunicación celular o la degradación de proteínas (*Ghezzi, 2005*).

La bilirrubina y el ácido úrico se han propuesto como antioxidantes al unirse a metales e impedir reacciones tipo Fenton. El ácido úrico también es eficiente protegiendo contra el O_3 , el NO y RNS (*Becker, 1993*).



La histidina y otros compuestos de la misma familia (carnosina, anserina), que eliminan ROS por secuestro directo de radicales OH^\cdot , ROO^\cdot , RO^\cdot , uniéndose al H_2O_2 , eliminando O_2 o uniendo metales de transición (*Kohen, et al., 1998*).

La hormona melatonina, que atrapa una gran variedad de ROS además de estimular la síntesis de importantes enzimas antioxidantes (*Reiter, et al., 2001*).

3.3.6. Sistema de defensa antioxidantes exógenos

La capacidad de nuestro organismo para luchar contra las agresiones producidas por las moléculas oxidantes es limitada, por lo que necesita cierta ayuda externa. Los nutrientes básicos que ingerimos a través de la dieta (proteínas, lípidos, vitaminas y minerales), ayudan a los mecanismos de defensa internos contra todas las oxidaciones no deseadas, ya sea actuando como antioxidantes por si solos o haciendo de cofactores de los sistemas antioxidantes endógenos. Por este motivo, llevar una dieta equilibrada y variada es de vital importancia para mantener el equilibrio redox del organismo (*Diplock At Charleux, et al., 1998*).

3.3.7. Nutrientes básicos que adquirimos a través de la dieta.

Proteínas: un déficit de proteínas en la dieta provocaría una disminución en el aporte de aminoácidos como glutamina, cisteína y arginina, constituyentes de las enzimas antioxidantes, lo que causaría una sobre producción de radicales libres por disminución de estas enzimas.

Lípidos: la ingesta de ácidos grasos ω -3, disminuye el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, ya que parecen actuar como inhibidores de la producción de radicales libres aumentando la expresión de genes de antioxidantes (*Vertuani, et al., 2004*).

Vitaminas: ciertas vitaminas inhiben la producción de NO y otras actúan como secuestradoras de ROS y reguladoras de la actividad de las enzimas antioxidantes. Destacan la vitamina E (α -tocoferol), que inhibe la formación de ROS inducida por radicales lipídicos y protege a la célula de la peroxidación lipídica y la vitamina C (ácido ascórbico), una eficaz secuestradora de ROS.



Minerales: actúan como cofactores de muchas enzimas que participan en la eliminación de radicales libres. Como ejemplos, un déficit en cobre o zinc, disminuye la actividad de la superóxido dismutasa y aumenta la actividad del citocromo P-450, estimulando la producción de ROS; un aumento de hierro intra o extracelular, estimula la producción de ROS, aumentan la peroxidación lipídica y aumenta la síntesis de NO (*Powell, 2000*).

Además de todos estos nutrientes básicos a través de la dieta obtenemos también una de las principales fuentes de antioxidantes exógenos, las llamadas sustancias fitoquímicas, que son compuestos procedentes del reino vegetal de estructura química y propiedades muy variadas, que juegan un papel importante en el mantenimiento del equilibrio redox y en disminuir la incidencia del daño producido por los radicales libres, por lo que actualmente se consideran altamente beneficiosos para la salud. Aunque el interés científico por estos compuestos es relativamente reciente, durante siglos han constituido el único remedio natural existente para el tratamiento de enfermedades.

3.3.8. Antioxidantes en la prevención de enfermedades

Antioxidantes y enfermedad cardiovascular: la enfermedad cardiovascular secundaria al proceso conocido como aterosclerosis, constituye la primera causa de mortalidad e invalidez en la cuarta década de la vida. La modificación oxidativa de las lipoproteínas, particularmente las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los RL, sería uno de los mecanismos básicos de la aterogénesis.

El colesterol y los fosfolípidos de las LDL, se encuentran protegidos de la oxidación por varios agentes antioxidantes lipofílicos como, vitaminas E, B, C y ubiquinol. El antioxidante más importante en la protección de las lipoproteínas es la vitamina E, calculándose que cada molécula de esta, es capaz de proteger 500 moléculas de fosfolípidos.

3.3.8.1. Antioxidantes y cáncer

Más de 150 estudios epidemiológicos evidencian una correlación inversa entre la ingesta de antioxidantes y el riesgo de adquirir diversos tipos de tumores y tienden a señalar al beta caroteno como el agente protector en enfermedades tumorales.



Como posible mecanismo se reconoce que el ADN puede dañarse y por ende, sufrir mutaciones por lesión directa de los RL sobre las bases, o en forma directa afectando la actividad de las proteínas específicas que lo repara (proto-oncogen), o lo frena (supresores). También el tabaquismo produce un alto grado de estrés oxidativo por diversos mecanismos y al mismo tiempo poseen bajos niveles de antioxidantes.

3.3.8.2. Antioxidantes y enfermedades oculares

La directa exposición del ojo a las radiaciones ionizantes, el humo del tabaco y otros agentes generadores de RL, determina que algunas estructuras se afecten por el estrés oxidativo. Jacques y otros, observaron que los individuos con altas concentraciones plasmáticas de por lo menos 2 de los 3 antioxidantes dorsados (vitaminas E, C, B), presentaban un riesgo menor de adquirir cataratas que los individuos con valores bajos.

El estrés oxidativo, es responsable de los eventos fisiopatológicos de las enfermedades inflamatorias intestinales, hepatopatías, desórdenes neurológicos y envejecimiento, entre otras afecciones. Por otra parte, es vital el conocimiento de que se dispone en la práctica médica de antioxidantes, con eficacia demostrada en la prevención y atenuación de los efectos negativos conocidos por el estrés oxidativo.

Permitiendo con pasos agigantados que estos agentes formen parte del arsenal terapéutico de muchas enfermedades (por ejemplo el uso de la vitamina E como neuroprotector en los trastornos neurodegenerativos operados en la enfermedad de Alzheimer).

3.4. Estrés oxidativo

En los seres vivos existe un equilibrio interno entre la producción de radicales libres y la acción de los antioxidantes. Pero cuando este equilibrio se altera y se produce en exceso de oxidación frente a la capacidad antioxidante de la célula, un desequilibrio de este tipo desencadenar un cuadro de cambios fisiológicos y bioquímicos conocido como estrés oxidativo (*Halliwel & Chirico, 1993*)

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico para detoxificar rápidamente los



reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células.

Este entorno reductor es preservado por las enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Desbalances en este estado normal redox, pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN.

En el ser humano, el estrés oxidativo, está involucrado en muchas enfermedades, como: aterosclerosis, encefalopatía miálgica, sensibilidad química múltiple y la enfermedad de Alzheimer y también puede ser importante en el envejecimiento. Sin embargo, las especies reactivas de oxígeno pueden resultar beneficiosas ya que son utilizadas por el sistema inmunitario como un medio para atacar y matar a los patógenos. Las especies reactivas del oxígeno son también utilizadas en la señalización celular. Esta es denominada señalización redox (*Tabla 3, Anexo 9*).

3.4.1. Efectos químicos y biológicos

En términos químicos, el estrés oxidativo es un gran aumento (cada vez menos negativo) en la reducción del potencial celular o una gran disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión. Los efectos del estrés oxidativo, dependen de la magnitud de estos cambios, si la célula es capaz de superar las pequeñas perturbaciones y de recuperar su estado original.

Sin embargo, el estrés oxidativo severo puede causar la muerte celular y aún una oxidación moderada, puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis. Un aspecto particularmente destructivo del estrés oxidativo, es la producción de especies de oxígeno reactivo, que incluyen los radicales libres y los peróxidos.

Algunas de las menos reactivas de estas especies (como el superóxido), pueden ser convertidas por una reacción redox con metales de transición u otros compuestos de ciclo redox en quinonas, especie radical más agresiva que puede causar extenso daño celular.



La mayoría de estas especies derivadas del oxígeno se producen en un nivel bajo en condiciones normales de metabolismo aeróbico y el daño que causan a las células es reparado constantemente. Sin embargo, bajo los graves niveles de estrés oxidativo que causa la necrosis, el daño produce agotamiento de ATP, impidiendo la muerte celular por apoptosis controlada, provocando que la célula simplemente se desmorone (*Tabla 4, Anexos 10*).

3.4.2. Producción y consumo de oxidantes

La fuente más importante de oxígeno reactivo en condiciones normales, en organismos aeróbicos es probablemente la pérdida de oxígeno activado, de las mitocondrias durante el funcionamiento normal de la respiración oxidativa.

Otros enzimas capaces de producir superóxido, son la xantina oxidasa, NADPH oxidasa y citocromo P450. El peróxido de hidrógeno es producido por una amplia variedad de enzimas incluidas monooxigenasas y oxidasas. Las especies reactivas de oxígeno juegan un papel muy importante en la señalización celular, en un proceso denominado señalización redox. Así, para mantener la homeostasis celular, debe lograrse un equilibrio entre la producción de oxígeno reactivo y su consumo.

Los antioxidantes celulares mejor estudiados son las enzimas superóxido-dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa. Antioxidantes enzimáticos menos estudiados, (pero probablemente muy importantes) son la peroxirredoxina y la sulfirredoxina. Otros enzimas que tienen propiedades antioxidantes, (aunque esta no es su función primordial) incluyen la paraoxonasa, la glutatión S-transferasa, y la aldehído deshidrogenasa.

El estrés oxidativo contribuye a la lesión tisular, después de la irradiación e hipoxia. Se sospecha (aunque no está demostrado), que es importante en las enfermedades neurodegenerativas incluida la enfermedad de Lou Gehrig, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington.

También se considera que está vinculado a ciertas enfermedades cardiovasculares, ya que la oxidación de LDL, en el endotelio vascular es un precursor de la formación de placas. Además desempeña un papel en la cascada isquémica debido a los daños por la reperfusión de oxígeno



que sigue a la hipoxia. Esta cascada incluye tanto los accidentes cerebrovasculares como ataques cardíacos.

3.5. Polifenoles.

Como bien se habla de antioxidantes en la temática anterior, cabe recalcar que dentro de su clasificación se encuentra quizás el grupo más importante de compuestos llamados polifenoles, que de acuerdo a su estructura poseen actividad anti-radicalaria; que pueden actuar en diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción debido a su amplias propiedades bioquímicas y físico-químicas.

Los polifenoles son un conjunto diverso y heterogéneo de estructuras monoméricas y poliméricas, constituidas por unidades de grupos fenólicos o fenoles, que comparten la singular característica de poseer una estructura conformada por varios grupos bencenos, sustituidos a su vez por funciones hidroxílicas.

Este tipo de sustancias posee bajo puntos de fusión y puntos de ebullición elevados, debido a que forman fácilmente puentes de hidrogeno, lo que favorece su facilidad de formar compuestos más estables (*Figura 10, Anexos 11*).

Respecto a sus propiedades físico-químicas son esencialmente insolubles, se oxidan con facilidad y son bastante ácidos. Aparte de su acidez, la propiedad química más notable de un fenol, es la reactividad extremadamente elevada de su anillo a la sustitución electrofílica, en donde radicales libres, extraen un electrón de su capa más externa, para formar compuesto químicamente estable.

La acidez desempeña un papel importante incluso en la sustitución anular, ya que la ionización de un fenol genera el grupo O^- , aún más liberador de electrones que el OH^- , debido a su carga negativa (*Morrison & Boyd, 1998*).

En relación a su metabolismo se sabe que se absorben nivel intestinal, en diferentes grados ya sea en su forma nativa o modificada. Después que son metabolizados en productos detectables para el organismo y el plasma, que es donde ejercen su capacidad antioxidante, son excretados por vía biliar o urinaria.



Durante el proceso de absorción, los polifenoles son conjugados mediante procesos de metilación, sulfatación y glucorinización, primero en el intestino delgado y después en el hígado. En general los metabolitos de los polifenoles son rápidamente eliminados del plasma, lo que indica que es necesario un consumo diario de productos vegetales para mantener altas concentraciones de estos metabolitos en sangre.

Por su estructura química actúan como antioxidantes, filtran la radiación UV y se acumulan en ciertas partes de la planta. La acción farmacológica de estas moléculas es conocida desde la antigüedad y se aplica en fitoterapia como expectorantes, laxantes, purgantes, antifúngicos, astringentes, antihelmínticos y estrógenicos. De tal forma, que actúan también como antimicrobianos y antimutagénicos, inhibiendo in vitro la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), relacionadas con enfermedades coronarias.

Así mismo protegen al ADN del daño oxidativo, que tiene graves consecuencias en algunos cánceres relacionados con la edad, además inhiben la agregación plaquetaria y presentan efectos antiinflamatorios y actúan como protectores frente a la peroxidación lipídica en los glóbulos rojos. Los taninos o polifenoles poliméricos tienen una mayor actividad antioxidante que los fenoles monoméricos simples.

3.5.1. Clasificación de polifenoles

Los polifenoles se clasifican en cuatro familias en función del número de anillos fenólicos y de los elementos estructurales unidos a esos anillos: ácidos fenólicos, taninos, ligninas y flavonoides. La estructura de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta estructuras complejas como los taninos condensados (*Esquema 2, Anexo 11*).

Muchos de los polifenoles poseen diferentes capacidades antioxidantes, es quizás debido a que se encuentran relacionadas con sus estructuras químicas. Un valor sumamente importante en este estudio es que durante la estandarización de estos métodos, se hicieron pruebas con diferentes solventes, siendo el agua el mejor solvente de extracción, ya que extrae en mayor proporción polifenoles, que la acetona. Es importante recalcar que si bien un extracto acuoso presenta un poder reductor menor que el extracto obtenido con acetona, esta diferencia no es tan significativa, por lo que el tratamiento más adecuado para el objetivo de este estudio es el agua.



Esta análisis se adapta a la vida cotidiana, ya que si un individuo decide tomarse un te de albahaca no utilizara ningún tipo de solvente orgánico para prepararlo, sino agua a 90 °C, y comprobando esto experimentalmente, cabe mencionar que los métodos de extracción de polifenoles afectan la concentración de estos.

3.5.2. Estructura de los polifenoles

Estas sustancias polifenólicas constituyen un gran grupo de antioxidantes naturales, más abundantes y ampliamente distribuidos en el reino vegetal, con más de 8000 estructuras polifenólicas. Son productos del metabolismo secundario de las plantas y se encuentran en raíces, tallos, troncos, hojas y frutos.

Los flavonoides corresponden al grupo más grande de polifenoles y se conocen de estas aproximadamente 5000 estructuras. Los flavonoides son polifenoles de bajo peso molecular formados por la combinación de derivados fenilalanina y el ácido acético. Comparten una estructura común, caracterizada por tener un esqueleto difenilpropano, basado en un núcleo flavonoide formados por tres anillos conocidos como A, B y C.

El anillo aromático (A) esta condensado con un anillo de seis carbonos (C), un heterociclo oxigenado, que en posición dos tiene un anillo bencénico como sustituyente (B). Las diferencias entre los diversos grupos flavonoides se establecen por el grado de aromaticidad, (dobles enlaces conjugados), el patrón de hidroxilacion, (orden y número), el tipo de sustituciones, (glicosilacion, metilación, sulfatación) y el grado de polimerización de sus estructuras (*Figura 11, Anexo 10*).

3.5.3. Clasificación de Flavonoides

Las variaciones estructurales en los anillos permiten subdividir a los flavonoides en seis subclases: flavonoles, flavonas, flavononas, isoflavonas, flavonolas y antocianidinas. (*Esquema 3, Anexo 12*).

Entre los principales grupos de flavonoides que se clasifican de acuerdo a su actividad antioxidante según (Casadevall, 2009), se encuentran:



Flavonoles: Se presentan en forma glicosilada y se acumulan en los tejidos exteriores aéreos (epidermis y hojas), porque su síntesis esta estimulada por la luz. Estructuralmente están compuestos por un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo OH en posición 3 del Anillo C (*Figura 12, Anexo 13*).

Flavonas: las más representativas son la luteolina y la epigenina, poseen únicamente un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C, del núcleo del Flavonoide (*Figura 13, Anexo 13*).

Flavanonas: se presentan glicosiladas y las agliconas más importantes son la naringenina en el pomelo, y la hesperetina en las naranjas, su estructura corresponde a un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C, y aun Metoxi en la Posición 4 del anillo B (*Figura 14, Anexo 14*).

Isoflavonas: Se les clasifica como fitoestrogenos, por tener una estructura similar a la de los estrógenos. La más importante es la genisteina y la daidzeina. En donde el anillo B se encuentra unido en la posición 3 del anillo C (*Figura 15, Anexo 14*).

Flavanos: puede presentarse en forma monoméricas como la catequinas y en forma polimérica como las proantocianidinas, cuya estructura corresponde a un grupo OH en la posición 3 del anillo C (*Figura 16, Anexos 15*)

Antocianidinas: son inestables en la forma aglicona, constituye principalmente la antocianidina, cianidina, en la cual tiene unido el grupo OH en la posición 3, pero además poseen un doble enlace en la posición 2 y 4 del anillo C (*Figura 17, Anexos 15*).

Los polifenoles de tipo flavonoide, como flavonoles, flavonas, isoflavonas, antocianos, flavanonas, catequinas y proantocianidinas, son los antioxidantes más potentes presentes en los alimentos vegetales.

Los flavonoides debido a su heterociclo oxigenado, muestran mayor actividad que los no flavonoides. A su vez la solubilidad y los efectos estéricos de cada molécula pueden verse afectados por el tipo de estructura de dicha molécula, como es el caso de los derivados glicosilados y otros aductos, lo que puede aumentar o disminuir la actividad antioxidante.



Los flavonoides de las plantas específicamente las del te, son poderosos antioxidantes comprobados in vitro en un sistema de oxidación de lipoproteínas de (LDL), simulando al que ocurre en el cuerpo humano siendo el rango permisible de consumo en la dieta diaria entre 25 mg a 1 gr por día.

Un aspecto importante en la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en las hierbas aromáticas es quizás, que esta se ve incrementada con el número de grupos hidroxilos sustituyentes en el anillo B.

3.5.4. Beneficios de los polifenoles para la salud

Entre los mecanismos propuestos implicados en los efectos beneficiosos para la salud por los flavonoides, se encuentran el efecto antioxidante, la quelación de metales, la inhibición enzimática y la regulación génica. Se sabe que los flavonoides pueden ejercer su actividad antioxidante en numerosos sistemas biológicos, pero se ha de tener en cuenta que su distribución en estos sistemas depende de su relativa hidrofiliidad e hidrofobicidad y de sus interacciones con determinadas macromoléculas (*Saija, et al., 1995*).

Estos factores determinan la concentración local de los flavonoides lo que influye, entre otras características, en su capacidad de regular ciertos fenómenos celulares.

Gran parte del efecto protector ejercido por los flavonoides, por ejemplo de las catequinas presentes en el te, se ha atribuido a su actividad antioxidante por neutralización o secuestro de radicales libres; pero cada vez que hay más estudios que evidencian, que estos compuestos también actúan regulando ciertas actividades enzimáticas celulares y que parte de esta regulación estaría relacionada con la capacidad de los flavonoides, de alterar la estructura de la membrana celular (*Caturla, et al., 2003*).

Este efecto sobre la membrana, haría que estos compuestos ejercieran su influencia sobre diversos procesos celulares estrechamente relacionados con la membrana celular, como la señalización celular (*Spencer, et al., 2001*), el ciclo celular, el metabolismo del ácido araquidónico (*Alvarez & Orallo, 2004*) y la proliferación celular, la apoptosis y la funcionalidad de las mitocondrias (*Schoeder, et al., 2008*).



Además de su conocida capacidad como antioxidante, se sabe que los flavonoides juegan un papel más amplio en el funcionamiento del organismo y que poseen gran cantidad de actividades biológicas como son: un efecto vasodilatador, acción anticancerígena, antibacteriana y estimulante del sistema inmune (*Middleton, et al., 2000*); actúan además como antialérgicos y antivirales (*Song, et al., 2005*), tienen efectos estrógenicos e inhiben numerosas enzimas como la ciclooxigenasa, lipooxigenasa y fosfolipasa A, pero estimulan otras como la superóxido dismutasa (*Santangelo, et al., 2007*).

3.5.5. Toxicidad de los polifenoles

Debido a reconocidos beneficios para la salud la gente tiende a consumir cada vez más suplementos alimenticios y productos farmacéuticos, ricos en compuestos de origen vegetal como polifenoles e incluso recurren a la medicina natural. Pero existe poca información sobre el potencial riesgo, para la salud humana que podrían suponer estos compuestos

Ciertas sustancias presentes en las plantas expresan actividades citotóxicas y genotóxicas y muestran una relación con la incidencia de ciertos tumores, además de poder causar efectos irritantes o reacciones de tipo alérgico por el contacto con la piel u otros órganos. Por lo tanto, entender los beneficios para la salud y su toxicidad potencial de estos componentes vegetales es fundamental para garantizar su correcta y segura utilización (*Labieniec & Gabryelak, 2005*).

La determinación de la citotoxicidad y la genotoxicidad, son una parte fundamental en la evaluación de nuevos compuestos con potenciales usos, en campos como la quimioterapia o la dermatofarmacia para determinar las asociaciones riesgo-beneficio de dichos compuestos y garantizar que los productos ejerzan sus actividades, de una forma segura con el mínimo de efecto tóxico sobre el organismo.

A pesar de todo esto, los flavonoides pueden tener efectos antinutricionales debido a que pueden interactuar con algunos elementos de la dieta. Por ejemplo, una ingestión muy elevada y crónica de estos compuestos puede interferir en la absorción del hierro de la dieta y provocar anemia. Sin embargo, en general, la toxicidad de los flavonoides en una ingestión moderada, es muy poca debido a su baja absorción, rápido metabolismo y a la presencia de un sistema muy eficaz de detoxificación.



El problema es que la mayoría de estudios están hechos *in vitro*, por lo que su particularidad obedece a un sistema químico, por lo que su determinación suele ser más simple, por lo tanto probar en animales de experimentación, limita la extrapolación de resultados en el hombre.

Se ha visto que los polifenoles pueden ser tóxicos si su ingestión está entre el 1 y el 5% del total de la dieta, cosa imposible en condiciones normales, ya que lo habitual es ingerir, aproximadamente, entre 25 mg-1g por día. Aun así, conviene ser prudentes y no recomendar un consumo muy elevado de compuestos fenólicos, hasta que su bioactividad no esté mejor entendida (*Visoli, et al., 2000*).

3.5.6 Métodos para determinar actividad antioxidante.

Método TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity): mide la capacidad de un compuesto de reducir el radical catiónico ABTS⁺ (2, 2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sufonato) evaluando la disminución en la absorbancia a 734 nm. Se expresa en relación a la actividad trolox.

Método del radical HNTTM (tris (2, 4, 6 – tricloro - 3, 5-dinitrofenil) metil): dado que este radical es inerte a la captación donadora de electrones de los antioxidantes al radical

Ensayo FRAP (ferric - reducin antioxidant power): mide la capacidad de una muestra de reducir el complejo incoloro tripiridiazina ferrica (Fe³⁺- TPTZ) al complejo azulado tripiridiazina ferrosa (Fe²⁺- TPTZ) que presenta absorbancia a 593 nm (*Casadevall, 2009*).

IV. DISEÑO METODOLÓGICO



IV. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de estudio

El presente trabajo que se realizó es una investigación de tipo experimental, descriptiva y transversal.

4.2 Área y tiempo de estudio.

4.2.1 Área de estudio

Las muestras son recolectadas del “Centro experimental campos azules”, Masatepe, del departamento de Masaya. Estas plantas son comercializadas en tres viveros del departamento de Carazo- Jinotepe.

4.2.2 Tiempo de estudio

El presente estudio se realizó a partir del mes de octubre 2011, hasta marzo 2012.

4.3 Población de estudio

El universo de la población está constituido por 40 subespecies de albahaca que provienen de la familia de Lamiaceae, que pertenecen al género *Ocimum* y especie *basilicum*.

4.4 Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra corresponde a tres plantas por cada subespecie, las cuales son *Ocimum basilicum minimum*, *Ocimum basilicum sanctum*, *Ocimum basilicum crispum*.

4.5 Muestreo

La selección de la población de estudio, fue a través de un muestreo por conveniencia, no probabilístico, identificando las subespecies o variedades de uso popular, teniendo en cuenta que se eligieron tres especies de albahaca de acuerdo a sus características taxonómicas y morfológicas.



4.6 Criterios de selección

4.6.1 Criterios de Inclusión

Se incluyen todas aquellas plantas de albahaca que pertenecen a la familia de las Lamiaceae, que sean del genero *Ocimum*, y que pertenezcan a la especie *basilicum*.

4.6.2 Criterios de exclusión

No pertenecen a este estudio todas aquellas subespecies o variedades de albahaca que se ven afectadas por factores climáticos, ya que su cosecha puede incidir en la aparición de sesgos, debido a que son sensibles a las heladas y a temperaturas extremadamente altas, por lo que ameritan climas cálidos y húmedos, de tal forma que se excluyeron aquellas plantas que no fueron cultivadas bajo las mismas condiciones.

4.7 Tipo de fuente de información, recolección y procesamiento de datos

Para la obtención de las muestras se elaboró una ficha de recolección de datos, para obtener la información necesaria de la planta, esta ficha es una modificación de la que emplea la organización mundial de la salud, (OMS), para la recolección de plantas medicinales (*Organizacion Mundial de la Salud, 2003*) (*Ficha 1, Anexos 16*).

Las subespecies de albahaca analizadas, proceden del centro experimental campos azules, Masatepe las cuales son transportadas a viveros en el departamento de Carazo.

Se recolectaron las muestras por conveniencia, de los diferentes viveros las cuales fueron trasladadas, hasta el laboratorio de Biociencia de la UNAN-Managua para el análisis.

Seguidamente se procedió a seguir el protocolo de estandarización basado en espectrofotometría de absorción Ultravioleta-visible (UV), que consiste en la determinación de la concentración en polifenoles, a través del método de Folin-ciocalteau.

Así mismo de manera análoga, se aplicó para el método de decoloración del radical DPPH, para la determinación de la actividad antioxidante en subespecies de Albahaca.



La fuente de obtención de datos es primaria, ya que se procesaron a través de un espectrofotómetro Biospec-mini/DNA/RNA/Protein analyzer, marca Shimadzu Biotech.

Durante la recolección de datos se utilizaron dos fichas que corresponden a tablas, clasificadas por, número, código, peso de la muestra (mg), Absorbancia (nm), concentración de la muestra ($\mu\text{g/ml}$) en el caso de la cuantificación y porcentaje de decoloración del radical DPPH (%), para la determinación de la actividad antioxidante (*Ficha 2,3; Anexos 18, 19*).

4.8 Variables según los objetivos

Objetivo 1

Subespecies de Albahaca

Concentración de polifenoles

Objetivo 2

Subespecies de Albahaca

Actividad antioxidante

Objetivo 3

Correlación entre concentración de polifenoles y actividad antioxidante.



4.9 Operacionalización de variables

Variable	Definición Operacional	Indicadores	Escala/Valor de Medición	Tipo de Variable
Especies de albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>)	Variedad de las especies como, color de la planta, raíz, tamaño del tallo y hoja.	Propiedades taxonómicas y morfológicas.	Los valores se expresaran de forma categórica. <i>Ocimum basilicum</i> <i>minimun</i> <i>Ocimum basilicum sanctum</i> <i>Ocimum basilicum crispum</i>	Nominal
Cuantificación de polifenoles	Concentración de polifenoles presentes en las diferentes especies de <i>Ocimum basilicum</i> expresados como equivalente gramos, haciendo uso del método de Folin-Ciocalteu.	Espectrofotómetro Biospec-mini/DNA/RNA/Protein analyzer	Los valores se expresan de forma numérica [310-430 µg-ml] Baja [431-536 µg-ml] Media [537-589 µg-ml] Alta	Ordinal Continua
Actividad antioxidante	Es la capacidad que poseen los polifenoles en detener o retardar los procesos oxidativos, mediados por radicales libres.	Espectrofotómetro Biospec-mini/DNA/RNA/Protein analyzer	Los valores se expresan de forma numérica [70-80%] Baja [81-90%] Media [91-100%] Alta	Ordinal Continua



4.10 Control de sesgos de información y selección

4.10.1 Control de sesgos de información

Para controlar el error en los datos, se utilizaron instrumentos de medición mecánicos como el espectrofotómetro Biospec-mini/DNA/RNA/Protein analyzer, marca Shimadzu Biotec, así mismo herramientas estadísticas y quimiométricas, haciendo un análisis por triplicado entre cada muestra a analizar.

4.10.2 Control de sesgos de selección

En el presente estudio existen sesgos de selección ya que las muestras analizadas fueron elegidas por conveniencia. Por lo que para controlar los sesgos que pueden producir errores sistemáticos y puedan interferir con la validez del estudio, entre la correlación de la cuantificación de polifenoles y la actividad antioxidante de las diferentes especies, se incremento la población a tres plantas por especie, debido a que no se pudieron analizar mayores cantidades de plantas, ya que se cuenta con un presupuesto estimado para esta investigación.

4.11 Plan de Análisis

Según el tipo de variable analizada se expresaron, para los categóricos valores absolutos y relativos. Para las variables numéricas normales se aplicaron promedios y desviación estándar. Se comparó de forma descriptiva cual de las subespecies, es la que posee mayor concentración de polifenoles y cual es la que tiene mayor actividad antioxidante.

De acuerdo a las variables numéricas de concentración de polifenoles y actividad antioxidante se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson, para determinar la relación que existe entre estas dos variables, así mismo se utilizo el test de Kruskal-Wallis para demostrar la significancia estadística de las muestras.

Los resultados recolectados en las diferentes fichas de datos se analizaron en el programa de Microsoft Excel 2010, se hicieron uso de gráficos de dispersión, para determinar la linealidad de las curvas de calibración, así como el uso de fórmulas para establecer las concentraciones de la actividad antioxidante y cuantificación de polifenoles.



Se usaron tablas simples para representar los valores obtenidos de las tres especies, cuya escala es nominal, que corresponden a todas las concentraciones de polifenoles obtenidas de las diferentes subespecies estudiadas.

Los resultados de actividad antioxidante fueron representados mediante gráficos de pastel, para demostrar de acuerdo a su proporcionalidad cual de las especie en porcentajes, es la que posee mayor actividad antioxidante.

4.12. Métodos a utilizar

Para la cuantificación de polifenoles libres y solubles, se utiliza el método cuantitativo basado en la espectrofotometría de absorción visible.

Preparación de la curva de estandarización

1. A partir de la solución stock de 100 $\mu\text{g/ml}$ de ácido gálico realizar diluciones de 1, 2, 4, 6, 8, 9, 10 $\mu\text{g/ml}$ en agua desionizada.

Tubos estándar	Stock ácido gálico (100 $\mu\text{g/ml}$)	Agua desionizada a 90 $^{\circ}\text{C}$	Volumen total (ml)	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
1	1	9	10	10
2	2	8	10	20
3	4	6	10	40
4	6	4	10	60
5	8	2	10	80
6	9	1	10	90
7	10	0	10	100

2. Realizar la reacción colorimétrica tomando 50 μl de cada dilución.
3. Añadir 100 μl de reactivo de Folin-Ciocalteu.
4. Agregar 850 μl de 0.4 M Na_2CO_3 .
5. Incubar las muestras en baño María a 42 $^{\circ}\text{C}$ por 9 minutos.
6. Dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos. Proteger las muestras de la luz directa.
7. Tomar 1 ml de cada muestra y transferirlo a las cubetas de medición.
8. Medir la absorbancia a 765 nm.



Preparación de los reactivos

Reactivos	Especificaciones del reactivo	Preparación	Recomendaciones
80% Metanol	Metanol puro	Mezclar 80 ml de metanol puro con 20 ml de agua desionizada.	Preparar semanalmente y almacenar a 4 ^o C.
dI-dH ₂ O	Agua desionizada		Mantener a temperatura ambiente.
1.2 M HCl	Acido clorhídrico con una pureza de 37%	Mezclar 5 ml de HCl con 45 ml de metanol puro	Preparar semanalmente y almacenar a 4 °C, para evitar la evaporación
25% Folin-Ciocalteu	2N Folin-Ciocalteu	Para la preparación utilizar un recipiente color ámbar. Mezclar 2.5 ml de F-C con 7.5 ml de agua desionizada	Preparar semanalmente y almacenar a temperatura ambiente. Agitar la mezcla antes de usar
0.4 M Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio, grado analítico	Disolver 4.25 g de Na ₂ CO ₃ en 100 ml de agua desionizada	Asegurarse de que todo el Na ₂ CO ₃ se ha disuelto. Preparar diario y almacenar a temperatura ambiente
Stock de ácido gálico (100µg/ml)		Para la preparación utilizar un recipiente color ámbar. Disolver 10 mg de ácido gálico en 100 ml de metanol puro.	Preparar semanalmente a 4°C, para evitar la evaporación. Agitar la mezcla antes de usar.
0.1 M Tris-HCl	PH 7.5	Mezclar 5 ml de Tris-HCl en 95 ml de agua desionizada	Preparar semanalmente y almacenar a temperatura ambiente
0.3 Mm DPPH	2,2-diphenyl-1picril-hidrazyl	Para la preparación utilizar un recipiente color ámbar. Disolver 11.82 mg del reactivo de DPPH en 100 ml de metanol puro.	Preparar diario



4.12.1 Método folin-ciocalteu (FC).

El método FC, se basa en la transferencia de electrones del compuesto antioxidante al molibdeno que contiene el reactivo FC, formándose un complejo azulado que presenta absorbancia a 765 nm.

Extracción de polifenoles libres y solubles por el método de Folin-Ciocalteu

1. Lavar las hojas de albahaca
2. Pesar 10 mg de hoja de albahaca, de cada una de las especies por triplicado.
3. Macerar las hojas de albahaca en un tubo eppendorf con un mini mortero en 300 μ l de agua desionizada a 90⁰C.
4. Añadir 1000 μ l de agua destilada a 90 °C
5. Incubar las muestras en el horno a 90 °C por 30 minutos, agitando las muestras cada 5 a 10 minutos.
6. Dejar enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
7. Centrifugar a 14000 rpm, a 20 °C por 5 minutos.
8. Extraer el sobrenadante cuidadosamente y transferirlo a un nuevo tubo eppendorf.
9. Realizar la reacción colorimétrica.

Reacción colorimétrica por el método de Folin-Ciocalteu

1. Para realizar la reacción colorimétrica es necesario diluir las muestras 5 veces para los polifenoles libres y solubles.

Polifenoles libres y solubles		
Extracto μ l	Agua desionizada μ l	Volumen total μ l
20	80	100

2. Añadir 20 μ l de extracto en un tubo eppendorf.
3. Agregar 40 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteu.
4. Añadir 940 μ l de 0.4 M Na₂CO₃
5. Incubar las muestras en baño maría a 42 °C por 9 minutos.
6. Dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos. Proteger las muestras de la luz directa.
7. Tomar 1 ml de cada muestra y transferirlo a las cubetas de medición.
8. Medir la absorbancia a 765 nm.



4.12.2 Método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)

El 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), se basa en la reducción del radical por captación de un átomo de hidrogeno, al añadir el antioxidante. Se cuantifica midiendo la disminución de absorbancia a 517 nm. Se emplea sobre todo para determinar la eficacia antiradicalaria de compuestos fenólicos.

Medición de la actividad antioxidante por el método de decoloración del radical DPPH.

1. Tomar 40 µl de extracto de polifenoles
2. Adicionar 60 µl de metanol al 80%.
3. Añadir 400 µl de 0.1 M de Tris-HCl (pH 7.5)
4. Agregar 500 µl de reactivo 0.3 Mm DPPH.
5. Dejar reposar a temperatura ambiente por 20 minutos.
6. Transferir 1 ml de la muestra a las cubetas de medición.
7. Medir la absorbancia a 517 nm.
8. Calcular el porcentaje de decoloración del reactivo DPPH por medio de la siguiente formula

$$\% \text{ decoloración del DPPH} = \left(1 - \frac{\text{Abs de la muestra}}{\text{Abs del blanco}} \right) \times 100$$

Donde Abs de la muestra, es la mezcla, (DPPH, metanol al 80 %, Tris-HCl, extracto), y Abs del blanco es (DPPH, metanol al 80 %, Tris-HCl).

V. RESULTADOS



V. RESULTADOS OBTENIDOS

Los resultados que se obtuvieron en este estudio, fueron a través de la aplicación de herramientas estadísticas, como fue el coeficiente de correlación de Pearson, entre la actividad antioxidante y la concentración de polifenoles cuyo valor fue de 0.28, así mismo se utilizó el test de Kruskal-Wallis para determinar la significancia estadística entre las muestras, de las diferentes variedades de albahaca, tanto para concentración de polifenoles con un valor de $(0,561 > \alpha)$, y para actividad antioxidante cuyo valor de p corresponde a $(0.193 > \alpha)$.

TEST DE KRUSKAL-WALLIS			
Rangos			
Variable	Variedades de la especie de albahaca	N	Rango de significancia
Concentraciones de polifenoles	<i>O. B. crispum</i>	3	5,33
	<i>O. B. minimun</i>	3	6,00
	<i>O. B. sanctum</i>	3	3,67
	Total	9	

Test Estadístico ^{a,b}	
Pruebas	Concentración de polifenoles
Chi-Cuadrado	1,156
df	2
Asymp. Significancia.	0,561



TEST DE KRUSKAL-WALLIS			
Rangos			
Variable	Variedades de la especie de albahaca	N	Rango de significancia
Actividad antioxidante	<i>O. B. crispum</i>	3	2,67
	<i>O. B. minimum</i>	3	6,00
	<i>O. B. sanctum</i>	3	6,33
	Total	9	

Test Estadístico ^{a,b}	
Pruebas	Actividad antioxidante
Chi-Cuadrado	3,289
df	2
Asymp. Significancia.	0,193

Las cuales sirvieron para el análisis de resultados durante la estandarización del método de extracción y cuantificación de polifenoles; haciendo uso del método de Folin-Ciocalteu, así mismo se trabajó en la adaptación de esta técnica, para la determinación de la actividad antioxidante por el método del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, (DPPH).

En cuanto al muestreo para la selección de la población de estudio, se analizaron tres plantas por cada subespecies de albahaca que corresponde a *Ocimum basilicum crispum*, *Ocimum basilicum sanctum* y *Ocimum basilicum minimum*, para eliminar los sesgos en la información entre cada planta estas se cuantificaron por triplicado así como en su actividad. Estos valores que se presentan corresponden a una masa de 10 mg.

Polifenoles libres y solubles

Ocimum basilicum crispum (O.B.C.)

Con respecto a las concentraciones de polifenoles libres y solubles obtenidos mediante la ecuación de regresión en $\mu\text{g/ml}$ de ácido gálico equivalente, para la subespecie *Ocimum*



basilicum crispum en la planta numero 1, corresponde un valor de 438.16 $\mu\text{g/ml}$ de AGE, sin embargo para la planta numero 2 la concentración fue de 447.17 $\mu\text{g/ml}$ de AGE, en el caso de la subespecie tres de *O.B. crispum* hay una disminución en comparación con la anterior cuyo valor es de 441.51 $\mu\text{g/ml}$ de AGE.

Concentración de polifenoles libres y solubles en tres subespecies de albahaca expresados en ($\mu\text{g/ml}$ de ácido gálico equivalente)	
Subespecie de <i>Ocimum basilicum</i>	Concentración de polifenoles libres y solubles ($\mu\text{g/ml}$ de ácido gálico equivalente)
<i>Ocimum basilicum crispum</i> planta 1	438.16
<i>Ocimum basilicum crispum</i> planta 2	447.17
<i>Ocimum basilicum crispum</i> planta 3	441.51

Ocimum basilicum sanctum (O.B.S.)

En el caso de esta subespecie hay un ligero aumento en las concentraciones con respecto a la subespecie *crispum*, cuyos datos son para *O.B. sanctum* en la planta numero uno, de 443.59 $\mu\text{g/ml}$ de AGE, para la segunda muestra fue de 441.16 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo el tercer valor de este tipo de albahaca corresponde a 435.09 $\mu\text{g/ml}$ de AGE.

Concentración de polifenoles libres y solubles en tres subespecies de albahaca expresados en ($\mu\text{g/ml}$ de ácido gálico equivalente)	
Subespecie de <i>Ocimum basilicum</i>	Concentración de polifenoles libres y solubles ($\mu\text{g/ml}$ de ácido gálico equivalente)
<i>Ocimum basilicum sanctum</i> planta 1	443.59
<i>Ocimum basilicum sanctum</i> planta 2	441.16
<i>Ocimum basilicum sanctum</i> planta 3	435.09



Ocimum basilicum minimum (O.B.M.)

Este tipo de subespecie fue la que presento los valores mas altos, teniendo en cuenta que la variabilidad entre cada una de estas variedades de albahaca, no es tan significativa. Sin embargo las concentraciones fueron para la subespecie numero uno de *O. B. minimum* de 448.66 $\mu\text{g/ml}$ de AGE, para la numero dos de 446.95 $\mu\text{g/ml}$, y el ultimo valor que pertenece a la planta numero tres es de 435.82 $\mu\text{g/ml}$.

Concentración de polifenoles libres y solubles en tres subespecies de albahaca expresados en (μg-ml de ácido gálico equivalente)	
Subespecie de <i>Ocimum basilicum</i>	Concentración de polifenoles libres y solubles ($\mu\text{g/ml}$ de acido gálico equivalente)
<i>Ocimum basilicum minimum</i> planta 1	448.66
<i>Ocimum basilicum minimum</i> planta 2	446.95
<i>Ocimum basilicum minimum</i> planta 3	435.82

Actividad Antioxidante

Ocimum basilicum crispum (O.B.C.)

De acuerdo a la actividad antioxidante expresada en porcentaje de decoloración del radical DPPH, de polifenoles libres y solubles, se obtuvieron porcentajes del 84.32 % para *O. B. crispum* numero uno y 88.00 % para *O.B.C.* numero dos, teniendo en cuenta que para la muestra *O.B.C.* tres corresponde al 88.97%, este porcentaje fue más alto en comparación, con la muestras anteriores de *O.B.C.*



Actividad Antioxidante en tres subespecies de Albahaca expresadas en porcentaje de decoloración del radical DPPH (%)	
Subespecie de <i>Ocimum basilicum</i>	Actividad antioxidante (%)
<i>Ocimum basilicum crispum</i> planta 1	84.32
<i>Ocimum basilicum crispum</i> planta 2	88.00
<i>Ocimum basilicum crispum</i> planta 3	88.97

Ocimum basilicum Sanctum (O.B.S.)

En cuanto a actividad antioxidante las muestras de *O.B.S.*, presento el valor más alto la planta numero tres el cual fue del 93.35%, en cambio para la muestra de *O.B.S.* numero uno su valor corresponde al 90.52%, sin embargo en la muestra *O.B.S* dos obtuvo el porcentaje de 91.38% respectivamente. En el análisis de esta disyuntiva, se obtiene como resultado que la actividad antioxidante in vitro, no es directamente proporcional a la cuantificación de polifenoles.

Actividad Antioxidante en tres subespecies de Albahaca expresadas en porcentaje de decoloración del radical DPPH (%)	
Subespecie de <i>Ocimum basilicum</i>	Actividad antioxidante (%)
<i>Ocimum basilicum sanctum</i> planta 1	90.52
<i>Ocimum basilicum sanctum</i> planta 2	91.38
<i>Ocimum basilicum sanctum</i> planta 3	93.35



Ocimum basilicum minimum (*O.B.M*)

Esta subespecie obtuvo una mayor actividad antioxidante con respecto a la otras subespecies de albahaca, cuyos valores para la variedad uno de *O.B.M.* fue del 91.81%, en el caso de la muestra numero dos, el valor fue de 94.07 %, el cual fue el valor mas alto de en este estudio, con respecto a la subespecie numero tres, el dato refleja un 87.75% de actividad antioxidante.

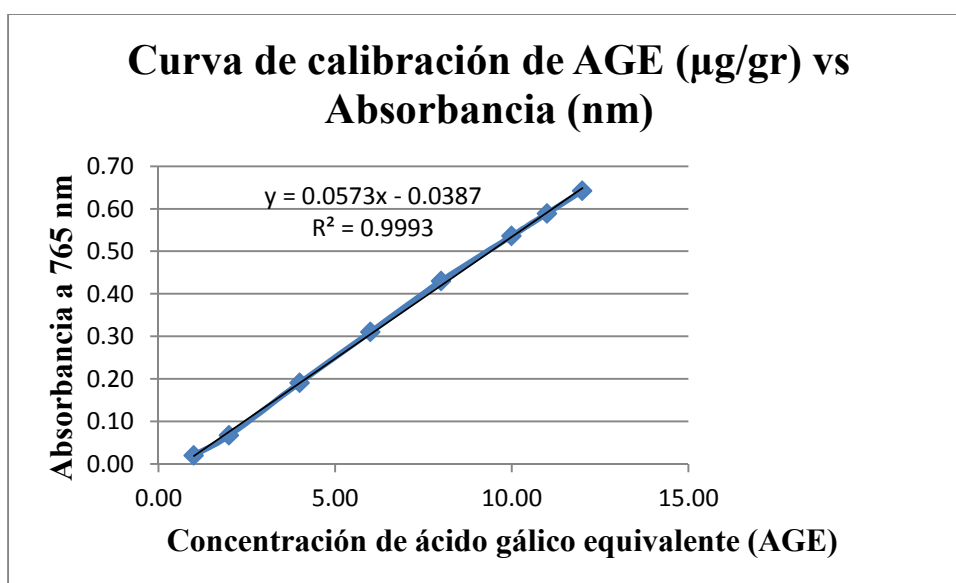
Actividad Antioxidante en tres subespecies de Albahaca expresadas en porcentaje de decoloración del radical DPPH (%)	
Subespecie de <i>Ocimum basilicum</i>	Actividad antioxidante (%)
<i>Ocimum basilicum minimum</i> planta 1	91.81
<i>Ocimum basilicum minimum</i> planta 2	94.07
<i>Ocimum basilicum minimum</i> planta 3	87.75

VI. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS



VI. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

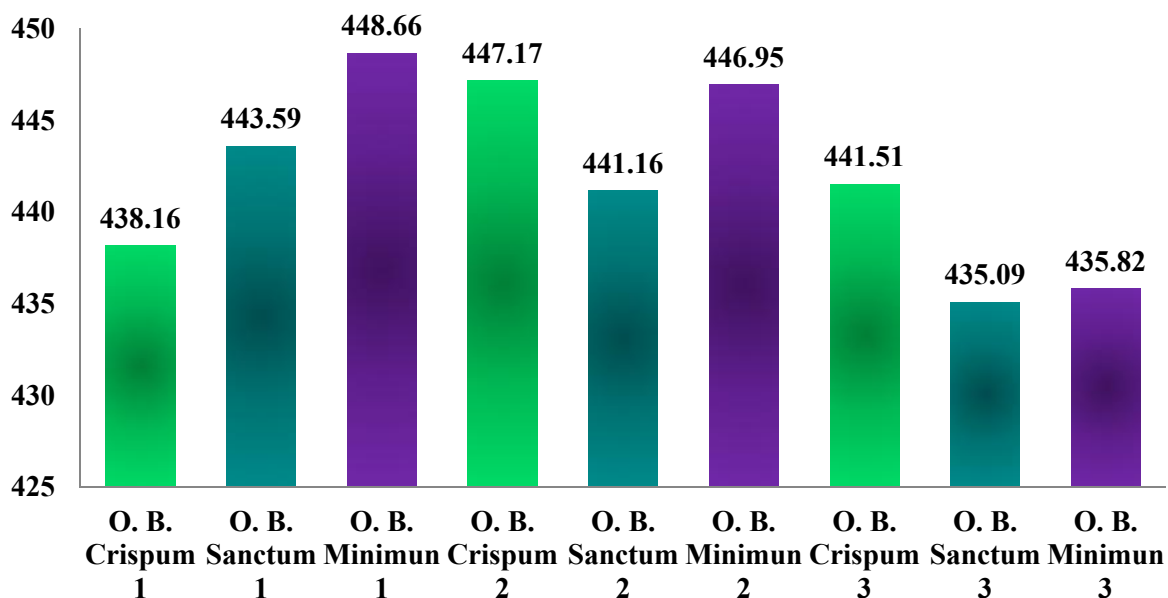
Con este estudio se determinó la concentración de polifenoles libres y solubles, mediante la calibración del método o ensayo de Folin-Ciocalteu, empleando ácido gálico como patrón con una concentración de 100 µg/ml. La calibración de la curva fue analizada mediante la técnica estadística del coeficiente de correlación de Pearson (R^2), con el objetivo de obtener una curva de calibración que vincule las concentraciones de ácido gálico con las absorbancias obtenidas por el analito.



Cuyos valores en las plantas que presentaron mayor contenido fenólico fueron para *Ocimum basilicum crispum* de 447.17 µg/ml, para *Ocimum basilicum sanctum* 443.59 µg/ml, y para la subespecie *Ocimum basilicum minimum* el dato fue de 448.66 µg/ml. Estos valores expresados de forma numérica corresponden a una concentración media entre 431-536 µg/ml, este valor fue obtenido mediante la curva de calibración de ácido gálico, cuyas concentraciones en las diferentes muestras de albahaca se encuentran comprendidas entre este rango.



Concentración de Polifenoles libres y solubles expresadas en



En cuanto a la actividad antioxidante que presentaron estos compuestos fenólicos los valores no tuvieron un efecto significativo, ya que los valores reportados de $p > 0.05$ según el test de Kruskal-Wallis tanto para actividad antioxidante como para concentración de polifenoles, el cual fue calculado con el objetivo de separar y estimar las diferentes causas de variaciones debido al error de los valores medios obtenidos, lo que permitió contrastar la diferencia entre las medias muestrales.

Analizando lo antes mencionado con respecto al valor de p , se acepta la hipótesis nula que dice que no hay diferencia significativa entre las muestras y variedades de albahaca, debido a que no existe una gran magnitud y tamaño muestral de las variables de estudio, donde según (*Eileen M. et al., 2011*), los valores reportados fueron de 0.004 donde demuestran que hay diferencias sobre los niveles de compuestos fenólicos, esto es debido a que en este estudio se analizaron grandes cantidades de albahaca bajo las mejores condiciones.



Por lo tanto la actividad antioxidante depende del poder reductor que tengan los diferentes estructuras químicas de polifenoles, sin embargo los valores en las plantas que presentaron mayor actividad antioxidante fueron para, *Ocimum basilicum sanctum* del 93.35 %, *Ocimum basilicum minimun* del 94.07 %, y por ultimo para *Ocimum basilicum crispum* fue del 88.97 %.



Estos valores numéricos que se encuentran en el rango entre el 81 al 90 %, corresponden a una actividad antioxidante media, como es en el caso de la subespecie *crispum*, sin embargo las otras dos subespecies *sanctum* y *minimun*, corresponden a un rango entre el 91 al 100 % por lo que su actividad antioxidante es alta, estos valores categóricos fueron clasificados de acuerdo a los valores bajos y altos obtenidos durante su determinación.

Mediante la determinación del coeficiente de correlación de Pearson, se pudo verificar que no existe ninguna relación entre variable actividad antioxidante y la variable concentración de polifenoles libres y solubles. Dando un valor de R^2 de 0.28. Ya que r puede tomar valores en el intervalo $-1 \leq r \leq +1$, donde un valor de r de -1 describe una correlación negativa perfecta, de manera similar cuando r es igual a $+1$, se tiene una correlación positiva perfecta. Sin embargo, esto es debido a que no se sabe de manera específica cual es la estructura química que posee mayor actividad, ya que en el momento de su extracción se extrae de manera general.



Haciendo hincapié en este resultado se puede decir que sus estructuras químicas están relacionados con su actividad, debido a que entre más grupos sustituyentes OH posean estos polifenoles, su capacidad de donar electrones o átomos de hidrógenos, a los radicales libres aumentará, de tal forma que se neutralizan volviéndose compuestos químicamente estables, cuya importancia de estos antioxidantes radica en la inhibición de procesos de peroxidación lipídica, que están asociados a enfermedades neurodegenerativas y el cáncer.

VII. CONCLUSIONES



VII. CONCLUSIONES

Con respecto a la concentración de polifenoles libres y solubles los resultados indican de manera descriptiva un valor de 448.66 $\mu\text{g/ml}$ de AGE para la subespecie *Ocimum basilicum minimum*, siendo esta subespecie la que presenta el valor más alto en comparación con las otras subespecies analizadas, en cuanto al Test de Kruskal-Wallis realizado entre las subespecies se concluye que no hay ninguna diferencia significativa.

Para los valores de la actividad antioxidante analizados de forma descriptiva, el valor más alto corresponde a un 94.07 % de la subespecie *Ocimum basilicum minimum* y el test de Kruskal-Wallis muestra que no hay diferencia significativa entre las subespecies analizadas.

No existe ninguna correlación entre la actividad antioxidante y la concentración de polifenoles libres y solubles de acuerdo a la determinación del coeficiente de correlación de Pearson, ya que no se sabe de manera específica cual de las estructuras de polifenoles extraídas es la que posee potencial antioxidante

VIII. RECOMENDACIONES



VIII. RECOMENDACIONES

Realizar futuras investigaciones, donde se plantee la identificación de los polifenoles que poseen mayor actividad antioxidante, ya que de esa manera aportaran mayores beneficios a la salud.

Se recomienda hacer un muestreo aleatorio simple, en donde se obtengan muestras representativas del universo que esta comprendido entre 40 a 60 subespecies a nivel global.

Es recomendable para futuros estudios cultivar la albahaca bajo las mejores condiciones climáticas y de suelo, para obtener resultados de calidad.

Analizar la actividad antioxidante de compuestos fenólicos en la albahaca a través de diferentes métodos para relacionar su potencial en la captación de radicales libres.

IX. BIBLIOGRAFÍA



IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez, E. & Orallo, F., 2004. Los flavonoides (I): biodisponibilidad, acción antiinflamatoria e inmunorreguladora.. *El farmacéutico*, p. 313.
2. Ames, 1990. Dietary pesticides (99.99% all natural). *proc Natl Acad sci USA*.
3. Becker, 1993. Towards the physiological function of uric acid free radical *biol med.* pp. 14, 615-631.
4. Boots, A. W., Haenen, G. R. & Bast, A., 2008. Health effects of quercetin from antioxidant to nutraceutical. *Eu J Pharmacol.* pp. 585, 325-337.
5. Bruyne, T. D. et al., 2003. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *curr med chem.* pp. 11, 1345-1359.
6. Cadenas, 1997. Basic mechanisms of antioxidant activity. *biofactors.* pp. 6, 391-397.
7. Carlsen, M. H. et al., 2010. The total antioxidant contents of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements use worldwide. *Nutrition Journal*.
8. Casadevall, V. U., 2009. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. *Universitat de Barcelona*, p. 45.
9. Caturla, N. et al., 2003. The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Rad Biol Med.* pp. 34, 648-662.
10. Davis, 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals I General aspects *J. biol chem.* pp. 262, 9895-9901.
11. Diplock At Charleux, J. L. et al., 1998. Functional food science and defense against reactive oxidative species *Br J Nutr* 80 (suppl1).
12. Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. & Rodriguez, H., 2002. free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *free radic biol hed.* pp. 32, 1102-1115.
13. Echavarria, B., Franco S., A. & Martínez M, A., 2009. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe colombiano. *Vitae*, pp. 126-131.
14. Eileen M. et al., 2011. variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*ocimum basilicum* L.) cultivars. *food chemistry*.



15. Elsayed & Bendich, 2001. Dietary antioxidants: potencial effects on oxidative products in cigarette smoke. *Nutre Res.* pp. 21, 551-567.
16. Fenton, H. J., 1894. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem soc. Trans.*
17. García Bacallao, L., García Gómez, L. V., Rojo Dominguez, D. M. & Sánchez García, E., 2001. Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista Cubana Invest Biomed.*
18. Garcia Poveda, J. & Fuentes, E., n.d. Fraccionamiento biodirigido del extracto etanolico del dedrella odorata con actividad antioxidante y citotóxica.. *Campus medico, UNAN-Leon.*
19. Ghezzi, 2005. Regulation of protein function by glutathionylation free radical.. pp. 39, 573-580.
20. Guyton, A. C. & Hall, J. E., 2006. Tratado de fisiología medica. In: *Tratado de fisiología medica. s.l.:s.n., pp. 68: 848-851.*
21. Halliwell, B., 1995. Antioxidant Characterization-Methodology and mechanism *biochem pharmacol.* pp. 49, 1341-1348.
22. Halliwell, B., 1999. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress-new approaches for their evaluation. *biomed pharmacother.* pp. 53, 181-192.
23. Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *plant physiol.* pp. 141, 312-322.
24. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M., 1999. *free radicals in biology and medicine ed. oxford: oxford University Press, RU.*
25. Halliwell & Chirico, S., 1993. lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J clin Nutr.* pp. 57, 751-725.
26. Jaime Lopez, M. & Salazar Cabrera, F., 2009. Evaluacion de la actividad antioxidante en los extractos metanolicos de 7 especies vegetales. *Laboratorio control de calidad de medicamentos, UNAN- Leon.*
27. Kehrer, 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *toxicology.* pp. 149, 43-50.
28. Kim, et al., 2006. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death.



29. Kohen R, N. A. 2., 2002. oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *toxicol pathol.* pp. 30, 620-650.
30. Kohen, R. & Nyska, A., 2002. oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *toxicol pathol.*
31. Kohen, Yamamoto, Y., Cundy, K. C. & Ames, B. N., 1998. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain *proc. natl acad sci USA.* pp. 85, 3175-3179.
32. Kumar, V., Abbas, A. K. & Fausto, N., 2007. Patología estructural y funcional. In: Patología estructural y funcional. s.l.:s.n.
33. Lozano, 2005. Nous derivats of flavonols aboutr subproducts vegetals. sintesis, purificacion and evaluation of capacitat anti-radicalaria and pro-apoptotica in cells no tumorals; canceroses..
34. MacNee, 2001. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J pharmacol.*
35. Middleton, E., Kadaswami, C. & Theoharides, T. C., 2000. The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev..* pp. 52, 673-751.
36. Molovi, B., Rosouli, N., Mehta & Sinha, A. K., n.d. Oxidative stress in diabetes: A mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. *Int J Biochem cell biol.* pp. 38, 794-803.
37. Morrison, R. T. & Boyd, R. N., 1998. Química Organica. Quinta Edicion ed. Naucalpan de Juarez: Pearson Addison Wesley.
38. Negaresh, S., 2010. Propiedad antioxidante del cacao nicaraguense proveniente de la Raas, Rio san juan, Granada y productos alimenticios con contenido de cacao de managua., Managua: s.n.
39. Norhanom, A. W., Ashirl, Y. & Mustafa, A. M., 1999. Anti-tumour activity in local ulam, phytochemicals and biopharmaceutins from the malaysian rain forest.
40. Organizacion Mundial de la Salud, 2003. Directrices de la Organización Mundial de la Salud sobre buenas practicas agricolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales.. World Health Organizacion, p. 87.



41. Powell, 2000. The antioxidant properties of Zinc. *J Nutr.* pp. 130, 1447-1454.
42. Reiter, Tan, D. X., Manchester, L. C. & Qi, W., 2001. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence cell biochem biophys. pp. 34, 237-56.
43. Saija, A. et al., 1995. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biol Med.* pp. 19, 481-486.
44. Santangelo, C. et al., 2007. Polyphenols, intracellular signaling and inflammation. *Am J Clin Nutr.* pp. 43, 349-405.
45. Sawyer, D. T. & Valentine, J. S., 1981. How super is superoxide? *Acc Chem Res.*
46. Schoeder, E. K. et al., 2008. Green tea epigallocatechin 3-gallate accumulates in mitochondrial oxidative stress in neurons. *Antioxid redox signal* Epub ahead of print.
47. Song, J. M., Lee, K. H. & Seong, B. L., 2005. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Anti Res.* pp. 68, 66-74.
48. Spencer, J. et al., 2001. Epicatechin and its in vivo metabolite, 3-o-methyl epicatechin, protect human fibroblast from oxidative stress-induced cell death involving caspase-3 activation *biochem J.* pp. 354, 493-500.
49. Spittler, 2001. lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Exp Gerontol.* pp. 36, 1425-1457.
50. Tournier, H., Fioravanti, D., Dadé, M. & Schinella, G., 2010. Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles de 21 extractos de plantas medicinales.. Tercera época.
51. Verstraeten, S. V., Faga, C. G., Oteiza, P. I. & Eeiejman, A. G., 2004. The interaction of flavonoids with membranes: potential determination of flavonoid antioxidant effects *free radic Res.* pp. 38, 1311-1320.
52. Vertuani, S., Angusti, A. & Hanfredini, S., 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview *curr pharma des.* pp. 10, 1677-1694.
53. Visoli, F. et al., 2000. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS letters.* pp. 468, 159-60.
54. Waris G, A. H. 2., 2006. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions, *J carcinog.* pp. 5, 14.



55. Zangar, 2004. mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450 toxicol appl pharmacol.

X. GLOSARIO



X. GLOSARIO

Acinesia: privación de movimiento, intervalo que separa en la pulsación la sístole de la diástole.

Aquenos: fruto seco, indehisciente, con el pericarpio no soldado a la semilla.

Arsenal: establecimiento en que se construyen, reparan y conservan embargaciones, conjunto de noticias, etc.

Ateromas: quiste sebáceo, arteriosclerosis con alteraciones grasientas de la pared arterial.

Cambicum: estrato celular meristemático responsable del crecimiento secundario de tallo y raíces.

Caudado: falda o cola de la capa del núcleo.

Coalesce: unión de varias cosas en una sola, unión de partículas en suspensión coloidal para formar gránulos o de gotas en una emulsión para formar otras gotas de mayor tamaño.

Disrupción: interrupción de un flujo.

Entomófila: de las plantas en las que la polinización se verifica por medio de los insectos.

Embalsamar: perfumar, aromatizar.

Estambres: órgano sexual masculino de las plantas fanerógamas.

Etnobotánico: ciencia que estudia las diferentes especies de las plantas.

Festinante: tendencia involuntaria a andar de prisa para evitar la caída hacia adelante.

Glabra: calvo, lampiño.

Nervaduras: conjunto de los nervios de una hoja.

Organelas: parte de una célula en la cual esta cumple la función de un órgano.

Pecicolo: parte de la hoja vegetal, con aspecto de tallo y que sirve de zona de inserción con el resto de vástago.

Perenne: que vive mas de dos años.

Pistilo: órgano del gineceo de las flores femeninas o hermafroditas, constituido por la soldadura en recipiente de uno o más carpelos u hojas fértiles. Consta de tres partes diferenciadas: ovario, estilo y estigma.



Pubescencia: llegar a la pubertad.

Sumidades: ápice o extremo mas alto de una cosa.

Violáceo: familia de plantas angiospermas dicotiledóneas, herbáceas, con hojas simples, flores hermafroditas pentámeras, y frutos en cápsula polisperma, que contienen semillas con albumen carnosos.

Xilema: conjunto de vasos leñosos de un vegetal. Están constituidos por traqueadas (gimnospermas) o por tráqueas (angiospermas)

ANEXOS

Imagen 1. Subespecie *Ocimum basilicum minimum*



Fuente: *Karina Auxiliadora Brenes Argüello y Giselle Alejandra García Cruz*

Imagen 2. Subespecie *Ocimum basilicum sanctum*



Fuente: *Karina Auxiliadora Brenes Argüello y Giselle Alejandra García Cruz*

Imagen 3. Subespecie *Ocimum basilicum crispum*



Fuente: *Karina Auxiliadora Brenes Argüello y Giselle Alejandra García Cruz*

Tabla 1. Especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS)

Clasificación	ROS	Símbolo	RNS	Símbolo
Radicales	Anión Superóxido	O_2^-	Óxido nítrico	$NO\cdot$
	Hidroxilo	$OH\cdot$	Dióxido de nitrógeno	NO_2
	Alcóxido	RO		
	Peróxido	$ROO\cdot$		
No Radicales	Peróxido de Hidrogeno	H_2O_2	Peroxinitrito	$ONOO^-$
	Acido Hipocloroso	$HClO$	Ácido nitroso	NO_2
	Ozono	O_3	Catión nitrosilo	NO^+
	Oxigeno Singulete	$^1\Delta O_2$	Anión nitroxilo	NO^-
			Peroxinitritos alquilo	$ROONO$

Fuente: (Casadevall, 2009)

Figura 1. Reacción de Fenton.



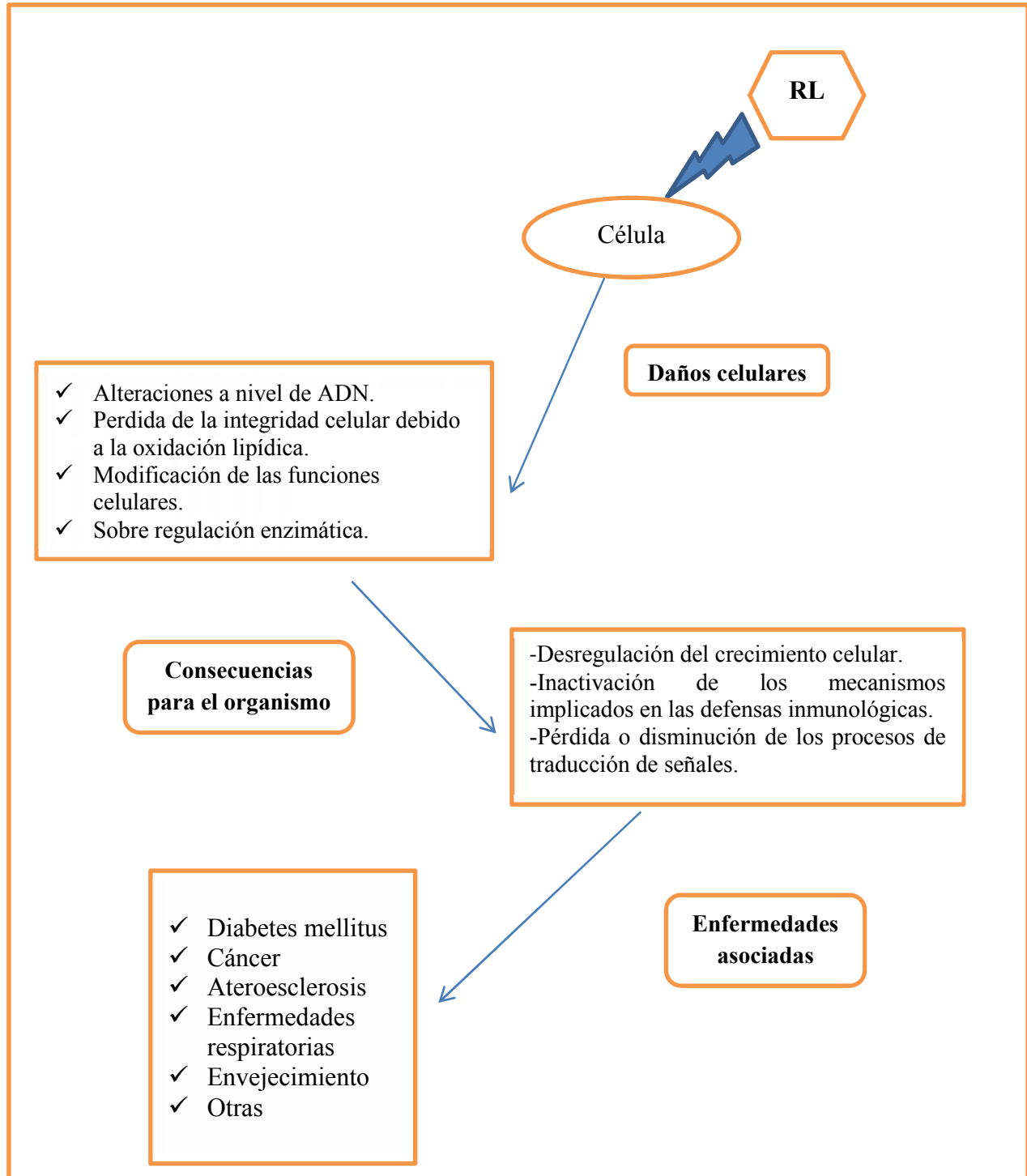
Fuente: (Fenton, 1894)

Tabla 2. Principales factores externos que incrementan la producción de ROS

Factores	Ejemplos
Contaminantes	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Fibras de asbestos ✓ Polvo de minerales ✓ Ozono ✓ Monóxido de carbono ✓ Óxido nítrico y Dióxido de nitrógeno ✓ Sílice ✓ Solventes ✓ Toxinas ✓ Hipocloritos ✓ Dióxido de sulfuro ✓ Bifenilos policlorados ✓ Paraquat y Diquat
Drogas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Acetaminofeno ✓ Ciprofloxacina ✓ Antidepresivos tricíclicos ✓ Nitrofurantoinas ✓ Antidiabéticos ✓ Bleomicina ✓ Doxorubicina
Iones metálicos	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hierro ✓ Niquel ✓ Cadmio ✓ Cobre ✓ Cromo ✓ Mercurio
Radiaciones	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Ultravioleta ✓ Rayos X ✓ Gamma
Dieta	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Acidos grasos poliinsaturados ✓ Glucosa
Otros	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Tabaco ✓ Ejercicio intenso

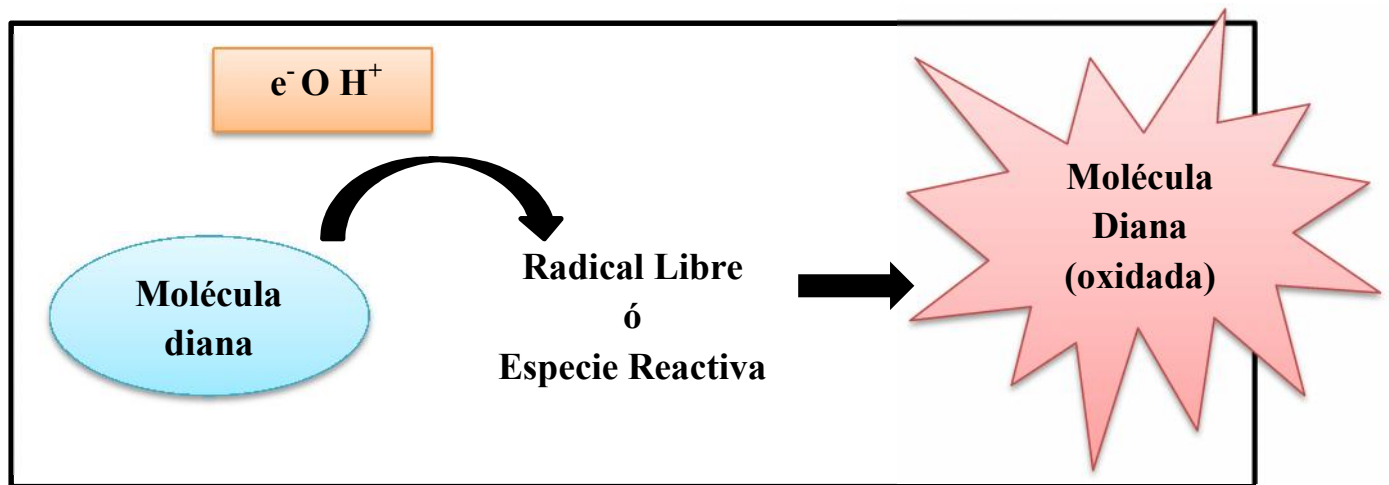
Fuente: (Casadevall, 2009)

Figura 3. Daños producidos por los radicales libres.



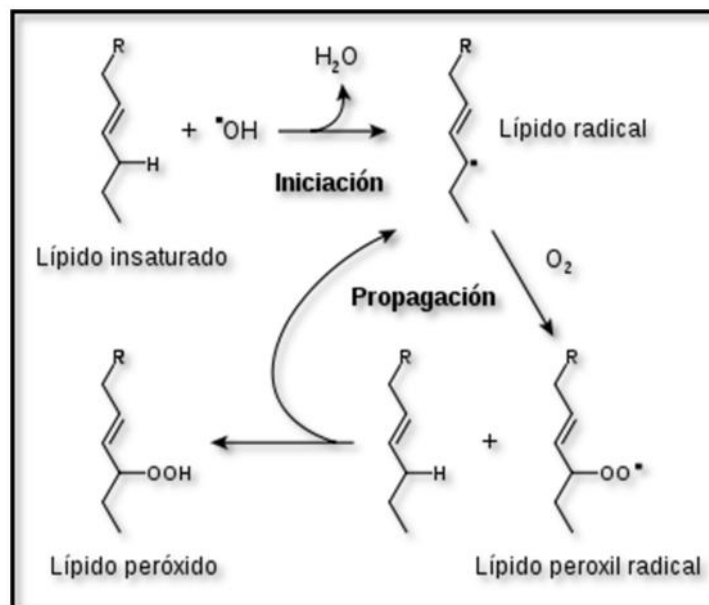
Fuente: (Kohen & Nyska, 2002; Sawyer & Valentine, 1981)

Figura 4. Mecanismo de ataque de los RL.

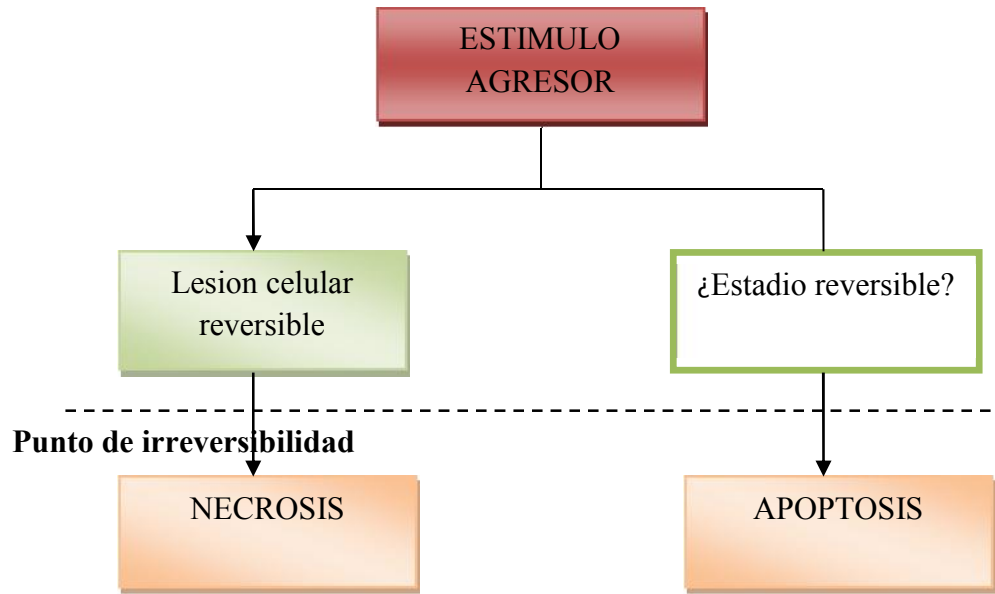


Fuente: (Casadevall, 2009)

Figura 5. Proceso de peroxidación lipídica iniciada por el radical R

Fuente: *Wikipedia.com*

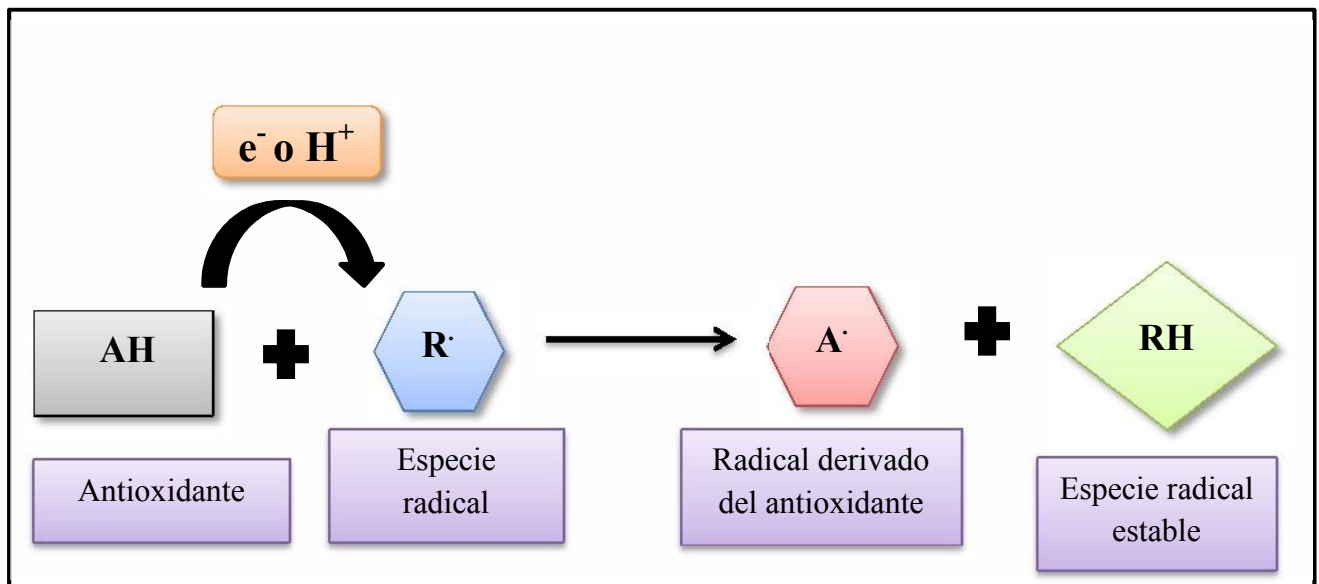
Esquema 1. Lesión celular por radicales libres



Estadios en la evolución de la lesión y muerte celular

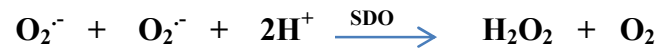
Fuente: (Kumar, et al., 2007)

Figura 6. Mecanismo antiradicalario de las moléculas antioxidantes.



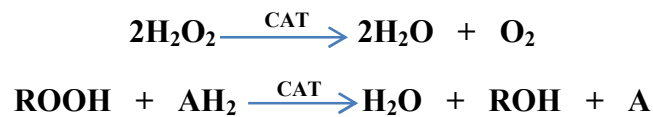
Fuente: (Cadenas, 1997)

Figura 7. Reacción catalizada por la superóxido dismutasa (SOD).



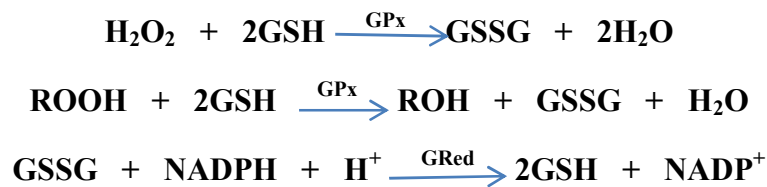
Fuente: (Casadevall, 2009)

Figura 8. Reacciones catalizadas por la enzima Catalasa (CAT).



Fuente: (Casadevall, 2009).

Figura 9. Reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GRed).



Fuente: (Casadevall, 2009)

Tabla 3. Principales enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

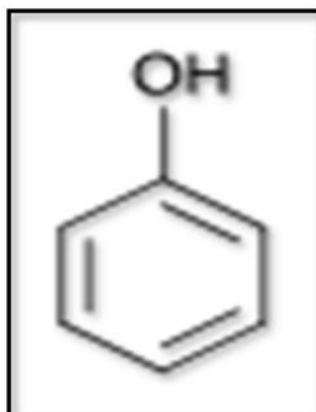
Enfermedades vasculares	Aterosclerosis Infarto de miocardio Isquemia
Enfermedades neurológicas	Alzheimer Esquizofrenia Parkinson
Enfermedades autoinmunes	Artritis reumatoide
Enfermedades oculares	Cataratas Retinopatías

Fuente: *(Casadevall, 2009)*

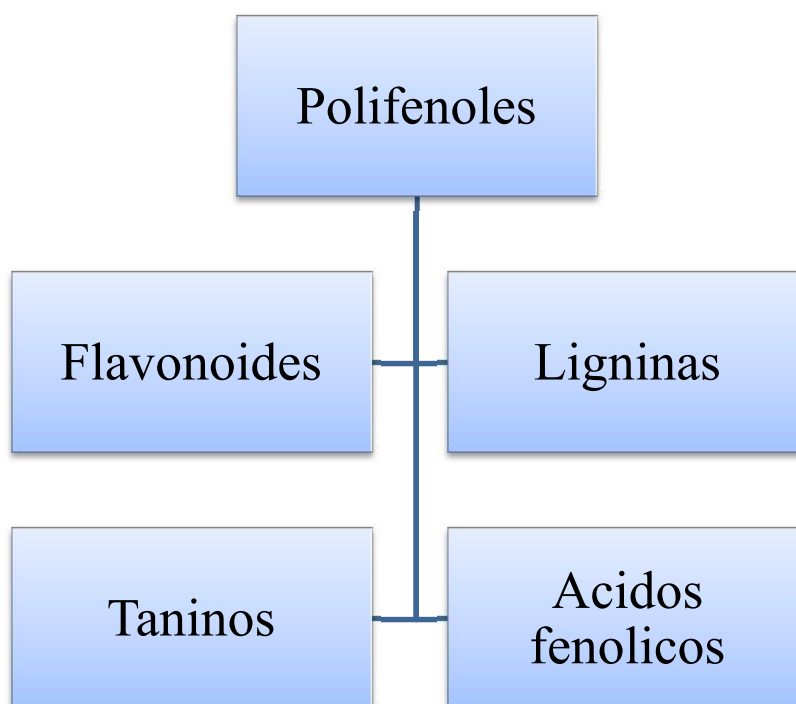
Tabla 4. Efectos químicos y biológicos del estrés oxidativo.

Oxidante	Descripción
$\bullet\text{O}_2^-$, Anión superóxido	Estado de reducción de un electrón de O_2 , formado en muchas reacciones de autooxidación y por la cadena de transporte de electrones. Es poco reactivo, pero puede liberar Fe^{2+} de proteínas ferrosulfuradas y de la ferritina. Sufre dismutación para formar H_2O_2 espontáneamente o por catálisis enzimática y es un precursor para la formación de $\bullet\text{OH}$ catalizado por metales.
H_2O_2 , peróxido de hidrógeno	Estado de reducción de dos electrones, formado por la dismutación de $\bullet\text{O}_2^-$ o por reducción directa de O_2 . Soluble en lípidos y por ende capaz de difundir por membranas.
$\bullet\text{OH}$, radical hidroxilo	Estado de reducción de tres electrones, formado por la reacción de Fenton y la descomposición de peroxinitrito. Extremadamente reactivo, ataca la mayoría de los componentes celulares.
ROOH , hidroperóxido orgánico	Formado por reacciones de radicales con componentes celulares como lípidos y nucleobases.
$\text{RO}\bullet$, alcoxi- y $\text{ROO}\bullet$, peroxi-	Radicales orgánicos centrados en oxígeno. Formas lipídicas participan en reacciones de peroxidación de lípidos. Producido en presencia de oxígeno por adición de radicales a dobles enlaces o eliminación de hidrógeno.
HOCl , ácido hipocloroso	Formado a partir de H_2O_2 por la mieloperoxidasa. Soluble en lípidos y altamente reactivo. Rápidamente oxida constituyentes de proteínas, incluyendo grupos tiol, grupos amino y metionina.
OONO^- , peroxinitrito	Formado en una rápida reacción entre $\bullet\text{O}_2^-$ y $\text{NO}\bullet$. Liposoluble y similar en reactividad al ácido hipocloroso. Protonación forma ácido peroxinitroso, que puede someterse a escisión homolítica para formar radicales de hidroxilo y de dióxido de nitrógeno.

Fuente: *Wikipedia.com*

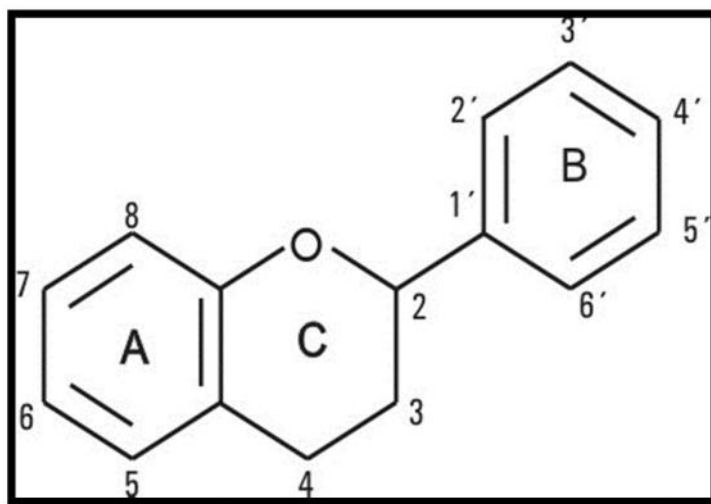
Figura 10. Unidad Básica y monomérica de un fenol

Fuente: (Casadevall, 2009)

Esquema 2. Clasificación de Polifenoles

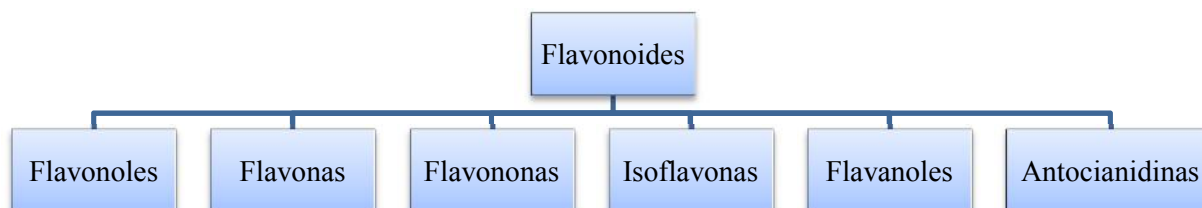
Fuente: (Casadevall, 2009)

Figura 11. Estructura química de un polifenol



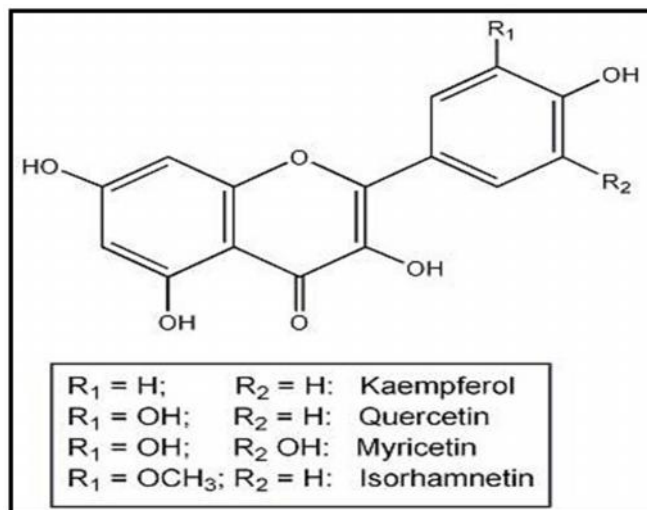
Fuente: (Casadevall, 2009)

Esquema 3. Clasificación de flavonoides



Fuente: (Casadevall, 2009)

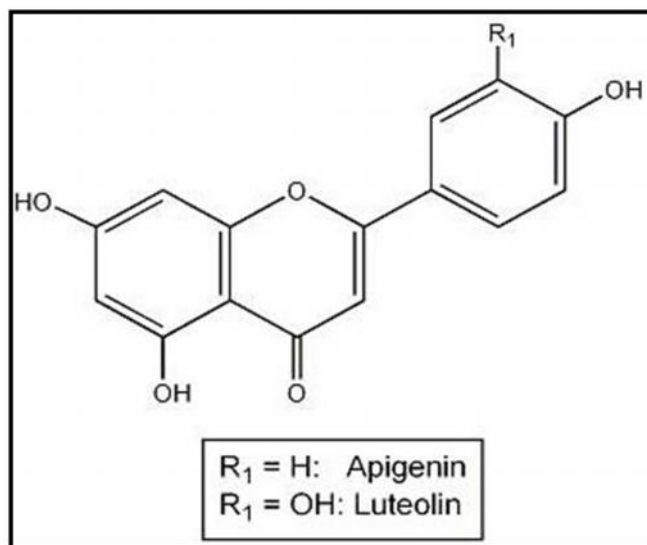
Figura 12. Estructura química de un Flavonol



Este flavonoide presenta un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo OH en posición 3, representa una de las estructuras más activas.

Fuente: (Casadevall, 2009)

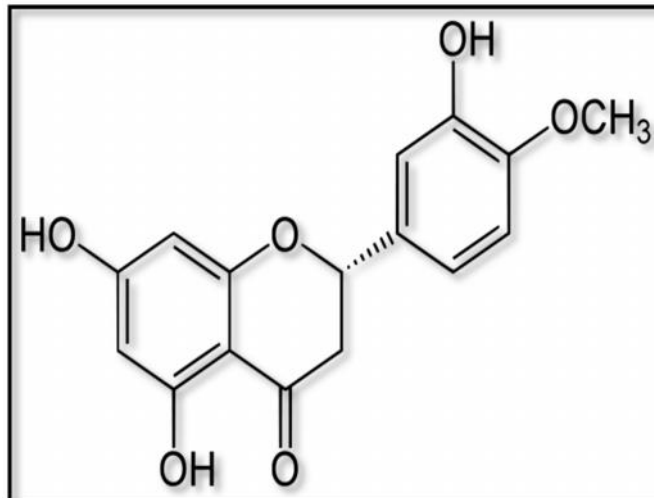
Figura 13. Representación estructural de una Flavonas



Las más representativas son la luteolina y la epigenina, poseen únicamente un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C, del núcleo del Flavonoide, carecen de un grupo OH en la posición 3.

Fuente: (Casadevall, 2009)

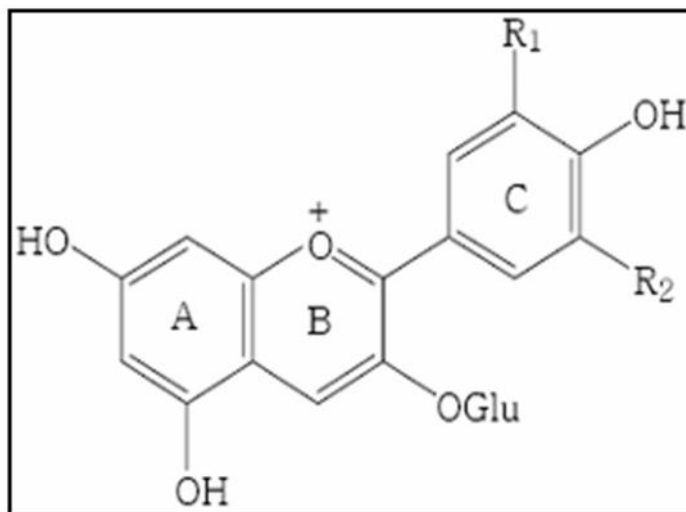
Figura 14. Estructura de una Flavonona (Hesperetina)



La Hesperetina se encuentra presente en las naranjas, su estructura corresponde a un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C, y aun Metoxi en la Posición 4 del anillo B.

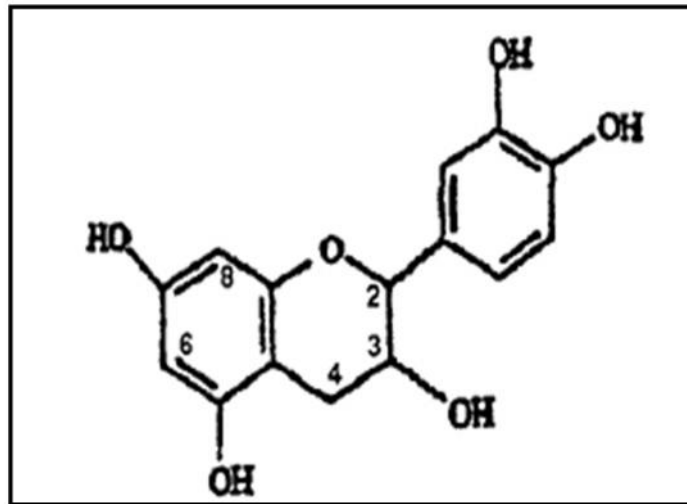
Fuente: (Casadevall, 2009)

Figura 15. Representación de la estructura química de una Isoflavona



Fuente: (Casadevall, 2009)

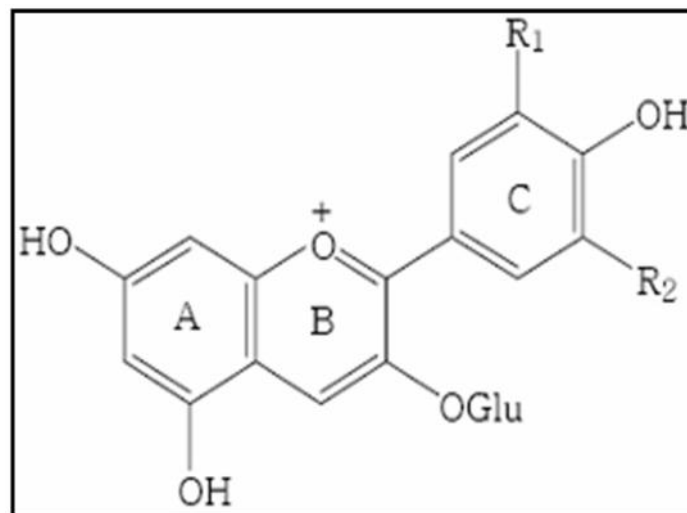
Figura 16. Estructura de un Flavonol



Puede presentarse en forma monomérica como la catequina y en forma polimérica como las proantocianidinas, cuya estructura corresponde a un grupo OH en la posición 3 del anillo C.

Fuente: (Casadevall, 2009)

Figura 17. Estructura de una antocianidina



Son inestables en la forma aglicona constituye principalmente la antocianidina, cianidina en la cual tiene unido el grupo OH en la posición 3, pero además poseen un doble enlace en la posición 2 y 4 del anillo C.

Fuente: (Casadevall, 2009)

Ficha 1**Ficha de información sobre plantas medicinales cultivadas**

Identificación de la planta medicinal cultivada

Nombre científico (género, especie, autor, familia): _____

Nombre local: _____

Nombre común en inglés (si se conoce): _____

Parte de la planta que se cosecha: _____

Código numérico del cultivo: _____

Identificación del lugar de cultivo

Ubicación del campo de cultivo: _____

Provincia/región/país: _____

Identificación del cultivo

Nombre del agricultor: _____

Dirección de contacto: _____

Fecha (dd/mm/aaaa) de comienzo del cultivo: _____

Fecha (dd/mm/aaaa) de final del cultivo: _____

Semillas y materiales de propagación

Origen del material plantado: _____

Descripción física del material plantado: _____

Disponible comercialmente (señale con un círculo): sí/no

Si responde sí, indique el nombre del cultivar: _____

Nombre del proveedor: _____

Circunstancias no habituales que pueden influir en la calidad

(Condiciones climatológicas extremas, exposición a sustancias peligrosas, brotes de plagas, etc.):

Resumen de las condiciones de crecimiento de las plantas
Año _____

Características	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sept	Oct	Nov
Duración de la luz solar (horas)											
Temperatura media diurna (°C)											
Temperatura media nocturna (°C)											
Pluviosidad media (mm)											
Altura de las plantas (cm.)											
Diámetro de las plantas (cm)											
Yemas florales											
Formación del cáliz											
Daños por insectos											
Enfermedades											
Herbicida aplicado											
Plaguicida aplicado											
Ramificación											
Laboreo											
Riego											
Heladas/enfriamiento											
Viento											
Sequía											
Rendimiento por planta (parte cosechada)											

Otras observaciones y recomendaciones:

Fuente: (Organizacion Mundial de la Salud, 2003)

Ficha 2

Ficha de recolección de datos Cuantificación de polifenoles				
N ⁰	Código	Peso de la muestra (mg)	Absorbancia (nm)	Concentración de la muestra µg/ml
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				

Fuente: *Karina Auxiliadora Brenes Argüello y Giselle Alejandra García Cruz*

Ficha 3

Ficha de recolección de datos Actividad antioxidante				
N ⁰	Código	Peso de la muestra (mg)	Absorbancia (nm)	Porcentaje de decoloración del radical DPPH (%)
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				

Fuente: *Karina Auxiliadora Brenes Argüello y Giselle Alejandra García Cruz*