/004/2008
TM-004
2008

MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR
CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA

PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Rhizophora mangle L.* Y DE SU FRACCIÓN POLIFENÓLICA MAYORITARIA EVALUADAS EN SISTEMAS *IN VITRO* E *IN VIVO*.

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias

Autora: Lic. Janet Sánchez Calero, MSc.

La Habana
2007

MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR
CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA

PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Rhizophora mangle L.* Y DE SU FRACCIÓN POLIFENÓLICA MAYORITARIA EVALUADAS EN SISTEMAS *IN VITRO* E *IN VIVO*.

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias

Autora:Lic. Janet Sánchez Calero, MSc.
Tutor:Dr. Roberto Faure García, DrC

La Habana
2007

INDICE Pag

INTRODUCCIÓN.....1

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....5

I.1 CONCEPTOS BÁSICOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVOYPRINCIPALESCARACTERÍSTICASDELAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO DE INTERÉS BIOLÓGICO 5

I.1.1 Conceptos básicos sobre el Estrés Oxidativo.....5

I.1.2 Especies Reactivas del Oxígeno de interés biológico. Principales características.....5

I.1.2.1 Especies radicalarias.....5

I.1.2.2 Especies no radicalarias.....7

I.2 INTERACCIÓN DE LAS ERO CON LOS COMPONENTES CELULARES.....8

I.2.1 Daño oxidativo a los lípidos.....8

I.2.2 Daño oxidativo a las proteínas.....9

I.2.3 Daño oxidativo al ADN.....10

I.3 MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE.....10

I.3.1 Mecanismos antioxidantes endógenos.....11

I.3.1.1 Enzimas antioxidantes.....11

I.3.1.2 Glutatión.....12

I.3.2 Mecanismos antioxidantes exógenos.....13

I.3.2.1 Taninos o Polifenoles.....14

I.3.2.1.1 Definición y distribución.....14

I.3.2.1.2 Clasificación.....15

I.3.2.1.3 Propiedades farmacológicas.....16

I.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DEL EXTRACTO ACUOSO DE CORTEZAS DE *RHIZOPHORA MANGLE* L.....18

I.4.1 Rhizophora mangle L.: Características generales.....18

I.4.2 Composición química del extracto acuoso de cortezas de Rhizophora mangle L.....19

I.4.3 Propiedades farmacológicas del extracto acuoso de cortezas de Rhizophora mangle L.....19

I.5 CURACIÓN DE HERIDAS 20

I.5.1 Concepto.....20

I.5.2 Fases del proceso de curación de heridas.....20

I.5.2.1 Fase de latencia o inflamatoria.....21

I.5.2.2 Fase de epidermización.....22

I.5.2.3 Fase celular.....22

I.5.2.4 Fase de fibroplasia.....23

I.5.2.5 Fase de retracción o contracción.....23

I.5.3 Biomodelos de curación de heridas para el estudio de la actividad antioxidante.....23

II. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....25
II.1 MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....25
II.1.1 Reactivos.....25
II.1.2 Obtención de las preparaciones botánicas.....25
II.1.2.1 Extracto acuoso de *Rhizophora mangle L*.....25
II.1.2.2 Fracción polifenólica mayoritaria.....26
II.1.3 Determinación de la concentración de taninos en las preparaciones evaluadas.....26
II.1.4 Aspectos generales en el desarrollo de los ensayos.....26
II.1.5 Análisis estadístico.....26
II.1.6 Consideraciones éticas.....27
II.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *RHIZOPHORA MANGLE L* Y SU FRACCIÓN POLIFENÓLICA MAYORITARIA A NIVEL DE REACCIONES QUÍMICAS. 28
II.2.1 Introducción.....28
II.2.2 Materiales y Métodos.....29
II.2.2.1 Reactivos.....29
II.2.2.2 Ensayo del 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).....30
II.2.2.3 Ensayo de la generación de anión superóxido en el sistema xantina/xantina oxidasa.....30
II.2.2.4 Ensayo de la degradación oxidativa de la 2-desoxi-D-ribosa en el sistema Fenton.....30
II.2.2.4.1 Ensayo de determinación de productos reactivos con el ácido tiobarbitúrico (PRATB).....31
II.2.3 Resultados.....31
II.2.3.1 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la generación de radicales DPPH.....31
II.2.3.2 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la producción de anión superóxido.....32
II.2.3.3 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la degradación oxidativa de la 2-desoxi-D-ribosa mediada por el secuestro de radicales hidroxilo.....33
I.2.3.4 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción mayoritaria sobre la degradación oxidativa de la 2-desoxi-D-ribosa mediada por la unión a los iones de hierro.....33
II.2.4 Discusión.....34
II.2.5 Conclusión.....39
II.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *RHIZOPHORA MANGLE L*. Y SU FRACCIÓN POLIFENÓLICA MAYORITARIA A NIVEL DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS.....40
II.3.1 Introducción.....40
II.3.2 Materiales y Métodos.....42
II.3.2.1 Reactivos.....42
II.3.2.2 Ensayo de peroxidación lipídica inducida por Fe^{3+} / ascorbato en un homogenado de cerebro de rata.....42

II.3.2.3 Ensayo de daño oxidativo a la ASB ocasionado por el sistema Fenton.....43
II.3.2.4 Ensayo de daño oxidativo al ADN provocado por el sistema Bleomicina / Fe 2+.....43
II.3.3 Resultados.....*44*
II.3.3.1 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la peroxidación lipídica inducida por Fe^{3+}/ascorbato.....44
II.3.3.2 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la pérdida de grupos sulfidrilos en la ASB expuesta al sistema Fenton.....45
II.3.3.3 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre el daño oxidativo al ADN ocasionado por el sistema Bleomicina / Fe^{3+}.....45
II.3.4 Discusión.....*46*
II.3.5 Conclusión.....*53*
II.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *RHIZOPHORA MANGLE* . Y SU FRACCIÓN POLIFENÓLICA MAYORITARIA A NIVEL DE CÉLULAS. 54
II.4.1 Introducción.....*54*
II.4.2 Materiales y Métodos.....*56*
II.4.2.1 Reactivos.....56
II.4.2.2 Ensayo de generación de anión superóxido en una linea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 estimulada con LPS o PMA.....56
II.4.2.3 Ensayo de generación de NO˙ en una linea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 estimulada con LPS o PMA.....57
II.4.2.4 Ensayo de hemólisis de las células rojas de la sangre humana inducida por AAPH.....58
II.4.3 Resultados.....*58*
II.4.3.1 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la generación de anión superóxido en macrófagos estimulados con LPS o PMA.....58
II.4.3.2 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la generación de NO˙ en macrófagos estimulados con LPS o PMA.....59
II.4.3.3 Efecto del extracto acuoso de Rhizophora mangle L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la lisis de los eritrocitos humanos inducida por AAPH.....60
II.4.4 Discusión.....*61*
II.4.5 Conclusión.....*70*
II.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *RHIZOPHORA MANGLE* . Y SU FRACCIÓN POLIFENÓLICA MAYORITARIA A NIVEL DE ORGANISMO.....71
II.5.1 Introducción.....*71*
II.5.2 Materiales y Métodos.....*72*
II.5.2.1 Reactivos.....72
II.5.2.2 Características de los animales y condiciones de alojamiento.....72
II.5.2.3 Modelo de curación de heridas asépticas en ratas.....73
II.5.2.3.1 Determinación de los indicadores de la curación de las heridas.....74
II.5.2.3.2 Determinación de los indicadores del balance redox en las heridas.....75

II.5.2.3.2.1 Procesamiento de las muestras.....75
II.5.2.3.2.2 Ensayo de determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa.....76
II.5.2.3.2.3 Ensayo de determinación de la actividad de la enzima catalasa.....76
II.5.2.3.2.4 Ensayo de determinación de la concentración de glutatión reducido.....77
II.5.2.3.2.5 Ensayo de determinación de la concentración de malonildialdehído.....77
II.5.3 Análisis estadístico.....*78*
II.5.4 Resultados.....*79*
II.5.4.1 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre indicadores del proceso de curación de heridas.....79
II.5.4.2 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre indicadores del balance redox durante el proceso de curación de heridas asépticas en ratas.....80
II.5.5 Discusión.....*82*
II.5.6 Conclusión.....*86*
II.6. DISCUSIÓN GENERAL.....87
II.7.CONCLUSIÓN GENERAL 96
II.8 RECOMENDACIONES.....97
II.9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 97

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales constituyen el elemento más importante dentro de la Medicina Tradicional. Se considera una planta potencialmente medicinal, a todo vegetal que contiene en uno o más de sus órganos, metabolitos secundarios con determinada actividad biológica, que permite utilizarlos con fines terapéuticos. La información de que una planta se emplea en Medicina Tradicional indica con frecuencia su estudio científico, considerando que muchos medicamentos valiosos se han derivado de plantas (Akerele, 1987; Fuentes, 1988).

En tal sentido, se le atribuyen diferentes propiedades a los preparados obtenidos a partir de la planta *Rhizophora mangle L. (R. mangle)*, la cual se ha utilizado para el tratamiento de enfermedades de la garganta y en la tuberculosis pulmonar (Roig, 1988). Así como contra la lepra, el asma, el envenenamiento con pescados contaminados, la úlcera péptica, los trastornos digestivos, las infecciones de la piel y las enfermedades venéreas (Rojas y Coto, 1978). Además se reportó que tiene actividad antifúngica (Cáceres *et al.,* 1993).

En la última década se demostraron varias propiedades farmacológicas del extracto acuoso de la corteza de *R. mangle*, que incluyen, prevención de la mastitis bovina (Armenteros, 1998) y eficacia en la curación de las heridas (Bulnes *et al.*, 2001, Fernández *et al.*, 2002), así como propiedades antimicrobianas (Montes de Oca *et al.*, 2001; Melchor *et al.*, 2001), a su vez resultó exitoso en el tratamiento de las infecciones uterinas (Agüero, 2004) y las úlceras gastroduodenales (Sánchez *et al.*, 2001), recientemente se demostraron sus propiedades antiinflamatorias (Marrero *et al.*, 2006).

La caracterización química realizada al extracto acuoso de la corteza de *R. mangle* reveló la presencia de polifenoles (54,78 %), representados en su mayoría por taninos poliméricos (80 %) y taninos hidrolizables (20 %), destacándose la presencia en estos últimos de epicatequina, catequina, ácido clorogénico, ácido gálico y ácido elágico, además se encontraron galotaninos y elagitaninos. De las estructuras no tánicas, se refiere la presencia de carbohidratos (17,5 %) libres y enlazados; ácidos grasos (4,0 %) de cadena larga, saturados e insaturados; fitoesteroles

(0,0285 %); componentes volátiles o semivolátiles (70 compuestos) (0,0205 %) y aromas o aceites esenciales no volátiles (Sánchez, 1998).

Aunque todos los grupos químicos presentes en el extracto de *R. mangle* mostraron actividad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, su componente mayoritario, la fracción de taninos poliméricos, contribuyó con el mayor aporte a esta actividad (Sánchez *et al.*, 2000).

A los polifenoles, sea como compuestos individuales o los constituyentes de mezclas complejas en extractos obtenidos de diferentes plantas, les fueron reveladas una gran variedad de propiedades farmacológicas, dentro de las cuales se encuentran, su actividad antioxidante. La que está vinculada con la capacidad secuestradora de radicales libres (Goncalves *et al.*, 2005; Matkowski y Piotrowska, 2006; Senevirathne *et al.*, 2006), la acción quelante de iones de hierro (Sestili *et al.*, 2002; Higuchi *et al.*, 2003; Weinreb *et al.*, 2004), el efecto protector sobre el daño oxidativo a las principales biomoléculas (Martínez *et al.* 2000; Misra *et al.*, 2003; Lee *et al.,* 2003; Cheung y Cheung, 2005) y la inducción de antioxidantes endógenos (Chan *et al.*, 2002; Vayalil *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006; Mokni *et al.*, 2007). Sin embargo, los polifenoles están ampliamente disponibles en el te, vinos, frutas, vegetales, semillas y corteza; y poseen una gran heterogeneidad estructural, lo cual conlleva a que la eficacia terapéutica como antioxidantes difiera grandemente (Plumb *et al.,* 1998; Kajiya *et al.,* 2001; Frei y Higdon, 2003).

Estudios previos demostraron que el empleo de polifenoles puros (Kapoor *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2006) o aquellos integrantes de extractos vegetales (Gupta *et al.*, 2005), así como de otras sustancias con actividad antioxidante (Shukla *et al.*, 1999; Musalmah *et al.*, 2005) pueden contribuir a acelerar el proceso de curación de heridas, teniendo en cuenta que el mismo se inicia por una fase inflamatoria, caracterizada por la infiltración de leucocitos PMN y macrófagos en el tejido lesionado, los cuales producen una gran cantidad de ERO en el sitio de la herida (Sen *et al.*, 2002); las que pueden dañar el tejido naciente y entorpecer el proceso de curación (Torres, 1986; Sen, 2003).

Martínez (2000) reportó una metodología para el estudio de compuestos con potencial actividad antioxidante, que incluye estudios desde el nivel de reacciones químicas hasta el nivel de organismos, empleando una batería de ensayos disponible en la literatura.

Varias razones sustentan la necesidad de demostrar desde el punto de vista científico las propiedades antioxidantes del extracto acuoso de *R. mangle* y de su fracción mayoritaria:
1- La heterogénea composición química del extracto, en el cual coexisten una gran variedad de grupos funcionales con propiedades farmacológicas diferentes, lo que categoriza a la planta como una fuente muy valiosa de agentes activos generadores de candidatos a medicamentos. 2- Su fracción mayoritaria es de naturaleza polifenólica, pero de composición desconocida.
3- En la práctica veterinaria, las enfermedades para las cuales este extracto ha demostrado ser eficaz tienen como base común la inflamación, fenómeno estrechamente vinculado a los procesos de estrés oxidativo, por lo que resulta imprescindible ampliar los fundamentos que sirvan de base a las indicaciones terapéuticas actuales y futuras.
4- En la literatura no se informa acerca de las propiedades antioxidantes del extracto acuoso de *R. mangle*, ni de su componente mayoritario.

Tomando en consideración estos elementos se plantea la siguiente Hipótesis de trabajo:

> El extracto acuoso de cortezas de *Rhizophora mangle L.* posee propiedades antioxidantes y su fracción polifenólica mayoritaria es la principal determinante de éstas.

Y como Objetivo General:

> Demostrar el efecto antioxidante del extracto acuoso de *Rhizophora mangle L.* y determinar la contribución que realiza la fracción polifenólica mayoritaria al mismo, en sistemas evaluativos de estrés oxidativo que van desde el nivel de reacciones químicas hasta el nivel de organismos.

Para dar respuesta a este Objetivo General se formularon los siguientes Objetivos Parciales:

Determinar a nivel de reacciones químicas si el extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria poseen actividad secuestradora de radicales libres y acción quelante de iones de hierro.

Conocer si el extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria protegen a las principales biomoléculas del daño oxidativo.

Determinar a nivel celular el efecto que ocasionan el extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la hemólisis, y la producción de $O_2^{\bullet-}$ y $NO^{\bullet}$.

Dilucidar el efecto que ejercen el extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre indicadores del balance redox durante el proceso de curación de heridas.

Alcumplimentar los objetivos trazados en el presente trabajo se habrán aportado los siguientes aspectos novedosos:

Se informan, por primera vez, las propiedades antioxidantes del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y de su fracción polifenólica mayoritaria, así como que ella es la principal responsable de esta actividad en el extracto.

Se revela, por primera vez, que las propiedades cicatrizantes del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria, están mediadas, al menos en parte, por un mecanismo antioxidante.

Se brindan nuevos conocimientos de carácter básico acerca de los efectos del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. relacionados con un mecanismo redox, que pueden contribuir a esclarecer posibles mecanismos de acción por los cuales este extracto ejerce los efectos farmacológicos previamente demostrados; a la vez que constituyen un punto de partida para la evaluación de nuevas indicaciones para afecciones biomédicas relacionadas con alteraciones redox.

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1 Conceptos básicos sobre el Estrés Oxidativo y principales características de las Especies Reactivas del Oxígeno de interés biológico.

I.1.1 Conceptos básicos sobre el Estrés Oxidativo.

Se denomina estrés oxidativo a un estado de desbalance en las concentraciones de especies reactivas del oxígeno (ERO), ya sea por un aumento de su producción o por una disminución de los mecanismos de defensa antioxidante. Este fenómeno provoca que las células estén expuestas a un ambiente prooxidante, afectándose el estado redox celular, y está asociado con decenas de patologías (Aruoma, 1994).

En los sistemas biológicos, los elementos prooxidantes provienen en su mayoría del oxígeno, por lo que son denominados ERO. Las ERO incluyen a los radicales libres derivados del oxígeno, los cuales son especies químicas con uno o más electrones no pareados en el orbital más externo; y a otras moléculas que contienen oxígeno, que aunque no pueden clasificarse químicamente como radicales libres, tienen una alta capacidad reactiva y son altamente prooxidantes (McCord, 2000).

I.1.2 Especies Reactivas del Oxígeno de interés biológico. Principales características.

I.1.2.1 Especies radicalarias.

Entre las especies radicalarias de mayor interés desde el punto de vista biológico, se destacan el radical anión superóxido ($O^{\bullet -}$), el radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$), el óxidonítrico($NO^{\bullet}_2$), el radical peroxilo ($RO^{\bullet}$) y el radical alcoxilo ($RO^{\bullet}_2$).

El $O^{\bullet -}_2$se forma a partir de una molécula de O_2, en presencia de una cantidad de energía suficiente que le permita adquirir un electrón adicional. Esta especie es producida por reacciones de autooxidación, por transferencia no enzimática de electrones provenientes de la reducción molecular univalente del oxígeno y por un gran número de enzimas, tales como la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa. El $O^{\bullet -}_2$ formado *in vivo* tiene un tiempo de vida media del

orden de los milisegundos porque se dismuta por la enzima superóxido dismutasa (SOD) con una rápida constante de reacción, o por vía no enzimática, en HO. El $O^{\bullet-}_{222}$puede penetrar las membranas biológicas y causar daño a blancos específicos (Fridovich, 1989). Además de los procesos de dismutación anteriormente mecionados, el $O^{\bullet-}_2$ es capaz de reaccionar con el ácido ascórbico, con una constante de velocidad de $2{,}7\cdot10^5\ M^{-1}\cdot s^{-1}$ a pH=7,0 (Nishikimi, 1975). Bajo condiciones de sobreproducción y agotamiento de sus secuestradores, el $O^{\bullet-}_2$ puede interactuar con los grupos –SH de las proteínas y enzimas de su vecindad e inactivarlas, además de agotar el glutatión (Brent y Rumack, 1993) e iniciar una cascada de eventos oxidativos, donde la reacción de Haber-Weiss (Haber y Weiss, 1934) juega un papel fundamental.

El $^{\bullet}OH$ es el radical más reactivo encontrado en los sistemas biológicos (Aruoma, 1996). Tiene la capacidad de reaccionar con casi todas las moléculas biológicas con constantes de velocidad del orden de 10^9-$10^{10}\ M^{-1}\cdot s^{-1}$. Se forma a partir de $O^{\bullet-}_2$y H_2O_2, a través de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton (Goldstein, 1993), las que requieren trazas de metales de transición como catalizadores. Los iones de hierro son los que intervienen fundamentalmente en esta reacción *in vivo* (Halliwell y Gutteridge, 1989). No existen secuestradores específicos *in vivo* para esta especie radicalaria.

$$O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \longrightarrow O_2 + Fe^{2+}$$

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- + Fe^{+3} \quad \text{Reacción de Fenton}$$

$$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \xrightarrow{Fe/Cu} {}^{\bullet}OH + OH^- + O_2 \quad \text{Reacción de Haber-Weiss}$$

Los radicales $RO^{\bullet}$ y $RO^{\bullet}_2$ se forman como intermediarios durante la ruptura de lípidos peroxidados en las reacciones radicalarias de la peroxidación lipídica (POL) (Aruoma, 1996). La formación de $RO^{\bullet}_2$ es el paso más importante de las reacciones de propagación en cadena durante la POL (Gardner, 1989). La peroxidación de las membranas produce pérdida de la fluidez y alteración de los gradientes iónicos (Southorn y Powis, 1988). Numerosos residuos químicos de estas reacciones, dentro de los cuales se encuentra el malonildialdehído (MDA), pueden difundir del sitio donde se producen y provocar edema, alterar la permeabilidad

vascular, desencadenar la reacción inflamatoria y la quimiotaxis, estimular la fosfolipasa A2 e inducir la liberación del ácido araquidónico, con la subsiguiente formación de eicosanoides (Southorn y Powis, 1988). Entre los secuestradores más importantes de los radicales $RO^{\bullet}_2$ y $RO^{\bullet}$ se encuentra el glutatión y la vitamina C (de fase acuosa) y la vitamina E y los β- carotenos (de fase lipídica) (Halliwell y Gutteridge, 1990).

El $NO^{\bullet}$ es un gas incoloro que posee un electrón no pareado deslocalizado entre el átomo de nitrógeno y el de oxígeno. El $NO^{\bullet}$ se forma *in vivo* a partir del aminoácido L-arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). Esto tiene lugar en las células del endotelio vascular, las neuronas y por los fagocitos activados. El $NO^{\bullet}$ es una molécula que participa en la señalización intracelular, la neurotransmisión y modula el tono vascular (Moncada *et al.*, 1991). El NO también regula la formación de colágeno, la proliferación celular y la contracción de la herida, en modelos animales de curación de heridas (Witte y Barbul, 2002) e incrementa la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) durante la curación de heridas cutáneas (Frank *et al.*, 1999). El $NO^{\bullet}$ puede interactuar con el $O^{\bullet-}_2$ en una reacción radical-radical para general el anión peroxinitrito ($ONOO^-$), en una reacción que transcurre con una velocidad de $6{,}7 \cdot 10^9\ M^{-1} \cdot s^{-1}$. El $ONOO^-$ es un compuesto altamente tóxico que provoca daño oxidativo sobre las células de manera directa (Beckman *et al.*, 1990; Radi *et al.*, 1990) o puede descomponerse en otros productos tóxicos, que incluyen el $^{\bullet}OH$ (Hogg *et al.*, 1992).

I.1.2.2 Especies no radicalarias.

Las especies no radicalarias de mayor interés biológico son: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso (HClO), el peroxinitrito ($ONOO^-$) y el oxígeno singlete ($^1O_2$).

El H_2O_2 se forma *in vivo* por dismutación del $O^{\bullet-}_2$, de manera espontánea o enzimática por acción de la SOD (Aruoma, 1994). A bajas concentraciones el H_2O_2 es poco reactivo, sin embargo, altas concentraciones es capaz de oxidar los grupos –SH de las proteínas (Grisham y McCord, 1986) y causar ruptura de las hebras del ADN. Su efecto más nocivo es la formación de $^{\bullet}OH$ catalizado por metales de transición mediante la reacciones de Haber-Weiss y Fenton

(Goldstein, 1993). Fisiológicamente el H_2O_2 se remueve por la acción de las enzimas GPx y Catalasa (CAT) (McCord, 2000).

El ácido hipocloroso (HClO) es un potente agente antioxidante formado por los neutrófilos activados en los sitios de inflamación, por acción de la enzima mieloperoxidasa, en presencia de HOy $^{-}{}_{22}$Cl (Aruoma, 1996). Este agente reacciona con los grupos sulfidrilos (-SH) y aminos proteicos, y puede clorar las bases purínicas del ADN. El ácido ascórbico a concentraciones fisiológicas es un poderoso inactivador de esta ERO (McCord, 2000).

Los principales procesos por los que se generan las ERO se resumen en la figura 1.

I.2 Interacción de las ERO con los componentes celulares.

I.2.1 Daño oxidativo a los lípidos

Los radicales libres de alta reactividad, como el $^{\bullet}$OH, pueden sustraer un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos, conduciendo a la reacción en cadena conocida como POL (Figura 2). Los ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles al ataque de los radicales libres y como consecuencia resultan oxidados. La POL ocurre en mayor medida en las membranas biológicas y en las lipoproteínas. Este evento conduce a un aumento considerable de la permeabilidad de las membranas celulares, que origina alteraciones irreversibles de las propiedades funcionales de la célula que pueden conducir a su lisis total (Sevanian y Ursini, 2000). La POL puede disminuir la fluidez de las membranas biológicas, inactivar enzimas y receptores asociados a la membrana celular y aumentar la permeabilidad al Ca^{2+}. Este fenómeno conduce a la formación de numerosos derivados tóxicos: los hidroperóxidos, los 4- hidroxi-alquenales, el MDA y otros (Dennis y Shibamoto, 1989). La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) constituye uno de los mecanismos que participa en la génesis de la placa ateromatosa (Salvayre *et al.*, 2002).

I.2.2 Daño oxidativo a las proteínas

Los aminoácidos más sensibles al daño oxidativo son el triptófano, la tirosina, la fenilalanina, la metionina y la cisteína (Stadtman y Levine, 2000). La tabla 1 muestra los mismos y los principales productos de oxidación correspondientes a cada uno.

En especial, el $^{\bullet}OH$ interactúa con muchos aminoácidos, y en ocasiones genera daños puntuales a proteínas que están unidas a metales de transición (Stadtman y Oliver, 1991; Aruoma, 1994). Los aminoácidos aromáticos y el anillo de imidazol de la histidina son hidroxilados como consecuencia de su reacción con el $^{\bullet}OH$. Los aminoácidos de cadena alifática, como son: valina, leucina, isoleucina y prolina cuando interactúan con el $^{\bullet}OH$ resultan peroxidados. Muchas ERO son capaces de oxidar los grupos sulfidrilos de las proteínas, lo cual conduce a su inactivación o reducción de su actividad biológica. Este efecto ha sido observado en numerosas enzimas, como: fosfofructo-quinasa, hexoquinasa, glutatión reductasa, glucosa-6-fosfatasa, adenilato ciclasa, guanilato ciclasa, proteína quinasa dependiente de AMPc, entre otras (León *et al.,* 2004).

Otro importante daño oxidativo, que tiene lugar en las proteínas, es la oxidación de los grupos amino de los aminoácidos a grupos carbonilo. Los residuos de mayor relevancia en este tipo de modificación son: lisina, arginina, prolina e histidina (León *et al.,* 2004). Por otro lado, el $ONOO^-$ también es responsable del daño a las proteínas por al menos tres mecanismos: 1) puede descomponerse y generar el $^{\bullet}OH$, 2) el $ONOO^-$ reacciona directamente con los grupos – SH proteicos y 3) puede reaccionar con los iones metálicos para generar una potente especie, el catión nitronio, capaz de nitrar muchos aminoácidos. Los residuos de tirosina nitrosilados son estables y constituyen indicadores del ataque del $ONOO^-$ a las proteínas (Simonian y Coyle, 1996).

Como resultado del ataque de las ERO se producen entrecruzamientos de cadenas polipeptídicas y fragmentación de las proteínas, perdiendo éstas su función biológica. Las consecuencias bioquímicas de las modificaciones oxidativas a las proteínas, incluyen la

pérdida de la función de receptores, enzimas y proteínas de transporte, así como la generación de nuevos antígenos que provocan respuestas inmunitarias.

I.2.3 Daño oxidativo al ADN.

El ˙OH es la ERO principal que actúa sobre el ADN, resultando todos sus componentes susceptibles a la acción de esta especie radicalaria. Los daños fundamentales que se obtienen de esta reacción redox son: ruptura de las hebras del ADN, hidroxilación de bases y fragmentación del azúcar 2-desoxi-D-ribosa por el ataque al grupo 3´-OH (Southorn y Powis, 1988; Henle y Linn, 1997; Box *et al.*, 2001). El ˙OH puede generarse en la vecindad del ADN, mediante la reacción de Fenton (Goldstein, 1993), a partir de los metales de transición, hierro y cobre, los cuales en condiciones de estrés oxidativo, pueden ser liberados de las proteínas que los mantienen secuestrados y a su vez unirse al ADN. Además, la movilización de Ca^{2+} inducida por ERO puede activar endonucleasas dependientes de este catión y provocar la fragmentación del ADN (Orrenius *et al.*, 1989; Fernández *et al.*, 1995). Cuando el NO˙ se produce en exceso, esta ERO se descompone en diferentes óxidos de nitrógeno para producir daño directo al ADN, entre ellos se encuentra el N_2O_3, el cual promueve la desaminación oxidativa de muchas aminas aromáticas primarias, incluyendo las purinas y pirimidinas (León *et al.*, 2004). La tabla 2 muestra los productos finales derivados del ataque del ˙OH y el N_2O_3 a las bases del ADN. Las consecuencias *in vivo* del daño oxidativo al ADN, incluyen: alteraciones estructurales del ADN, debido a mutaciones, pérdida e inserción de bases; las cuales a su vez conducen a la pérdida de la expresión de genes o a la síntesis de una proteína anormal; como consecuencia se producen alteraciones en el metabolismo y el crecimiento, así como un funcionamiento inadecuado de las vías de señalización celular; todas estas disfunciones fisiológicas conllevan al desarrollo de enfermedades, como el cáncer, al envejecimiento, e incluso pueden conducir a la muerte celular (León *et al.*, 2004).

I.3 Mecanismos de defensa antioxidante.

Las sustancias antioxidantes pueden clasificarse en antioxidantes primarios, secundarios o terciarios en cuanto a la función que realizan para ejercer este tipo de actividad biológica.

Los **antioxidantes primarios** son los que previenen la formación de nuevas ERO. Este efecto se logra con la conversión de las ERO en moléculas menos perjudiciales, antes de que éstas puedan reaccionar; o evitan su producción a partir de otras moléculas. En este grupo se destacan las enzimas antioxidantes: SOD, GPx y CAT, así como las proteínas de unión a metales ferritina y ceruloplasmina (RANDOX, 1996, Matés, 1999).

Los **antioxidantes secundarios** capturan los radicales libres y evitan las reacciones en cadena. Ejemplos de ellos son: vitamina E y C, β-carotenos, ácido úrico, bilirrubina, albúmina y glutatión.

Los **antioxidantes terciarios** son los encargados de la reparación de las biomoléculas dañadas. En este grupo se incluyen las enzimas reparadoras del ADN y la metionina sulfóxido reductasa.

En la figura 1 aparece una representación de la interacción entre los sistemas antioxidantes.

A continuación se relacionan las principales características de las sustancias antioxidantes, clasificadas en cuanto a su localización.

I.3.1 Mecanismos antioxidantes endógenos

I.3.1.1 Enzimas antioxidantes

Las SOD (EC 1.15.1.1) son un grupo de metaloenzimas que pueden dividirse en dos familias filogenéticas diferentes CuZn-SOD y Mn-SOD. Las SOD catalizan la conversión de $O^{\bullet-}_2$ a HyO,conunaconstantedereacción de 2 x 10^9 $M^{-1}.s^{-1}{}_2O_2{}_2$ para la CuZn-SOD (Guiseppe, 1972; Zelko *et al.*, 2002). En los organismos eucariotas existen tres tipos diferentes de SOD en dependencia de su localización, que en su conjunto contribuyen a regular las concentraciones de $O^{\bullet-}_2$ (Marklund, 1992).

Las GPx (EC 1.11.1.9) son enzimas dependientes de selenio (Se) y son uno de los sistemas antioxidantes más importantes de la célula (Matés *et al.*, 1999). Contienen un átomo de Se unido a un residuo de cisteína en cada una de las cuatro subunidades idénticas. La GPx tiene

un peso molecular de aproximadamente 80 kDa. El Se es esencial para la actividad de la enzima. Se han indentificado cinco isoenzimas de la GPx en mamíferos en dependencia de su localización (Matés *et al.*, 1999). La GPx ejerce su acción destoxificante por la reducción del $H2O_2$ o los hidroperóxidos (ROOH). La GPx tiene mucho mayor afinidad por el H_2O_2 en concentraciones relativamente bajas que la CAT. La GPx utiliza el glutatión reducido (GSH) como cofactor y es altamente específica por el mismo, por tanto, para que pueda mantenerse la actividad de esta enzima se requiere de otra enzima, la glutatión reductasa, responsable de la regeneración del glutatión oxidado (GSSG) a reducido (GSH) (McCord, 2000).

La CAT (EC 1.11.1.6) es una metaloproteína tetramérica que contiene cuatro subunidades de 60 kDa. Cada una contiene un grupo hemo. Se localiza en la matriz de los peroxisomas y en las mitocondrias, mientras que en los eritrocitos se encuentra en el citosol. Existen muchas isoformas de la CAT, la mayoría presenta Fe, pero algunas poseen Mn. Reacciona con el H_2O_2 para generar H_2O y O_2. Aunque su afinidad por el H_2O_2 es inferior a la que exhibe la GPx, bajo condiciones de sobreproducción, puede asumir el papel protagónico en la eliminación del $H2O_2$ (García *et al.*, 1994).

I.3.1.2 Glutatión

El **glutatión** es un tripéptido, γ-glutamil-cisteinil-glicina, que se encuentra en todas las células y es el compuesto con grupos –SH más abundante en los tejidos. El GSH se sintetiza a partir de los aminoácidos precursores en el citosol de prácticamente todas las células. La disponibilidad de L-cisteína es muy importante en la síntesis del GSH. El proceso de síntesis de GSH ocurre en dos pasos y ambas reacciones requieren ATP:

L-glutamato + L-cisteína + ATP $\xrightarrow{\text{γ-glutamil-cisteína sintetasa}}$ γ-glutamil-L-cisteína + ADP + Pi

γ-glutamil-L-cisteína + L-glicina + ATP $\xrightarrow{\text{GSH sintetasa}}$ GSH + ADP + Pi

La γ-glutamil-cisteína sintetasa (GCS) cataliza el paso limitante en la síntesis del GSH. Está compuesta por una subunidad pesada (73 kDa) y otra ligera (30 kDa) que están codificadas por genes diferentes. En la subunidad pesada está presente toda la actividad catalítica de la GCS y la ligera es reguladora de la función de la enzima. La GCS es regulada por retroalimentación negativa por el GSH y por la disponibilidad de cisteína. La GCS es regulada además por el estrés oxidativo y el TNFα, los que incrementan su actividad. El segundo paso de la síntesis del GSH es catalizado por la GSH sintetasa, una enzima que no es regulada por el GSH y ha sido muy poco estudiada (Griffith, 1999; Anderson, 1998).

Las principales funciones del GSH son: capturar los radicales libres, servir de cofactor de la GPx, preservar los grupos –SH en proteínas al prevenir su oxidación, ser reservorio de cisteína (León *et al*., 2004).

I.3.2 Mecanismos antioxidantes exógenos

Vitamina E es un término genérico para designar diferentes tocoferoles. De ellos el más activo y abundante es el α-tocoferol. Su estructura le permite reaccionar con los radicales libres, interactuar con los radicales lipídicos e impedir las reacciones de propagación. Como resultado se oxida a la forma radicalaria α-tocoferilo, el cual se regenera a α-tocoferol con la intervención del ácido ascórbico y del GSH (Aruoma, 1996).

La actividad biológica de la vitamina E resulta de sus propiedades antioxidantes y es importante en el mantenimiento de la integridad y estabilidad de las membranas biológicas al proteger los ácidos grasos poliinsaturados de la oxidación. El α-tocoferol es también un importante inhibidor de la formación de nitrosaminas, por su capacidad de captar el $NO^{\bullet}$ (Muller, 1995; Aruoma, 1996).

El **ácido ascórbico** (vitamina C) se considera el más potente antioxidante de fase acuosa presente en los mamíferos. A pH 7,4 el ácido ascórbico está presente en un 99,95 % como ascorbato, por tanto, en condiciones fisiológicas las propiedades antioxidantes de la vitamina C se deben a esta especie, la cual una vez que interactúa con los radicales libres, se transforma en una especie radicálica (radical semidehidroascorbato) menos activa que el radical captado

(Fontham, 1994; Chen y Tappel, 1995). El mismo puede eliminar $O^{\bullet -}$, HO y $^{1}{}_{222}O_2$. El ácido ascórbico también participa en la regeneración del α-tocoferol (Sies *et al.,* 1992). Otra función muy importante de la vitamina C es la formación y mantenimiento del colágeno, la cual es requerida para la actividad de las enzimas encargadas de la conversión de la prolina y la lisina en hidroxiprolina e hidroxilisina, las cuales son importantes en la estructura del colágeno (Kivirikko y Prockop, 1967).

El ácido ascórbico, según el pH donde se encuentre, forma un complejo redox donde media una especie radicálica (radical ascorbilo) en el equilibrio entre ácido ascórbico y dehidroascórbico. Actualmente se considera, que como consecuencia de este mecanismo, las concentraciones elevadas de ácido ascórbico pueden ser generadoras de radicales libres (Niki, 1987). Aunque existen sistemas enzimáticos capaces de regenerar el ácido ascórbico que emplean NADH (NADH semidehidroascorbato reductasa) o GSH (GSH-semidehidroascorbato reductasa), estos son mayormente intracelulares, por lo que en condiciones de estrés oxidativo, las concentraciones de ascorbato en los fluidos disminuyen rápidamente (Diplock, 1994; Fontham, 1994).

Los **carotenoides**, junto con la vitamina E, son los antioxidantes principales de las membranas biológicas, y en los animales se obtienen también a partir de la dieta. Entre los más comunes se encuentran: el β-caroteno, el licopeno, la luteína y la criptoxantina. Son capaces de inactivar al $^{1}O_2$ y a los radicales libres. Los carotenos son especialmente reactivos con los lipoperóxidos. Su efecto antioxidante se debe a la interacción entre los dobles enlaces conjugados de la cadena insaturada y el radical. Los carotenoides, también son precursores de la vitamina A y muestran propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas (Edge *et al.,* 1997).

I.3.2.1 Taninos o Polifenoles.

I.3.2.1.1 Definición y distribución.

"Tanino" es un término técnico, que representa una mezcla de compuestos polihidroxifenólicos (Martínez Luzardo, 1995). Los taninos (polifenoles) constituyen un grupo

significativo de compuestos secundarios de las plantas, que de acuerdo a la definición clásica de Bate-Smith y Swain (1962), son fenoles solubles en agua con un peso molecular entre 500-3000 (500- 5000, Swain, 1965), que además de las reacciones de los fenoles, tienen la propiedad de precipitar los alcaloides, gelatinas, las proteínas y los minerales (Haslam, 1996).

Los taninos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en diferentes partes de las plantas, incluyendo: semilla, raíces, corteza, hojas y frutos. Se encuentran comúnmente en frutas (uvas, fresas, cerezas, manzanas), en el té, en el chocolate y en los vinos. Ellos son responsables del gusto astringente que experimentamos cuando tomamos vinos o comemos frutas frescas, y del color llamativo visto en las flores y en las hojas en el otoño (Haslam, 1996).

I.3.2.1.2 Clasificación.

En general, los taninos se clasifican en taninos hidrolizables, taninos condensados y taninos complejos (Figura 3) (Martínez Luzardo, 1995).

Los taninos hidrolizables son compuestos poliester de carbohidratos, generalmente D-glucosa. Los grupos hidroxilo de estos carbohidratos están parcialmente o totalmente esterificados con los ácidos carboxílicos fenolados de ácido gálico (galotaninos) o de ácido elágico (elagitaninos). Estos compuestos se hidrolizan con facilidad por la acción de ácidos, álcalis o enzimas. El principal representante comercial de los taninos hidrolizables es él ácido tánico (Martínez Luzardo, 1995).

Los taninos condensados (proantocianidinas) están más ampliamente distribuidos que los taninos hidrolizables. Estos son oligómeros o polímeros de unidades de flavonoides, como por ejemplo el flavan-3-ol (catequina), unidas por enlaces C-C o C-O-C, no suceptibles a la hidrólisis. Los taninos condensados pueden contener de 2 a 50 o más unidades de flavonoides, constituyendo polímeros con estructuras complejas debido a que las unidades de flavonoides pueden diferir en algunos sustituyentes y porque pueden existir sitios variables de enlace entre las mismas. El término, proantocianidina, es derivado de la reacción de oxidación de las mismas por calentamiento en soluciones de alcohol acídicas, la cual produce las

antocianidinas rojas. Los pigmentos de antocianidinas son responsables de la amplia gama de colores encontrados en las flores, hojas, frutos, jugos de frutas y vinos (Martínez Luzardo, 1995).

En el grupo de los taninos complejos se encuentran taninos condensados, en cuyas estructuras están presentes además de las unidades de flavonoides, grupos sustituyentes de los taninos hidrolizables. Ejemplos: 3-O- galato (-)-epicatequina, 3'3'-di-O-galato procianidina B-2 (Martínez Luzardo, 1995).

I.3.2.1.3 Propiedades farmacológicas.

Entre las propiedades farmacológicas fundamentales de este tipo de compuestos, se destacan las siguientes: antioxidantes, aceleradoras de la curación de las heridas, antimicrobianas, antifúngicas, antiinflamatorias, analgésicas, antitumorales y antiulcerosas.

Varios trabajos informan que los polifenoles, como compuestos individuales o formando mezclas complejas en extractos obtenidos de diferentes plantas, muestran propiedades antioxidantes. Las mismas han estado vinculadas con su capacidad secuestradora de radicales libres (Goncalves *et al.*, 2005; Matkowski y Piotrowska, 2006; Senevirathne *et al.*, 2006;), la acción quelante de iones de hierro (Sestili *et al.*, 2002; Higuchi *et al.*, 2003; Weinreb *et al.*, 2004), el efecto protector sobre el daño oxidativo a las principales biomoléculas (Martínez *et al.* 2000; Misra *et al.*, 2003; Lee *et al.,* 2003; Cheung y Cheung, 2005) y la inducción de antioxidantes endógenos (Chan *et al.*, 2002; Vayalil *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006; Mokni *et al.*, 2007).

Estudios realizados con una combinación de un extracto de proantocianidinas y resveratrol indican que estos taninos facilitan la curación de las heridas, por promover la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular, un elemento clave en la angiogénesis de la herida (Sen *et al.*, 2002a). La aplicación tópica de un extracto de proantocianidinas de la semilla de la uva sobre heridas dérmicas en ratones, aceleró la contracción y el cierre de las heridas, así como incrementó la proliferación de la región epitelial, la densidad celular y la deposición de tejido conectivo; a su vez mejoró la arquitectura histológica (Khanna *et al.*, 2002). El extracto

alcohólico de flores de la planta *Catharanthus roseus* L. mostró actividad cicatrizante en un modelo de heridas de incisión en ratas, evidenciada en un aumento en la velocidad de contracción de la herida y de la epitelización, además incrementó el peso del tejido de granulación y el contenido de hidroxiprolina (Nayak y Pinto, 2006). Efectos similares se obtuvieron con el empleo de extractos acuosos y metanólicos de hojas de la plantas *Vernonia arborea* Hk (Manjunatha *et al.*, 2005) y *Leucas hirta* (Manjunatha *et al.*, 2006).

Varios taninos, tales como, ácido tánico, ácido gálico, ácido elágico, epicatequina, epicatequina galato y epigalocatequina galato mostraron actividad antibacterial frente a *Staphylococcus aureus* (Akiyama *et al.*, 2001). En otra investigación se reveló que los taninos hidrolizables exhibieron propiedades antifúngicas frente a las levaduras: *Candida glabrata; Candidata krusei* y *Cryptococcus neoformans* (Latté y Kolodziej, 2000). Ho *et al.*, (2001) señalaron que taninos aislados de *Vaccinium vitis-idaea* L. exhibieron actividad antimicrobiana frente a patógenos periodontales como *P. gingivalis* y *P. intermedia*.

El extracto acuoso de hojas de la planta *Psidium guajava Linn* mostró efectos antiinflamatorios y analgésicos, evidenciados en una inhibición de forma dependiente de la dosis del edema, en un modelo de edema plantar inducido por albúmina en ratas y del dolor, inducido térmicamente empleando el método del "plato-caliente" y químicamente con ácido acético, en ratones (Ojewole, 2006). En otro estudio se informan los mismos efectos farmacológicos para el extracto metanólico y sus fracciones obtenidos de la especie *Hypericum reflexum* L. en ratones, en los ensayos de edema de la oreja inducido por el tetradecanoil forbol acetato (TPA) y de dolor inducido por ácido acético (Sánchez-Mateo *et al.*, 2006).

Varios trabajos demuestran las propiedades antitumorales de los taninos. Uno de ellos señala que el ácido tánico en bajas dosis mostró un efecto protector sobre el desarrollo de neoplasmas hepáticos (adenomas y carcinomas) en ratones machos C 3H (Nepka *et al.*, 1999). En otro estudio se indica que la epigalocatequina galato indujo muerte celular apoptótica en células de tumor orales humanas, mediante la activación de caspasas y la fragmentación del ADN (Sakagami *et al.*, 2005). Santoshkumar *et al.*, (2007) reportaron que la administración oral del

extracto metanólico de la planta *Hypericum hookerianum* a ratones que padecen del tumor denominado carcinoma ascítico de Ehrlich, incrementó la sobrevivencia de los animales; disminuyó el peso corporal de los mismos, que aumentó con la presencia del tumor; redujo el conteo de células en el tejido viable y alteró muchos parámetros hematológicos, que cambiaron durante la progresión del tumor.

Un trabajo informa que el extracto derivado de las hojas de la planta *Casearia sylvestris* redujo el tamaño de la ulceración e incrementó el número de fibras de colágeno después de 5 días de tratamiento de úlceras crónicas inducidas con ácido acético (Sertié *et al.*, 2000). En otro estudio se indica que la administración oral del extracto hidroalcohólico de hojas de la especie *Campomanesia xanthocarpa* mostró actividad anti-ulcerogénica en la mucosa gástrica de ratas (Ortega *et al.*, 2004). Pushpangadan *et al.*, (2004) demostraron que el extracto etanólico de *Utleria salicifolia* exhibió un efecto protector sobre el desarrollo de úlceras en diferentes modelos de úlceras agudas y crónicas inducidas con diversos agentes: aspirina, etanol y ácido acético.

I.4 Composición química y propiedades farmacológicas del extracto acuoso de cortezas de *Rhizophora mangle* L.

I.4.1 *Rhizophora mangle* L.: Características generales.

El manglar es un bosque que marca la transición entre el mar y la tierra. Los manglares están extendidos en las regiones entre 30° al norte y al sur del ecuador, por lo que representan una amplia distribución (Spalding, 1997). Los manglares constituyen la formación boscosa más importante de Cuba y representan el 26 % de la superficie de bosques y el 4,8 % de la superficie del país. Por su extensión, los manglares cubanos ocupan el noveno lugar del mundo. En nuestro país la vegetación de manglar está representada por cuatro especies arbóreas, *Rhizophora mangle*, mangle rojo; *Avicennia germinans*, mangle prieto; *Laguncularia racemosa*, patabán y *Conocarpus erectus*, yana; según datos del MINAGRI

(1988).

El mangle rojo es un árbol con cortezas astringentes, que alcanza una altura de 10 m o más. Su madera es dura, de color pardo-rojizo y posee un contenido de taninos muy elevado, inusual en el reino vegetal. Análisis efectuados señalan que la corteza de árboles jóvenes de esta especie pueden contener hasta un 15 % de taninos, pero en árboles maduros es mucho mayor, pudiendo alcanzar hasta un 42 %, con un promedio general del 30 % (MINAGRI, 1984).

I.4.2 Composición química del extracto acuoso de cortezas de *Rhizophora mangle L.*

La caracterización química realizada al extracto acuoso de la corteza de *R. mangle* reveló la presencia de polifenoles (54,78 %), representados en su mayoría por taninos poliméricos (80 %) y taninos hidrolizables (20 %), destacándose la presencia en estos últimos de epicatequina, catequina, ácido clorogénico, ácido gálico y ácido elágico, además se encontraron galotaninos y elagitaninos. De las estructuras no tánicas, se refiere la presencia de carbohidratos (17,5 %) libres y enlazados (Xilosa, Ramnosa, Glucosa, Fucosa, Arabinosa, Manosa y Galactosa); ácidos grasos (4,0 %) de cadena larga, saturados e insaturados, desde C 10:0 hasta C 24:0; fitoesteroles (0,0285 %), representados por estigmasterol, sitoesterol y posiblemente campesterol; componentes volátiles o semivolátiles (70 compuestos) (0,0205 %) y aromas o aceites esenciales no volátiles (Sánchez, 1998).

I.4.3 Propiedades farmacológicas del extracto acuoso de cortezas de *Rhizophora mangle* L.

En Medicina Tradicional se le atribuyen diferentes propiedades a los preparados obtenidos a partir de la planta *Rhizophora mangle L*. Su corteza se emplea en forma de cocimiento para el tratamiento de enfermedades de la garganta y en la tuberculosis pulmonar (Roig, 1988). El cocimiento de la corteza y las raíces se usan contra la lepra y el jarabe contra el asma. La decocción de las hojas es empleada en el tratamiento de personas afectadas por envenenamientos con pescados contaminados, úlcera péptica, trastornos digestivos, infecciones de la piel y enfermedades venéreas (Rojas y Coto, 1978). Se reporta dentro de las siete plantas americanas con actividad antifúngica (Cáceres *et al*., 1993).

En la última década se demostraron varias propiedades farmacológicas del extracto acuoso de la corteza de *R. mangle* y se desarrollaron dos productos veterinarios a partir del mismo, UDERTAN®, desinfectante mamario post-ordeño y CIKRON-V®, antiséptico y cicatrizante. Estudios realizados por Armenteros (1998), mostraron la eficacia del UDERTAN® en la prevención de la mastitis bovina. Varios resultados indican los efectos beneficiosos en la curación de heridas del extracto de *R. mangle* (Figueroa *et al.,* 1995***;*** Bulnes *et al.*, 2001) y el CIKRON-V® (Fernández *et al.*, 2002). También se demostraron las propiedades antimicrobianas tanto por el extracto acuoso de *R. mangle* en estudios *in vitro* (Montes de Oca *et al.*, 2001; Melchor *et al.*, 2001), como por el producto CIKRON-V®, el cual evidenció propiedades antisépticas *in vivo* en un modelo de curación de heridas (Melchor *et al.*, 2001a), además resultó eficaz en la prevención de las infecciones umbilicales en perros, ovinos (Solano *et al.*, 2000) y en terneros neonatos (Gutiérrez *et al.*, 2001), así como en el tratamiento de la sarna y la tiña del conejo (Melchor *et al.*, 2004). Además, en las infecciones uterinas en bovinos resultó exitoso tanto el empleo del extracto de *R. mangle* (Agüero, 1998) como el CIKRON-V® (Agüero, 2004). También este extracto mostró eficacia en el tratamiento de úlceras gastroduodenales (Sánchez *et al.*, 2001). Además, el mismo exhibió propiedades antiinflamatorias *in vitro*, evidenciadas en su efecto inhibidor de la actividad de la Fosfolipasa A2 de secreción (Marrero *et al.*, 2006).

I.5 Curación de heridas.

I.5.1 Concepto.

La curación es el conjunto de procesos biológicos, físico - químicos y celulares que se producen como respuesta de los tejidos a una lesión y tienen como finalidad obtener la recuperación funcional de los mismos (Torres, 1986). Camba Capaz (1979) y García (1970) lo definen como un proceso natural de los tejidos orgánicos vivos, por el cual se origina otro nuevo de naturaleza embrionaria, que pronto se transforma en adulto y da lugar a la curación de la herida.

I.5.2 Fases del proceso de curación de heridas.

El estudio del proceso de curación en heridas agudas empleando modelos animales, mostró que independientemente de la clasificación de la herida, que incluye, aquellas producidas de forma mecánica o por quemaduras, limpias o infectadas, simples o complejas, tiene un mismo esquema fundamental (Kerstein, 1997).

En el proceso de curación ocurren una serie de acontecimientos bioquímicos y fisiológicos integrados, altamente dinámicos. Aunque se ha dividido en cinco etapas o fases separadas para la mejor comprensión de este fenómeno, en realidad ocurren simultáneamente. Las principales características de las mismas descritas por Jurlow (1996), se señalan a continuación.

I.5.2.1 Fase de latencia o inflamatoria.

Inmediatamente de producida la herida comienza un proceso inflamatorio, se inicia con una vasoconstricción refleja transitoria, seguida de una vasodilatación de todos los capilares sanguíneos locales. Este cambio brusco, en la tonicidad de los vasos sanguíneos locales, produce en el endotelio capilar alteración de su permeabilidad, provocando que a las pocas horas de ocurrida la lesión, el fondo de la herida se llene de un exudado inflamatorio muy rico en células como leucocitos polimorfonucleares, macrófagos, eritrocitos, proteínas plasmáticas solubles y bandas de fibrina.

Los leucocitos y los macrófagos constituyen la primera línea de defensa del organismo; dotados de gran movilidad en este período, comienzan a fagocitar fragmentos celulares y residuos de los tejidos dañados.

La duración e intensidad de esta respuesta inflamatoria depende de la cantidad de tejido destruido, en general podemos decir que dura aproximadamente hasta 4 días. Una herida extensa, sea por una gran pérdida de tejido inicial o por una infección, puede prolongar esta fase inflamatoria por más tiempo.

I.5.2.2 Fase de epidermización.

Mientras se eliminan los deshechos de tejido de las regiones más profundas, tiene lugar la epidermización de la herida a partir de sus bordes, esto comienza aproximadamente a las 20 ó 24 h de ocurrida la lesión.

Las células basales fijas del estrato germinativo de la epidermis en la zona cercana al borde lesionado, experimentan una serie de divisiones mitóticas y las células hijas migran a lo largo de las bandas de fibrina en todas direcciones, especialmente hacia el borde contrario a fin de establecer un puente epitelial.

En 48 h la superficie de la herida está cubierta en su totalidad de un nuevo epitelio, mientras que en su parte más profunda encontramos aún exudado inflamatorio.

I.5.2.3 Fase celular.

A medida que mejora la reacción inflamatoria y aumenta el espesor de la superficie epitelial aparece un nuevo tipo de células en la profundidad de la herida. Este nuevo tipo de células son los fibroblastos, que encontramos a partir del 2do y 3er día de ocurrida la lesión y al cabo del 10mo día dominan la población celular, son responsables de la formación de fibras de colágeno.

Cuando los fibroblastos alcanzan una densidad suficiente, entre el 2do y 3er día, empieza la síntesis de fibras colágenas, las que no aparecen en la herida hasta el 4to ó 5to día. Las moléculas de colágeno fuera de la célula se orientan y entrecruzan determinando las propiedades físicas de las cicatrices. Esta orientación no tiene una disposición al azar, pues en las cicatrices en desarrollo, las fibras se disponen en orientación directa con las membranas celulares.

En esta fase se produce, además, el proceso de angiogénesis, el cual consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos, necesarios para proveer de oxígeno y nutrientes al tejido cicatricial.

I.5.2.4 Fase de fibroplasia.

Se inicia a los 4 ó 6 días de ocurrida la lesión, cuando aparecen las primera fibras colágenas. La maduración y proliferación de las fibras de colágeno, llevan a la formación de un cordón grueso, resistente, rasgo anatómico de la herida o cicatriz y que termina por unir los bordes de la herida.

El resultado final de la fase de fibroplasia es la remodelación de la cicatriz, que poco a poco ahoga a los capilares, las fibras colágenas se retraen y se torna pálida.

I.5.2.5 Fase de retracción o contracción.

La literatura sobre retracción de las heridas incluye muchas teorías. En general se ha visto que la fuerza que actúa en la retracción radica en las células vivas. Los fibroblastos; situados inmediatamente debajo del borde dérmico en el proceso de avance se apoyan fuertemente a la dermis y al lecho de la herida, al liberarse de ambas vinculaciones permite la retracción del borde libre. Estas fuerzas de retracción tienden a cerrar la herida cuando se llega a un equilibrio al igualarse la tensión con la piel circundante. De lo anterior se deduce que la retracción depende en gran medida de la tensión de la piel circundante al defecto, y no de la producción de nueva piel, debido a que las fibras colágenas no poseen proteínas contráctiles.

I.5.3 Biomodelos de curación de heridas para el estudio de la actividad antioxidante.

La literatura refiere el empleo de modelos de curación de heridas para el estudio de este fenómeno y de las propiedades aceleradoras de la curación de heridas de diferentes preparaciones en condiciones asépticas (Shukla *et al*., 1999, Gupta *et al*., 2005 y Gupta *et al*., 2006), en heridas infectadas (Holder *et al*., 1997; Konturek *et al*., 2000), así como en presencia de enfermedades como la diabetes (Musalmah *et al*., 1995) y en condiciones de inmunosupresión (Gupta *et al*., 2002). A su vez algunos de los mismos se han usado para la determinación de la actividad antioxidante de varias sustancias, lo cual se sustenta en que la curación de heridas se inicia con una fase inflamatoria, en la que los leucocitos PMN y macrófagos migran al sitio de la lesión y generan gran cantidad de ERO (Sen *et al*., 2002). La utilización del modelo de heridas cutáneas por excisión en condiciones asépticas en ratas se

reportó por Shukla *et al*., (1999), Gupta *et al*., (2005) y Gupta *et al*., (2006) para demostrar las propiedades antioxidantes del Asiaticoside, un compuesto derivado de la planta *Centella asiatica*, del extracto acuoso y de la flavona de hojas de la planta *Seabuckthorn* (*Hippophae rhamnoides L.*) respectivamente, evidenciadas por la elevación de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx, el aumento de las concentraciones de GSH y la disminución de la POL a los 7 días de provocadas las heridas. También se ha utlilizado este mismo tipo de modelo empleando ratas diabéticas, enfermedad en la que se conoce que se genera un estado de estrés oxidativo y se presentan dificultades en el proceso de curación de las heridas, así Musalmah *et al*., (1995) informó que la evaluación del extracto de vitamina E procedente de palma en este modelo elevó los antioxidantes enzimáticos en el área de la herida y disminuyó la concentración de MDA a los 10 días de tratamiento.

II. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

II.1 MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.

II.1.1 Reactivos

Los reactivos cloruro de hierro (III), ácido etiléndiaminotetracético, peróxido de hidrógeno, ácido ascórbico, ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico (ATB), butil hidroxitolueno (BHT) y la albúmina sérica bovina (ASB) se obtuvieron de los Laboratorios Sigma (St. Louis, MO). El ácido clorhídrico, el hidrógeno fosfato de sodio y el dihidrógeno fosfato de sodio procedían de los laboratorios Merck (Alemania).

II.1.2 Obtención de las preparaciones botánicas.

II.1.2.1 Extracto acuoso de *Rhizophora mangle L*.

Las cortezas de *Rhizophora mangle L*. (ERm) se colectaron en la zona de la Playa Caimito, La Habana, en junio del año 2002. Estas fueron autenticadas por el Herbario del Jardín Botánico Nacional (No. de muestra: 68/02 001001). Las mismas se secaron a temperatura ambiente durante72 a 120 h hasta que alcanzaron un valor de humedad relativa inferior al 15 %.

El extracto acuoso de cortezas de *R. mangle* se obtuvo en la Planta de Reactores del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), a partir de la decocción acuosa de las cortezas previamente molinadas, en una proporción (1: 7.5, p/v) durante 30 min a 95 °C. A continuación el material obtenido se filtró y se centrifugó en una centrífuga de flujo continuo para eliminar las partículas mayores de 1 mm. Posteriormente, el extracto acuoso se concentró hasta una concentración de 24 mg de materia seca/ mL de solución. La concentración se determinó en base a los sólidos totales en balanza infrarroja. Una parte del extracto acuoso se empleó para la obtención de la fracción polifenólica mayoritaria y el resto se liofilizó y se conservó a -20°C hasta el momento del ensayo.

II.1.2.2 Fracción polifenólica mayoritaria.

La fracción polifenólica mayoritaria (FRm) se obtuvo mediante la precipitación con NaCl del ERm, a una concentración de 24 mg/mL, en una proporción de 18 g de la sal en 50 mL de ERm (Matsuo y Itoo, 1980). El NaCl se trituró en un mortero antes de ser añadido lentamente al extracto, en condiciones de agitación y calentamiento a 70 °C durante 10 min. El sobrenadante se decantó para tubos de centrifugación de 50 mL y las muestras se centrifugaron a 3500 $r \cdot m^{-1}$ durante 15 min a temperatura ambiente. El precipitado obtenido se disolvió en agua desionizada y se le realizaron tres extracciones con n-butanol (1:2, v/v) para eliminar las sales contaminantes. La fase butanólica se colectó y se rotoevaporó hasta sequedad para la eliminación del solvente orgánico. El material obtenido, correspondiente a la FRm, posteriormente se liofilizó y se conservó a -20°C hasta el momento del ensayo.

II.1.3 Determinación de la concentración de taninos en las preparaciones evaluadas.

La concentración de taninos en el ERm y en la FRm se determinó mediante el método colorimétrico de precipitación de proteínas, con ASB, descrito por Hagermann y Butler (1978).

II.1.4 Aspectos generales en el desarrollo de los ensayos.

El empleo de ensayos colorimétricos para la evaluación de las propiedades antioxidantes de estas preparaciones coloreadas, hizo necesario determinar la interferencia del color de las mismas a las diferentes concentraciones ensayadas en cada sistema de reacción usado, la cual posteriormente se restó a los resultados para obtener los valores finales.

II.1.5 Análisis estadístico

A los resultados del estudio de la actividad antioxidante desde el nivel de reacciones químicas hasta el nivel celular se le realizó análisis de regresión lineal para obtener las curvas de regresión que relacionan las dosis con el efecto del extracto de *R. mangle* y su fracción polifenólica mayoritaria y posteriormente se hizo la comparación de las mismas, empleando el

paquete estadístico STATGRAPHICS versión 4.1 para WINDOWS, considerando valores estadísticamente significativos para $p < 0,05$.

II.1.6 Consideraciones éticas

En los ensayos donde se utilizaron animales de laboratorio, los procedimientos fueron realizados según lo aprobado por los Comité Internacionales para el Cuidado de los Animales y de acuerdo con las regulaciones nacionales para la experimentación animal (R 15: Cuidado y Manejo de animales de laboratorio. Principios éticos).

II.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Rhizophora mangle L* Y SU FRACCIÓN POLIFENÓLICA MAYORITARIA A NIVEL DE REACCIONES QUÍMICAS.

II.2.1 Introducción.

El empleo de métodos experimentales basados en reacciones químicas para el estudio del efecto antioxidante de diferentes productos naturales está ampliamente extendido (Valentao *et al.*, 2002; Ellnain-Wojtaszek *et al.*, 2003; Weinreb *et al.*, 2004; Senevirathne *et al.*, 2006). Estos sistemas incluyen un conjunto de métodos, cuyo basamento general consiste en la integración de un subsistema generador de la ERO de interés y otro, de detección de la molécula blanco, colocándose en el medio de reacción la sustancia a evaluar. Ellos permiten, a través de reacciones químicas, detectar si las acciones del agente que estudiamos están directamente relacionadas con su capacidad de capturar ERO o con mecanismos que impidan su formación (Halliwell, 1990).

Entre las ERO de mayor importancia biológica se encuentran el $O^{\bullet-}_2$ y el $^{\bullet}OH$. El primero en presencia de H_2O_2 y trazas de metales de transición, como hierro y cobre, puede dar lugar a través de la reacción de Haber-Weiss, al $^{\bullet}OH$ (Haber y Weiss, 1934), considerado el radical más reactivo encontrado en los sistemas biológicos, el cual tiene la capacidad de reaccionar con casi todas las moléculas biológicas, con constantes de velocidad del orden de 10^9-10^{10} $M^{-1}\cdot s^{-1}$ (Aruoma, 1996).

Entre los métodos más utilizados para el estudio del efecto antioxidante a nivel de reacciones químicas, se encuentran: el ensayo del DPPH, para determinar la capacidad secuestradora de este radical (Molyneux *et al.*, 2004); el ensayo de la degradación oxidativa de la 2-desoxi-D-ribosa por $^{\bullet}OH$, el cual permite evaluar la capacidad secuestradora de $^{\bullet}OH$ de un determinado compuesto y la capacidad quelante de iones de hierro (Aruoma, 1994a); el sistema xantina/xantina oxidasa, el cual se emplea para la generación de $O^{\bullet-}_2$ en un medio acelular y por tanto, permite determinar el efecto que tiene una sustancia sobre la generación de esta ERO (Imanari *et al.*, 1977).

El extracto acuoso de *Rhizophora mangle L.* se caracteriza por poseer un elevado contenido de taninos (54,78 %), correspondiéndole a su fracción mayoritaria el 80 % de los mismos (Sánchez, 1998). Existen reportes en la literatura sobre los polifenoles puros y aquellos integrantes de diferentes extractos vegetales que informan sobre su actividad secuestradora de radicales DPPH (Ellnain-Wojtaszek *et al.*, 2003; Alasalvar *et al.*, 2006), sus propiedades de disminuir la generación del $O^{\bullet-}_2$ (Lin *et al.* *etal.*,2000;Senevirathne,2006)ylosOH (Valentao *et al.*, 2002; Valentao *et al.*, 2002a), así como su capacidad para unirse a los iones de hierro (Higuchi *et al.*, 2003; Weinreb *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta que la composición química del extracto acuoso de *Rhizophora mangle L.* y su fracción polifenólica mayoritaria sugiere la existencia de una potencial actividad antioxidante en ambos, que aún no ha sido explorada y en particular, que las propiedades antioxidantes relacionadas con el secuestro o los mecanismos que impiden la formación de ERO no se conocen, y que además, se dispone de una batería de ensayos ampliamente utilizados con estos fines en otros extractos vegetales y compuestos polifenólicos aislados de los mismos, el objetivo de este capítulo es:

Determinar a nivel de reacciones químicas si el extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria poseen actividad secuestradora de radicales libres y acción quelante de iones de hierro.

II.2.2 Materiales y Métodos

II.2.2.1 Reactivos

Los reactivos 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, xantina, xantina oxidasa, nitroazul de tetrazolio y el fluoroglucinol se obtuvieron de Laboratorios Sigma (St. Louis, MO). El dimetil sulfóxido provenía de BDH (U.K.). La 2-desoxi-D-ribosa, el ácido clorhídrico, el carbonato de sodio, el hidrógeno fosfato de sodio y el dihidrógeno fosfato de sodio procedían de los laboratorios Merck (Alemania).

II.2.2.2 Ensayo del 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

La formación de radicales DPPH se evaluó según el método descrito por Kubo *et al*., (1984). El extracto de *R. mangle* (4,2; 8,5; 17,0; 34,0 µg/mL de taninos) y su fracción polifenólica mayoritaria (2,3; 4,6; 9,2; 18,3 µg/mL de taninos) a las concentraciones finales indicadas, preparados en etanol absoluto, se añadieron a una solución etanólica de DPPH 100 µM, previamente incubada a 37 ºC, en un volumen final de 3,0 mL. A partir de este momento la formación de radicales DPPH se siguió espectrofotométricamente durante 10 min, determinando la absorbancia a 517 nm. Como sustancias de referencia se utilizaron el BHT 22,0 µg/mL y el fluoroglucinol 37,8 µg/mL. Los resultados fueron expresados como porcentaje de la inhibición de la formación de radicales DPPH.

II.2.2.3 Ensayo de la generación de anión superóxido en el sistema xantina/xantina oxidasa.

La generación de $O^{\bullet-}_2$ en un sistema acelular a partir de xantina/xantina oxidasa se determinó según el método descrito por Imanari *et al*., (1977).

En este experimento en un volumen final de 2,4 mL, se añadieron los siguientes reactivos a las concentraciones finales señaladas: solución amortiguadora de carbonato de sodio 50 mM pH 10,2, xantina 3,0 mM, EDTA 3,0 mM, nitroazul de tetrazolio 0,75 mM, ASB 15 %, el extracto de *R. mangle* (4,2; 8,5; 17,0; 34,0 µg/mL de taninos) y su fracción (2,3; 4,6; 9,2; 18,3 µg/mL de taninos) y xantina oxidasa 50 mU/mL. La generación de $O^{\bullet-}_2$ fue monitoreada por medición de la absorbancia a 560 nm durante 10 min. Los resultados fueron expresados como porcentaje de la inhibición de la formación de $O^{\bullet-}_2$.

II.2.2.4 Ensayo de la degradación oxidativa de la 2-desoxi-D-ribosa en el sistema Fenton.

El método se basó en la generación de $^{\bullet}OH$ en la reacción de Fenton para detectar el daño que origina esta ERO a la 2-desoxi-D-ribosa (Aruoma, 1994a). Los productos de degradación de este azúcar reaccionan con el ATB y generan un compuesto coloreado que facilita la detección del daño (Buege y Aust, 1978). El medio de reacción contenía en un volumen final de 1,25 mL

los siguientes reactivos en las concentraciones finales que se indican: cloruro de hierro III 50 µm, EDTA 100 µm, 2-desoxi-D-ribosa 2,8 mM, solución amortiguadora Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 pH 7,4 10 mM, H_2O_2 67mM, ácido ascórbico 100 µm y el extracto de *R. mangle* (3,8; 19,1; 95,3; 286,0 µg/mL de taninos) y su fracción (2,2; 11,0; 54,8; 164,4 µg/mL de taninos) en las concentraciones señaladas para la determinación de la actividad secuestradora de ˙OH o agua destilada para el blanco. El dimetil sulfóxido (DMSO) 2,0 mg/mL se utilizó como control positivo. El EDTA y la solución de $FeCl_3$ se mezclaron previo a la adición de la 2-desoxi-D-ribosa. La mezcla de reacción se incubó 1 h a 37 °C. Posteriormente se determinaron los productos reactivos con el ácido tiobarbitúrico (PRATB). El procedimiento descrito anteriormente, se modificó mediante la omisión del EDTA, para estudiar la capacidad quelante de iones hierro empleando las siguientes concentraciones del extracto de *R. mangle* (0,8; 3,8; 19,1; 95,3 µg/mL de taninos) y su fracción mayoritaria (2,2; 11,0; 54,8 µg/mL de taninos). Se empleó el mesilato de deferrioxamina (DFO) 52,0 µg/mL como estándar de referencia en este ensayo.

II.2.2.4.1 Ensayo de determinación de productos reactivos con el ácido tiobarbitúrico (PRATB).

Este ensayo se realizó según lo descrito previamente por Buege y Aust (1978). A 500 µL de muestra se le añadieron 1,95 mL de una mezcla que contiene ATB (0,5 %) y ácido tricloroacético (15 %) en ácido clorhídrico (0,25 N) y posteriormente se añadieron 50 µL de BHT (1 %). La mezcla de reacción se calentó 15 min a 100°C, se centrifugó a 1000 x g durante 15 min. La densidad óptica del sobrenadante se midió a 535 nm. La formación de PRATB se cuantificó empleando el coeficiente de extinción del MDA $\varepsilon 1{,}56 10^5 M^{-1} cm^{-1}{}_{535=}$ ˙ .

II.2.3 Resultados

II.2.3.1 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la generación de radicales DPPH.

La figura 4 muestra la relación entre la inhibición de la formación de radicales DPPH y la concentración de taninos en el extracto acuoso de R. *mangle* y en su fracción polifenólica

mayoritaria. Tanto el extracto, como su fracción, disminuyeron la formación de radicales DPPH de manera dependiente de la concentración de taninos, con valores de índice de determinación (r^2) de 0,996 y 0,998 para el extracto y la fracción respectivamente. Los valores de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) del extracto y la fracción, 6,7 y 7,6 μg/mL de taninos respectivamente, demostraron la superioridad del extracto en este efecto. La comparación de las rectas de regresión reveló diferencias significativas ($p< 0,05$) entre las mismas, lo cual indica que a concentraciones de taninos por debajo del punto de corte de ambas rectas, el extracto resultó más eficaz en atrapar esta especie radicalaria que su fracción. Ambas muestras mostraron ser más efectivas en atrapar los radicales DPPH, que los controles positivos evaluados, BHT (22,0 μg/mL) y Fluoroglucinol (37,8 μg/mL) (Rosales *et al.*, 2006), los cuales exhibieron valores de inhibición de la generación de este radical de 29,7 % y 43,1 % respectivamente. Estos resultados demuestran las propiedades antioxidantes del extracto y su fracción.

II.2.3.2 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la producción de anión superóxido.

La figura 5 muestra el efecto del extracto de *R. mangle* y su fracción mayoritaria, a diferentes concentraciones de taninos, sobre la generación de $O^{\bullet-}_2$ en el sistema xantina/xantina oxidasa.
Se aprecia una disminución en la formación de esta ERO dependiente de la concentración de taninos en ambas muestras, con valores de índice de determinación (r^2) de 0,959 y 0,987 para el extracto y la fracción respectivamente. Los valores de la CI_{50} del extracto y la fracción, 31,9 y 21,6 μg/mL de taninos respectivamente, demostraron la superioridad de la fracción en este efecto. La comparación de las rectas de regresión reveló diferencias significativas ($p< 0,05$) entre las mismas, lo cual indica que la fracción resultó más eficaz en inhibir la producción de esta ERO que el extracto. A la máxima concentración ensayada, ambas muestras redujeron aproximadamente en un 50 % la producción del $O^{\bullet-}_2$. Estos resultados revelan las propiedades antioxidantes del extracto de *R. mangle* y su fracción mayoritaria.

II.2.3.3 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la degradación oxidativa de la 2-desoxi-D-ribosa mediada por el secuestro de radicales hidroxilo.

La figura 6 muestra que la incubación del extracto o la fracción con la mezcla de reacción del sistema Fenton, produjo una disminución del daño oxidativo a la 2-desoxi-D-ribosa por los ˙OH, lo que se evidencia por la disminución de la formación de PRATB. El extracto y su fracción resultaron más eficaces en el atrapamiento de esta ERO que un clásico secuestrador de ˙OH, el dimetil sulfóxido (Aruoma, 1994a), lo cual evidencia que la inhibición de la degradación de la 2-desoxi-D-desoxirribosa está asociada a un efecto secuestrador de ˙OH por ambas muestras. Este efecto fue dependiente de la concentración de taninos en el extracto y su fracción, con valores de índice de determinación (r^2) de 0,930 y 0,968 respectivamente. Los valores de la CI_{50} del extracto y la fracción, 6,1 y 3,1 µg/mL de taninos respectivamente, demostraron la superioridad de la fracción en este efecto. La comparación de las rectas de regresión reveló diferencias significativas ($p< 0,05$) entre las mismas, lo cual indica que a concentraciones de taninos por encima del punto de corte de ambas rectas, el extracto resultó más eficaz que la fracción en inhibir la formación de PRATB.

I.2.3.4 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción mayoritaria sobre la degradación oxidativa de la 2-desoxi-D-ribosa mediada por la unión a los iones de hierro.

La figura 7 muestra que el extracto o la fracción disminuyeron el daño oxidativo de la 2-desoxi-D-ribosa por los ˙OH en ausencia de EDTA, evidenciado por la disminución de las concentraciones de PRATB. Las dos muestras mostraron un poder de unión a los iones de hierro superior a un clásico quelador de este metal, el mesilato de deferroxamina (Miller *et al*., 1992), lo cual evidencia que la inhibición de la degradación de la 2-desoxi-D-desoxirribosa está asociada a una disminución en la formación de los ˙OH por un efecto quelante de iones de hierro de ambas muestras. Este efecto fue dependiente de la concentración de taninos en el extracto y su fracción, con valores de índice de determinación (r^2) de 0,968 y 0,977 respectivamente. Los valores de la CI_{50} del extracto y la fracción, 0,67 y 0,74 µg/mL de

taninos respectivamente, demostraron la superioridad del extracto en este efecto. La comparación de las rectas de regresión reveló diferencias significativas ($p< 0,05$) entre las mismas, lo cual indica que a concentraciones de taninos por encima del punto de corte de ambas rectas, la fracción resultó más eficaz que el extracto en inhibir la formación de PRATB.

La figura 8.A muestra que en el intervalo de concentraciones evaluadas, la fracción fue la principal responsable de la actividad antioxidante del extracto, en los ensayos de secuestro de
radicales DPPH, generación de $O^{\bullet -}$, secuestro de $^{\bullet}OH$ y quelación de iones de hierro, en los cuales aportó un intervalo de porcentajes de inhibición media de 69,6 a 90,4; 101,5 a 271,8; 79,6 a 124,0; y 97,4 a 117,1 respectivamente. La figura 8.B muestra que no existieron diferencias significativas en el aporte de la fracción en los ensayos de secuestro de radicales DPPH, secuestro de $^{\bullet}OH$ y quelación de iones de hierro, en cambio, en el ensayo de generación de $O^{\bullet -}_2$, se observa una contribución superior de la fracción.

II.2.4 Discusión

Para el estudio de las propiedades antioxidantes de una sustancia a nivel de reacciones químicas, se emplean un conjunto de métodos experimentales, cuyo basamento permite conocer si el agente que se investiga capta o impide de algún modo la generación de ERO.

El método espectrofotométrico de secuestro de radicales DPPH, ha sido uno de los más comúnmente usados para estimar la actividad antioxidante (Silva *et al.*, 2005, Alasalvar *et al.*, 2006, Jayaprakasha *et al.*, 2006, Matkowski y Piotrowska, 2006). El radical DPPH se considera un radical libre estable en virtud de la deslocalización de electrones disponibles sobre toda la molécula, demostrándose que las moléculas no dimerizan. Esta deslocalización electrónica que tiene lugar en la forma radicalaria de esta especie intensifica la coloración violeta observada en los experimentos y es la responsable de la banda de absorción obtenida a los 517 nm, cuando el DPPH se prepara en solución de etanol (Molyneux *et al.*, 2004).

En el presente trabajo cuando la solución de radicales DPPH es mezclada con el extracto de *R. mangle* o su fracción mayoritaria se obtiene una disminución de la absorbancia a los 517 nm,

indicativa de la inhibición de la formación de esta especie radicalaria. Los elevados porcentajes de actividad antioxidante que aporta la fracción al extracto a todas las concentraciones evaluadas, sugiere que los compuestos polifenólicos que contiene la misma contribuyen de manera considerable al efecto observado en el extracto. En trabajos previos se informa la propiedad que tienen diferentes extractos de plantas que contienen compuestos polifenólicos de inactivar los radicales DPPH (Dominguez *et al.*, 2005, Ellnain-Wojtaszek *et al.*, 2003, Kansci *et al.*, 2003, Materska y Perucka, 2005, Silva *et al.*, 2005, Alasalvar *et al.*, 2006, Jayaprakasha *et al.*, 2006, Matkowski y Piotrowska, 2006).

Cuando la solución de radicales DPPH es mezclada con una sustancia que puede donar átomos de hidrógeno, como es el caso de los compuestos polifenólicos, en los cuales se comprobó que son buenos agentes reductores en virtud de las propiedades donantes de hidrógeno de sus grupos hidroxilo polifenólicos (Yang y Wang, 1993), se obtiene la forma reducida del DPPH, con una consiguiente disminución de la absorbancia a los 517 nm. Representando al radical DPPH por $Z^{\bullet}$ y a la molécula que dona los átomos de hidrógeno como AH, la cual es la responsable de inactivar los radicales libres formados, la reacción primaria sería la siguiente:

$$Z^{\bullet} + AH = ZH + A^{\bullet}$$

Una posible explicación del efecto superior del extracto con respecto a la fracción en la capacidad de atrapamiento de los radicales DPPH, es el efecto aditivo o sinérgico que puede tener la interacción de los compuestos polifenólicos presentes en la fracción con el resto de los componentes del extracto, lo cual contribuye a incrementar la actividad antioxidante del extracto. En tal sentido, existen reportes en la literatura acerca de la actividad secuestradora de radicales DPPH por parte de componentes polifenólicos solo presentes en el extracto, tales como: ácido gálico (Terasawa y Yamazaki, 2002), ácido elágico (Hoon *et al.*, 2006) y ácido clorogénico (Ohnishi *et al.*, 1994), así como por otros tipos de compuestos también encontrados en el extracto, como aceites esenciales (Burits y Bucar , 2000; Pérez *et al.*, 2006; Su-Ying *et al.*, 2007). Por otra parte, se conoce que los compuestos derivados de las catequinas pueden estar presentes tanto en el extracto como en la fracción (Sánchez, 2007), y que estudios realizados por Nanjo *et al.*, (1996) en este tipo de compuestos, revelan que

determinados rasgos estructurales incrementan la eficiencia en el secuestro de radicales DPPH, como son: un grupo orto-trihidroxilo en el anillo B y un grupo galoil en la posición 3 del esqueleto del flavanol, lo cual incrementa la deslocalización electrónica en la molécula y esto a su vez aumenta la estabilidad de los radicales formados, produciéndose un aumento de la capacidad secuestradora de radicales DPPH.

La correlación positiva observada entre los valores de actividad antioxidante del extracto y su fracción, medida por la capacidad secuestradora de radicales DPPH, y el contenido de taninos en los mismos, se corresponde con los resultados obtenidos en los vinos argentinos tintos, rosados y blancos (Llano *et al.*, 2002) y en jugos de naranja (Rapisarda *et al.*, 1999) analizados por este método.

En el presente trabajo el extracto de *R. mangle* y su fracción mayoritaria mostraron un efecto inhibitorio sobre la generación de $O^{\bullet-}_2$. Los elevados porcentajes de actividad antioxidante que aporta la fracción al extracto a todas las concentraciones evaluadas, evidencia que los componentes polifenólicos presentes en la fracción son los principales responsables del efecto inhibitorio sobre la producción de $O^{\bullet-}_2$ observada en el extracto.

El efecto inhibitorio mostrado por el extracto y su fracción polifenólica sobre la generación de O▪-2 en un sistema acelular empleando el ensayo de la xantina/xantina oxidasa pudiera explicarse por dos mecanismos diferentes: el secuestro directo de esta ERO o la inhibición de la enzima responsable de su producción, la xantina oxidasa (XO). Varios trabajos informan que los compuestos polifenólicos pueden ejercer ambos tipos de efectos. Empleando el mismo sistema de experimentación del presente trabajo se demostró un efecto inhibitorio similar sobre la generación de esta ERO en presencia de una solución de β-catequina (Yoneda *et al.*, 1995) y de extractos de la planta *Ecklonia cava* conteniendo compuestos polifenólicos (Senevirathne *et al.*, 2006). Previamente se reportó un estudio comparativo de la actividad secuestradora de $O^{\bullet-}_2$de diferentes extractos y sustancias antioxidantes, obteniéndose este efecto de mayor a menor en el siguiente orden: extracto de *Ginkgo biloba*, extracto de corteza de pino, β-catequina y extracto de té verde (Noda *et al.*, 1997). Otra investigación con siete taninos puros demostró sus propiedades secuestradoras de $O^{\bullet-}_2$, generado en un sistema *in vitro*

(Chen *et al.*, 1990). Igualmente con un extracto de té verde y siete taninos puros aislados del mismo se obtuvieron efectos similares y se reveló la importancia de la unión del ácido gálico a la estructura del flavanol para esta actividad, indicando que la estructura orto-trihidoxi en el anillo B es determinante para esta propiedad (Nakagawa y Yokozawa, 2002). En otro trabajo se reportó la inhibición de la actividad de la enzima xantina oxidasa por cinco catequinas presentes en el te, los valores de las constantes de inhibición (Ki) en M y los tipos de inhibición fueron en orden decreciente: catequina (Ki = 303,95, no competitiva), epicatequina (Ki = 20,48, mixta), epigalocatequina (Ki = 10,66, mixta), epicatequina galato (Ki = 2,86, mixta), epigalocatequina galato (Ki = 0,76, competitiva) (Aucamp *et al.*, 1997). En otro estudio se informó que los polifenoles del té como las teaflavinas: teaflavina, teaflavina-3-galato, teaflavina-3,3'-digalato y la epigalocatequina-3-galato inhibieron la actividad de la enzima xantina oxidasa y actuaron como secuestradores de $O^{\bullet-}_2$. La teaflavina-3,3'-digalato actuó como un inhibidor competitivo de la enzima y resultó ser el más potente inhibidor de todos los compuestos evaluados (Lin *et al.*, 2000). En otro reporte se indicó que la fracción polifenólica de la cocoa comercial también inhibió la actividad de la enzima xantina oxidasa de manera dependiente de la dosis (Won *et al.*, 2006), el mismo efecto fue observado con las procianidinas presentes en la semilla de la uva (Wang *et al.*, 2004).

El estudio de los efectos del extracto acuoso de *R. mangle* y su fracción mayoritaria en el ensayo de la degradación oxidativa de la 2-desoxi-D-ribosa permitió conocer que tanto su actividad quelante de iones de hierro, como el secuestro directo de $^{\bullet}OH$ conducen a un disminución en los niveles de esta ERO.

En la variante del ensayo que permite determinar la capacidad de secuestro de $^{\bullet}OH$, también se demostró el porcentaje elevado que la fracción aporta a la actividad antioxidante del extracto, lo cual evidencia el importante papel que juega el componente polifenólico de la fracción en dicha actividad. La capacidad secuestradora de esta ERO se ha descrito para otros extractos de plantas que contienen polifenoles (Lopez *et al.*, 1999; Valentao *et al.*, 2002; Valentao *et al.*, 2002a; Valentao *et al.*, 2002b; Valentao *et al.*, 2003; Goncalves *et al*., 2005).

El efecto de atrapamiento de los ˙OH mostrado por el extracto acuoso de *R. mangle* y su fracción puede estar relacionado con el hecho que la capacidad donante de electrones descrita para los polifenoles en virtud de sus bajos potenciales de reducción (Jovanovic y Simic *et al.*, 2000) hace más probable la reacción polifenoles-˙OH que 2-desoxi-D-ribosa-˙OH. Esta propiedad química de los polifenoles es la responsable de los elevados valores de la constante de velocidad de reacción de estos compuestos con el ˙OH, la cual se encuentra en el orden de 10^9-10^{10} $M^{-1}\cdot s^{-1}$, según lo reportado por Scott *et al.*, (1993).

Una posible explicación relacionada con la mayor actividad antioxidante del extracto con respecto a la de la fracción a concentraciones de taninos superiores al punto de corte de ambas rectas, es que la interacción de los compuestos polifenólicos presentes en la fracción con el resto de los componentes del extracto provoque un efecto aditivo o sinérgico sobre la actividad secuestradora de ˙OH, que conduzca a un aumento de la actividad antioxidante del extracto. En correspondencia con esta idea, existen reportes en la literatura sobre la actividad secuestradora de ˙OH por parte de componentes polifenólicos solo presentes en el extracto, tales como: ácido gálico (Ohashi *et al.*, 2005), ácido elágico (Singh *et al.*, 1999) y ácido clorogénico (Zang *et al.*, 2003), así como por otros tipos de compuestos también encontrados en el extracto, como aceites esenciales (Burits y Bucar , 2000; Burits *et al.*, 2001; Vardar-Unlu *et al.*, 2003; Candan *et al.,* 2003).

En la variante del ensayo que permite determinar la propiedad de quelar los iones de hierro, también se demostró la importante contribución de la fracción a la actividad antioxidante del extracto. La propiedad de unión a los iones de hierro de los polifenoles puros o formando parte de extractos vegetales se ha descrito previamente (Guo *et al.*, 1996, Sestili *et al.*, 2002; Higuchi *et al.*, 2003; Weinreb *et al.*, 2004).

En el ensayo de evaluación de la propiedad quelante de iones de hierro, los resultados dependerán de la competencia que se establece entre los componentes del extracto o la fracción y la 2-desoxi-D-ribosa para unirse a los iones de hierro. En este sentido Aruoma (1994a) planteó que en este sistema cuando los iones férricos son añadidos a la mezcla de reacción como cloruro de hierro III ($FeCl_3$), en vez de formando un complejo con el EDTA,

algunos de los iones forman un complejo con la 2-desoxi-D-ribosa. El Fe^{3+} en este complejo puede ser reducido por el ascorbato a Fe^{2+}, el cual a su vez puede permanecer unido a la 2-desoxi-D-ribosa y a continuación reaccionar con el peróxido de hidrógeno. Esta reacción produce los $^{\bullet}OH$, los cuales inmediatamente comienzan la degradación de la 2-desoxi-D-ribosa de una manera sitio específica. Las moléculas que pueden inhibir la degradación de la 2- desoxi-D-ribosa son aquellas que tienen la capacidad de unirse a los iones de hierro y pueden extraerlos de la 2-desoxi-D-ribosa y de esta manera convertirlos en inactivos o pobremente activos en la reacción de Fenton.

Una posible explicación acerca de menor actividad antioxidante del extracto con respecto a la fracción, a concentraciones de taninos por encima del punto de corte de ambas rectas, es que la interacción de los compuestos polifenólicos de la fracción con el resto de los componentes del extracto conlleve a una acción antagónica que disminuya la capacidad quelante de hierro del extracto.

La capacidad del extracto de *R. mangle* y su fracción mayoritaria de inhibir la generación del radical $O^{\bullet-}$ y capturar los $^{\bullet}{}_2OH$, así como de inhibir la producción de este último, en virtud de su unión a los iones de hierro, permite suponer, que estas muestras eran capaces de ejercer protección a las biomoléculas del ataque de estas ERO.

II.2.5 Conclusión

Se demostró que el extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. posee propiedades secuestradoras de radicales libres, evidenciadas para las especies: DPPH, $O^{\bullet-}$ y $^{\bullet}{}_2OH$; así como efecto quelante de iones de hierro. La fracción polifenólica mayoritaria constituyó el principal determinante de los efectos mostrados por el extracto.

II.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Rhizophora mangle L.* Y SU FRACCIÓN POLIFENÓLICA MAYORITARIA A NIVEL DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS.

II.3.1 Introducción.

Las biomoléculas que constituyen las células, incluyen: las proteínas, el ADN, los lípidos y los carbohidratos. La integridad estructural y funcional de la célula como unidad básica de los seres vivos dependerá del estado normal de las mismas. Es conocido que en estados de estrés oxidativo, estas macromoléculas se dañan por la acción de las ERO, provocando por consiguiente alteraciones en sus funciones biológicas (Vaughan, 1997). De manera que, las investigaciones acerca de las propiedades antioxidantes de cualquier sustancia implican conocer la eficacia protectora que ésta ejerce cuando las biomoléculas se enfrentan a dichos daños.

La POL es el proceso inducido por ERO más extensamente estudiado de daño a los lípidos (Benzie, 1996; Sevanian y Ursini, 2000). Entre los métodos más utilizados para evaluar el efecto antioxidante sobre los lípidos, se encuentran aquellos que emplean homogenados de cerebro de rata y gerbil (Lee *et al.,* 2003; Cheung y Cheung, 2005) y sistemas liposomales (Lotito *et al.,* 2000; Tadolini *et al.,* 2000) como fuentes de esta biomolécula, y un sistema generador de ERO responsable de la oxidación de los lípidos, el agente en estudio se coloca en la mezcla de reacción para determinar la propiedad que posea de inhibir la POL.

En el caso de las proteínas estos tipos de estudios utilizan ensayos que detectan el efecto protector que ejerce el compuesto a evaluar sobre alteraciones a nivel de la estructura primaria (modificaciones oxidativas de los aminoácidos) y terciaria (agregación, fragmentación y entrecruzamiento), y cambios funcionales en estas macromoléculas (Davies, 1987). La oxidación del grupo sulfidrilo en el aminoácido cisteína constituye una de las modificaciones oxidativas de mayor relevancia biológica (Scherer y Deamer, 1986). La ASB ha sido ampliamente utilizada como proteína modelo en este tipo de estudio porque su estructura primaria, secundaria y terciaria está bien caracterizada y no posee grupos prostéticos u otros

rasgos estructurales que interfieren o complican la interpretación de los resultados (Waldmann, 1977). Existen varios reportes en la literatura sobre la modificación de esta proteína por las ERO (Di Simplicio *et al.,* 1991; Miura *et al.,* 1992; Davies *et al.,* 1993) y por último, la ASB representa el tipo más abundante de proteína animal (Carter y Ho, 1994) y se encuentra disponible en forma purificada.

Para el caso del ADN, la actividad antioxidante de la sustancia a ensayar se determina por la actividad inhibitoria que muestra sobre la degradación de esta biomolécula. Con este fin se emplean ensayos que detectan tanto alteraciones estructurales de las bases, como de los azúcares del ADN (Aruoma, 1993). Para el último caso el sistema Bleomicina-Fe^{3+} / ácido ascórbico ha sido extensivamente empleado. En este experimento los productos de degradación del ADN son reactivos con el ácido tiobarbitúrico (ATB) y pueden ser detectados por el ensayo de PRATB (Buege y Aust, 1978).

En la literatura se informa acerca del efecto protector que evidencian los polifenoles puros y aquellos integrantes de diferentes extractos vegetales, sobre las principales biomoléculas expuestas a la acción de las ERO. En correspondencia con esta idea se ha informado que estos compuestos inhiben la POL (Lotito *et al.,* 2000; Tadolini *et al.,* 2000; Cheung y Cheung, 2005), las modificaciones oxidativas de los aminoácidos en las proteínas (Martinez *et al.*, 2001; Filipe *et al.*, 2002) y la degradación del ADN expuesto a ERO (Martínez *et al.*, 2000; Fan and Lou, 2004; Stagos *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta los resultados del capítulo previo, donde se demuestra que el extracto acuoso de *Rhizophora mangle L.* y su fracción polifenólica mayoritaria tienen propiedades secuestradoras de $O^{\bullet -}$ y $^{\bullet}OH$, así como actividad quelante de iones de hierro, es posible suponer que los mismos pueden proteger a las principales macromoléculas biológicas del daño oxidativo provocado por su exposición a estas ERO. De ahí que, el objetivo de este capítulo es:

Conocer si el extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria protegen a las principales biomoléculas del daño oxidativo.

II.3.2 Materiales y Métodos

II.3.2.1 Reactivos

Los reactivos cloruro de sodio, ácido 5,5´ ditio-bis (2-nitrobenzoico), ADN de esperma de Salmón y cloruro de magnesio se obtuvieron de Laboratorios Sigma (St. Louis, MO). El Trolox C (2-carboxi-2,5,7,8-tetrametoxi-6-cromano) provenía de Aldrich Chemical Co. (Gillingham-Dorset SP8 4JL). La bleomicina procedía de Nippon Kayaka Coa. Ltd. (Chiyoda- ko, Tokyo Japón). El resto de los reactivos utilizados y las firmas donde fueron obtenidos se mencionan en el acápite II.1.1.

II.3.2.2 Ensayo de peroxidación lipídica inducida por Fe^{3+}/ascorbato en un homogenado de cerebro de rata.

La POL fue evaluada usando un homogenado de cerebro de rata, el cual es rico en fosfolípidos, según el método descrito por Ozdemirler *et al.*, (1995).

Para la obtención del homogenado se emplearon ratas Sprague-Dawley, macho, con pesos de 180-200 g. Éstas se sacrificaron por dislocación cervical y posteriormente se les extrajo el cerebro mediante cirugía. Los cerebros se homogenizaron en solución amortiguadora fosfato salina (PBS) 50 mM pH 7,0 helada, en una proporción p/v (3,2 g : 12,8 mL) a 10 000 $r \cdot min^{-1}$ durante 10 min. A continuación los homogenados se centrifugaron a 2 120 x g durante 15 min a 4 °C, se tomó el sobrenadante y se congeló a -20 °C hasta el momento de la determinación. Para el ensayo de POL el homogenado se diluyó en PBS 50 mM pH 7,0 a temperatura ambiente en una proporción v/v (2,5 mL : 7,5 mL).

Luego, en un volumen final de 1,05 mL estaban presentes los siguientes reactivos en las cantidades o concentraciones finales indicadas: homogenado diluído (900 µl), cloruro de hierro III (100 mM), el extracto de *R. mangle* (2,3; 11,3; 56,7 µg/mL de taninos) y su fracción (1,3; 6,5; 32,6 µg/mL de taninos) y el ácido ascórbico (100 mM). El Trolox C (28,0 µg/mL) se empleó como control positivo en este ensayo. La mezcla de reacción se incubó 1 h a 37 °C y

posteriormente se determinó la concentración de MDA, como un biomarcador de la POL, según se describió en el acápite II.2.2.4.1. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de la POL.

II.3.2.3 Ensayo de daño oxidativo a la ASB ocasionado por el sistema Fenton.

El daño oxidativo a la ASB se logró por su exposición a $^{\bullet}OH$ generados en el sistema Fenton, según el método descrito por Kingu y Wei (1997). La oxidación de la ASB (1 mg/mL) preparada en solución amortiguadora fosfato 50 mM pH 7,4, se realizó por incubación de la misma con los siguientes reactivos: extracto de *R. mangle* (4,0; 40,5; 405,2 μg/mL de taninos) o su fracción (4,1; 41,2; 411,8 μg/mL de taninos), EDTA (3,0 mM), $FeCl_3$ (1,0 mM), H_2O_2 (2,5 mM) y ácido ascórbico (1,0 mM) a 25 ºC durante 45 min en un volumen final de 1 mL. La solución de ASB, en un volumen igual de solución amortiguadora fosfato 50 mM pH 7,4, se utilizó como control. A las muestras incubadas se les añadió 1,0 mL de ácido tricloroaético (TCA) 10 % (p/v, concentración final) para precipitar las proteínas, a continuación se centrifugó (937·g 10 min 4 °C) y se decantó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 1,0 mL de TCA 10 % y se removió una vez más el sobrenadante. El precipitado se disolvió en 1,0 mL de solución amortiguadora fosfato 50 mM pH 7,4 y se le determinó el contenido de grupos sulfidrilos según el método descrito por Sedlak y Lindsay (1968) para evaluar la magnitud del daño oxidativo a esta proteína. Este ensayo consistió en hacer reaccionar las muestras con el ácido 5,5′ ditio-bis (2-nitrobenzoico) (Reactivo de Ellman´s) 4 mg/mL para obtener un cromógeno que absorbe a una λ=412 nm. Se utilizó una curva patrón de GSH. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de la pérdida de grupos sulfidrilos en la ASB.

II.3.2.4 Ensayo de daño oxidativo al ADN provocado por el sistema Bleomicina / Fe 2+.

El daño oxidativo sobre el ADN fue inducido por el sistema Bleomicina-Fe^{2+} según lo descrito por Aruoma (1993). La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 mL, los siguientes reactivos en las concentraciones finales indicadas: ADN de esperma de Salmón (1

mg/mL) preparado en solución amortiguadora fosfato 20 mM pH 7,4, bleomicina (0,05 mg/mL), $FeCl_3$ (50 µM), estos reactivos se mezclaron previo a la adición de la solución amortiguadora fosfato 20 mM pH 7,4 conteniendo $MgCl_2$ (5mM) y el ácido ascórbico (0,2 mM). El extracto de *R. mangle* (12,6; 50,6; 202,6; 810,3 µg/mL de taninos) y su fracción se emplearon en concentraciones de (12,7; 51,5; 205,9; 823,6 µg/mL de taninos). La mezcla de reacción se incubó 30 min a 37°C, a continuación se adicionó 0,1 mL de EDTA (0,1 M) para detener la reacción y se tomaron 500 µL para la determinación de PRATB, según se describió en el acápite II.2.2.4.1. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de la degradación del ADN.

II.3.3 Resultados

II.3.3.1 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la peroxidación lipídica inducida por Fe^{3+}/ascorbato.

La figura 9 muestra que la incubación del extracto o su fracción con el homogenado de cerebro de rata en presencia de Fe^{3+} y ácido ascórbico resultó en una inhibición de la POL de manera dependiente de la concentración de taninos, con valores de índice de determinación (r^2) de 0,999 y 0,868 para el extracto y la fracción respectivamente. El valor de la CI_{50} del extracto fue 29,3 µg/mL de taninos, mientras la fracción en el intervalo de concentraciones evaluadas no alcanzó el 50 % de inhibición de la POL, lo cual demostró la superioridad del extracto en este efecto La comparación de las rectas de regresión reveló diferencias significativas ($p< 0,05$) entre las mismas. Se aprecia que a valores de concentración de taninos por encima del punto de corte de ambas rectas, el extracto fue más eficaz en disminuir la oxidación de los lípidos que su fracción. El extracto resultó 2,5 veces más eficaz en proteger a los lípidos del daño oxidativo que el Trolox C (28,0 µg/mL), una sustancia ampliamente usada como compuesto de referencia en este tipo de ensayo (Lee *et al.*, 2005), en el cual mostró una inhibición de la POL de 34,6 %, mientras la fracción fue menos activa que el control positivo. Estos resultados demuestran las propiedades antioxidantes del extracto y su fracción.

II.3.3.2 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la pérdida de grupos sulfidrilos en la ASB expuesta al sistema Fenton.

La figura 10 muestra que la incubación del extracto o la fracción con la ASB expuesta a los reactantes del sistema Fenton resultó en una disminución del daño oxidativo a esta biomolécula, evidenciado en la inhibición de la pérdida de grupos sulfidrilo en la proteína. A la máxima concentración ensayada, el extracto y la fracción disminuyeron la oxidación de los grupos –SH en un 87,3 y 89,1 % respectivamente. Este efecto fue dependiente de la concentración de taninos con valores de índice de determinación (r^2) de 0,939 y 0,971 para el extracto y la fracción respectivamente. Los valores de la CI_{50} del extracto y la fracción, 0,67 y 0,36 μg/mL de taninos respectivamente, demostraron la superioridad de la fracción en este efecto. La comparación de las lineas de regresión reveló que el extracto y su fracción resultaron igualmente eficaces en proteger a la ASB de la oxidación por los $^{\bullet}OH$.

II.3.3.3 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre el daño oxidativo al ADN ocasionado por el sistema Bleomicina / Fe^{3+}

La figura 11 muestra que la incubación del extracto o la fracción con el ADN de esperma de Salmón expuesto al sistema Bleomicina – Fe^{3+} resultó en una inhibición del daño oxidativo a esta biomolécula, evidenciado por la disminución de la formación de PRATB. A la máxima concentración ensayada, el extracto y la fracción disminuyeron la oxidación del ADN en un 98,4 % y 91,9 % respectivamente. Este efecto fue dependiente de la concentración de taninos con valores de índice de determinación (r^2) de 0,925 y 0,97 para el extracto y la fracción respectivamente. Los valores de la CI_{50} del extracto y la fracción, 0,084 y 0,59 μg/mL de taninos respectivamente, demostraron la superioridad del extracto en este efecto. La comparación de las rectas de regresión reveló diferencias significativas ($p< 0,05$) entre las mismas, lo cual indica que en el intervalo de concentraciones estudiadas el extracto fue más eficaz en proteger al ADN de la degradación oxidativa que su fracción.

La figura 12.A muestra que en el intervalo de concentraciones evaluadas, la fracción fue la principal responsable de la actividad antioxidante del extracto, en los ensayo de POL y daño

oxidativo a la ASB y al ADN, en los cuales aportó un rango de porcentajes de 47,2 a 65,6; 95,4 a 106,2; y 86,0 a 93,6 respectivamente. La figura 12.B muestra que el aporte de la fracción resultó superior en los ensayos de daño oxidativo al ADN y las proteínas con relación a cuando se utilizaron los lípidos.

II.3.4 Discusión

Para el estudio de las propiedades antioxidantes de una sustancia a nivel de moléculas biológicas se emplean un conjunto de métodos experimentales, cuyo basamento permite conocer si el agente que se investiga protege a estas macromoléculas del daño oxidativo ocasionado por su exposición alas ERO.

En el presente trabajo el extracto de *R. mangle* y su fracción mayoritaria disminuyeron las concentraciones de (MDA) en un homogenado de cerebro de rata expuesto a Fe^{3+} y ácido ascórbico, lo cual es indicativo de un efecto inhibitorio de la POL por ambas muestras.

Los valores de inhibición de la POL obtenidos para la fracción, los cuales representan del 47,2 al 65,6 % del efecto obtenido en el extracto en el intervalo de concentraciones estudiadas, sugieren que los compuestos polifenólicos presentes en la fracción desempeñan un papel importante en la disminución del daño oxidativo a los lípidos presentes en el homogenado de cerebro de rata. En concordancia con estos resultados, otros autores han encontrado efectos similares empleando otros extractos de plantas que contienen polifenoles o evaluando los compuestos polifenólicos puros. Cheung y Cheung (2005) demostraron que diferentes fracciones obtenidas de extractos metanólicos y acuosos de las plantas *Lentinus edodes* y *Volvariella volvacea* inhibieron la POL en el mismo modelo experimental utilizado en el presente trabajo y que en estas fracciones hubo una correlación positiva entre la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos. En otro trabajo se refiere que la epigalocatequina galato, el principal polifenol del té verde, inhibió la oxidación de los lípidos inducida por Fe^{2+}, en un homogenado de cerebro de gerbil (Lee *et al.,* 2003). Bouhamidi *et al.,* (1998) reportaron este efecto en un extracto de semillas de uva que contienen proantocianidinas, el cual inhibió la POL en una solución acuosa de ácidos grasos

poliinsaturados. En otro estudio la quercetina y sus monoglucósidos redujeron la POL producida por el iniciador de radicales libres 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitrilo), en una solución del ácido graso metil linoleato y en una suspensión de fosfolípidos liposomal compuesta de fosfatidilcolina, por disminuir la velocidad de hidroperoxidación e incrementar la longitud del período de inducción de la POL (Ioku *et al.,* 1995). Pedrielli y Skibsted (2002) también demostraron que la mezcla quercetina/α-tocoferol (1:1) retardó la peroxidación del metil linoleato iniciada por el α,α- azoisobutironitrilo con una constante de velocidad de inhibición aparente k(inh) de $4{,}1 \cdot 10^5$ y $2{,}6 \cdot 10^6$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$ en ter-butil alcohol y clorobenceno respectivamente a 50 °C; a su vez la catequina sola en clorobenceno mostró en este sistema un valor de k(inh) de 4.4×10^5 a 50 °C. En otra investigación se indica que la epicatequina y sus oligómeros (procianidinas) del monómero al hexámero procedentes de la cocoa protegieron la oxidación de los lípidos en liposomas de fosfatidilcolina iniciada por diferentes agentes oxidantes: luz ultravioleta, azocompuestos como el 2,2'-azobis(2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH) o 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo) (AMVN) y Fe^{3+}/ascorbato (Lotito *et al.,* 2000). En otro estudio se informa que el Resveratrol inhibió la POL en liposomas de fosfatidilcolina provocada por diferentes agentes: i) Fe^{2+}, ii) AAPH, un iniciador de la formación de radicales peroxilo, soluble en agua, iii) AMVN, otro iniciador de la formación de este tipo de radicales peroxilo, pero soluble en los lípidos; resultando más efectivo en el último sistema, por su capacidad de incorporarse espontáneamente en el ambiente lipídico (Tadolini *et al.,* 2000).

Varios autores han estudiado el mecanismo de acción antioxidante a través del cual los compuestos polifenólicos protegen a los lípidos del daño oxidativo. En dos trabajos se señala que los polifenoles actúan interrumpiendo las reacciones de propagación en cadena de la POL (Rice-Evans, 1995; Salah *et al.*, 1995). Otros estudios refieren su propiedad de atrapar los radicales peroxilo y alquilo en las fases de iniciación y propagación de la POL (Liu *et al.,* 1999; Sano *et al.,* 2003; Fujisawa y Kadoma, 2006). Yamamoto *et al.,* (1999) informó que la estructura orto-dihidroxilo en el anillo B del polifenol es requerida para obtener una máxima actividad de atrapamiento de estos radicales lipídicos. Otro reporte indica la actividad quelante de iones de hierro, como otro posible mecanismo de inhibición de la POL (Higuchi *et al.,*

2003). Esta última idea coincide con el resultado de la presente tesis relacionado con la capacidad del extracto de *R. mangle* y su fracción mayoritaria de unirse a los iones de hierro, cuya propiedad podría explicar el efecto protector sobre el daño oxidativo a los lípidos del homogenado de cerebro de rata mostrado por ambas muestras en el presente trabajo.

El efecto inhibitorio de la POL fue superior en el extracto que en la fracción, lo cual puede ser atribuido a que otros componentes presentes en el extracto puedan establecer una acción sinérgica o aditiva en su interacción con los compuestos polifenólicos de la fracción, provocando un incremento de la actividad antioxidante del extracto. En este sentido, existen reportes acerca de la propiedad de inhibir la POL que tienen otros tipos de compuestos encontrados en el extracto, tales como: fitoesteroles (van Rensburg *et al.,* 2000; Yasukazu and Etsuo, 2003; Yokota *et al.,* 2006) y aceites esenciales (Vardar-Unlu *et al.,* 2003; Candan *et al.,* 2003; Mimica-Dukic *et al.,* 2004; Chericoni *et al.,* 2005), así como componentes polifenólicos solo presentes en el extracto, como son: ácido elágico (Osawa *et al.,* 1987), ácido clorogénico (Kono *et al.,* 1998) y ácido gálico (Cheol *et al.,* 2005).

Los resultados en la presente tesis indican que el extracto y su fracción ejercieron un efecto protector al daño oxidativo de la ASB ocasionado por los $^{\bullet}OH$, medido por la inhibición de la pérdida de grupos –SH en la proteína.

En la literatura se refiere que los aminoácidos también son sensibles al daño oxidativo (Davies, 1987). En este sentido un estudio revela que todos los aminoácidos de la ASB fueron modificados por la exposición de esta proteína a los $^{\bullet}OH$ (Davies *et al.,* 1987), resultando más vulnerables los residuos de triptófano, histidina y cisteína, lo cual está en concordancia con las constantes de velocidad de reacción de estos aminoácidos libres con los $^{\bullet}OH$ (Dorfman y Adams, 1973). Otros trabajos informan acerca de la pérdida de grupos –SH en la ASB expuesta a $^{\bullet}OH$, generados por radiolisis gamma (Di Simplicio *et al.,* 1991), xantina oxidasa + EDTA-Fe^{3+} (Miura *et al.,* 1992) o Fe^{2+} + H_2O_2 (Davies *et al.,* 1993).

Los valores de inhibición de la pérdida de grupos –SH obtenidos para la fracción, los cuales aportan más del 95 % al efecto antioxidante del extracto en el intervalo de concentraciones

estudiadas, sugieren que los compuestos polifenólicos presentes en la fracción son los responsables de la disminución del daño oxidativo a la ASB. En concordancia con estos resultados, otros autores han encontrado efectos protectores sobre esta y otras proteínas empleando otros extractos de plantas que contienen polifenoles o evaluando los compuestos polifenólicos puros. Así, se ha probado que el extracto acuoso de la corteza de la planta *Mangifera indica L.* atenuó la pérdida de grupos sulfidrilos tanto en la ASB expuesta al mismo sistema de estudio de la presente tesis (Martínez *et al.*, 2001), como en un homogenado de hígado de ratón tratado con TPA; efectos similares fueron obtenidos empleando la mangiferina, principal polifenol presente en este extracto (Martínez *et al.*, 2000). En otro trabajo se indica que las formas radicalarias de los aminoácidos aromáticos triptófano y tirosina, los cuales están entre los aminoácidos más oxidables en las proteínas, son reparadas por los compuestos polifenólicos quercetina, catequina y rutina mediante reacciones de transferencia de electrones para generar radicales de compuestos polifenólicos semioxidados (Filipe *et al.*, 2002). Se ha planteado que tanto las infusiones de te verde como el te negro y las catequinas presentes en este último, inhibieron la oxidación de la ASB y de las proteínas microsomales procedentes de pulmón, hígado y corazón, evidenciada por una disminución en el contenido de grupos carbonilo; además disminuyeron la fragmentación oxidativa en estas proteínas establecida por SDS-PAGE (Misra *et al.*, 2003). También se demostró que la quercetina protegió a la lizosima y a la β-lactoglobulina A de la fragmentación oxidativa evidenciada por electroforesis capilar (Salvi *et al.*, 2001).

Los posibles mecanismos que pueden explicar el efecto protector de los polifenoles sobre la pérdida de grupos –SH en la ASB ocasionada por los ˙OH, son las propiedades secuestradoras de esta ERO y la actividad quelante de iones de hierro previamente demostrada para los compuestos polifenólicos que conforman la fracción mayoritaria del extracto acuoso de *Rhizophora mangle L*. En presencia de compuestos polifenólicos, la disminución de la pérdida de grupos –SH en la ASB está dada porque la capacidad de donar átomos de hidrógeno descrita para los polifenoles hace más probable la reacción ˙OH-polifenoles que ˙OH-grupos SH.

En el presente trabajo se demostró que tanto el extracto como su fracción disminuyeron el daño oxidativo al ADN inducido por el complejo bleomicina-Fe^{2+}. Previamente se informó que el ADN de células tratadas con bleomicina resulta degradado (Moore, 1990). Se ha comprobado que la bleomicina provoca la ruptura de las cadenas dobles y simples en preparaciones purificadas de ADN (Solomon *et al.*, 1989) y que la escisión de cadena ocurre preferencialmente en la secuencia de bases guanina-pirimidina, en la dirección 5′ 3′ (Takeshita *et al.*, 1978). Giloni *et al.,* (1981) estudiaron el mecanismo responsable de la escisión de cadena del ADN inducida por bleomicina y concluyeron que los productos de la reacción primaria resultante incluyen: oligonucleótidos y bases de propenal, estas últimas con una estructura común: Base-CH=CH-CHO, las cuales forman cromóforos con el ATB (Povirk, 1979) y pueden ser detectadas por el ensayo de PRATB. Estos autores plantearon que el grupo propenal es derivado de los primeros tres carbonos de la desoxirribosa, mientras los carbonos restantes C-4′ y C-5′ de este azúcar permanecen como un residuo de ácido glicólico esterificado a través del grupo hidroxilo al fosfato 3′ terminal en el oligonucleótido residual. Estos investigadores sugieren que estas observaciones son consistentes con un mecanismo de ruptura de cadena del ADN que involucra la captura de un átomo de hidrógeno del C-4′ de la desoxirribosa por radicales libres, provocando la escisión del enlace (C-3′)-(C-4′), otros trabajos coinciden en considerar estos eventos como el posible mecanismo que explica la escisión de cadena en esta biomolécula inducida por radicales libres (Takeshita *et al.*, 1978), resultando los azúcares del ADN el principal blanco de daño oxidativo por el sistema Bleomicina - Fe^{2+}. Varios investigadores han concordado en sugerir que las especies radicalarias requeridas para este mecanismo pueden ser generadas a partir de un complejo bleomicina-Fe(II)-O_2 (Takeshita *et al.*, 1978; Povirk, 1979). Giloni *et al.,* (1981) han propuesto un modelo acerca de este complejo, su principal rasgo consiste en la coordinación del O_2 con el metal y la inserción preferencial de los anillos de bitiazol de la bleomicina entre los pares de base del ADN, en los cuales una cadena contiene una secuencia de bases GT o GC. La unión al ADN puede ser estabilizada a través de interacciones electrostáticas que se establecen entre las cadenas laterales terminales cargadas positivamente de la bleomicina y los grupos fosfato cargados negativamente del ADN. En este modelo el O_2 está estratégicamente posicionado, de tal forma que la reducción de una especie radicalaria conlleve a que un átomo de hidrógeno unido al C-4′ del anillo de la desoxirribosa sea capturado de manera selectiva,

guiando al clivaje oxidativo del enlace (C-3´)-(C-4´) en este azúcar. Si el complejo bleomicina - Fe(III) - Oes reducido *in situ* $^{\bullet}_{2}$, los OH pueden ser generados en la vecindad inmediata de los grupos adyacentes sobre el ADN y provocar su ruptura. Los parámetros cinéticos de la reacción de escisión del anillo de la desoxirribosa han sido reportados y la rápida ruptura observada en este azúcar, sugiere que los $^{\bullet}$OH pueden ser la especie directamente involucrada en la fragmentación del ADN inducida por bleomicina (Povirk, 1979). En correspondencia con estas ideas, otro estudio posterior reportó la medición, mediante un método fluorimétrico muy sensible, de los $^{\bullet}$OH generados por el complejo Bleomicina-Fe^{2+} en la vecindad inmediata del ADN (Chakrabarti *et al.* 1996). Apoyando lo planteado anteriormente, una investigación demostró el daño al ADN inducido por agentes reductores endógenos y Fe^{3+}, los cuales condujeron a la formación del $^{\bullet}$OH (Oikawa y Kawanishi, 1998). Giloni *et al.,* (1981) han sugerido que una de las reacciones que mencionaremos a continuación puede estar involucrada en el paso inicial de la secuencia de reacciones propuestas entre la bleomicina, el Fe (II) y el oxígeno: la formación de $O^{\bullet-}_{2}$ y $^{\bullet}$OH formados por reducción univalente del oxígeno, una reacción tipo Fenton, una reacción de oxidación-reducción catalizada por quelatos de hierro o una combinación de estos eventos. En este sentido otro trabajo revela el daño oxidativo al ADN mediado por $^{\bullet}$OH y $O^{\bullet-}_{2}$ (Moneghini, 1997).

En otros trabajos se informa que durante la degradación del ADN en presencia de bleomicina, iones férricos, oxígeno y ácido ascórbico, además de formarse bases de propenal como producto mayoritario, se detectó la presencia de pequeñas cantidades de bases modificadas, las cuales fueron idénticas a los productos formados cuando los $^{\bullet}$OH reaccionan con las bases del ADN, sugiriendo que el daño oxidativo a las bases del ADN puede ocurrir como una reacción secundaria o colateral, durante este complejo evento (Gajewski *et al.* 1991). Se ha puntualizado que esta modificación de bases es inhibida por la CAT, la SOD y secuestradores de $^{\bullet}$OH, indicando la participación de los $^{\bullet}$OH y el $O^{\bullet-}_{2}$en este proceso (Jackson *et al.* 1989; Gajewski *et al.* 1991), lo cual coincide con lo reportado por Giloni *et al.,* (1981).

Otro estudio reveló que la ruptura de cadenas del ADN provocada por su exposición a bleomicina provoca lesiones mutagénicas; las cuales están determinadas por el tipo de ruptura de cadenas en esta biomolécula. Si la ruptura es de simple cadena, se producen sustituciones

de bases, que generalmente son múltiples y originan errores en la actividad de la polimerasa en los sitios de ruptura de la cadena; cuando la ruptura es de doble cadena ocurren delecciones en secuencias repetidas cortas (Dar and Jorgensen, 1995).

Los elevados porcentajes que aporta la fracción a la actividad antioxidante del extracto en este ensayo indican que los compuestos polifenólicos presentes en la misma son de vital importancia para obtener los efectos mostrados por el extracto. Existen reportes en la literatura acerca del efecto protector que ejercen los polifenoles puros o aquellos integrados a extractos vegetales, sobre el daño oxidativo al ADN ocasionado por la bleomicina. En correspondencia con esta idea, el extracto acuoso de cortezas de *Mangifera indica* L. (Vimang®) protegió del daño oxidativo al ADN inducido por bleomicina- Fe^{2+} (Martínez *et al.* 2000). Stagos *et al.* (2006) reportaron que el extracto de semillas de la uva, en el que se destaca la presencia de compuestos polifenólicos como: catequina, epicatequina, trans-resveratrol y ácido gálico, disminuyó la actividad mutagénica de la Bleomicina en la cepa TA102 de *Salmonella typhimurium*. Empleando esta misma cepa como modelo de estudio, Edenharder y Grunhage (2003), demostraron que el mecanismo que explica la actividad antimutagénica de los polifenoles es su capacidad secuestradora de radicales libres. Coincidiendo con estos hallazgos, otros científicos encontraron una buena correlación entre la actividad antioxidante de la catequina, la epicatequina y un extracto de té verde, determinada por sus propiedades secuestradoras de radicales DPPH, $O^{\bullet-}{}_2$ y H_2O_2, y su acción antimutagénica (Geetha *et al.* 2004). En otro estudio se indica que el extracto de uvas inhibió la ruptura de cadenas del ADN inducida por mitomicina-c (Stagos *et al.* 2005), este es uno de los métodos empleados para la identificación de agentes quimiopreventivos, destinados al control del cáncer; que previenen el daño al ADN mediado por ERO (Stagos *et al.* 2005a), sugiriendo que este extracto puede inhibir el daño al ADN ocasionado por ERO. Otro reporte informa que cuando células del bazo de ratones son preincubadas con compuestos polifenólicos aislados de la semilla de la uva, tales como: procianidina B4, catequina y ácido gálico; resultaron menos susceptibles al daño al ADN inducido por el peróxido de hidrógeno según los resultados del ensayo cometa (Fan y Lou, 2004).

Las propiedades secuestradoras de $^{\bullet}OH$ y $O^{\bullet-}_2$ demostradas en el capítulo anterior para el extracto de *R. mangle* y su fracción pueden explicar el efecto protector ejercido por ambas muestras frente al daño oxidativo del ADN inducido por el sistema bleomicina – Fe^{2+}.

Las propiedades secuestradoras de radicales libres y la actividad quelante de iones de hierro, demostradas para el extracto de *R. mangle* y su fracción, así como el efecto protector mostrado por los mismos frente al daño oxidativo de las principales biomoléculas en este capítulo, permite suponer que estas muestras son capaces de reducir el estrés oxidativo a nivel celular.

II.3.5 Conclusión.

Se demostró que el extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. protege a las principales biomoléculas del daño oxidativo, evidenciado por la inhibición de la POL, de la pérdida de grupos sulfidrilos en la ASB y de la degradación del ADN. La fracción polifenólica mayoritaria constituyó el principal determinante de estos efectos.

II.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Rhizophora mangle L.* Y SU FRACCIÓN POLIFENÓLICA MAYORITARIA A NIVEL DE CÉLULAS.

II.4.1 Introducción.

Los estudios del efecto antioxidante de un compuesto a nivel celular son de vital importancia, ya que estos sistemas representan un nivel de organización de la materia superior al molecular, en este caso el compuesto objeto de estudio debe ser capaz de atravezar la barrera que representa la membrana celular para penetrar en el interior celular, y una vez aquí interactuar con diferentes componentes celulares, desencadenando la activación de mecanismos de señalización intracelular, lo cual permite evaluar las acciones de dicho compuesto sobre la integridad de la célula (estructural o funcional), la generación de ERO y la inducción de sistemas antioxidantes.

La POL es el evento más utilizado como marcador de los procesos oxidativos a este nivel. El daño oxidativo a las membranas celulares puede disminuir la fluidez de las mismas, conduciendo a la alteración de las permeabilidad celular, así como inactivar receptores asociados a ellas (Hensley *et al*., 2000). Los eritrocitos son vulnerables a la POL, debido a su alto contenido de lípidos insaturados, su rico suministro de oxígeno y a la presencia de metales de transición (Niki *et al*., 1988). Las ERO generadas en la fase acuosa o lipídica pueden atacar la membrana de los eritrocitos y producir la oxidación de los lípidos y proteínas, provocando la disrupción de la membrana, lo cual a su vez conduce a la hemólisis (Chiu *et al*., 1982). Por todo lo anteriormente expuesto, numerosos estudios han empleado a los eritrocitos como sistemas modelo para la investigación del daño oxidativo a las biomembranas (Carini *et al.*, 2000; Tedesco *et al.*, 2001).

También en este tipo de estudio, los macrófagos, tanto aislados de animales de laboratorio, como en las líneas celulares establecidas, han sido ampliamente utilizados como modelos para el análisis de los fenómenos del estrés oxidativo. Entre los agentes más utilizados para la inducción del estrés oxidativo en estas células, se encuentran: los lipopolisacáridos (LPS) y los ésteres de forbol, como el forbol-1,2-miristato-1,3-acetato (PMA). Los macrófagos después de

activados son responsables de la liberación de importantes mediadores que contribuyen al desarrollo del estrés oxidativo, tales como: citoquinas y ERO (Pan *et al.*, 2000; Zhu *et al*., 2006). Entre las ERO producidas por los macrófagos se encuentran el $O^{\bullet-}$ yel$NO^{\bullet}{}_2$ (Arantes *et al*., 2000, Khadaroo *et al*., 2003). El $O^{\bullet-}{}_2$ es generado por la enzima NADPH oxidasa, localizada en la membrana de la célula fagocítica (*Cathcart*, 2004). El $NO^{\bullet}$ es sintetizado endógenamente a partir de la L-arginina por tres isoformas de la enzima NOS (Crowell *et al*., 2003).

Existen reportes en la literatura sobre las propiedades antioxidantes, de los polifenoles puros y aquellos integrantes de diferentes extractos vegetales, relacionados con un efecto protector sobre la hemólisis (Yan *et al.*, 2002; Kaviarasan *et al.*, 2004) e inhibidor de la generación de O•-2 (Ying *et al.*, 2004; Won *et al.*, 2006); en contraste sus acciones sobre la producción de $NO^{\bullet}$ han resultado contradictorias, encontrándose que pueden tanto disminuir (Chan *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2000) como incrementar (Wallerath *et al*., 2002; Anter *et al*., 2004) la producción de esta ERO.

Teniendo en cuenta que el extracto acuoso de *Rhizophora mangle L.* y su fracción polifenólica mayoritaria mostraron propiedades secuestradoras de radicales libres, así como actividad quelante de iones de hierro y efecto protector a las principales biomoléculas del daño oxidativo provocado por su exposición a ERO, las cuales fueron demostradas en los capítulos anteriores, es posible suponer que los mismos puedan inhibir el estrés oxidativo a nivel celular, y como además, se dispone de una batería de ensayos ampliamente utilizados con estos fines en otros extractos vegetales y compuestos polifenólicos aislados de los mismos, el objetivo de este capítulo es:

Determinar a nivel celular el efecto que ocasionan el extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la hemólisis, y la producción de O-2 y NO.

II.4.2 Materiales y Métodos

II.4.2.1 Reactivos

Los reactivos PMA, LPS de *Escherichia coli* (serotipo 055:B5), medio de cultivo DMEM completo, solución salina balanceada de Hanks (HBSS), medio RPMI-1640, ferricitocromo c, N5-(1-iminoetil)-L-ornitina (L-NIO), SOD, L-arginina, Hepes, piruvato, glutamina, N-(1- naftil)-etilendiamina, sulfanilamida, ácido fosfórico y 2,2- azobis (amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) se obtuvieron de Laboratorios Sigma (St. Louis, MO). La linea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 provenía de la colección europea de cultivos de células animales, ECACC. La enzima nitrato reductasa procedía de Cayman Chemical (USA).

II.4.2.2 Ensayo de generación de anión superóxido en una linea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 estimulada con LPS o PMA.

La producción de O^{-}_{2} en macrófagos estimulados con dos tipos de agentes: PMA o LPS, se midió empleando el método de reducción del ferricitocromo c (Johnston *et al.*, 1978). Macrófagos cultivados en medio DMEM completo (DMEM con L-glutamina 2 mM, piruvato 1 mM, Hepes 20 mM, suero fetal bovino 10 %) se sembraron en placas de 12 pocillos (1·106 células/pocillo) y se incubaron durante tres horas a 37 ºC, en atmósfera de CO_2 5 %, para lograr la adhesión de las células a la placa. Transcurrido este tiempo los pocillos se lavaron tres veces con solución salina balanceada de Hanks (HBSS). A continuación se añadieron 900 µL HBBS, conteniendo 110 mg de ferricitocromo c; 1 mL de N^5-(1-iminoetil)-L-ornitina (L- NIO) 1 mM, 100 µL del extracto de *R. mangle* (5,1; 25,7; 51,4 µg/mL de taninos) o su fracción (2,8; 13,9; 27,8 µg/mL de taninos) y 10 µL de PMA o LPS (10 mg/mL). La mezcla de reacción se incubó durante dos h a 37 ºC, en atmósfera de CO_2 5 %. Se utilizó la SOD (6000 U/mL) como control de la inhibición de la producción de O^{-}_{2}. A continuación se detuvo la reacción poniendo los tubos en baño de hielo, se centrifugó a 800 x g, durante 10 min a 4 ºC, se recuperó el sobrenadante y se midió su absorbancia a 550 nm. La concentración de O^{-}_{2} se calculó empleando el coeficiente de extinción molar (21 $mM^{-1}.cm^{-1}$) del citocromo c reducido. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de la producción de O^{-}_{2}.

II.4.2.3 Ensayo de generación de $NO^{\bullet}$ en una linea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 estimulada con LPS o PMA.

La producción de NO se indujo en una linea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 activados con dos tipos de agentes: PMA o LPS, según el método descrito por Moreno *et al.*, (2003). Macrófagos cultivados en medio DMEM completo (DMEM con L-glutamina 2 mM, piruvato 1 mM, Hepes 20 mM, suero fetal bovino 10 %) se sembraron en placas de 12 pocillos (2,5·105 células/pocillo) y se incubaron durante tres horas a 37 ºC, en atmósfera de CO_2 5 %, para lograr la adhesión de las células a la placa. Transcurrido este tiempo los pocillos se lavaron tres veces con solución salina balanceada de Hanks (HBSS). A continuación se añadieron 112,5 µL de RPMI-1640, 100 µL de L-arginina (1,7 mg/mL); 1 mL de SOD (6000 U/mL), 2 mL de Hepes (20 mM), 1 mL de piruvato (1 mM), 1 mL de glutamina (2 mM), 100 µL del extracto de *R. mangle* (5,1; 25,7; 51,4 µg/mL de taninos) o su fracción (2,8; 13,9; 27,8 µg/mL de taninos) y 10 µL de PMA o LPS (10 mg/mL). La mezcla de reacción se incubó durante 24 h a 37 ºC, en atmósfera de CO_2 5 %. Se utilizó 1 mL de L-NIO (1 mM) como control de la inhibición de la producción de NO. A continuación se detuvo la reacción poniendo los tubos en baño de hielo, se centrifugó a 800·g, durante 10 min a 4 ºC y se recuperó el sobrenadante para la determinación de las concentraciones de NO.

La cuantificación de NO se realizó indirectamente a través de la determinación de nitritos empleando el método de Griess (Tracey *et al.*, 1995). En placas de 96 pocillos, se colocan 90 µL del sobrenadante de cada tubo, a los que se le añaden 10 µL de la solución de nitrato reductasa, para convertir los nitratos a nitritos. Después de una incubación de 40 min se añaden 100 µL del reactivo de Griess (1:1, v/v, 0,1 % N-(1-naftil)-etilendiamina y 1% sulfanilamida en 5 % H_3PO_4). Tras otros 10 min de incubación a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia a 540 nm. La concentración de nitritos se calculó con referencia a una curva patrón obtenida con $NaNO_2$ en concentraciones entre 0-50 µM. Los resultados fueron expresados como porcentaje de incremento de la generación de NO.

II.4.2.4 Ensayo de hemólisis de las células rojas de la sangre humana inducida por AAPH.

Las células rojas de la sangre (RBC) fueron obtenidas a partir de sangre normal, colectada de sujetos sanos. Las RBC fueron separadas del plasma y lavadas tres veces con 5 volúmenes de solución amortiguadora fosfato salina (PBS) 50 mM pH 7,4, durante el lavado las células se centrifugaron a 750·g durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación se preparó una solución de RBC al 50 % (v/v) en PBS 50 mM pH 7,4.

En el ensayo de hemólisis la mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1.0 mL los siguientes reactivos, preparados en PBS 50 mM pH 7,4, en las cantidades y concentraciones indicadas: 250 µL de RBC (50 %, v:v), 500 µL del extracto de *R. mangle* (51,4; 64,3; 77,2; 90,0; 102,9 µg/mL de taninos) o su fracción (26,7; 53,3; 106,7 y 213,4 µg/mL de taninos) y 250 µL de 2,2- azobis (amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) (100 mM*)*. Este sistema se mantuvo en agitación mientras se incubó a 37 °C durante 2,5 h. Posteriormente la mezcla de reacción se centrifugó a 750 · g durante 10 min. En el sobrenadante se determinó el grado de hemólisis, a partir de la absorbancia de la hemoglobina a 540 nm. Se utilizaron 250 µL de solución de RBC (50 %, v:v) y 750 µL de PBS 50 mM pH 7,4 como control negativo en el ensayo. El valor de 100 % de hemólisis se determinó a partir de la hemólisis inducida por AAPH (100 mM). Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de la hemólisis (Sato *et al.*, 1995).

II.4.3 Resultados

II.4.3.1 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la generación de anión superóxido en macrófagos estimulados con LPS o PMA.

Las figuras 13 A y B muestran respectivamente el efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle L.* y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la producción de O^{-}_{2}. Se observa que tanto el extracto como su fracción disminuyeron la generación de esta ERO cuando los macrófagos son estimulados con ambos tipos de agentes, pero en presencia de LPS el efecto

inhibitorio fue superior en comparación con la activación con PMA para ambas muestras, teniendo en cuenta que el análisis de regresión lineal arrojó que existían diferencias significativas ($p<0,05$) entre las rectas, tanto del extracto como de la fracción, obtenidas con ambos agentes. Este efecto fue dependiente de la concentración de taninos, con valores de índice de determinación (r^2) de 0,995 y 0,995 para el extracto, y 0,919 y 0,891 para la fracción, en presencia de PMA y LPS respectivamente. Los valores de la CI_{50}, 168,3 y 96,4 µg/mL de taninos para el extracto y 18,5 y 10,3 µg/mL de taninos para la fracción, en presencia de PMA y LPS respectivamente, demostraron la superioridad de la fracción en este efecto en presencia de ambos agentes. La comparación de las lineas de regresión (extracto *vs*. fracción) reveló que eran estadísticamente diferentes ($p<0,05$) tanto en presencia de PMA, como de LPS, resultando la fracción más eficaz que el extracto en reducir la generación de esta ERO. Estos resultados demuestran las propiedades antioxidantes del extracto y su fracción.

II.4.3.2 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la generación de $NO^{\bullet}$ en macrófagos estimulados con LPS o PMA.

Las figuras 14 A y B muestran respectivamente el efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle L.* y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la producción de NO. Se aprecia un aumento en la producción de NOen los macrófagos estimulados con PMA en presencia de ambas muestras. Este efecto fue dependiente de la concentración de taninos, con valores de índice de determinación (r^2) de 0,916 y 0,960 para el extracto y su fracción respectivamente. Los valores de la concentración efectiva media (CE_{50}) del extracto y la fracción, 21,8 y 16,1 µg/mL de taninos respectivamente, demostraron la superioridad de la fracción en este efecto en presencia de PMA. La comparación de las líneas de regresión obtenidas para el extracto y la fracción en presencia de PMA reveló diferencia estadística entre las mismas ($p<0,05$), obteniéndose que a valores de concentración de taninos por encima del punto de corte de ambas rectas, la fracción resultó más eficaz que el extracto en incrementar la generación de esta ERO. Cuando los macrófagos son estimulados con LPS, el extracto incrementó ligeramente la producción de NO, pero la fracción tuvo un efecto contrario, disminuyendo ligeramente la producción de esta especie radicalaria. Estos efectos fueron dependientes de la

concentración de taninos, obteniéndose valores de índice de determinación (r^2) de 0,76 y 0,999 para el extracto y su fracción respectivamente. La comparación de las líneas de regresión obtenidas para el extracto en presencia de PMA y LPS (figura 11.A) reveló diferencia estadística entre las mismas ($p<0,05$), siendo el extracto más eficaz en incrementar la generación de NO en presencia de PMA en comparación con el LPS.

II.4.3.3 Efecto del extracto acuoso de Rhizophora mangle L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la lisis de los eritrocitos humanos inducida por AAPH.

La figura 15 muestra una curva sigmoidal en la que se aprecia que tanto el extracto de *R. mangle* como su fracción polifenólica mayoritaria disminuyeron la lisis de los eritrocitos humanos inducida por AAPH, hasta lograr una inhibición total de la misma a partir de la tercera concentración evaluada, evento que se corresponde con la zona de meseta en el gráfico. En la zona lineal del gráfico, se demostró que este efecto fue dependiente de la concentración de taninos, con valores de índice de determinación (r^2) de 0,961 y 0,999 para el extracto y la fracción respectivamente. La comparación de las lineas de regresión mostró que eran estadísticamente diferentes ($p<0,05$), obteniéndose que a valores de concentración de taninos por encima del punto de corte de ambas rectas, el extracto resultó más eficaz que la fracción en ejercer un efecto protector sobre la hemólisis y viceversa.

La figura 16.A muestra que en el intervalo de concentraciones evaluadas, la fracción fue la principal responsable de la actividad antioxidante del extracto, en los ensayos de generación de $O^{\bullet -}$ en presenciadePMAy LPS, asícomodeproducciónde$NO^{\bullet}{}_2$ en presencia de PMA y
de hemólisis inducida por AAPH, en los cuales aportó un rango de porcentajes de 178,9 a 671,4; 175,4 a 397,0; 168,8 a 205,2, y 63,6 a 199,1 respectivamente. En cambio, en el ensayo de producción de NO en presencia del LPS, dado el comportamiento divergente entre el extracto y su fracción, se infiere que ésta como subsistema aislado no puede ser la responsable de las acciones mostradas por el extracto. En la figura 16.B se observa que en el ensayo de
O•-2, cuando los macrófagos son activados con PMA, el aporte de la fracción fue superior que en el resto de los ensayos utilizados a este nivel de complejidad, en el ensayo de hemólisis se obtuvo la menor contribución de la fracción.

II.4.4 Discusión

Para el estudio de las propiedades antioxidantes de una sustancia a nivel celular, se emplean un conjunto de métodos experimentales, cuyo basamento permite conocer si el agente que se investiga impide de algún modo la generación de ERO, así como su efecto sobre la integridad estructural y funcional de la célula expuesta a daño oxidativo; en un sistema de organización de la materia superior, en el cual el compuesto objeto de estudio establece interacciones más complejas, por la presencia de sistemas enzimáticos y moléculas que participan en los mecanismos de transducción de señales intracelular.

En el presente trabajo el extracto de *R. mangle* y su fracción mostraron un efecto inhibitorio sobre la producción de O^{-}_{2} en una linea celular de macrófagos estimulada con PMA o LPS, resultando este efecto superior en ambas muestras con el empleo del LPS. Una posible explicación a las diferencias observadas en presencia de estos dos agentes, está relacionada con la magnitud del efecto producido por estos compuestos, en este sentido, los macrógafos activados con LPS generaron modestas cantidades de O^{-}_{2} (1,42 ± 0,13 μmol); en cambio, cuando se emplea PMA como estímulo se producen mayores cantidades de esta ERO (66,0 ± 4,2 μmol), estos resultados coinciden con los reportados por Jian *et al.*, (1995); por tanto, es mucho más fácil revertir el efecto de un estímulo pequeño, que en las condiciones de la presente tesis se corresponde con el efecto que produce el LPS. Además, estos resultados también pueden ser debido a que estos agentes ejercen sus acciones por mecanismos distintos, en los cuales pueden activarse diferentes vías de señalización intracelular en los macrófagos para dar lugar a la generación de O^{-}_{2}; esta posibilidad fue sugerida por Yagawa *et al.*, (1985) derivada del análisis de resultados alcanzados con el empleo de varios tipos de compuestos activadores de los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleraes (PMN).Trabajos posteriores confirman estas ideas, uno de ellos revela diferentes vías de activación de la NADPH oxidasa de los neutrófilos con el empleo de zimosán opsonisado y PMA, indicando que cuando las células son estimuladas con PMA, la activación de la NADPH oxidasa es independiente de calcio y está mediada por la proteína quinasa C (PKC), en cambio, cuando se utiliza el zimosán, la liberación de O^{-}_{2}es dependiente de calcio e independiente de la PKC y está mediada por la PLA_2 (Maridonneau-Parini *et al.*, 1986). En contraste con el planteamiento

anterior, otro estudio indica que las vías de transducción de señales intracelular que son importantes en la estimulación de los macrófagos por LPS son las proteínas tirosina quinasa y las concentraciones de Ca^{2+} (Jian *et al.*, 1995).

Los elevados valores de actividad antioxidante obtenidos para la fracción en este ensayo con ambos tipos de estímulo, los cuales fueron a todas las concentraciones evaluadas, superiores que en el extracto, indican que los compuestos polifenólicos presentes en la fracción mayoritaria son los principales responsables de la inhibición de la generación de O^{-}_{2}del extracto en la linea celular de macrófagos. En este sentido, existen numerosos reportes en la literatura de estudios efectuados con sistemas celulares que dan cuenta de la inhibición de la generación de esta ERO por extractos de plantas que contienen polifenoles o por compuestos polifenólicos puros. Se indica que los polifenoles del te verde o negro como las teaflavinas y la EGCG (Lin *et al.*, 2000) y la fracción polifenólica de la cocoa comercial (Won *et al.*, 2006) inhibieron la generación de O^{-}_{2}en células HL-60 estimuladas con PMA y TPA respectivamente. Inicialmente se pensaba que los polifenoles actuaban solamente secuestrando ERO, pero posteriormente se ha reportado que ellos pueden actuar regulando la expresión de las enzimas encargadas de la producción de ERO e interactuar con los mediadores que participan en las vías de transducción de señales intracelular para modular la generación de ERO, este es otro aspecto que puede incidir en la respuesta diferencial del extracto y su fracción durante la activación de los macrófagos con PMA y LPS (Sen y Packer, 1996). En correspondencia con estas ideas, otros estudios han revelado que tanto los polifenoles del te verde como los del té negro disminuyeron la producción de $O^{\bullet-}_{2}$, por un mecanismo basado en la regulación negativa de la expresión de las subunidades p22phox y p67phox de la enzima NADPH oxidasa, enzima generadora de O^{-}_{2} (Ying *et al.*, 2003; Ying *et al.*, 2004). Otro trabajo reveló que los polifenoles del té verde inhibieron la activación de la proteína quinasa C provocada por un inductor de tumores (Komori *et al.*, 1993). También se informó que los polifenoles del té negro y verde, la teaflavina-3,3'-digalato y la epigalocatequina galato (EGCG) respectivamente, suprimieron la actividad de la PKC inducida por el TPA, otro éster de forbol, por bloquear la translocación de esta proteína del citosol a la membrana (Chen *et al.*, 1999). Con relación al papel que juega la proteína quinasa C, en la transducción de señales relacionada con la producción de O^{-}_{2}estimulada por PMA, Fan *et al.*, (2006) demostraron que

la misma aumenta la actividad de la NADPH oxidasa por fosforilar múltiples residuos de serina en las posiciones 303/304/328/345/348/379 de la subunidad p47phox.

En el presente trabajo el extracto de *R. mangle* y su fracción incrementaron la producción de NO en una línea celular de macrófagos estimulada con PMA. Los elevados porcentajes que aporta la fracción a la actividad estimuladora de la generación de NO del extracto cuando los macrófagos son estimulados con PMA indican que los compuestos polifenólicos de la fracción son los principales responsables de los efectos observados en el extracto. Al respecto, varios trabajos informan sobre la propiedad que tienen los compuestos polifenólicos de incrementar la producción de NO . Este efecto se observó en células endoteliales de aorta porcina, por un mecanismo que involucra el aumento de la actividad de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) por acción de la proteína quinasa activada por mitógenos p 38 (p38 MAPK), la cual activó la eNOS por fosforilar el residuo de Ser-1177, en respuesta a los polifenoles del te negro (Anter *et al*., 2004). Leikert *et al*., (2002) informaron por primera vez que el extracto polifenólico del vino rojo incrementó la expresión de la eNOS y como consecuencia la liberación de NO en células endoteliales. Otro estudio indica que el resveratrol, polifenol encontrado principalmente en vinos de uva, incrementó la actividad del promotor de la eNOS, específicamente el fragmento que incluye los primeros 263 pb, la expresión y estabilidad del RNAm de la eNOS y la producción de NO en células endoteliales; pero no mostró aumento en la actividad de unión de varios factores de transcripción que se conoce son importantes en la activación del promotor de la eNOS; aunque los autores de este trabajo no encontraron aún toda la explicación a los efectos observados con el resveratrol, sí concluyen que la sobreexpresión de la regulación de la eNOS por este polifenol involucra mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales y sugieren que la activación transcripcional es improbable que sea a través de la participación de uno de los factores de transcripción evaluados solamente, indicando que un proceso multifactorial o la participación de otros factores de transcripción aún no identificados pueden ser los responsables de este fenómeno (Wallerath *et al*., 2002), a conclusiones similares arribaron Wallerath *et al*., (2003) sobre los efectos del vino rojo francés. Otro trabajo informa que la antocianina, cianidina-3-glicósido, un pigmento típico, aumentó la expresión de la proteína eNOS en células endoteliales de arteria bovina, mediante la fosforilación de la quinasa Scr, la quinasa regulada por señal

extracelular (ERK1/2) y el factor de transcripción Sp1, además este polifenol aumentó la actividad de unión de Sp1 al promotor de la eNOS, estos autores concluyen que la cianidina-3-glicósido induce la expresión de eNOS y un incremento de la producción de NO mediante una vía de señalización dependiente de Src-ERK1/2-Sp1 (Jin-Wen *et al*., 2004). Se comunicó que los polifenoles de un extracto de hojas de la planta *Cynara scolymus L.* aumentaron la actividad del promotor y la expresión del RNAm de la eNOS en una linea de células endoteliales humanas y en anillos aórticos de ratas (Li *et al*., 2004).

El incremento de la producción de NO en función de la concentración de taninos observada en la presente investigación se corresponde con los resultados de otros autores. Se ha reportado una correlación positiva entre el contenido de resveratrol (Wallerath *et al*., 2002) y de compuestos polifenólicos (Wallerath *et al*., 2003) en diferentes vinos y sus potencialidades de incrementar la expresión de la eNOS.

Los resultados de la presente tesis indican efectos contradictorios de los compuestos polifenólicos sobre la producción de NO por los macrófagos. Mientras la fracción aumentó la producción de NO en macrófagos tratados con PMA, como se analizó previamente, en presencia de LPS, los compuestos polifenólicos presentes en la misma ejercieron un efecto inhibitorio sobre la producción de esta ERO. No obstante, existen también trabajos que reportan que los compuestos polifenólicos inhiben la producción de esta especie radicalaria. Un estudio informa que los polifenoles quercetina y resveratrol presentes en el vino rojo mostraron propiedades secuestradoras de NO en un sistema acelular usando nitroprusiato de sodio y que suprimieron la expresión del gen de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y la producción de $NO^{\bullet}$ en un sistema igual al empleado en la presente tesis (Chan *et al.*, 2000). Otro estudio indica que polifenoles del te como la EGC y la epigalocatequina-3-galato (EGCG) inhibieron la producción de NO en macrófagos peritoneales activados con LPS; el estudio del mecanismo de acción responsable de este efecto indicó que la principal catequina del té, la EGCG, decreció la actividad y los niveles de la proteína iNOS por reducir la expresión del RNAm de esta enzima debido a que previno la unión del factor nuclear kB al promotor de la iNOS, conduciendo a la inhibición de la inducción de la transcripción de la iNOS (Lin y Lin, 1997). A resultados similares arribaron Lin *et al.*, (1999) empleando la

teaflavina-3,3'-digalato, uno de los principales polifenoles del té negro, en una linea de macrófagos activados con LPS. Otro estudio informa que la teaflavina-3,3'-digalato y otros polifenoles disminuyeron los niveles de la iNOS mediante el decrecimiento de la activación del factor nuclear kappaB a través de la inhibición de la actividad de las quinasas IKK1 y IKK2 en la misma linea celular de macrófagos utilizada en la presente tesis estimulada con LPS, con lo cual bloquearon la fosforilación y posterior degradación de IkappaB α y IkappaB β respectivamente, eventos necesarios para la activación del factor nuclear kappaB, el cual interviene en el proceso de transcripción del gen de la iNOS **(**Pan *et al.*, 2000). También se encontró que el té verde inhibió la expresión del RNAm de la iNOS, la proteína iNOS y la producción de NO en dos lineas celulares epiteliales humanas, una alveolar A549/8 y la otra de colon DLD-1, por un mecanismo de inhibición de la transcripción del gen de la iNOS, relacionado con la disminución de la actividad de unión del factor de transcripción transductor de la señal y activador de la transcripción-1α (STAT- 1α) al ADN, debido a una reducida fosforilación de los residuos de tirosina en la proteína STAT- 1α **(**Tedeschi *et al.*, 2004).

Las diferencias observadas en el incremento de la producción de NO en los macrófagos estimulados con PMA o LPS en presencia del extracto, pueden estar asociadas como se planteó anteriormente para el O^{-}_{2}a diferencias en las vías de señalización intracelular mediante las cuales cada uno de ellos induce la producción de $NO^{\bullet}$y como consecuencia a la interacción de los componentes del extracto con diferentes moléculas que participan en estos mecanismos, dando como resultado un efecto modulador diferente en la generación de esta ERO. En correspondencia con esta idea, un trabajo informa que la PKC modula la activación de la eNOS en arterias mesentéricas (Blanco-Rivero *et al*., 2007). Otro estudio demostró que las isoformas PKCα y PKCε son las que están implicadas en la sobrerregulación de la expresión de la proteína eNOS en células endoteliales estimuladas con PMA, la activación de estas isoformas tuvo lugar por inducción de su translocación del citosol a la membrana celular, también el tratamiento con PMA estimuló la actividad del promotor de la eNOS (Li *et al*., 1998). En cambio, se reportó que las vías de señalización que están relacionadas con el LPS, son las de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la quinasa regulada por señal extracelular (ERK), las diferencias en la activación de esta última quinasa fue la responsable de la variación en la expresión de la iNOS y la producción de NO en macrófagos

peritoneales y esplénicos (Zhu *et al*., 2006). En otro estudio se corrobora la participación de estos mediadores en la transducción de señales inducida por LPS y señala además que la vía de la quinasa terminal-NH_2 c-Jun (JNK) también está involucrada (Guha y Mackman *et al*., 2002).

El ligero incremento en la producción de NO observado en presencia del extracto cuando los macrófagos son estimulados con LPS y el hecho de que la fracción no aporte a esta actividad del extracto, sugiere que otros compuestos presentes en el extracto pueden contribuir a este efecto, en este sentido los aceites esenciales de las flores de *Magnolia sieboldii* (Lim *et al.*, 2002) y de las hojas de la planta *Croton cajucara* (Do Socorro *et al.*, 2003) aumentaron la producción de NO en macrófagos peritoneales estimulados con LPS y *Leishmania amazonensis* respectivamente. No se han encontrado reportes en la literatura relacionados con un incremento de la producción de $NO^{\bullet}$ por los fitoesteroles, en este sentido un trabajo reporta que el β-sitoesterol y el estigmasterol aislados de vinos franceses y alemanes no tuvieron efecto sobre la expresión de la eNOS en células endoteliales (Wallerath *et al*., 2002).

En el presente trabajo se demostró el efecto inhibitorio del extracto y su fracción sobre la lisis de los eritrocitos humanos tratados con AAPH. La membrana de las células rojas de la sangre (RBC) es rica en ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son muy suceptibles a la peroxidación mediada por radicales libres (Chiu *et al*., 1982). La descomposición térmica a temperatura fisiológica del AAPH, genera la iniciación de radicales libres, los cuales pueden atacar la membrana de las RBC para inducir POL (Niki *et al.*, 1988) y como la misma es una reacción en cadena de radicales libres y un radical iniciador puede inducir más de veinte reacciones de propagación, así la membrana es rápidamente dañada, dando lugar a la hemólisis (Liu *et al.*, 1999).

Una posible explicación del efecto superior del extracto con respecto a la fracción en la protección sobre la hemólisis, a concentraciones de taninos superiores al punto de corte de las rectas de regresión de ambas muestras, pudiera ser que la interacción de la fracción con otros componentes del extracto puede dar lugar a un efecto aditivo o sinérgico que incremente la actividad antioxidante del extracto con respecto a la fracción. En este sentido, en estudios que

emplean el mismo sistema de experimentación de la presente tesis, se refiere la inhibición de la hemólisis inducida por radicales libres ejercidas por compuestos polifenólicos monoméricos sólo presentes en el extracto, como el ácido gálico (Lanping *et al.*, 2000). Por otra parte, se conoce que los compuestos derivados de las catequinas y epicatequinas pueden estar presentes tanto en el extracto como en la fracción (Sánchez, 2007) y que estudios realizados por Verstraeten *et al.*, (2003), revelan que determinados rasgos estructurales en los polifenoles incrementan la eficacia en la inhibición de la hemólisis, como es un elevado número de grupos hidroxilo en la estructura de los mismos, lo cual favorece un incremento de las interacciones entre los polifenoles y la superficie de la membrana, teniendo en cuenta que a pH fisiológico la mayoría de estos compuestos interactúan con los grupos de la cabeza polar de los fosfolípidos en la superficie de la membrana, vía la formación de enlaces por puentes de hidrógeno, que involucran a los grupos hidroxilo de los polifenoles; esta adsorción de los mismos probablemente limita el acceso de los oxidantes acuosos a la superficie de la membrana y su ataque inicial a la superficie de esta, lo cual contribuye a la reducción del daño oxidativo a la membrana del eritrocito y como consecuencia a una disminución de la hemólisis. Otros trabajos han coincidido en plantear que la capacidad de las polifenoles de interactuar con las biomembranas juega un papel esencial en su actividad protectora sobre la POL; teniendo en cuenta que los radicales lipídicos resultantes de las reacciones de propagación en cadena están localizados dentro de la membrana, por tanto, los polifenoles tienen que interactuar con la membrana antes de ejercer sus efectos, consecuentemente, la velocidad de incorporación de los mismos dentro de las células y su localización y orientación en la membrana debe ser tomada en cuenta para comprender la eficacia de su actividad antioxidante (Yang *et al.,* 2001). En correspondencia con estas ideas estudios realizados por Kajiya *et al.,* (2001) acerca de la influencia del efecto estérico en la interacción de las catequinas presentes en el te con las bicapas lipídicas, empleando sistemas de liposomas, revelaron que la cantidad de catequinas tipo trans incorporada dentro de los liposomas fue menor que la de las respectivas catequinas tipo cis, estos autores concluyeron que en adición al número de grupos hidroxilo sobre el anillo B, la estructura estereoquímica del anillo C gobierna la hidrofobicidad de estos compuestos y que estas características estructurales pueden influir en su afinidad por las bicapas lipídicas, en la alteración de la estructura de la membrana y en las diferencias en las actividades biológicas. También se ha informado que la

glicosilación de las catequinas disminuye su actividad antioxidante tanto en la fase lipídica como en la acuosa (Plumb *et al.,* 1998). Otro estudio investigó el efecto de varios factores externos sobre la afinidad de las catequinas del te verde por las bicapas lipídicas usando liposomas como modelos de membrana y reveló que la cantidad de catequinas incorporadas dentro de las bicapas lipídicas incrementó con el aumento de la concentración de cloruro de sodio en un medio acuoso y decreció con el incremento de las cargas eléctricas negativas en la bicapa lipídica. Además la cantidad de epigalocatequina galato y epicatequina galato incorporada dentro de las bicapas lipídicas incrementó con el aumento de la concentración de epicatequina. Estos autores concluyeron que la concentración de sal en el medio acuoso, la carga eléctrica de la membrana y la presencia de otras catequinas gobiernan la afinidad de las mismas por las bicapas lipídicas (Kajiya *et al.,* 2002).

Los elevados porcentajes de actividad antioxidante que aporta la fracción al extracto a todas las concentraciones evaluadas, indican que la fracción es la principal responsable de la actividad antioxidante del extracto. En este sentido se ha reportado que extractos de plantas que contienen compuestos polifenólicos y estos compuestos puros han mostrado estos efectos. Dos estudios informan que los principales componentes polifenólicos extraídos del té verde de jazmín (Zhang *et al.,* 1997) y de las hojas del té verde (Lanping *et al.,* 2000), como la epicatequina, la epigalocatequina, la epicatequina galato y la epigalocatequina galato suprimieron la hemólisis oxidativa en el mismo sistema experimental utilizado en la presente tesis, en el primer estudio se comprobó que el efecto inhibitorio fue dependiente de la dosis y el análisis de ácidos grasos reveló que los cuatro isómeros de la epicatequina previnieron la pérdida de ácido araquidónico (20:4n-6) y ácido docosahexanoico (22:6n-3) de la membrana de las RBC. Otro estudio demostró que las antocianinas del vino rojo ejercieron un efecto protector sobre la lisis de las RBC humanas, normales, inducida por H_2O_2, e inactivas de CAT (Tedesco *et al.,* 2001). Resultados similares se obtuvieron utilizando un extracto de vino rojo y polifenoles aislados del mismo, resveratrol y quercetina, los cuales redujeron el daño oxidativo de los eritrocitos humanos expuestos a H_2O_2, evidenciado por la disminución de la POL y la hemólisis (Tedesco *et al.*, 2000). En correspondencia con los resultados anteriores, las procianidinas de la semilla de la uva protegieron a los eritrocitos de la acción oxidativa de la luz ultravioleta de manera dependiente de la dosis, lo cual se reveló en la inhibición de la

formación de hidroperóxidos fosfolipídicos de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina en la cara interna y de fosfatidilcolina en la cara externa de la membrana de las RBC según análisis por HPLC; además estos compuestos suprimieron el decrecimiento de la fluidez de la membrana debido a la oxidación de los lípidos y de los grupos tiol de las proteínas y disminuyeron el consumo de vitamina E (Carini *et al.*, 2000). Otro estudio indica que el extracto de la cocoa y los polifenoles individuales de la misma como: catequina, epicatequina y oligómeros de procianidina mostraron un efecto protector sobre la hemólisis de los eritrocitos de ratas inducida por AAPH de manera dependiente de la dosis. Estos autores han sugerido mecanismos potenciales mediante los cuales los polifenoles de la cocoa pueden proteger a los eritrocitos de la hemólisis, como son: i) ellos pueden actuar como antioxidantes primarios por reducir directamente la formación de radicales libres mediada por AAPH, ii) ellos pueden disminuir el consumo, mantener o regenerar el α-tocoferol y otros antioxidantes, por donar un átomo de hidrógeno a los radicales tocoferoles, lo cual también ha sido previamente reportado para las catequinas del te verde (Zhu *et al.*, 1999a), y iii) ellos pueden actuar como agentes quelantes y unirse a metales activos redox, incluyendo Fe^{2+} y Cu^{+}, involucrados en la iniciación de la formación de los radicales libres (Yan *et al.*, 2002); en concordancia con los mecanismos propuestos para el efecto protector de los polifenoles de la cocoa sobre la lisis de los eritrocitos, las propiedades previamente demostradas para el extracto acuoso *de Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria de secuestrar las ERO, inhibir la POL y la oxidación de los grupos –SH de las proteínas; así como quelar los iones de hierro pueden explicar los efectos protectores sobre la hemólisis obtenidos con estas muestras.

La propiedad mostrada por el extracto de *R. mangle* y su fracción de reducir el estrés oxidativo a nivel celular, unido a sus efectos secuestradores de radicales libres, quelante de iones de hierro y protectores del daño oxidativo a biomoléculas, permite suponer que estas muestras eran capaces de ejercer acciones antioxidantes a nivel de organismo.

II.4.5 Conclusión

Se demostró que el extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. redujo el estrés oxidativo a nivel celular, evidenciado en la disminución de la hemólisis y la generación de $O^{\bullet -}_2$ en macrófagos; a su vez incrementó la producción de $NO^{\bullet}$ en estas células. La fracción polifenólica mayoritaria constituyó el principal determinante de los efectos mostrados por el extracto.

II.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Rhizophora mangle* L. Y SU FRACCIÓN POLIFENÓLICA MAYORITARIA A NIVEL DE ORGANISMO.

II.5.1 Introducción.

Los estudios a nivel de organismos son decisivos en la evaluación de una sustancia propuesta como antioxidante. Éstos aportan los elementos definitivos sobre la bioactividad y biodisponibilidad del compuesto estudiado, y permiten dar respuesta, entre otras interrogantes, a si se alcanzan las concentraciones suficientes *in vivo* para ejercer la protección y si ocurren daños en sistemas fisiológicos diferentes a aquellos considerados dianas. Entre los biomarcadores más utilizados para evaluar el efecto antioxidante a este nivel se encuentran, los indicadores de protección: la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx; y el contenido de antioxidantes (GSH, vitaminas) y como indicadores de daño: el MDA, la concentración de grupos carbonilo o pérdida de grupos sulfidrilo y la fragmentación del ADN; evaluados en su conjunto en homogenados de tejido, plasma o suero.

En los últimos años se han desarrollado un gran número de modelos experimentales para la evaluación de la actividad antioxidante *in vivo* de una sustancia, en los cuales se reproducen diferentes situaciones fisiopatológicas generadoras de estados de estrés oxidativo. El modelo de curación de heridas abiertas asépticas en ratas fue utilizado para demostrar el efecto que tenía el CIKRON-V sobre dicho proceso (Melchor, 1999), un producto desarrollado por el CENSA a base del extracto acuoso de *Rhizophora mangle L*. (Sánchez *et al*., 1998).

Existen reportes en la literatura acerca de que los polifenoles puros y aquellos integrantes de diferentes extractos vegetales, incrementan los niveles de antioxidantes endógenos, como las enzimas SOD y CAT y el GSH y disminuyen los niveles de POL durante el proceso de curación de heridas en el tejido que logra la reparación (Gupta *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta que no se conocen las bases farmacológicas que sustentan las propiedades cicatrizantes del extracto de *R. mangle* y que se ha informado que el proceso de curación de

heridas se inicia por una fase inflamatoria, en la que se generan grandes cantidades de ERO (Torres, 1986), todo esto unido a que el extracto acuoso de *Rhizophora mangle L.* y su fracción polifenólica mayoritaria mostraron propiedades secuestradoras de radicales libres, así como actividad quelante de iones de hierro, efecto protector a las principales biomoléculas expuestas a daño oxidativo e inhibieron el estrés oxidativo a nivel celular; y como además, se dispone de una batería de ensayos ampliamente utilizados para el estudio de la actividad antioxidante *in vivo* de los compuestos, el objetivo de este capítulo es:

Dilucidar el efecto que ejercen el extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre indicadores del balance redox durante el proceso de curación de heridas.

II.5.2 Materiales y Métodos

II.5.2.1 Reactivos

Los reactivos cloruro de potasio, ácido 5,5´-ditio-bis (2-nitrobenzoico) (DTNB), peróxido de hidrógeno, N-metil-2-fenil-indol, 1,1,3,3 tetrametoxipropano se obtuvieron de Laboratorios Sigma (St. Louis, MO). La procedencia de otro grupo de reactivos se describe en el acápite II.1.1. El resto de los reactivos eran puros para análisis y procedían de los laboratorios Merk (Alemania) o BDH (U.K.).

II.5.2.2 Características de los animales y condiciones de alojamiento

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos, de 180 - 200 g de peso corporal, clínicamente sanas, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Bejucal, La Habana, Cuba). Las condiciones ambientales del local de experimentación fueron controladas automáticamente, registrándose valores de temperatura y humedad relativa de 22 ± 2 °C y 50 % – 60 % respectivamente, los animales fueron alojados individualmente en cajas plásticas y se mantuvieron con ciclos de 12 h de luz y oscuridad, con libre acceso a la alimentación (dieta estándar, CENPALAB) y al agua.

Los animales se mantuvieron durante todo el ensayo en un local de experimentación con condiciones asépticas, el cual fue previamente sometido a desinfección mecánica y química con Tego 2 % y aerosoles de formol y permanganato de potasio; además el mismo disponía de un filtro bacteriológico EPA. El alimento, el agua y la cama fueron esterilizadas a 120 °C durante 20 min antes de su uso. Las cajas plásticas fueron fregadas y desinfectadas con solución de Tego al 2 % y el personal que participó en el ensayo utilizó módulo de ropa estéril al trabajar con los animales. Se tomaron todas estas medidas para eliminar la posibilidad de presencia de infecciones en las heridas.

II.5.2.3 Modelo de curación de heridas asépticas en ratas.

Este modelo se realizó según se describió previamente por Melchor (1999). Se emplearon cuatro grupos experimentales que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Grupos de Tratamiento.

GRUPOS	TRATAMIENTOS
I II	Sin tratamiento (control)
III	Extracto acuoso de *R. mangle* 12,5 mg/mL de taninos
IV	Fracción mayoritaria de *R. mangle* 10 mg/mL de taninos
	Solución de ácido ascórbico 10 %

El día antes de la creación de las heridas, a los animales se les realizó inspección clínica, haciendo hincapié en las características de la piel e inmediatamente fueron anestesiados en una cámara con éter dietílico y afeitados en la región dorso – escapular. Al día siguiente, los animales fueron anestesiados en las mismas condiciones y se les provocaron cuatro heridas, dos a cada lado de la linea dorsal, en cada rata, utilizando un biótomo de 8 mm de diámetro (Acuderm, Lauderdale, FL, USA). Las heridas fueron identificadas de la siguiente forma:

1:Anterior izquierda
2:Anterior derecha
3:Posterior izquierda
4:Posterior derecha



Lasheridas se mantuvieron abiertas y fueron tratadas diariamente, una vez al día, con 0.5 mL delasustancia correspondiente a cada grupo.

Los tratamientos por herida fueron distribuidos aleatoriamente de forma tal que estuvieran presentes en las cuatro posiciones posibles. Cada grupo estuvo conformado por 9 ratas, lo cual se corresponde con 36 heridas para cada tratamiento. En cada grupo se emplearon 6 animales (24 heridas) para el estudio de los indicadores de la curación de las heridas y 3 animales (12 heridas) para la evaluación de los indicadores del balance redox, excepto el grupo del ácido ascórbico, donde solo se realizó el último estudio.

II.5.2.3.1 Determinación de los indicadores de la curación de las heridas

La curación de las heridas se evaluó mediante la medición del área de las heridas y el análisis macroscópico y microscópico de las mismas.

La medición del área (mm^2) de las heridas se realizó al séptimo día de realizadas las mismas, utilizando el Sistema de Procesamiento Digital de Imágenes MADIP 3.0 Lab Lapdis del Hospital Carlos J. Finlay. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital. Los datos de las áreas fueron automáticamente introducidos en una base de datos.

El análisis macroscópico de las heridas se realizó a los 11 días de tratamiento, considerando los siguientes aspectos:

- Características de la herida (seca o húmeda)
- Presencia de costra
- Presencia de exudado

- Presencia y severidad de inflamación
- Aspecto de los bordes de la herida (Presencia de coaptación de los bordes)

Para el análisis microscópico, se tomaron muestras de piel correspondientes a cada una de las heridas, a los 11 días de provocadas las mismas. Los fragmentos de piel de cada herida, fueron fijados en Formol neutro tamponado al 10 %. Posteriormente las muestras fueron procesadas con alcohol en grado descendente, seguido por xilol e incluidas en bloques de parafina. Dos cortes de cada muestra fueron teñidos con hematoxilina - eosina y procesados por la técnica histoquímica de Van Gienson descrita por Luna (1960) para la demostración de colágeno. Para la interpretación de los hallazgos histopatológicos y la comparación de la respuesta entre grupos se empleó la escala semicuantitativa para la evaluación histológica del nivel de curación de las heridas propuesta por Berlanga *et al*., (1997), la que establece tres grados de regeneración epitelial y maduración de la dermis por separado. Para la evaluación integral del proceso en cada uno de los grupos, se tomaron los valores promedios de presentación de cada uno de los grados para la epidermis y la dermis y se compararon entre sí.

II.5.2.3.2 Determinación de los indicadores del balance redox en las heridas

La escisión del tejido cicatricial se realizó con los animales previamente anestesiados en una cámara con éter dietílico a los 3, 7 y 14 días después de realizadas las heridas usando un biótomo, realizando el ponche exactamente sobre el nuevo tejido cicatricial formado. Estos ponches de piel, junto a los obtenidos el día de creación de las heridas, los cuales representan el día 0, fueron conservados a -80 °C hasta que se realizaron las determinaciones bioquímicas de los indicadores del balance redox.

II.5.2.3.2.1 Procesamiento de las muestras.

Todo el procesamiento de los tejidos se realizó sobre hielo. Éstos fueron pesados y cortados en pequeñas piezas. A continuación se preparó un homogenado al 10 % en solución amortiguadora KCl (0,15 M), conteniendo EDTA 5 mM, usando un homogenizador (potter) de forma manual, introduciéndolo y extrayéndolo durante 20 veces para cada muestra de la

herida. Del homogenado obtenido se tomó una alícuota para la estimación del GSH y el homogenado remanente se incubó con tritón X-100, a una concentración final de 0,1 % (v/v), a 4 °C durante 2,5 h. Transcurrida la incubación se centrifugó a 6000 $r \cdot min^{-1}$, durante 15 min a 4 °C, se desechó el precipitado y el sobrenadante se distribuyó en viales para la determinación del resto de los indicadores bioquímicos. Los homogenados destinados a la determinación de la actividad de la SOD y la concentración de GSH fueron deslipidados previo al desarrollo del ensayo correspondiente. Para la deslipidación, 100 µL de homogenado se mezclaron con 30 µL de cloroformo y 50 µL de metanol, la mezcla de reacción se agitó y se centrifugó a 6000 $r \cdot min^{-1}$ durante 15 min a 4 °C, se colectó el sobrenadante y se conservó a -20 °C hasta el momento del ensayo.

II.5.2.3.2.2 Ensayo de determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa

La actividad de la SOD se determinó usando el método que emplea pirogalol, el cual se auto-oxida en medio básico y genera en el medio de reacción O^{-}_{2}, de esta forma la reacción radicalaria se propaga y se acelera la auto-oxidación del pirogalol, cuya forma oxidada absorbe la luz a 420 nm. La presencia de un secuestrador de O^{-}_{2}, como la SOD, inhibe la auto-oxidación al evitar las reacciones de propagación. Por convenio se tomó 1 U de SOD como la cantidad de enzima que inhibió en un 50 % la reacción de auto-oxidación del pirogalol a 25 °C y pH = 8,2. Brevemente, en el ensayo se mezclaron en una cubeta de cuarzo los siguientes reactivos: 100 µL de homogenado deslipidado, 2,8 mL de solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM pH = 8,2, 50 µL de EDTA (concentración final, 1mM) y 50 µL de pirogalol (concentración final, 0,124 mM). Después de 10 s de reacción, se determinó la diferencia de densidad óptica durante 1 min a 420 nm. Para el ensayo blanco se sustituyeron los 100 µL de muestra por agua destilada. Los resultados se expresaron como actividad enzimática de la SOD ($U.mL^{-1}.min^{-1}$ / g de tejido) (Boehringer Mannheim, 1987).

II.5.2.3.2.3 Ensayo de determinación de la actividad de la enzima catalasa.

La actividad de la CAT se determinó usando la técnica que se fundamenta en el seguimiento de la densidad óptica a λ=240 nm, a la cual tiene lugar la descomposición del H_2O_2 por acción de la CAT. En el ensayo se mezclaron en una cubeta de cuarzo los siguientes reactivos: 900 µL de solución amortiguadora fosfato 50 mM pH = 7,0; 500 µL de H_2O_2 (50 mM) y 100 µL de homogenado. Después de 10 s de reacción se determinó la diferencia de densidad óptica durante 1 min a 240 nm. Para el ensayo blanco se sustituyeron los 100 µL de muestra por solución amortiguadora fosfato 50 mM pH = 7,0. Los resultados se expresaron como actividad enzimática de la CAT ($U \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}$ / g de tejido) (Boehringer Mannheim, 1987).

II.5.2.3.2.4 Ensayo de determinación de la concentración de glutatión reducido.

La concentración de GSH se determinó usando el método descrito por Sedlak y Lindsay (1968). En el ensayo se mezclaron en una cubeta de cuarzo los siguientes reactivos: 2 750 µL de solución amortiguadora fosfato 50 mM pH = 8,0, 200 µL de homogenado deslipidado y 50 µL de DTNB (50 mM). Después de agitar el contenido de la cubeta durante 15 s, se determinó la densidad óptica a 412 nm. Para el ensayo blanco se sustituyeron los 200 µL de muestra por solución amortiguadora fosfato 50 mM pH = 8,0. Se realizó una curva patrón con concentraciones conocidas de GSH. Los resultados se expresaron como concentración de GSH (µM / g de tejido).

II.5.2.3.2.5 Ensayo de determinación de la concentración de malonildialdehído

La concentración de MDA se determinó usando el método descrito por Esterbaver y Cheeseman (1990). En el ensayo se mezclaron en tubos de vidrio con tapa los siguientes reactivos: 650 µL de N-metil-2-fenil-indol (10,3 mM, preparada en acetonitrilo) diluída antes del inicio del ensayo en metanol, en una proporción 3:1 (v/v), 200 µL de homogenado y 150 µL de ácido clorhídrico (35 %). Posteriormente la mezcla de reacción se agitó y los tubos una vez tapados, se incubaron a 45°C durante 1h. Después de enfriar las muestras a temperatura ambiente, se centrifugó a 3000 $r \cdot min^{-1}$ durante 15 min y se leyó la densidad óptica a λ= 586 nm. Para el ensayo blanco se sustituyeron los 200 µL de muestra por agua destilada. Se realizó

una curva patrón empleando concentraciones conocidas del 1,1,3,3 tetrametoxipropano. Los resultados se expresaron como concentración de MDA (μM / g de tejido).

II.5.3 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se inició con la detección y eliminación de outliers. Los resultados de la medición de las heridas se procesaron por el Procedimiento del Modelo Lineal Generalizado del SAS, donde el efecto a evaluar fue el tratamiento y el área inicial se usó como covariable con vistas a eliminar la posible influencia del tamaño inicial en el resultado final. Las variables dependientes fueron los valores de las áreas en los diferentes grupos de tratamiento.

La fórmula empleada en el análisis fue la siguiente:

$$Y_{ijk} = A_{ijk} + AF_{ijk} + E$$

Donde: Y es el tratamiento
A es el área de la herida el día cero (covariable)
AF es el área de la herida el día 7
E es el error

Para el análisis del resto de los resultados se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS versión 4.1 para WINDOWS. Los datos de los estudios macroscópicos y microscópicos se procesaron realizando la comparación de las proporciones, usando un ANOM (análisis de medias), seguida por la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan. En el caso de los valores de los indicadores del balance redox se realizó un análisis no paramétrico utilizando la prueba de Mann-Whitney U.

En todos los casos se consideró como nivel de significación estadística ($p<0,05$).

II.5.4 Resultados.

II.5.4.1 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre indicadores del proceso de curación de heridas.

La figura 17 muestra que las preparaciones de extracto y fracción no mostraron diferencias significativas entre sí en los valores del área de las heridas y resultaron más eficaces en reducir la misma que el grupo control.

La tabla 4 muestra que las alteraciones macroscópicas de las heridas fueron presencia de costras secas y la no coaptación de los bordes en algunas de las mismas, sin otras alteraciones de interés. Hubo un solo animal en el que se observó, en tres de las cuatro heridas, no coaptación de los bordes (heridas abiertas), perteneciente al grupo tratado con el extracto. La frecuencia de presentación de estos cambios se expresa en la tabla 4, donde se aprecia que no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, demostrándose que no hubo influencia del tratamiento utilizado y que tampoco hubo una relación directa entre estos dos hallazgos macroscópicos, lo que es indicativo de que el desarrollo del proceso de cicatrización ocurrió de forma satisfactoria y bastante homogénea en todos los grupos analizados.

La tabla 5 muestra los cambios desde el punto de vista microscópico en las heridas, los cuales se caracterizaron por diferentes grados de epitelización de la epidermis con presencia ocasional de costras (coágulo seco) y formación de tejido de granulación en la dermis, con diferentes grados de invasión del espacio de la incisión por fibroblastos, neoformación de capilares y organización del colágeno, se observó infiltración eventual de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos. Por lo general, se observó correspondencia entre el grado de epitelización epidérmica y el grado de maduración de la dermis. Los elementos más significativos desde el punto de vista de la relación macroscópica y los hallazgos microscópicos se observaron en el grupo control, donde solo hubo 2 heridas abiertas (análisis macroscópico), y sin embargo, no hubo coaptación de los bordes de las mismas en 6 casos (análisis microscópico), lo que clasifica el proceso como grado 1, indicador de una fase de curación mas tardía, no obstante, no se apreciaron diferencias estadísticas entre los grupos. A

esta misma conclusión se arribó también, al analizar la frecuencia de aparición de casos ubicados en el grado 3 o fase final del proceso de curación de las heridas. Debe destacarse que existió un predominio de heridas ubicadas en esta fase final del desarrollo de este proceso en todos los grupos, cuyos indicadores representan un grado adecuado de epitelización y maduración de la dermis, lo que pudiera estar asociado al carácter aséptico de las heridas. Estos resultados indican que independientemente de las variantes utilizadas para el análisis del desarrollo del proceso de curación, todos los grupos lo completaron con similar eficiencia.

II.5.4.2 Efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria sobre indicadores del balance redox durante el proceso de curación de heridas asépticas en ratas.

Las figuras 18 A, B, C y D muestran respectivamente el efecto del extracto acuoso de *Rhizophora mangle L.* y su fracción polifenólica mayoritaria sobre la actividad de las enzimas SOD y CAT, así como sobre las concentraciones del GSH y el MDA, evaluados en diferentes momentos del proceso de curación de las heridas. Se aprecia a los 3 y 7 días de realizadas las heridas en todos los grupos de tratamiento, una disminución significativa ($p< 0,05$) en la actividad de las enzimas SOD y CAT y en las concentraciones de GSH y un incremento significativo ($p< 0,05$) en la concentración de MDA en el tejido cicatricial, en comparación con los valores obtenidos para estos indicadores en la piel normal (0 días). Es importante señalar, que en los grupos tratados con el extracto, su fracción y el ácido ascórbico, se observó que la actividad de las enzimas antioxidantes y las concentraciones de GSH estaban incrementados significativamente ($p< 0,05$), mientras la concentración de MDA se encontraba disminuída de manera significativa ($p< 0,05$), con respecto al grupo control, lo cual demuestra las propiedades antioxidantes del extracto y su fracción. No obstante, se observa una recuperación gradual de estos indicadores de manera total o parcial en el transcurso del tiempo en todos los grupos.

En la figura 18.A se aprecia que el tratamiento de las heridas con el extracto y su fracción resultó igualmente eficaz ($p< 0,05$) en aumentar la actividad de la SOD que cuando se empleó el ácido ascórbico, como antioxidante de referencia, a los 3, 7 y 14 días de realizadas las

heridas. A los 14 días de tratamiento, no se encontraron diferencias significativas en la actividad de la SOD en el tejido cicatricial, entre cada uno de estos grupos y el valor de este indicador en la piel intacta (día 0), lo cual indica una recuperación total de la actividad de esta enzima en estos tres grupos de tratamiento; en cambio, este efecto solo se logró de forma parcial en los animales del grupo control.

En la figura 18.B se aprecia que a los 3, 7 y 14 días de tratamiento de las heridas con el extracto, su fracción y el ácido ascórbico, no se encontraron diferencias significativas en los valores de la actividad enzimática de la CAT con el empleo de estas sustancias para un mismo intervalo de tiempo de tratamiento. A los 14 días de curadas las heridas con estas sustancias, solo se recuperó de forma parcial la actividad de esta enzima, detectándose diferencias significativas ($p< 0,05$) en los valores de esta variable con respecto a los obtenidos para la piel intacta (día 0); el mismo comportamiento se obtuvo para el grupo control, con la particularidad de que éste fue menos eficaz en aumentar la actividad de esta enzima que el resto de los grupos.

En la figura 18.C se aprecia que a los 3 días de tratamiento de las heridas, la fracción fue más eficaz ($p< 0,05$) en aumentar las concentraciones del GSH en el tejido cicatricial que el extracto y el ácido ascórbico. Transcurridos 7 días de curar las heridas con estas sustancias, se obtuvieron valores superiores ($p<0,05$) de esta variable con la fracción y el ácido ascórbico; no se observaron diferencias significativas para este indicador con el empleo del extracto y el ácido ascórbico. A los 14 días de provocadas las heridas, los grupos tratados con el extracto y su fracción mostraron una mayor elevación de las concentraciones de GSH en el tejido de granulación que el resto de los grupos ($p< 0,05$); no se observaron diferencias estadísticas para los valores de esta variable en los grupos tratados con la fracción y el ácido ascórbico. Al final del tratamiento, aún se mantienen las diferencias de manera significativa ($p< 0,05$) en las concentraciones de esta variable en la piel intacta (día 0) con respecto a las obtenidas para el resto de lo grupos, lo cual indica una recuperación parcial en las concentraciones de este indicador.

En la figura 18.D se aprecia que a los 3 días de tratamiento, el extracto, su fracción y el ácido ascórbico resultaron igualmente eficaces ($p< 0,05$) en reducir la concentración de MDA. En cambio, a los 7 y 14 días de realizadas las heridas, se observaron diferencias significativas ($p< 0,05$) en los valores para esta variable con el empleo de estos tratamientos. A los 14 días, sólo en las heridas del grupo tratado con el ácido ascórbico se obtuvieron valores de este indicador comparables a los registrados en la piel intacta.

La figura 19.A muestra que en el período evaluado del proceso de curación de heridas, la fracción fue la principal responsable de la actividad antioxidante del extracto, en virtud de su efecto sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT, las concentraciones de GSH y la concentración de MDA en el tejido de granulación. La contribución, en porciento, realizada por la fracción para los cuatro indicadores mencionados en ese orden fue de 76,7 a 96,4; 77,2 a 120,1; 75,7 a 142,3 y 69,0 a 104,0 respectivamente. La figura 19.B muestra que el aporte de la fracción fue igual para todos los ensayos.

II.5.5 Discusión

En el presente trabajo se obtuvo una disminución en las concentraciones de antioxidantes endógenos y un incremento de la POL en el tejido en reparación a los 3 y 7 días de realizadas las heridas en los cuatro grupos de tratamiento, en comparación con los valores de estos indicadores en la piel intacta ($p<0,05$), lo cual se corresponde con lo reportado por otros autores (Shukla *et al.*, 1997; Gupta *et al.*, 2002). Esta disminución fue mucho más marcada a los tres días después de realizadas las heridas, momento que se corresponde con la fase inflamatoria del proceso de curación de heridas, caracterizada por la infiltración de leucocitos PMN y macrófagos en el tejido lesionado, los cuales a la vez que fagocitan los fragmentos celulares y residuos de los tejidos dañados, producen una gran cantidad de ERO (Sen *et al.*, 2002), por tanto, las fuentes endógenas antioxidantes se consumen para neutralizar las nuevas ERO generadas, y de esta forma mantener el equilibrio redox celular. A su vez estas ERO oxidan a los lípidos presentes en el tejido nuevo formado, incrementando las concentraciones de MDA. Aunque se ha planteado que la producción exacerbada de ERO puede dañar el tejido naciente y entorpecer el proceso de curación (Sen, 2003); es importante destacar que la

presencia de ERO en pequeñas concentraciones en el área de la herida es beneficiosa, porque las ERO participan en la destrucción de microorganismos y de esta manera previenen la infección, fenómeno que puede entorpecer el proceso de curación (Holder *et al.*, 1997; Konturek *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha reportado que los oxidantes generados en pequeñas cantidades en el sitio de la herida, como el H_2O_2, actúan como mensajeros intracelulares para promover la curación (Sen *et al.*, 2002), en este sentido, en un estudio se informa que esta ERO a concentraciones micromolares induce la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en queratinocitos humanos, elemento esencial en el proceso de curación, estos investigadores encontraron la secuencia en el promotor del VEGF responsable de la respuesta a H_2O_2, es por ello que estos autores concluyeron que el proceso de curación de heridas está sujeto a control redox (Sen *et al.*, 2002a). El VEGF es un factor de crecimiento clave que regula el proceso de angiogénesis, el cual consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos, los cuales son de vital importancia, pues a través de ellos llega al tejido el oxígeno y los nutrientes necesarios para su reparación (Bates *et al.*, 2003).

En el presente trabajo se obtuvo que las concentraciones de antioxidantes endógenos en el tejido cicatricial de todos los grupos evaluados fueron incrementando en el tiempo, a la vez que se observó una disminución de la POL, lo cual indica una recuperación de las defensas antioxidantes endógenas a partir de los siete días de realizadas las heridas, las cuales alcanzaron valores cercanos a los fisiológicos, estos últimos representados por las concentraciones existentes en la piel intacta (día 0), a los 14 días de iniciado el proceso de curación; tal comportamiento ha sido reportado por otros autores (Shukla *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2002). Es importante destacar que el efecto registrado fue significativamente superior ($p< 0,05$) en los grupos donde se aplicó el extracto, su fracción mayoritaria y el ácido ascórbico, en comparación con los animales que no recibieron tratamiento, lo cual sugiere que el extracto y su fracción muestran propiedades antioxidantes, dado el hecho de incrementar la actividad de las enzimas antioxidantes, encargadas de la conversión de ERO en moléculas menos perjudiciales, aumentar las concentraciones de GSH, principal reservorio de grupos sulfidrilos y responsable de mantener el equilibrio redox celular, y proteger a los lípidos del daño oxidativo en el tejido naciente. Estas propiedades antioxidantes del extracto y su fracción en el

tejido cicatricial pueden explicar, al menos en parte, el efecto acelerador de la curación de heridas mostrado por ambas muestras.

El ácido ascórbico es considerado el más potente antioxidante de fase acuosa (McCord, 2000). Un estudio informó que la aplicación del palmitato de ascorbilo en piel de oreja porcina expuesta a radiaciones ultravioletas disminuyó la formación de radicales libres (Jurkovic *et al.*, 2003). El tratamiento con ácido ascórbico de heridas irradiadas se ha reportado que eleva las actividad de las enzimas antioxidantes y las concentraciones de GSH, a la vez que reduce la POL (Chandra, 2007). También se ha informado que el ácido ascórbico aumenta la síntesis de NO en el área de heridas irradiadas (Chandra, 2007). Además se conoce que el ácido ascórbico participa en la regeneración del α-tocoferol, el cual cumple un papel esencial en el mantenimiento de la integridad y estabilidad de las membranas biológicas al proteger los ácidos grasos poliinsaturados de la oxidación (McCord, 2000).

Los elevados porcentajes que aporta la fracción a la actividad antioxidante del extracto indican que los compuestos polifenólicos contenidos en la misma, son los principales responsables del incremento de las enzimas antioxidantes SOD y CAT y de las concentraciones de GSH, así como de la inhibición de la POL en el tejido cicatricial. En este sentido existen numerosos reportes en la literatura acerca de los efectos antioxidantes *in vivo*, relacionados con los indicadores mencionados anteriormente, por extractos de plantas que contienen polifenoles o por compuestos polifenólicos puros. Así, un estudio revela que heridas cutáneas en ratas albinas tratadas por vía tópica con el extracto acuoso de hojas de la planta *Seabuckthorn* (*Hippophae rhamnoides L.*) mostraron a los 7 días de tratamiento un incremento significativo con respecto al control, en la concentración de GSH y vitamina C, así como en las actividades de las enzimas SOD, CAT y GPx, mientras las concentraciones de MDA estaban disminuídos; a su vez también encontraron que este extracto aumentó significativamente el proceso de curación, evidenciado por el aumento de hidroxiprolina, hexosamina y proteínas y la reducción del área de la herida; estos investigadores sugieren que el efecto de este extracto de promover la curación puede ser debido a un incremento en los niveles de antioxidantes en el tejido de granulación (Gupta *et al.*, 2005). Efectos similares en cuanto a la actividad cicatrizante, el incremento del nivel de antioxidantes, representados por el GSH, la vitamina C

y la actividad de la enzima CAT y la disminución de la oxidación de los lípidos fueron obtenidos por el empleo de la flavona de la planta *Seabuckthorn* (*Hippophae rhamnoides L.*) en el tratamiento de heridas cutáneas provocadas en ratas (Gupta *et al.*, 2006). En otro estudio se informa que el tratamiento tópico de un extracto de polifenoles del té verde en la piel de ratones expuestos a radiación ultravioleta resultó en una significativa prevención de la disminución de las enzimas antioxidantes: GPx y CAT y de los niveles de GSH, igualmente inhibió la POL y la oxidación de proteínas (Vayalil *et al.*, 2003). Otros trabajos reportan estos efectos antioxidantes de los polifenoles en tejidos diferentes al epitelial, en este sentido las catequinas incrementaron la actividad enzimática de la SOD y aumentaron la expresión del RNAm de esta proteína en un cultivo de astrocitos de cerebro de rata (Chan *et al.*, 2002). Huang *et al.*, (2006) informaron que en el tratamiento con catequinas de células de microglia murina, expuestas a estrés oxidativo, incrementó el nivel de las enzimas antioxidantes CAT y SOD. El Resveratrol incrementó de forma dependiente de la dosis las actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT en el tejido cerebral de ratas sanas (Mokni *et al.*, 2007). Un extracto de polifenoles de la manzana se reportó que protege a las células epiteliales de la mucosa gástrica de ratas de la POL (Graziani *et al.*, 2005). En otra investigación, empleando un extracto de polifenoles de esta misma fruta, se informó que el mismo protege a los lípidos de la oxidación *in vivo* por disminuir el consumo de vitamina E y de las enzimas antioxidantes (Akazome *et al.*, 2004). Mateos *et al.*, (2005) encontraron una disminución en las concentraciones de MDA en tejido hepático de ratas alimentadas con dietas que contienen polifenoles procedentes de fresa, cocoa y ciruela. Investigaciones realizadas por Moskaug *et al.*, (2005) revelaron que los compuestos polifenólicos incrementaron la expresión del gen de la enzima glutamilcisteína sintetasa en células HepG2 tratadas con quercetina, e *in vivo* en tejido muscular de ratones alimentados con cerezas, en este último caso también detectaron un aumento en la concentración de glutatión; esta enzima participa en la síntesis del glutatión y es además la que limita la velocidad de este proceso (Lu, 1998).

Resultados similares a los obtenidos en la presente tesis con el empleo del extracto de *R. mangle* y su fracción, se han encontrado utilizando otros compuestos con efecto antioxidante en modelos de curación de heridas, así un estudio que revela la comparación del efecto de la suplementación de ratas diabéticas con dos preparaciones de vitamina E sobre la curación y la

actividad de enzimas antioxidantes y MDA en heridas dérmicas, reveló que el extracto de vitamina E procedente de palma tuvo mayor potencia en aumentar la reparación de las heridas y la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx en el tejido cicatricial que el α- tocoferol; a su vez ambos redujeron significativamente la POL en el área de las heridas comparado con el grupo control (Musalmah *et al.*, 2005). En otro trabajo se informa que la aplicación de Asiaticoside en heridas cutáneas de ratas, un compuesto derivado de la planta *Centella asiatica*, el cual previamente mostró actividad cicatrizante, incrementó el nivel de los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, correspondientes a SOD, CAT, GPx, vitamina E y ácido ascórbico, a su vez disminuyó las concentraciones de los peróxidos lipídicos, a los 7 días de tratamiento; la aplicación continuada hasta 14 días no mostró diferencias significativas comparado con los valores obtenidos para estos indicadores en el tejido de la herida tratado con vehículo (Shukla *et al.*, 1999).

En el presente trabajo los efectos del extracto y su fracción encontrados para las enzimas SOD y CAT pueden estar asociado a un incremento de la expresión o a un aumento en la actividad de estas enzimas, lo cual ha sido sugerido por Shukla *et al.*, (1999) y Gupta *et al.*, (2005), por otra parte, las propiedades secuestradoras de $O^{\bullet-}{}_2$previamente demostradas, contribuyen a que se consuma menos la SOD, enzima encargada de la conversión de esta ERO en una molécula menos dañina, el H_2O_2 (McCord, 2000) y como consecuencia, la CAT, enzima encargada de la eliminación del H_2O_2, convirtiéndolo en H_2O y O_2 (McCord, 2000). A su vez las propiedades quelantes de iones de hierro y protectoras sobre el daño oxidativo de los lípidos que mostraron ambas muestras en los experimentos anteriores pueden explicar su eficacia en disminuir las concentraciones de MDA *in vivo*.

II.5.6 Conclusión.

Se demostró que el extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. modificó el balance redox durante el proceso de curación de las heridas, expresado por una disminución en la concentración de MDA y un incremento en las concentraciones de GSH y las enzimas antioxidantes SOD y CAT. La fracción polifenólica mayoritaria constituyó el principal determinante de dichos efectos.

II.6. DISCUSIÓN GENERAL

La estrategia investigativa desarrollada en la presente tesis para realizar la caracterización antioxidante del extracto acuoso de *R. mangle* y su fracción polifenólica mayoritaria, consideró un conjunto de experimentos de carácter escalonado e interdependientes configurados por estudios *in vitro* e *in vivo*. Se partió de modelos de baja complejidad funcional, cuyos resultados condicionaron la introducción de sistemas más complicados hasta llegar a aplicar los modelos experimentales *in vivo*. Este esquema general de ensayos se realizó de acuerdo a lo sugerido por Martínez (2000).

Entre los aspectos que comprende la eficacia de un antioxidante se encuentran su potencial de reducción y la cinética de eliminación de los diversos radicales libres con los cuales reacciona. Jovanovic y Simic, (2000) determinaron que los potenciales de reducción de galocatequinas y flavonoides estaban en el inytervalo de 0,33 v (quercetina) y 0,75 v (Kaempferol) y las constantes de velocidad de reacción de 15 flavonoides con el O^{-}_{2}estaban en el intervalo de 10^{5} a 10^{7} $M^{-1}\cdot s^{-1}$. Además la constante de velocidad de reacción de los compuestos polifenólicos con el OH, se encuentra en el orden de 10^{9} a 10^{10} $M^{-1}s^{-1}$, según lo reportado por Scott *et al.*, (1993). Teniendo en cuenta estos conocimientos podemos afirmar que las propiedades secuestradoras de radicales DPPH, OH y O^{-}_{2} demostradas en la presente tesis para el extracto de *R. mangle* y su fracción pueden ser explicadas por los bajos potenciales de reducción de los compuestos polifenólicos contenidos en los mismos, lo cual indica que se requiere menos energía para donar un electrón o un átomo de hidrógeno, y los elevados valores de las constantes de velocidad de reacción de este tipo de compuesto con dichas ERO.

Las propiedades secuestradoras de radicales libres del extracto y su fracción, así como su actividad quelante de iones de hierro, demostradas en el estudio de la actividad antioxidante a nivel de reacciones químicas, sustentan sus efectos protectores sobre las principales biomoléculas expuestas a daño oxidativo. Pues la elevada reactividad del extracto y su fracción frente a las ERO, en virtud de las propiedades químicas de los compuestos polifenólicos contenidos en los mismos, (previamente señaladas; Scott *et al.*, 1993; Jovanovic y Simic, 2000) hacen más probable la reacción de las ERO con los constituyentes

polifenólicos, que con los grupos dianas de las biomoléculas estudiadas. Por otra parte, se conoce que los iones de hierro participan en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, las cuales dan lugar al $^{\bullet}OH$ (Goldstein, 1993), el cual tiene la capacidad de reaccionar con casi todas las biomoléculas (McCord, 2000). En el presente estudio es éste radical el responsable de la oxidación de los grupos –SH de la ASB y de la degradación oxidativa del ADN según el mecanismo propuesto por Giloni *et al.,* (1981) para explicar el daño oxidativo a esta biomolécula trabajando con el sistema Bleomicina / Fe^{3+}. Además, se informó que los iones de hierro pueden iniciar directamente la oxidación de los lípidos (Fontecave y Pierre, 1993).

El extracto y su fracción inhibieron la POL a todos los niveles de los sistemas de ensayos estudiados, dígase el de biomoléculas empleando un homogenado de cerebro de rata expuesto a Fe^{3+}/ascorbato, como durante la hemólisis inducida por AAPH, en la cual, aunque no se midió un biomarcador indicativo de la oxidación de los lípidos, según los reportes de la literatura, se sugiere que la lisis de la membrana eritrocitaria en presencia de un agente iniciador de la formación de radicales libres como es el AAPH se debe a la oxidación de los lípidos y proteínas constituyentes de dicha estructura celular (Kaviarasan *et al.*, 2004). En el estudio *in vivo* también se evidenció este efecto inhibitorio de la POL producido por ambas formulaciones y revelado por la disminución de las concentraciones de MDA en el tejido cicatricial. Paralelo a la explicación sugerida previamente con relación al efecto protector del extracto y su fracción sobre la oxidación de los lípidos, otro enfoque puede derivarse de la propiedad que tienen los compuestos polifenólicos de atrapar los radicales lipídicos y mantener las reservas del α-tocoferol, el principal antioxidante protector de los lípidos (McCord, 2000). Así, Salah *et al.* (1995) y Rice-Evans (1995) plantearon que los polifenoles inhiben la POL por interrumpir las reacciones de propagación en cadena de formación de nuevos radicales lipídicos, que tienen lugar durante este proceso. Años más tarde, se informó que la acción antioxidante de los polifenoles presentes en el té verde se debe al atrapamiento de los radicales peroxilo y alquilo en las fases de iniciación y propagación de la POL (Liu *et al.,* 1999; Sano *et al.,* 2003; Fujisawa y Kadoma, 2006) debido a que los polifenoles tienen menor potencial de reducción que los alquilperoxilo e hidroperoxilo resultantes de la oxidación de los lípidos (Yang *et al.,* 2001). Otro reporte sugiere que los polifenoles de la cocoa pueden ejercer un efecto protector sobre la hemólisis por disminuir el consumo,

mantener o regenerar el α-tocoferol y otros antioxidantes, al donar un átomo de hidrógeno a los radicales α-tocoferilos, lo cual también se informó previamente para las catequinas del té verde (Zhu *et al.*, 1999a).

Los resultados del efecto del extracto y su fracción sobre la producción de ERO a nivel celular, empleando una linea celular de macrófagos, mostraron un efecto antioxidante de ambas formulaciones frente al $O^{\bullet-}_2$, mientras que se obtuvieron resultados contradictorios con relación al $NO^{\bullet}$. No obstante, ambos efectos a este nivel de complejidad no pueden explicarse únicamente por la interacción directa de los polifenoles con estas ERO, porque esto sería un análisis simplificado de este complicado fenómeno, teniendo en cuenta que en los últimos años se señaló que los compuestos polifenólicos regulan el nivel de las ERO mediante su interacción con enzimas y moléculas que participan en los mecanismos de señalización intracelular que dan lugar a la formación de dichas ERO. En este sentido la literatura refiere que estos compuestos inhiben oxidasas, tales como la lipooxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO); evitando la generación de ERO, así como de hidroperóxidos orgánicos. Por otra parte, se conoce que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2 (FLA2), la cual está involucrada en la generación de ERO a través de la cascada del ácido araquidónico (Pérez *et al.,* 2003). Además se comprobó que los polifenoles pueden inhibir la activación de factores de transcripción sensibles al estado redox intracelular, como el factor nuclear kB (NF-kB) y la proteína activadora 1 (AP-1) (Pérez *et al.,* 2003). También se demostró que estos compuestos pueden inhibir proteínas quinasas en complejas vías de señalización (Chen *et al.*, 1999; Anter *et al*., 2004; Jin-Wen *et al*., 2004).

Los ensayos de evaluación del efecto del extracto y su fracción sobre la producción de $O^{\bullet-}_2$ demostraron las propiedades antioxidantes que ambas formulaciones poseían tanto a nivel de reacciones químicas empleando el sistema xantina/xantina oxidasa, como de células, en una linea celular de macrófagos murinos. Aunque a nivel de organismo, no se midió directamente la acción de estas preparaciones sobre esta ERO, el incremento significativo producido en la actividad de la enzima SOD a los 3 y 7 días de tratamiento de las heridas con el extracto y su

fracción, alcanzando a los 14 días de tratamiento valores que no difieren estadísticamente de los fisiológicos, puede ser debido, al menos en parte, a una disminución en el consumo de esta enzima por la presencia de compuestos polifenólicos, ya que en el grupo control la eliminación del $O^{\bullet-}_2$solo puede ocurrir a expensas de la dismutación de esta ERO en H_2O_2 por acción de la SOD (McCord, 2000), en cambio, en presencia del extracto o su fracción, una parte de las especies radicalarias pueden ser eliminadas por su reacción con los compuestos polifenólicos contenidos en estos, teniendo en cuenta las propiedades secuestradoras de $O^{\bullet-}_2$ demostradas para ambos en los estudios a nivel de reacciones químicas, lo cual coincide con lo reportado en otras plantas que contienen polifenoles (Nakagawa y Yokozawa, 2002; Senevirathne *et al.*, 2006). Así, este tipo de constituyente puede prevenir el agotamiento de esta enzima antioxidante.

Los estudios a nivel de organismo también revelaron las propiedades antioxidantes del extracto y su fracción. A los 14 días de tratamiento de las heridas con ambas preparaciones la actividad de la enzima SOD alcanzaron valores que no difirieron estadísticamente de los fisiológicos y de esta forma se garantizó la conversión del $O^{\bullet-}_2$en H_2O_2 mediante la acción de esta enzima (McCord, 2000). Aunque la actividad de la CAT no alcanzaron los valores normales al final del tratamiento, es posible que la descomposición del H_2O_2 en H_2O y O_2 pueda lograrse al inicio por la acción de esta enzima y después por la participación de la enzima GPx, teniendo en cuenta que en concentraciones relativamente bajas de esta ERO, la GPx tiene mayor afinidad por el H_2O_2 que la CAT, según lo reportado por McCord (2000), además las concentraciones de GSH también resultaron elevadas significativamente durante la curación de las heridas con el extracto y su fracción y es conocido que esta sustancia es un cofactor de la enzima GPx (McCord, 2000). A su vez, la eliminación en el sitio de la herida del $O^{\bullet-}$ y el HOevita también la generación del $^{\bullet}_{222}OH$ por la reacción de Haber-Weiss (Goldstein, 1993), no obstante, la pequeña cantidad que pudiera producirse puede ser neutralizada por las preparaciones evaluadas en la presente tesis a partir de las propiedades de atrapamiento de ERO que mostraron en los estudios del efecto antioxidante a nivel de reacciones químicas, esto unido al incremento de las concentraciones de GSH, incidió en la

disminución de las cojncentraciones de MDA en el tejido de granulación de la herida en los grupos tratados con ambas formulaciones.

Los elevados porcentajes que la fracción polifenólica mayoritaria aportó a la actividad antioxidante del extracto en los diferentes ensayos, indica que esta es la principal responsable de los efectos mostrados por el extracto. Existen varias características estructurales que se han relacionado con la actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos vinculada a sus efectos secuestradores de radicales libres: el número y la posición de los grupos hidroxilo sobre el anillo B, planteándose que un mayor número de grupos hidroxilo y la posición orto de los mismos, principalmente en los carbonos 3´ y 4´ para formar la estructura catecol o en los carbonos 3´, 4´ y 5´ para formar un grupo galato, favorecen la actividad antioxidante (Nanjo *et al.*, 1996; Nakagawa y Yokozawa, 2002; Verstraeten *et al.*, 2003); así como un grupo galato esterificado en la posición 3 del anillo C y grupos hidroxilo en las posiciones 5 y 7 del anillo A (Frei y Higdon, 2003), ya que la especie radicalaria resultante después de su reacción con las ERO es más estable por existir una mayor deslocalización electrónica (Figura 20). Por otra parte, se han reportado diferencias en cuanto a las características estructurales de estos compuestos que favorecen su actividad antioxidante de acuerdo al ambiente que le sirve de escenario (lipídico u acuoso), así mientras la polimerización disminuyó la actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos en la fase lipídica, en la fase acuosa esta actividad aumentó del monómero al trímero y entonces decreció del trímero al tetrámero. Además se indicó que la presencia de sustituyentes como el grupo galoil, el cual es un anillo bencénico con tres grupos hidroxilos sustituidos en posición orto, potencian la actividad antioxidante del compuesto polifenólico en un ambiente acuoso, mientras la disminuyen en uno lipídico. En cuanto a la glicosilación, se ha comprobado que decrece este efecto en ambas fases (Plumb *et al.,* 1998). También se plantea que las catequinas tipo cis tienen una mayor afinidad por las bicapas lipídicas que las catequinas tipo trans y logran insertarse en la membrana en mayor proporción que estas últimas, lo cual indica que las catequinas tipo cis son más eficaces en proteger a las membranas del daño oxidativo (Kajiya *et al.,* 2001). Las ideas planteadas anteriormente brindan posibles explicaciones a la menor actividad antioxidante que aportó la fracción al extracto en un ambiente lipídico en comparación a la obtenida en un ambiente acuoso, lo cual se evidenció en los ensayos de evaluación de la POL

en un homogenado de cerebro de rata inducida por Fe^{3+}/ascorbato, en la hemólisis inducida por AAPH y en la determinación de la concentración de MDA en el tejido de granulación durante el proceso de curación de heridas. Teniendo en cuenta estos elementos la fracción polifenólica mayoritaria de *R. mangle* pudiera contener una proporción importante de catequinas tipo trans, así como de polifenoles galoilados y glicosilados, lo cual unido a la presencia de compuestos poliméricos contribuyen a obtener una disminución en la actividad antioxidante en un ambiente lipídico. Estos son razonamientos que precisan de una ulterior confirmación.

En los ensayos de secuestro de radicales DPPH y $^{\bullet}OH$, de exposición del ADN al sistema bleomicina / Fe^{3+} y los desarrollados en un ambiente lipídico, en determinadas concentraciones de taninos, se obtuvo que el extracto resultó ser un antioxidante más potente que su fracción, lo cual pudiera estar asociado a la presencia en éste de otros componentes polifenólicos monoméricos, tales como: ácido gálico (Ohashi *et al.*, 2005; Terasawa and Yamazaki, 2002; Cheol *et al.,* 2005), ácido elágico (Osawa *et al.,* 1987; Singh *et al.*, 1999; Hoon *et al.*, 2006) y ácido clorogénico (Ohnishi *et al.*, 1994; Kono *et al.,* 1998; Zang *et al.*, 2003), de los cuales la literatura refiere efectos antioxidantes; por otro lado, para constituyentes del extracto de naturaleza no polifenólica, también se han reportado propiedades antioxidantes, son los casos de los fitoesteroles (Yasukazu y Etsuo, 2003; Yokota *et al.,* 2006) y los aceites esenciales (Vardar-Unlu et al., 2003; Candan et al., 2003; Mimica- Dukic *et al.,* 2004; Chericoni *et al.,* 2005; Pérez *et al.*, 2006; Su-Ying *et al.*, 2007). Así, el efecto aditivo o sinérgico resultante de la interacción de estos componentes con los polifenoles que contituyen la fracción evaluada, puede ser la razón del incremento de la actividad antioxidante del extracto.

En la presente tesis se encontró que el efecto antioxidante del extracto y su fracción fue dependiente de la concentración de taninos. Varios estudios empleando cocoa, té y diferentes tipos de vinos, los cuales contienen compuestos polifenólicos, han revelado efectos semejantes (De Beer *et al.,* 2003; Lee *et al.,* 2003a; Sanchez-Moreno *et al.,* 2003).

En la presente tesis se demuestran por primera vez, las propiedades antioxidantes que tienen las preparaciones elaboradas a partir del extracto acuoso de *R mangle*, resultados que brindan fundamentos farmacológicos a los medicamentos desarrollados en el CENSA que hoy se utilizan en medicina veterinaria como son el UDERTAN® y el CIKRON-V®, cuyas formas farmacéuticas tienen como base el extracto mencionado. El aporte cognoscitivo logrado también sienta pauta para recomendar nuevas indicaciones hacia aquellas afecciones biomédicas que tienen como asiento alteraciones del mecanismo REDOX. Es conocido que tal desbalance está presente en los procesos inflamatorios, y que en la práctica veterinaria es común enfrentarse a entidades tales como la onfalitis, endometritis, mastitis y dermatitis, entre otras.

Así, la aparición de las mastitis se ha relacionado con la merma de los sistemas antioxidantes, como son la vitamina E y la producción de las enzimas SOD, GPx y CAT, indicándose que la suplementación vitamínico-mineral ha demostrado prevenir a la hembra de esta dolencia (Castillo *et al.,* 2001). Por tanto, es posible que la eficacia mostrada por UDERTAN® en la prevención de la mastitis bovina (Armenteros, 1998) sea debido, al menos en parte, a las propiedades que tienen los compuestos polifenólicos contenidos en este producto de aumentar las defensas antioxidantes en la glándula mamaria.

La acción antimicrobiana de *R. mangle* fue comprobada tanto a nivel *in vitro* (Melchor *et al.*, 2001; Montes de Oca *et al.,* 2001), como *in vivo*. Esto último verificado a través del efecto antiséptico demostrado por el producto CIKRON-V®, en diversos procesos tales como curación de heridas (Melchor *et al.,* 2001a), prevención de las infecciones umbilicales en perros, ovinos (Solano *et al*., 2000) y en terneros neonatos (Gutiérrez *et al*., 2001); así como en el tratamiento de la sarna y la tiña del conejo (Melchor *et al*., 2004). Dicha acción puede ser explicada, al menos en parte, por los efectos demostrados en el presente trabajo para este extracto relacionados con sus propiedades de aumentar la producción de $NO^{\bullet}$ y quelar los iones de hierro. El $NO^{\bullet}$ se demostró que cumple importantes funciones, entre las que se encuentran, la destrucción de patógenos (Moncada *et al.,* 1991). Por otra parte, se conoce que el hierro, es un nutriente esencial para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos

patogénicos. En presencia de compuestos polifenólicos, los iones de hierro forman complejos, por lo que se produce una restricción en la disponibilidad del hierro libre para el microorganismo, este fenómeno es denominado inmunidad nutricional y juega un papel clave en la estrategia de defensa no específica contra patógenos potenciales (Haslam, 1996).

La propiedad de acelerar la curación de las heridas del extracto de *R. mangle* (Bulnes *et al.*, 2001) y su formulación farmacéutica, CIKRON-V® (Fernández *et al.*, 2002) también pueden tener cierta explicación en su efecto antioxidante revelado en la presente tesis, relacionado con un incremento de las concentraciones de antioxidantes endógenos y una disminución de la POL en el sitio de la herida, ya que varios trabajos sugieren que los compuestos polifenólicos (Gupta *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2006) y no polifenólicos, pero con actividad antioxidante (Shukla *et al.*, 1999; Musalmah *et al.*, 2005) contribuyen al desarrollo exitoso del proceso de curación de heridas. El efecto del extracto de *R. mangle* de aumentar la producción de $NO^{\bullet}$ también es otro posible mecanismo que contribuye al proceso de curación, dado que se demostró que la iNOS es sintetizada por células inflamatorias en la fase temprana de la curación de heridas, principalmente por macrófagos, aunque muchas células participan en la síntesis de $NO^{\bullet}$ durante la fase proliferativa después de originada la herida. Se plantea que el $NO^{\bullet}$ liberado a través de la iNOS, regula la formación de colágeno, la proliferación celular y la contracción de la herida, en modelos animales de curación de heridas, no obstante, el mecanismo exacto de acción del $NO^{\bullet}$ sobre los parámetros de curación de la herida son aún desconocidos (Witte y Barbul, 2002). Estudios realizados por otros autores también revelaron que el $NO^{\bullet}$ derivado de iNOS es de vital importancia para la reparación de las heridas, se comprobó que esta especie radicalaria está estrechamente vinculada con la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la angiogénesis, pues el $NO^{\bullet}$ derivado de iNOS incrementa la expresión del VEGF durante la curación de heridas cutáneas (Frank *et al.*, 1999), además se conoce que fibroblastos procedentes de ratones, a los que se les ha inactivado el gen de la iNOS, mostraron menor velocidad de proliferación y una disminución en la síntesis de colágeno (Shi *et al.*, 2001), en concordancia con estos resultados, otro estudio informa que la inhibición de la iNOS redujo significativamente la síntesis de colágeno por los fibroblastos en la herida (Schaffer *et al.*, 1997). También se informó que la iNOS juega un

papel anti-fibrótico, así la inducción de iNOS puede ser uno de los mecanismos protectivos contra la fibrosis y el desarrollo anormal del proceso de curación (Ferrini *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta los aspectos abordados previamente acerca del papel fisiológico del $NO^{\bullet}$ durante el proceso de la curación de heridas, unido a otros de sus bioefectos, como vasodilatación, neurotransmisión y transducción de señales (Moncada *et al.*, 1991) permite deducir que la propiedad del extracto de aumentar los niveles de $NO^{\bullet}$ en concentraciones moderadas no resulta perjudicial, sino por el contrario beneficiosa, si se considera que además este extracto disminuye los niveles de producción de $O^{\bullet-}_2$, lo cual evita la producción de la ERO fuertemente oxidante, $ONOO^-$, que se produce a partir de la reacción del $NO^{\bullet}$ y el $O^{\bullet-}_2$ (McCord, 2000).

Los resultados de la presente tesis brindan argumentos fundamentados que sirven de apoyo al valor terapéutico de las formulaciones elaboradas a partir del extracto acuoso de *R. mangle*, al combinarse en un mismo producto varias propiedades farmacológicas, tales como la antiséptica, acelerar la reparación de las heridas y ahora añadida, la propiedad antioxidante e incrementadora del $NO^{\bullet}$. A su vez, se abren nuevas perspectivas para el empleo de esta planta en el tratamiento de numerosas enfermedades veterinarias y humanas, en las que se conoce que existe un desbalance redox.

II.7 CONCLUSIÓN GENERAL

Se demostró que el extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. posee propiedades antioxidantes en todos los niveles de complejidad evaluados y que la fracción polifenólica mayoritaria es el principal determinante de las mismas.

II.8 RECOMENDACIONES

Realizar estudios a nivel molecular, con énfasis sobre los mecanismos de señalización intracelular, que permitan profundizar en el conocimiento de las propiedades antioxidantes del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su fracción polifenólica mayoritaria.

Evaluar la factibilidad de desarrollar una formulación farmacéutica a partir de la fracción polifenólica mayoritaria.

Desarrollar formulaciones a base de *Rhizophora mangle* L para nuevas afecciones, en cuyos componentes fisiopatológicos, esté presente el estrés oxidativo.

II.9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Agüero F. Evaluación de *Rhizophora mangle* L en el tratamiento de infecciones uterinas en bovinos. Tesis de Maestría en Reproducción. CENSA. 1998.

Agüero F. Evaluación de un producto natural, a base de *Rhizophora mangle* L. en la terapia de la endometritis bovina. [Tesis doctoral] La Habana: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Universidad Agraria de La Habana. 2004.

Akazome Y. Characteristics and physiological functions of polyphenols from apples. *Biofactors.* 2004, 22(1-4): 311-314.

Akerele, O. The best of Both World: Bringing Traditional Medicine up to date. *Soc. Sci. Med.* 1987, 24(2): 137- 141.

Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono T and Iwatsuki K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2001, 48: 487-491

Alasalvar C, Karamac M, Amarowicz R, Shahidi F. Antioxidant and antiradical activities in extracts of hazelnut kernel (Corylus avellana L.) and hazelnut green leafy cover. J Agric Food Chem. 2006, 54(13): 4826-32.

Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact*. 1998, 24(111-112): 1-14.

Anter E, Thomas SR, Schulz E, Shapira OM, Vita JA, Keaney JF. Activation of Endothelial Nitric-oxide Synthase by the p38 MAPK in Response to Black Tea Polyphenols *J. Biol. Chem.* 2004, 279(45): 46637-46643.

Arantes RM, Lourenssen S, Machado CR, Blennerhassett MG. Early damage of sympathetic neurons after co-culture with macrophages: a model of neuronal injury in vitro. *Neuroreport.* 2000, 11(1): 177-181.

Armenteros M. Evaluación de un desinfectante mamario post-ordeño de origen natural. [Tesis doctoral] La Habana: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Universidad Agraria de La Habana, 1998.

Aruoma OI. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Rad. Biol. Med.* 1996, 20: 675-705.

Aruoma OI. Deoxyribosa assay for detecting hydroxyl radicals. *Meth. Enzimol.* 1994a, 233: 57-66.

Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Fd. Chem. Toxic.* 1994, 32: 671-683.

Aruoma OI. Use of DNA damage as a measure of pro-oxidant actions of antioxidant food additives and nutrient components. In DNA and Free radicals, ed. by B. Halliwell and 0. I Aruoma, Ellis Horwood, London. 1993: 315-327.

Aucamp J, Gaspar A, Hara Y, Apostolides Z. Inhibition of xanthine oxidase by catechins from tea (Camellia sinensis). *Anticancer-Res*. 1997, 17(6D): 4381-4385.

Bates DO. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*. 2003, 2(2): 107-120.

Bate-Smith EC, Swain T. In Comparative Biochemistry. 3ra ed. New York: Ed. Academic Press. 1962: 764.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87: 1 620-1 624.

Benzie IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. Int. J. *Food Sci. Nutr.* 1996, 47: 233–261.

Berlanga J, Lodos J, Labarta V, Merino N, Gonzalez T, Hayes O, Puentes P, Mulet J and Lopez-Saura P. The effect of the Epidermal Growth Factor treatment schedule on the healing of full-thickness wounds in pigs. *Biotecnologia Aplicada* 1997, 14(3): 163-168.

Blanco-Rivero J, Sagredo A, Balfagon G, Ferrer M.Protein kinase C activation increases endothelial nitric oxide release in mesenteric arteries from orchidectomized rats. *J Endocrinol* . 2007, 192(1): 189-97.

Boehringer Mannheim. Biochemical information. A revised biochemical reference sources. Enzymes for routine. First Edition. Boehringer Mannheim, Germany. 1987: 80-81.

Bouhamidi R, Prevost V, Nouvelot A. High protection by grape seed proanthocyanidins (GSPC) of polyunsaturated fatty acids against UV-C induced peroxidation. *C R Acad Sci III.* 1998, 321(1): 31-38.

Box HC, Dawidzik JB, Budzinski EE. Free radical-induced double lesions in DNA. *Free Radic Biol Med*. 2001, 31(7): 856-868.

Brent JA, Rumack BH. Role of free radicals in toxic hepatic injury I. Free Radical Biochemistry. *Clin. Toxicol.* 1993, 31(1): 139-171.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978, 30: 301-310.

Bulnes C, Fernández O, Navarro D, Marrero E, Rueda D, Figueroa O, *et al*. Healing effect of a red mangrove extract in open aseptic wounds in rat. *Rev. Salud Anim.* 2001, 23(2): 102-108.

Burits M and Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytother Res. 2000, 14(5): 323-8.

Burits M, Asres K and Bucar F. The Antioxidant Activity of the Essential Oils of Artemisia afra, Artemisia abyssinica and Juniperus procera. Phytother. Res. 2001, 15: 103–108.

Cáceres A, López B, Juárez X, del Aguila J, García S. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections 2: Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *J Ethnopharm.* 1993, 40: 207-213.

Camba Capaz A. Cirugía y Veterinaria: Editora Combinado poligráfico "Osvaldo Sánchez" 1979: 6-7.

Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of Achillea millefolium subsp. millefolium Afan. (Asteraceae). *J Ethnopharmacol*. 2003, 87(2-3): 215-220.

Carini M, Aldini G, Bombardelli E, Morazzoni P, Maffei Facino R. UVB-induced hemolysis of rat erythrocytes: protective effect of procyanidins from grape seeds. *Life Sci.* 2000, 67(15): 1799-1814.

Carter DC and Ho JX. Structure of Serum Albumin. Adv. Protein Chem. 1994, 45: 153-203.

Castillo C, Benedito JL, López M, Miranda M, Hernández J. Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. Arch. med. vet. 2001, 33(1).

Cathcart MK. Regulation of Superoxide Anion Production by NADPH Oxidase in Monocytes/Macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2004, 24: 23.

Chakrabarti S, Makrigiorgos GM, O'Brien K, Bump E, Kassis AI. Measurement of hydroxyl radicals catalyzed in the immediate vicinity of DNA by metal-bleomycin complexes. *Free Radic Biol Med.* 1996, 20(6): 777-783.

Chan M, Mattiacci J, Hwang H, Shah A, Fong D. Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochem. pharmacol*. 2000, 60(10): 1539-1548.

Chan P, Cheng JT, Tsai JC, Lien GS, Chen FC, Kao PF, et al. Effect of catechin on the activity and gene expression of superoxide dismutase in cultured rat brain astrocytes. *Neurosci Lett.* 2002, 328(3): 281-284.

Chandra G. Wound Healing by Ascorbic Acid in Mice. http://doctor.medscape.com/ viewarticle/464469 5, (2007).

Chen H, Tappel A L. Protection of Vit. E, Se, trolox C, Vit. C, Againt Oxidative Damage to Rat Blood and Tissue *in vivo*. *Free Radic Biol. Med.* 1995, 18**:** 949-953.

Chen YC, Liang YC, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Inhibition of TPA-induced protein kinase C and transcription activator protein-1 binding activities by theaflavin-3,3'-digallate from black tea in NIH3T3 cells. *J Agric Food Chem.* 1999, 47(4): 1416-1421.

Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. Free Radic Biol Med. 1990, 9(1): 19-21.

Cheol J, Dong W, Ro J, Hee S, Won J. Changes in hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation by methanol extract and major compound of Orostachys japonicus. *J. ethnopharmacol.* 2005, 102(3): 313-318.

Chericoni S, Prieto JM, Iacopini P, Cioni P, and Morelli I. In Vitro Activity of the Essential Oil of Cinnamomum zeylanicum and Eugenol in Peroxynitrite-Induced Oxidative Processes. *Agric. Food Chem.* 2005, 53 (12), 4762 -4765.

Cheung LM and Cheung PCK. Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry.* 2005, 89(3): 403-409.

Chiu D, Lubin B, Shohet S. Peroxidative reactions in red cell biology. In: Pryor W, Ed. Free Radicals in Biology. New York: Academia Press. 1982, Vol V: 115-160.

Crowell JA, Steele VE, Sigman CC and Fay JR. Is Inducible Nitric Oxide Synthase a Target for Chemoprevention? *Molecular Cancer Therapeutics.* 2003, 2:815-823.

Dar ME, Jorgensen TJ. Deletions at short direct repeats and base substitutions are characteristic mutations for bleomycin-induced double- and single-strand breaks, respectively, in a human shuttle vector system. *Nucleic Acids Res*. 1995, 23(16): 3224-3230.

Davies KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. Modification of aminoacids. *J Biol Chem*. 1987, 262(20): 9895-9901.

Davies KJ, Delsignore ME and Lin SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J. Biol. Chem*. 1987, 262 (20): 9902-9907.

Davies MJ, Gilbert BC, Haywood RM. Radical-induced damage to bovine serum albumin: role of the cysteine residue. *Free Radic Res Commun*. 1993, 18(6): 353-367.

De Beer D, Joubert E, Gelderblom WC, Manley M. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging. J Agric Food Chem. 2003, 51(4): 902-909.

Dennis K J, Shibamoto T. Gas Chromatographic determination of malonaldehyde formed by lipid peroxidation. *Free Radical Biol. Med.* 1989, 7: 187-191.

Di Simplicio P, Cheeseman KH, Slater TF. The reactivity of the SH group of bovine serum albumin with free radicals. Free Radic Res Commun. 1991, 14(4): 253-62.

Diplock AT. Antioxidant and disease prevention. *Mol. Asp. Med.* 1994, 15: 293-376.

Dominguez M, Nieto A, Marin JC, Keck AS, Jeffery E, Cespedes CL. Antioxidant activities of extracts from Barkleyanthus salicifolius (Asteraceae) and Penstemon gentianoides (Scrophulariaceae). *J Agric Food Chem*. 2005, 53(15): 5889-5895.

Dorfman LM and Adams GE (1973). Reactivity of the hydroxyl radical in aqueous solution. National Standards Reference Series 46, National Bureau of Standards, Washington, D.C.

Do Socorro M, Ricardo R. Mendonça F, Bizzo HR, Almeida I, Soares MRA, et al. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from Croton cajucara. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003, 47(6): 1895–1901.

Edenharder R, Grunhage D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in Salmonella typhimurium TA102. *Mutat Res*. 2003, 540(1): 1-18.

Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. The carotenoids as anti-oxidants - a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 1997, 41: 189-200.

Ellnain-Wojtaszek M, KruczyZ, Kasprzak J. Investigation of the free radical scavenging activity of Ginkgo biloba L. leaves. *Fitoterapia* 2003, 74(1-2).

Esterbaver H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth. Enzymol.* 1990, 186: 407-421.

Fan L, Santoro D, Palicz A, Li L, Lewis EM, Ledford BG, et al. Activation of protein kinase C via phospholipase D enhances NADPH oxidase activity. *The FASEB Journal.* 2006; 20: 484.

Fan P, Lou H. Effects of polyphenols from grape seeds on oxidative damage to cellular DNA. *Mol Cell Biochem*. 2004, 267(1-2): 67-74.

Fernández A, Kiefer J, Fosdick L, McConkey DJ. Oxygen radical production and thiol depletion are required for Ca2 mediated endogenous activation in apoptotic thymocytes. *J. Immunol.* 1995, 155(11): 5 133-5 139.

Fernández O, Capdevila JZ, Dalla G, Melchor G. Efficacy of Rhizophora mangle aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. *Fitoterapia.* 2002, 73: 564-568.

Ferrini MG, Vernet D, Magee TR, Shahed A, Qian A, Rajfer J, et al. Antifibrotic role of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide Biol Chem.* 2002, 6: 283-294

Figueroa O, Figueredo JM, Rodríguez A, Pérez P. Efecto de una solución de mangle rojo en la curación de heridas experimentales en conejos. *Rev Salud Anim.* 1995, 17(1): 96-99.

Filipe P, Morliere P, Patterson LK, Hug GL, Maziere JC, Maziere C, et al. Mechanisms of flavonoid repair reactions with amino acid radicals in models of biological systems: a pulse radiolysis study in micelles and human serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta 1572.* 2002: 150-162.

Fontecave M, Pierre JL. Iron: metabolism, toxicity and therapy. *Biochimie*. 1993, 75(9): 767-773.

Fontham ETH. Vitamin C, vitamin C foods, and cancer: Epidemiologic studies. In: Frei, B., ed. Natural antioxidants in human health and disease. London, Academic Press. 1994, 157-197.

Frank S, Stallmeyer B, Kampfer H. Nitric Oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *FASEB J.* 1999, 13:2002-2014.

Frei B and Higdon JV. Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies. *J. Nutr*. 2003, 133: 3275S-3284S.

Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* 1989, 264: 7761- 7764.

Fuentes V. Las plantas medicinales en Cuba. Tesis presentada en opción al grado científico de Candidato a Doctor en Ciencias Biológicas. Ministerio de Salud Pública. Estación Experimental de Plantas Medicinales ¨Dr. J.T. Roig. La Habana. 1988: 1-159.

Fujisawa S and Kadoma Y. Comparative study of the alkyl and peroxy radical scavenging activities of polyphenols. *Chemosphere*. 2006, 62(1):71-79.

Gajewski E, Aruoma OI, Dizdaroglu M, Halliwell B. Bleomycin-dependent damage to the bases in DNA is a minor side reaction. *Biochemistry*. 1991, 30(9): 2444-2448.

García T, Morín B S, Céspedes MA, Caples EM, Olembe H, et al. Radicales libres: ¿Sueños moleculares o realidades clínicas? *Rev. Cub. Inv. Biomed.* 1994, 13: 12-18.

García C. Patología Quirúrgica de los animales domésticos. Ed. Revolucionaria. 6ta edición. Instituto del libro. 1970: 57-64.

Gardner HW. Oxigen radical chemistry of polynsaturated fatty acids. *Free Rad. Biol. Med.* 1989, 7: 65-86.

Geetha T, Garg A, Chopra K, Pal Kaur I. Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. *Mutat Res*. 2004, 556(1-2): 65-74.

Giloni L, Takeshita M, Johnson F, Iden C and Grohant AP. Bleomycin-induced strand-scission of DNA. Mechanism of deoxyribose cleavage. *The Journal of Biological Chemistry.* 1981, 256(16): 8608-8615.

Goldstein S. The felton reagents. *Free Radic. Biol. Med.* 1993, 15: 435-445.

Goncalves C, Dinis T, Batista MT. Antioxidant properties of proanthocyanidins of Uncaria tomentosa bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. Phytochemistry. 2005, 66(1): 89-98.

Graziani G, Argenio GD, Tuccillo C, Loguercio C, Ritieni A, F Morisco F, et al. Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells in vitro and to rat gastric mucosa in vivo. *Gut.* 2005, 54: 193-200.

Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med*. 1999, 27(9-10): 922-935.

Grisham MB, McCord JM. Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In: Physiology of Oxygen Radicals. Taylor AE, Matalon S, Ward P. eds., Bethesda, Maryland: American Physiological Society. 1986, 1-18.

Guha M and Mackman N. The Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway Limits Lipopolysaccharide Activation of Signaling Pathways and Expression of Inflammatory Mediators in Human Monocytic Cells. *J. Biol. Chem*. 2002, 277(35): 32124-32132.

Guiseppe R. A pulse radiolysis study of superoxide dismutase. *Biochim. Biophys. Acta* 1972, 268: 605-609.

Guo Q, Zhao B, Li M, Shen S, Xin W. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. Biochim Biophys Acta. 1996, 1304(3): 210-22.

Gupta A, Kumar R, Pal K, Banerjee PK and Sawhney RC. A Preclinical Study of the Effects of Seabuckthorn (Hippophae rhamnoides L.) Leaf Extract on Cutaneous Wound Healing in Albino Rats. *Lower Extremity Wounds.* 2005, 4(2): 88-92.

Gupta A, Kumar R, Pal K, Singh V, Banerjee PK and Sawhney RC. Influence of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) flavone on dermal wound healing in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*.2006, 290(1-2): 193-198.

Gupta A, Singh LR and Raghubir R. Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2002, 241: 1-7.

Gutiérrez M, Melchor G, Figueredo JM. Evaluación de la eficacia del CIKRON como preventivo de infecciones umbilicales de terneros neonatos (ensayo clínico fase III). *Rev Salud Anim*. 2001, 23(1): 32-36.

Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. Ser.* 1934, 147: 332-52.

Hagermann AE y Butler LG. Protein precipitation method for the determination of tannins. *J. Agric. Food Chem*. 1978, 26: 809-812.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine, 2 ed, Clarendon Press, Oxford U.K. 1989.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Rol of Free Radicals and catalytic metal ion in human disease: an overview. *Meth. Enzymol*. 1990, 186: 1-85.

Halliwell, B.. How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad. Res. Comms.* 1990, 9: 1-32.

Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Posible modes of action. *J Nat Prod.* 1996, 59(2): 205-215.

Henle E and Linn S**.** Formation, Prevention, and Repair of DNA Damage by Iron/Hydrogen Peroxide. *Journal of Biological Chemistry*. 1997: 19095-19098.

Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signalling, and cell injury. *Free Rad Biol Med.* 2000, 28: 1456–1462.

Higuchi A, Yonemitsu K, Koreeda A, Tsunenari S. Inhibitory activity of epigallocatechin gallate (EGCg) in paraquat-induced microsomal lipid peroxidation--a mechanism of protective effects of EGCg against paraquat toxicity. *Toxicology.* 2003, 183(1-3): 143-149.

Ho KY, Tsai CC, Huang JS, Chen CP, Lin TC, Lin CC. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2001, 53(2): 187-191.

Hogg N, Darley-Usmar VM, Wilson MT, Moncada S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem. J.* 1992, 281: 419-424.

Holder IA, Brown RL, Greenhalgh DG. Mouse models to study wound closure and topical treatment of infected wounds in healing-impaired and normal healing hosts. *Wound Repair and Regeneration.* 1997, 5(2): 198-204.

Hoon D, Jeon M, Hee J. Antioxidant and apoptosis-inducing activities of ellagic acid. Anticancer Res. 2006, 26(5A): 3601-6.

Huang Q, Li-Jun W, Shin-Ichi T, Satoshi O, Takashi I. Elevated levels of DNA repair enzymes and antioxidative enzymes by catechin in murine microglia cells after oxidative stress. *J. Asian Nat. Prod. Res*. 2006, 8(1-2): 61-71.

Imanari T, Hirota M, Miyazaki M, Hayakawa K and Tamura Z. Improved assay method for superoxide dismutase. *Igaku no Ayumi* 1977, 101: 496-497.

Ioku K, Tsushida T, Takei Y, Nakatani N, Terao J. Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*. 1995, 1234(1): 99-104.

Jayaprakasha GK, Ohnishi-Kameyama M, Ono H, Yoshida M, Jaganmohan L. Phenolic constituents in the fruits of Cinnamomum zeylanicum and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem*. 2006, 54(5): 1672-1679.

Jian ZJ, Yang Z, Mason GL, Slauson DO, Bochsler PN. Regulation of superoxide anion generation in bovine alveolar macrophages by bacterial lipopolysaccharide, serum proteins, and modulators of signal transduction. *Inflammation.* 1995, 19(6): 637-650.

Jin-Wen X, Katsumi I, Yukio Y. Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Cyanidin-3-Glucoside, a Typical Anthocyanin Pigment. *Hypertension.* 2004, 44: 217.

Johnston RB, Godzik CA y Cohn ZA. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J. Exp. Med.* 1978, 148: 115-119.

Jovanovic SV and Simic MG. Antioxidants in Nutrition. Reactive Oxygen Species: From Radiation To Molecular Biology: A Festschrift in Honor of Daniel L. Gilbert. Edited by the New York Academy of Sciences 2000, 899: 326-334.

Jurkovic P, Sentjurc M, Gasperlin M, Kristl J, Pecar S. Skin protection against ultraviolet induced free radicals with ascorbyl palmitate in microemulsions. *Eur J Pharm Biopharm.* 2003, 56(1): 59-66.

Jurlow. Curación de las heridas. www.puc.cl/sw educ/ninoquemado/html/mod4/cicatrizacion.html.1996.

Kajiya K, Kumazawa S and Nakayama T. External Factors on the Interaction of Tea Catechins with Lipid Bilayers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002, 66(11): 2330-2335.

Kajiya K, Kumazawa S, Nakayama T. Steric effects on interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2001, 65(12): 2638-2643.

Kansci G, Dongo E, Genot C. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) test demonstrates antiradical activity of Dorstenia psilurus and Dorstenia ciliata plant extracts. Nahrung. 2003, 47(6): 434-7.

Kapoor M, Howard R, Hall I, and Appleton I. Effects of Epicatechin Gallate on Wound Healing and Scar Formation in a Full Thickness Incisional Wound Healing Model in Rats. *American Journal of Pathology*. 2004, 165(1).

Kaviarasan S, Vijayalakshmi K and Anuradha CV. Polyphenol-Rich Extract of Fenugreek Seeds Protect Erythrocytes from Oxidative Damage. *Biomedical and Life Sciences*. 2004, 59(4): 143-147.

Kerstein MD. The scientific basis of healing. *Adv Wound Care* 1997, 10(3) :30-36.

Khadaroo RG, Kapus A, Powers KA, Cybulsky MI, Marshall JC, and Rotstein OD. Oxidative Stress Reprograms Lipopolysaccharide Signaling via Src Kinase-dependent Pathway in RAW 264.7 Macrophage Cell Line. *J. Biol. Chem.* 2003, 278(48): 47834-47841.

Khanna S, Venojarvi M, Roy S, Sharma N, Trikha P, Bagchi D, et al. Dermal Wound Healing Properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002, 33(8): 1089–1096.

Kingu CS, Wei R. Alcohol deshydrogenase catalyzed reduction of protein carbonyl derivatives. J Biochem. Biophys. Meth. 1997, 34: 61-68.

Kivirikko KI, Prockop DJ. Enzymatic hydroxylation of proline and lysine in protocollagen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1967,57: 782-789.

Komori A, Yatsunami J, Okabe S, Abe S, Hara K, Suganuma M, *et al*. Anticarcinogenic activity of green tea polyphenols. *Jpn J Clin Oncol.* 1993, 23(3): 186-190.

Kono Y, Kashine S, Yoneyama T, Sakamoto Y, Matsui Y, Shibata H. Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. *Biosci. biotechnol. biochem*. 1998, 62(1): 22-27.

Konturek SJ, Brzozowski T, Konturek PC, Kwiecien S, Karczewska E, Drozdowicz D, et al. Helicobacter pylori infection delays healing of ischaemia-reperfusion induced gastric ulcerations: new animal model for studying pathogenesis and therapy of H. pylori infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2000,12(12) :1299-1313.

Kubo K, Yoshitake I, Kumada Y, Shuto K and Nakamizo N. Radical scavenging actino of flunarizine in rat brain in vitro. *Arch. Int. Pharmacodyn*. 1984, 272: 283-295.

Lanping MA, Zaiqun L, Bo Z, Li Y, Zhongli L. Inhibition of free radical induced oxidative hemolysis of red blood cells by green tea polyphenols. *Chinese Science Bulletin.* 2000, 45(22): 2052-2056.

Latté KP and Kolodziej H. Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. *Z Naturforsch [C]*. 2000, 55(5-6): 467-72.

Lee H, Jang YH, Lee SR. Protective effect of propofol against kainic acid-induced lipid peroxidation in mouse brain homogenates: comparison with trolox and melatonin. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2005, 17: 144-8.

Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agric Food Chem*. 2003a, 51(25): 7292-7295.

Lee SR, Im KJ, Suh SI, Jung JG. Protective effect of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and other antioxidants on lipid peroxidation in gerbil brain homogenates. *Phytother Res.* 2003, 17(3): 206-209.

Leikert JF, Räthel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red Wine Polyphenols Enhance Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Subsequent Nitric Oxide Release From Endothelial Cells. *Circulation.* 2002, 106: 1614.

León OS, Martínez G, García I, Bilbao T, Ledesma L. Balance Antioxidante/Prooxidante: Salud y enfermedad. 2004, 1ra. Ed.

Li H, Oehrlein SA, Wallerath T, Ihrig-Biedert I, Wohlfart P, Ulshöfer T, et al. Activation of Protein Kinase C α and/or ε Enhances Transcription of the Human Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene. *Molecular Pharmacology.* 1998, 53(4): 630-637.

Li H, Xia N, Brausch I, Yao Y, Förstermann U**.** Flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus L.*) Up-Regulate Endothelial-Type Nitric-Oxide Synthase Gene Expression in Human Endothelial Cells. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics.* 2004, 310: 926-932.

Lim SS, Shin KH, Ban HS, Kim YP, Jung SH, Kim YJ, et al. Effect of the essential oil from the flowers of Magnolia sieboldii on the lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and prostaglandin E2 by rat peritoneal macrophages. *Planta Med.* 2002, 68(5): 459-62.

Lin JK, Chen PC, Ho CT, Lin-Shiau SY. Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3,3'-digallate, epigallocatechin-3-gallate, and propyl gallate. *J Agric Food Chem.* 2000, 48(7): 2736-2743.

Lin YL and Lin JK. Epigallocatechin-3-gallate Blocks the Induction of Nitric Oxide Synthase by Down-Regulating Lipopolysaccharide-Induced Activity of Transcription Factor Nuclear Factor-B. *Molecular Pharmacology.*1997, 52: 465-472.

Lin YL, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Theaflavin-3,3'-digallate from black tea blocks the nitric oxide synthase by down-regulating the activation of NF-kappaB in macrophages. *Eur J Pharmacol.* 1999, 367(2-3): 379-88.

Liu ZQ, Yu W, Liu ZL. Antioxidative and prooxidative effects of coumarin derivatives on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low-density lipoprotein. *Chem£ Phys£ Lipids*. 1999, 103(1): 125.

Lopes GKB, Schulman HM, Hermes-Lima M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999, 1472: 142.

Lotito SB, Renart ML, Goretta LA, Caligiuri M, Rein D, Schmitz HH, Keen CL, and Fraga CG. Protection against lipid oxidation by cocoa procyanidins. www.oxyclubcalifornia.org/pastoccs/2000/posters.html.

Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis. *Semin Liver Dis.* 1998, 18: 331–343.

Luna, L.C. Manual of Histology. Staining methods the Armed Forces Institute of Pathology. Third Editions. Mc. Graw Hill Book Company. New York. 1960.

Llano A, Sgroppo KR, Avanza SC, Jorge R. Actividad antioxidante y contenido en fenoles totales en vinos de origen nacional. 2002. www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2002/08-Exactas/E-014.pdf

Manjunatha BK, Vidya SM, Krishna V, Mankani KL. Wound healing activity of *Leucas hirta. Indian J Pharm Sci.* 2006, 68: 380-384.

Manjunatha BK, Vidya SM, Rashmi KV, Mankani KL, Shilpa HJ, Singh SJ. Evaluation of wound-healing potency of Vernonia arborea Hk. *Indian J Pharmacol.* 2005, 37: 223-226.

Maridonneau-Parini I, Tringale SM, Tauber AI. Identification of distinct activation pathways of the human neutrophil NADPH-oxidase. *J Immunol.* 1986, 137(9): 2925-2929.

Marklund SL. Regulation by citokynes of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzimes in fibroblastes. *J. Biol. Chem.* 1992, 267: 6 696-6 701.

Marrero E, Sánchez J, de Armas E, Escobar A, Melchor G, Abad MJ, et al. COX-2 and $sPLA_2$ inhibitory activity of aqueous extract polyphenols of *Rhizophora mangle* (red mangrove). *Fitoterapia.* 2006, 77: 313- 315.

Martínez G, Delgado R, Pérez G, Garrido G, Núñez AJ. Evaluation of the *in vitro* Antioxidant Activity of *Mangifera indica* L. Extract (Vimang). *Phytother. Res*. 2000, 14: 424-427.

Martínez G, Giuliani A, León OS, Pérez G and Nuñez Sellés AJ. Effect of Mangifera indica L. Extract (QF808) on Protein and Hepatic Microsome Peroxidation. *Phytother. Res*. 2001, 15: 581–585.

Martínez G, Giuliani A, Nuñez AJ, Pérez G, León OS. Protective effects of *mangifera indica* L. Extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacological Research*. 2000a, 42(6).

Martínez G. Caracterización del extracto de Mangifera indica L. (QF808). Un antioxidante multifuncional. [Tesis doctoral] Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. 2000.

Martínez Luzardo F. Los taninos vegetales y sus aplicaciones. Folleto de curso. Universidad do Estado do Rio de Janeiro e Instituto Superior de Ciencias y Tecnologías Nucleares. 1995, 1-25.

Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of chromatography.* 2005, 827, n1 (40 ref.): 76-82.

Materska M, Perucka I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (Capsicum annuum L). J Agric Food Chem. 2005, 53(5): 1750-6.

Mates JM, Pérez-Gomez C, Nunez CI. Antioxidant enzymes and human diseases.*Clinical Biochemistry.*1999, 32.

Matkowski A and Piotrowska M. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. Fitoterapia 2006, 77 (5): 346-353.

Matsuo T and McCord Itoo SA. Simple and rapid purification method of condensed tannins from several young fruits. *Agric. Biol. Chem*.1980, 45: 1885-1887.

McCord JM. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *Am J Med*. 2000, 108: 652-659.

Melchor G, Armenteros M, Fernández O, Linares E, Fragas I. Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* bark. *Fitoterapia*. 2001, 72: 689-691.

Melchor G, Fernández O, Alvarez E, Fragas I, Lobo E. Evaluación del efecto antiséptico in vivo del CIKRON. *Rev Mex Ciencias Farmac.* 2001a, 32(1): 25-30.

Melchor G, Fernández O, Camargo M. Evaluación de la eficacia de CIKRON en el tratamiento de la sarna y la tiña del conejo. Estudio preliminar. *Revista de Salud Animal* 2004, 26: 128-131.

Melchor G. Efectos cicatrizante y antiséptico del extracto y de una forma farmacéutica obtenida a paritr de Rhizophora mangle L. [Tesis doctoral] La Habana: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Universidad Agraria de La Habana. 1999.

Miller DM, Spear NH, Aust SD. Effects of deferrioxamine of iron-catalyzed lipid peroxidation. Arch. biochem. biophys. 1992, 295(2): 240-246.

Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N. Antimicrobial and antioxidant activities of Melissa officinalis L. (Lamiaceae) essential oil. *J Agric Food Chem*. 2004, 52(9): 2485-2489.

MINAGRI. Características del Patrimonio Forestal en la formación de manglar. Monografía. 1988

MINAGRI. Seminario sobre manejo integral de manglares. Manzanillo: Ministerio de la Agricultura y Representación de la FAO en Cuba. 1984: 1-28.

Misra A, Chattopadhyay R, Banerjee S, Chattopadhyay DJ, Chatterjee IB. Black tea prevents cigarette smoke-induced oxidative damage of proteins in guinea pigs. *J Nutr*. 2003, 133(8): 2622-2628.

Miura T, Muraoka S, Ogiso T. Oxidative damage to bovine serum albumin induced by hydroxyl radical generating systems of xanthine oxidase + EDTA-Fe3+ and ascorbate + EDTA-Fe3+. *Chem Biol Interact*. 1992, 85(2-3): 243-254.

Mokni M, Elkahoui S, Limam F, Amri M and Aouani E. Effect of Resveratrol on Antioxidant Enzyme Activities in the Brain of Healthy Rat. *Neurochemical Research.* 2007, 32(6): 981-987.

Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol*. 2004, 26(2): 211-219.

Moncada S, Palmer RMJ, and Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991, 43: 109-142.

Moneghini R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radical Biol. Med.* 1997, 23: 783-792.

Montes de Oca N, Reverón Y, González R. Evaluation of antimicrobial activity of different extracts of *Rhizophora mangle L* using five methods. *Revista de Salud Animal* 2001, 23: 1-11.

Moore CW. Degradation of DNA and Structure-Activity Relationship between Bleomycins A2 and B2 in the Absence of DNA Repair. *Biochemistry* 1990, 29: 1342-1347.

Moreno JJ. Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radic Biol Med.* 2003, 35(9) :1073-1081.

Moskaug J, Carlsen H, Myhrstad MCW, and Blomhoff R. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr.* 2005,81(suppl): 277S–283S.

Muller DPR. Vitamin E and neurological funtions. *Redox Rep.* 1995, 1: 239-245.

Musalmah M, Nizrana MY, Fairuz AH, Noor Aini AH, Azian AL, Gapor MT, et al. Comparative effects of palm vitamin E and α-tocopherol on healing and wound tissue antioxidant enzyme levels in diabetic rats. *Lipids.* 2005, 40: 575-580.

Nakagawa T and Yokozawa T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. Food Chem Toxicol. 2002, 40(12): 1745-50.

Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Free Radic Biol Med. 1996, 21(6): 895-902.

Nayak BS and Pinto LM. *Catharanthus roseus* flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats. *BMC Complement Altern Med*. 2006, 6: 41.

Nepka C, Sivridis E, Antonoglou O, Kortsaris A, Georgellis A, Taitzoglou I, et al. Chemopreventive activity of very low dose dietary tannic acid administration in hepatoma bearing C3H male mice. *Cancer lett*. 1999, 141(1-2): 57-62.

Niki E, Komuro E, Takahashi M, Urano S, Ito E, Terao K. Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. *J Biol Chem.* 1988, 263(36): 19809–19814.

Niki E. Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol. *Am. N. Y. Acad. Sci*. 1987, 493: 186-199.

Nishikimi M. Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by Xantini-Xantine Oxidase system *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975, 63: 463-468.

Noda Y, Anzai K, Mori A, Kohno M, Shinmei M, Packer L. Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system. Biochem Mol Biol Int. 1997, 42(1): 35-44.

Ohashi Y, Takeuchi Y, Hirama M, Yoshioka H and Yoshioka H. Determination of the Reaction Rate Constants of Antioxidants with the Hydroxyl Radical by a Rapid-Flow ESR Method. *Bulletin of the Chemical Society of Japan.* 2005, 78(10): 1757-1762.

Ohnishi M, Morishita H, Iwahashi H, Toda S, Shirataki Y, Kimura M, Kido R. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. Phytochemistry 1994, 36(3): 579-583.

Oikawa S, Kawanishi S. Distinct mechanisms of site-specific DNA damage induced by endogenous reductants in the presence of iron(III) and copper(II). *Biochim Biophys Acta*. 1998, 1399(1): 19-30.

Ojewole JA. Antiinflammatory and analgesic effects of *Psidium guajava Linn*. (Myrtaceae) leaf aqueous extract in rats and mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2006, 28(7): 441-446.

Orrenius S, McConKey DJ, Bellomo G. Role of Ca2 in toxic cell killing.*Trends Pharmacol. Sci.* 1989, 10: 281-285.

Ortega BE, de Marianne E and Myiake ET. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa. Journal of Ethnopharmacology.* 2004, 94(1): 55-57.

Osawa T, Ide A, Jeng-de SU, Namiki M, Inhibition of lipid peroxidation by ellagic acid. *J. agric. food chem.* 1987, 35(5): 808-812.

Ozdemirler G, Mehmetcit G, Oztezcan S, Toker G, Sivas A, Uysal M. Peroxidation potential and antioxidant activity of serum in patients with Diabetes Mellitus and myocard infarction. *Horm Metab Res*. 1995, 27: 196.

Pan MH, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JH, Lin JK. Suppression of lipopolysaccharide-induced nuclear factor-kappaB activity by theaflavin-3,3'-digallate from black tea and other polyphenols through down-regulation of IkappaB kinase activity in macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2000, 59(4): 357-367.

Pedrielli P, Skibsted LH. Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin, and (+)-catechin on alpha-tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate. *J Agric Food Chem*. 2002, 50(24): 7138-7144.

Pérez RM, Hernández H, Hernández S. Antioxidant activity of *Tagetes erecta* essential oil. *J. Chil. Chem. Soc*. 2006, 51(2): 883-886.

Pérez G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*. 2003.

Plumb GW, De Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Cheynier V, Williamson G. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radic Res*. 1998, 29(4): 351-358.

Povirk LF. Catalytic release of deoxyribonucleic acid bases by. oxidation and reduction of an iron-bleomycin complex. *Biochemistry*. 1979, 18: 3989-3995.

Pushpangadan P, Rao CV, Govindarajan R, Mehrotra S, Ojha S K, Radhakrishnan K, et el. Antiulcer activity of *Utleria salicifolia* rhizome extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004, 91(2/3): 243-249.

Radi R, Beckman JS, Bush KKM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1990, 266: 4 244-4 250.

RANDOX. Radicales Libres. Ed. Randox Laboratories Ltd. Crumlin, U.K. 1996, 1-16.

Rapisarda P, Tomaino A, Lo Cascio R, Bonina F, De Pasquale A, Saija A. Antioxidant effecttiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. J. Agric. Food Chem. 1999, 47: 4718-4723.

Rice-Evans C. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochem Soc Symp.* 1995, 61: 103-116.

Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba. 2 da Ed. Editorial Científica Técnica. Habana. 1988: 606-607.

Rojas N, Coto O. Propiedades antimicrobianas de extractos de Rhizophora mangle L. *Rev Cub Med Tropical.* 1978, 30(3): 181-187.

Rosales M, Pérez ME, Ponce MC. Propiedades antirradicales libres y antibacterianas de extractos de corteza de pino. *Madera y Bosques* 2006, 12(1): 37-49.

Sakagami H, Satoh K, Motohashi N, Kawase M, Hatano H, Kanno M, et al. Antitumor potential of polyphenols: possible application to oral cancer

phytochemotherapy.www.cababstractsplus.org/google/abstract.asp AcNo=20053168550. 2005.

Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys.* 1995, 322(2): 339-346.

Salvayre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvayre A. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta 1585.* 2002, 213– 221.

Salvi A, Carrupt PA, Tillement JP, Testa B. Structural damage to proteins caused by free radicals: asessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding. *Biochemical Pharmacology 61.* 2001: 1237–1242.

Sánchez LM, Armenteros M, Varcárcel L. Actividad antimicrobiana de los principales grupos químicos presentes en *Rhizophora mangle* L. *Rev Salud Anim.* 2000, 22(3): 174-179.

Sánchez LM, Melchor G, Alvarez S, Bulnes C. Caracterización química y toxicológica de una formulación cicatrizante de *Rhizophora mangle* L. *Rev. Salud Anim*. 1998, 20(2): 69-72.

Sánchez LM, Rueda D, Gómez BC. Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L. *J Ethnopharmacol.* 2001, 77: 1-3.

Sánchez LM. Caracterización química y actividad biológica de un extracto acuoso de la corteza de *Rhizophora mangle* L. [Tesis doctoral] La Habana: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Universidad Agraria de La Habana. 1998.

Sánchez LM. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Departamento de Química-Farmacología-Toxicología. Comunicación personal. 2007.

Sánchez-Mateo CC, Bonkanka CX, Hernández-Pérez M and Rabanal RM**.** Evaluation of the analgesic and topical anti-inflammatory effects of *Hypericum reflexum* L. fil. *Journal of Ethnopharmacology***.** 2006, 107(1): 1-6.

Sanchez-Moreno C, Cao G, Ou B, Prior RL. Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highbush blueberry. *J Agric Food Chem.* 2003, 51(17): 4889-4896.

Sano M, Yoshida R, Degawa M, Miyase T, Yoshino K. Determination of peroxyl radical scavenging activity of flavonoids and plant extracts using an automatic potentiometric titrator. *J Agric Food Chem.* 2003, 51(10):2912-2916.

Santoshkumar HD, Shrishailappa B, Senthilkumar N and Chandrashekhar H. Antitumor Activity of the Methanol Extract of *Hypericum hookerianum* Stem Against Ehrlich Ascites Carcinoma in Swiss Albino Mice. *Journal of Pharmacological Sciences.* 2007, 103(4): 354-359.

Sato Y, Kamo S, Takahashi T and Suzuki Y. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: Hemolysis by water-soluble radical initiator. *Biochemistry.* 1995, 34: 8940-8949.

Schaffer MR, Efron PA, Thorton FJ. Nitric oxide: an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function. *J Immunol.* 1997, 158: 2375–2381.

Scherer NM, Deamer DW. Oxidative stress impair the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryls group in the Ca2+ ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986, 246: 589-601.

Scott BC, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI. Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. *Free radic. res. commun.* 1993,19(4): 241-253.

Sedlak J, Lindsay, RH. Estimation of total protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman´s reagent. *Anal. Biochem.*1968, 25: 192-205.

Sen CK, Khanna S, Babior BM, Hunt TK, Ellison EC, et al. Oxidant-induced Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Human Keratinocytes and Cutaneous Wound Healing J. *Biol. Chem*. 2002a, 277(36): 33284-33290.

Sen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M, et al. Oxygen, Oxidants, and Antioxidants in Wound Healing: an emerging paradigm. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2002, 957: 239-249.

Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 1996, 10: 709–720.

Sen CK. The general case for redox control of wound repair. *Wound Repair and Regeneration* 2003, 11(6): 431–438.

Senevirathne M, Kim SH, Siriwardhana N, Ha JH, Lee KW and Jeon YJ. Antioxidant Potential of Ecklonia cava on Reactive Oxygen Species Scavenging, Metal Chelating, Reducing Power and Lipid Peroxidation Inhibition. *Food Sci Tech Int.* 2006, 12(1): 27–38.

Sertié JAA, Carvalho JCT, Panizza S. Antiulcer Activity of the Crude Extract from the Leaves of Casearia Sylvestris. *Pharmaceutical Biology.* 2000, 38(2): 112-119.

Sestili P, Diamantini G, Bedini A, Cerioni L, Tommasini I, Tarzia G and Cantoni O. Plant-derived phenolic compounds prevent the DNA single-strand breakage and cytotoxicity induced by tert-butylhydroperoxide via an iron-chelating mechanism. Biochem. J. 2002, 364: 121–128.

Sevanian A, Ursini F. Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: similarities and differences. *Free Radic. Biol. Med*. 2000, 29: 306–311.

Shi HP, Efron DT, Most D, Barbul A. The role of iNOS in wound healing. *Surgery* 2001, 130:225–229

Shukla A, Rasik AM, Dhawan BN. Asiaticoside induced elevation of antioxidant levels in healing wounds. *Phytother Res.* 1999,13(1); 50-54.

Shukla A, Rasik AM, Patnaik GK. Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defence enzymes in a healing cutaneous wound. *Free Radic Res.* 1997, 26: 93-101.

Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins. Viatmin E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann NY Acad Sci.* 1992, 669: 7-20.

Silva CG, Herdeiro RS, Mathias CJ, Panek AD, Silveira CS, Rodrigues VP, Renno MN, Falcao DQ, Cerqueira DM, Minto AB, Nogueira FL, Quaresma CH, Silva JF, Menezes FS, Eleutherio EC. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. Pharmacol Res. 2005, 52(3): 229-33.

Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol*. 1996, 36: 83-106.

Singh K, Khanna AK, Visen PK and Chander R. Protective effect of ellagic acid on t-butyl hydroperoxide induced lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *Indian J Exp Biol*. 1999, 37(9): 939-40.

Solano L, Figueredo JM, Marrero F, Pérez I, Lima L, Gómez D. Comparación de la efectividad del CIKRON y la Metilrosanilina en la prevención de infecciones umbilicales en perros y ovinos neonatos. *Rev Salud Anim.* 2000, 22(2): 102-105.

Solomon LR, Beerelli RD, Moseley PL. Bleomycin-iron can degrade DNA in the presence of excess ethylenediaminetetraacetic acid in vitro. *Biochemistry*. 1989, 28(26): 9932-9937.

Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clinic. Proc.* 1988, 63: 381-389.

Spalding M, Blasco F and Field C. Cap.3. The Global distribution of Mangrove. World Mangrove Atlas, Published by: International society for Mangrove Ecosystems (ISTME). Printed by: Smith Settle, Otley West Yorkshire.U.K. 1997: 23-26.

Stadtman ER and Levine RL. Protein Oxidation *Ann. NY Acad. Sci*. 2000, 899(1): 191–208.

Stadtman ER, Oliver DN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consecuences. *J.Biol. Chem.* 1991, 266: 2 005-2 008.

Stagos D, Karaberis E, Kouretas D. Assessment of antioxidant / anticarcinogenic activity of plant extracts by a combination of molecular methods. *In Vivo*. 2005, 19(4): 741-747.

Stagos D, Kazantzoglou G, Magiatis P, Mitaku S, Anagnostopoulos K, Kouretas D. Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of Vitis vinifera on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. *Int J Mol Med*. 2005, 15(6):1013-1022. Stagos D, Kazantzoglou G, Theofanidou D, Kakalopoulou G, Magiatis P, Mitaku S, et al. Activity of grape extracts from Greek varieties of Vitis vinifera against mutagenicity induced by bleomycin and hydrogen peroxide in Salmonella typhimurium strain TA102. *Mutat Res.* 2006, 609(2): 165-175.

Su-Ying L, Yue Y and Shao-Ping L. Identification of Antioxidants in Essential Oil of Radix Angelicae Sinensis Using HPLC Coupled with DAD-MS and ABTS-Based Assay. J. Agric. Food Chem. 2007, 55(9): 3358-3362.

Swain T. Plant Biochemistry. 4a ed. New York: Ed. Academic Press; 1965. p. 552

Tadolini B, Juliano C, Piu L, Franconi F, Cabrini L. Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Radical Research* 2000, 33(1): 105-114.

Takeshita M, Grollman AP, Ohtsubo E, and Ohtsubo E. Interaction of Bleomycin with DNA. PNAS. 1978, 75(12): 5983-5987.

Tedeschi E, Menegazzi M, Yao Y, Suzuki H, Förstermann U, and Kleinert H. Green Tea Inhibits Human Inducible Nitric-Oxide Synthase Expression by Down-Regulating Signal Transducer and Activator of Transcription-1 Activation. *Mol Pharmacol*. 2004, 65: 111-120.

Tedesco I, Russo LG, Nazzaro F, Russo M and Palumbo R. Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 2001, 12(9): 505-511.

Tedesco I, Russo M, Russo P, Iacomino G, Russo GL, Carraturo A, et al. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *The Journal of Nutritional Biochemistr.* 2000, 11(2): 114-119

Terasawa N and Yamazaki N. Radical Scavenging Activity of Japanese Black Tea, Toyama Kurocha. *Food Science and Technology Research*. 2002, 8(3): 218-220.

Torres, R. curación y cuidado de las heridas. Tratado de cirugía. 1986 Vol 1. Nueva Edt. Interam. S.A. de C.V. Mexico: 1-17.

Tracey MR, Tse J, Carter G. Lipopolysacaccharide induced changes in plasma nitrite and nitrates concentrations in rats and mice: Pharmacological evaluation of nitric oxido synthase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp.* 1995, 272: 1011-1015.

Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML. Antioxidative properties of cardoon (Cynara cardunculus L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. *J Agric Food Chem*. 2002, 50(17): 4989-93.

Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML. Hydroxyl radical and hypochlorous acid scavenging activity of small centaury (Centaurium erythraea) infusion. A comparative study with green tea (Camellia sinensis). *Phytomedicine.* 2003, 10(6-7): 517-22.

Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, de Lourdes Basto M. Studies on the antioxidant activity of Lippia citriodora infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biol Pharm Bull*. 2002a, 25(10): 1324-7.

Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, de Lourdes Bastos M. Antioxidant activity of Hypericum androsaemum infusion: scavenging activity against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biol Pharm Bull*. 2002b, 25(10): 1320-3.

van Rensburg SJ, Daniels WM, van Zyl JM, Taljaard JJ. A comparative study of the effects of cholesterol, beta-sitosterol, beta-sitosterol glucoside, dehydroepiandrosterone sulphate and melatonin on in vitro lipid peroxidation. *Metab Brain Dis*. 2000, 15(4): 257-265.

Vardar-Unlu G, Candan F, Sokmen A, Daferera D, Polissiou M, Sokmen M, et al. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of Thymus pectinatus Fisch. et Mey. Var. pectinatus (Lamiaceae). *J Agric Food Chem*. 2003, 51(1): 63-67.

Vaughan M. Oxidative Modification of Macromolecules. Minireview Series. Minireview Prologue. *The Journal of Biological Chemistry.* 1997, 272(30): 18513.

Vayalil PK, Elmets CA, Katiyar SK. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. *Carcinogenesis.* 2003, 24(5): 927-36.

Verstraeten SV, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG, Oteiza PI. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radic Biol Med.* 2003, 34: 84-92.

Waldmann TA. In: "Albumin Structure, Function and Uses". (Eds. V. M. Rosenoer, M. Oratz, and M. A. Rothschild). Pergamon, Oxford. 1977 : 255-273

Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Förstermann U. Resveratrol, a Polyphenolic Phytoalexin Present in Red Wine, Enhances Expression and Activity of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation.* 2002, 106: 1652.

Wallerath T, Poleo D, Li H, Förstermann U. Red Wine Increases the Expression of Human Endothelial Nitric Oxide Synthase. A Mechanism That May Contribute to its Beneficial Cardiovascular Effects. *Journal of the American College of Cardiology* 2003, 41: 471-478.

Wang Y, Zhu JX, Kong LD, Yang C, Cheng CH, Zhang X. Administration of procyanidins from grape seeds reduces serum uric acid levels and decreases hepatic xanthine dehydrogenase/oxidase activities in oxonate-treated mice. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2004, 94(5): 232-7.

Weinreb O, Mandel S, Amit T, Youdim MB. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. J Nutr Biochem. 2004, 15(9): 506-16.

Witte MB and Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am. J. Surg*. 2002, 183(4): 406-412.

Won K, Kumar J, Ok S, Chun KS, Joo H and Surh YJ. Cocoa Polyphenols Inhibit Phorbol Ester-Induced Superoxide Anion Formation in Cultured HL-60 Cells and Expression of Cyclooxygenase-2 and Activation of NF-B and MAPKs in Mouse Skin In Vivo. *J. Nutr.* 2006, 136: 1150-1155.

Yagawa K, Kaku M, Ichinose Y, Aida Y, Tomoda A. Fc receptor-mediated desensitization of superoxide (O2-) generation response of guinea-pig macrophages and polymorphonuclear leucocytes. *Immunology.* 1985, 55(4): 629-638.

Yamamoto N, Moon JH, Tsushida T, Nagao A, Terao J. Inhibitory effect of quercetin metabolites and their related derivatives on copper ion-induced lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. *Arch Biochem Biophys*. 1999, 372(2): 347-354.

Yan Q, Holt R, Sheryl L, Timothy J. Orozco L. Inhibitory Effects of Cocoa Flavanols and Procyanidin Oligomers on Free Radical-Induced Erythrocyte Hemolysis. *Exp Biol Med.* 2002, 227(5): 321-329.

Yang B, Kotani A, Arai K and Kusu F. Relationship of Electrochemical Oxidation of Catechins on Their Antioxidant Activity in Microsomal Lipid Peroxidation. *Chem. Pharm. Bull*. 2001, 49(6): 747-751.

Yang CS & Wang ZY Tea and cancer. J. Natl. Cancer Inst. 1993, 85: 1038-1049.

Yasukazu Y, Etsuo N; Antioxidant effects of phytosterol and its components. *J. nutr. sci. vitaminol*. 2003, 49(4): 277-280.

Ying CJ, Sun XF, Zhang SL, Zhang XP, Mao LM, Zuo XZ, et al. ROS-related enzyme expressions in endothelial cells regulated by tea polyphenols. *Biomed Environ Sci.* 2004, 17(1): 33-39.

Ying CJ, Xu JW, Ikeda K, Takahashi K, Nara Y, Yamori Y. Tea polyphenols regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunit expression and ameliorate angiotensin II-induced hyperpermeability in endothelial cells. *Hypertens Res.* 2003, 26(10):823-828.

Yokota J, Takuma D, Hamada A, Onogawa M, Yoshioka S, Kusunose M, Miyamura M, Kyotani S and Nishioka Y. Scavenging of Reactive Oxygen Species by *Eriobotrya japonica* Seed Extract. *Biol. Pharm. Bull.* 2006, 29: 467-471.

Yoneda T, Hiramatsu M, Sakamoto M, Togasaki K, Komatsu M, Yamaguchi K. Antioxidant effects of "beta catechin". *Biochem Mol Biol Int*. 1995, 35(5): 995-1008.

Zang LY, Cosma G, Gardner H, Castranova V, Vallyathan V. Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. *Mol. cell. biochem*. 2003, 247(1-2): 205-210.

Zelko IN, Mariani TJ and FOlz RJ. Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene Structures, Evolution, and Expression. *Free Radical Biology & Medicine.* 2002, 33(3): 337–349.

Zhang A, Zhu QY, Luk YS, Ho KY, Fung KP, Chen ZY. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. *Life Sci.* 1997, 61(4): 383-394.

Zhu QY, Huang Y, Tsang D, Chen ZY. Regeneration of α-tocopherol in human LDL by green tea catechins. *J Agric Food Chem.* 1999, 47: 2020–2025.

Zhu YN, Yang YF, Ono S, Zhong XG, Feng YH, Ren YX, et al. Differential expression of inducible nitric oxide synthase and IL-12 between peritoneal and splenic macrophages stimulated with LPS plus IFN- is associated with the activation of extracellular signal-related kinase. http://intimm.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/dxl034v1, 2006.