

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
Departamento de Farmacia

TRABAJO DE DIPLOMA
En opción al título de
Licenciado en Ciencias Farmacéuticas

Título: Evaluación de la actividad antioxidante de extractos totales y cumarinas aisladas de la corteza de *Gymnanthes lucida* Sw.

Diplomante: Naylan Castelnaux Ochoa

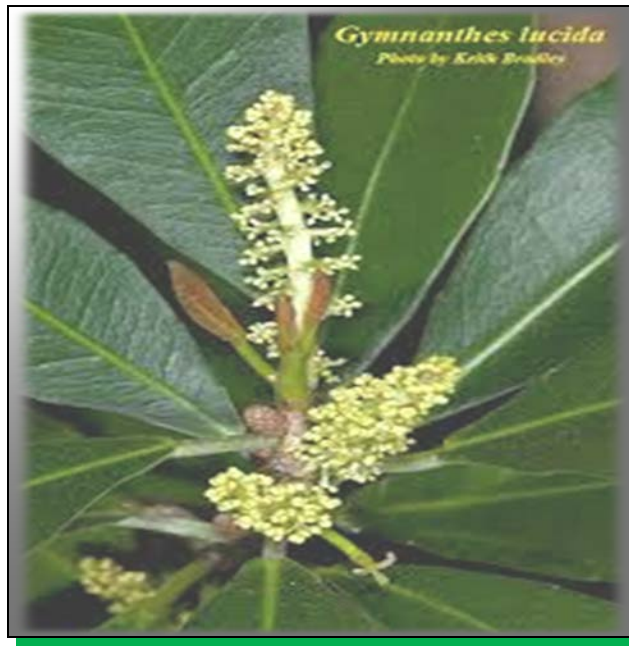
Tutora: Dra.C. Ania Ochoa Pacheco (PT)

Asesora: Lic. Diana Julia Arró Díaz

Curso 2018-2019
Santiago de Cuba



Pensamiento



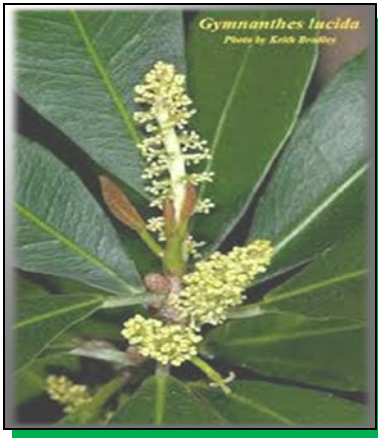
Pensamiento

La ciencia hace verdaderos progresos cuando una verdad nueva encuentra un ambiente preparado para acogerla.

Piotr Alekseevich.



Dedicatoria



Dedicatoria

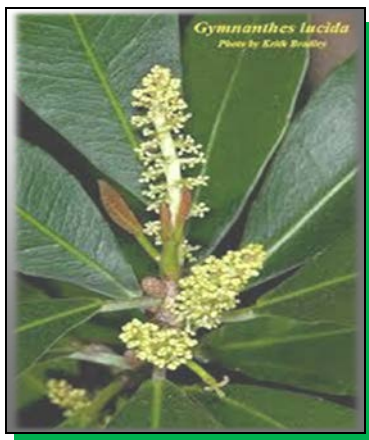
Este acto de defensa se lo dedico a mi madre, mi guía, mi progenitora. Ella es el principal pilar de ejemplo para lograr los resultados que he obtenido hasta el momento, así como este acto de culminación de mis estudios. Le agradezco por darme la vida, por ser una guía, una educadora, una sabia y sobre todo una madre.

También se lo dedico a mi familia, tía y abuela que son las otras dos partes importantes en mi vida, que ayudaron junto a mi madre a mi formación como universitaria y futura profesional. Me apoyaron en momentos donde me faltó ella y en toda mi vida en general.

Gracias a ellas y por supuesto a mí como autora principal de mi futuro.



Agradecimientos



Agradecimientos

A lo largo de nuestra vida nos cruzamos con muchas personas que sin duda algunas son para recordar. Son esas personas que nos han prestado ayuda cuando la hemos necesitado. Siempre han estado allí en los momentos difíciles o simplemente porque han crecido junto a nosotros brindándonos su amor incondicional.

A todas ellas le agradezco infinitamente por haberme ayudado en todo este período de construcción de mi tesis. Ellas son: la Dra. C. Ania Ochoa Pacheco y la Lic. Diana J. Arró Díaz mis tutoras que me guiaron, me dieron la base para realizar con éxito este acto, los profesores del departamento de Farmacia y de otros departamentos, en especial, el profe Jesús, Rosalia, y Yaribey. A mis compañeros de aula que en algún momento tuve que apoyarme de ellos. Y a Yoan, que es y será una de las personas más importantes que he conocido durante este transcurso en la universidad, ha sido un apoyo, compañero, amigo y un gran amor. En general a Dios por darme el don de poder estudiar y con resultados satisfactorios.

Muchas Gracias a todos.



Resumen

Resumen

Investigaciones precedentes en busca de plantas con efectos antioxidantes, sugieren que la especie vegetal *Gymnanthes lucida* Sw. (Yaití, Aité), perteneciente a la familia Euphorbiaceae, es una candidata potencial para la obtención de sustancias bioactivas con estas características, resultando necesaria la evaluación de estas propiedades. En este trabajo se realizó la caracterización química cualitativa del extracto etanólico y de diclorometano (fase) obtenidos a partir de la corteza de la especie, mediante la técnica de tamizaje fitoquímico; así como la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de estos y las cumarinas aisladas, a través de los ensayos de DPPH, ABTS y poder reductor. La composición química cualitativa determinada para ambos extractos, mostró la presencia de triterpenos y esteroides, quinonas, cumarinas, fenoles y taninos, flavonoides, aminoácidos libres y aminos; adicionalmente para el extracto etanólico: alcaloides, carbohidratos y azúcares reductores. La fase de diclorometano resultó ser la de mayor capacidad secuestradora de radicales libres reflejado en los menores valores de CE_{50} obtenidos y evidenciando el efecto sinérgico de las cumarinas presentes; mientras que el extracto etanólico total fue el de mayor poder reductor, con el más alto valor de la absorbancia. La escopoletina es el componente más activo de los compuestos puros evaluados, resultando el principal responsable de la actividad secuestradora de radicales libres y poder reductor mostrada por la fase de diclorometano y el extracto etanólico total de la corteza, bajo las condiciones estudiadas. Ninguna muestra presentó mayor actividad antioxidante que el ácido ascórbico como fármaco de referencia.



Abstract

Abstract

Previous research in search of plants with antioxidant effects, suggest that the medicinal species *Gymnanthes lucida* Sw. (Yaití, Aité), belonging to the family Euphorbiaceae, is a potential candidate for obtaining bioactive substances with these characteristics, resulting in the evaluation of these properties. In this work, the qualitative chemical characterization of the ethanolic extract and dichloromethane (phase) obtained from the bark of the species was carried out using the phytochemical screening technique; as well as the evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of these and the isolated coumarins, through the tests of DPPH, ABTS and reducing power. The qualitative chemical composition determined for both extracts showed the presence of triterpenes and steroids, quinones, coumarins, phenols and tannins, flavonoids, free amino acids and amines; additionally for the ethanolic extract: alkaloids, carbohydrates and reducing sugars. The dichloromethane phase was found to be the highest free radical scavenging capacity of reflected in lower EC_{50} values obtained and demonstrating the synergistic effect of coumarins present; while the total ethanolic extract had the highest reducing power, with the highest absorbance value. Scopoletin is the most active component of the pure compounds evaluated, being the main responsible for the activity of scavenger of free radicals and reducing power shown by the dichloromethane phase and the total ethanolic extract of the bark, under the conditions studied. No sample showed greater antioxidant activity than ascorbic acid as a reference drug.



Índice

Índice

Acápites	Pág.
Introducción.....	1
Capítulo I. Revisión bibliográfica.....	5
I.1 Proceso de oxidación celular. Definición.....	5
I.1.1 Radicales libres y especies reactivas del oxígeno. Concepto y mecanismos fisiológicos de generación.....	5
I.1.2 Estrés oxidativo. Fisiopatología y enfermedades asociadas.....	7
I.2 Antioxidantes. Generalidades.....	7
I.3 Métodos para evaluar actividad antioxidante.....	8
I.4 Familia Euphorbiaceae. Características generales.....	10
I.4.1.1 Antecedentes de estudios científicos para el género <i>Excoecaria</i>	10
I.4.1 Géneros <i>Gymnanthes</i> y <i>Excoecaria</i> . Aspectos generales.....	11
I.4.1.2 <i>Gymnanthes lucida</i> Sw. Sinonimias.....	12
I.4.1.2.1 Nombres comunes.....	12
I.4.1.3 Clasificación taxonómica.....	12
I.4.1.4 Hábitat y distribución.....	12
I.4.1.5 Usos etnofarmacológicos.....	13
I.4.1.6 Antecedentes de estudios químicos para la especie.....	13
I.4.1.7 Antecedentes de estudios farmacológicos para la especie.....	15
I.5 Cumarinas.....	16
I.5.1 Características generales.....	16
I.5.2 Estudios farmacológicos de las cumarinas aisladas en <i>G. lucida</i> Sw.....	17
Capítulo II. Materiales y métodos.....	20
II.1 Características generales de la investigación.....	20
II.2. Obtención de las muestras.....	20
II.3 Caracterización química de los extractos.....	20
II.3.1 Determinación cualitativa de los metabolitos.....	20
II.4. Evaluación de la actividad antioxidante.....	21
II.4.1. Preparación de las disoluciones de las muestras a evaluar	21

II.4.2. Actividad antioxidante frente al radical DPPH•.....	21
II.4.3. Actividad antioxidante frente al radical ABTS ^{•+}	22
II.4.4 Determinación del Poder reductor.....	23
II.5. Análisis estadístico y procesamiento de los resultados.....	24
Capítulo III. Resultados y discusión.....	25
III.1. Caracterización química de los extractos. Determinación cualitativa de los metabolitos.....	25
III.2 Evaluación de la actividad antioxidante.....	28
III.2.1 Actividad antioxidante frente al radical DPPH•.....	28
III.2.2 Actividad antioxidante frente al radical ABTS ^{•+}	33
III.2.3 Determinación del Poder reductor.....	36
Conclusiones.....	43
Recomendaciones.....	44
Referencias bibliográficas	
Anexos	



Introducción

Introducción

Diariamente el organismo origina ciertos tipos de moléculas conocidas como radicales libres, las que producidas en menor cantidad cumplen con funciones biológicas indispensables. El problema se genera cuando el número de estos aumenta, ya sea por esta vía o por influencia ambiental, por lo que es necesario eliminarlos. Estos radicales libres, que incluyen especies reactivas del oxígeno (ERO), especies reactivas del nitrógeno (ERN) y especies reactivas del azufre (ERA), son producidos fisiológicamente por todas las células, no solo durante la respiración celular sino también en los mecanismos de inmunidad celular contra patógenos y tumores.¹ Bajas cantidades de ERO son necesarias para mantener la homeostasis biológica, sin embargo, altas concentraciones celulares de estos causan graves efectos, como la peroxidación lipídica y el daño al ADN, por lo que existen mecanismos antioxidantes en el organismo humano capaces de neutralizarlos.²

Los antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhabilitando la iniciación o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. Se pueden distinguir dos categorías: sintéticos y naturales. Los primeros son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los segundos pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides, cumarinas, ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminos) o carotenoides.

El estudio de la capacidad antioxidante de las plantas medicinales ha crecido en las últimas décadas, ocupando en la actualidad un lugar privilegiado, ya que un número importante de productos obtenidos de éstas, como los aceites esenciales, alcaloides y diversos polifenoles poseen efectos antioxidantes, los que son evidenciados mediante diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*. Por su elevado consumo a través de la dieta y la presencia ubicua en muchas especies vegetales, el potencial de los polifenoles como agentes antioxidantes ha sido el más estudiado.³

Las plantas juegan un papel fundamental en esta necesidad, ya que en ellas se encuentran estos elementos denominados antioxidantes, que ayudan a eliminar los radicales libres del organismo. Estos principios activos presentes en muchas especies vegetales ayudan a

combatir los efectos dañinos de los radicales libres producidos en el organismo, como el envejecimiento prematuro, alteraciones en el aparato circulatorio y del sistema nervioso, e incluso se les relacionan con el cáncer y otras enfermedades degenerativas.⁴

El reconocimiento global de esta problemática ha contribuido a la movilización de recursos para la realización de investigaciones, con el propósito de desarrollar nuevas sustancias que provean protección contra la oxidación. Como resultado se han obtenido antioxidantes sintéticos, pero los mismos tienen un uso restringido, debido a estudios de la comunidad científica acerca de su posible carácter carcinogénico y efectos tóxicos.⁵ Lo expuesto de forma previa ha aumentado la urgencia de encontrar antioxidantes de origen vegetal, como alternativa terapéutica para el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como el cáncer, la aterosclerosis, la Diabetes mellitus, las enfermedades glomerulares renales, cardiovasculares, coronarias y enfermedades cerebrales asociadas al envejecimiento, lo que sustenta y potencia la investigación con especies vegetales que posean un alto poder antioxidante y baja toxicidad.⁶

A nivel mundial las personas utilizan indistintamente especies medicinales con esta propiedad, sin embargo, muchos de estos usos terapéuticos carecen de investigaciones científicas que fundamenten su eficacia y seguridad; así como la aplicación en el campo clínico-farmacéutico. Esta problemática limita la calidad, seguridad, desarrollo, producción y la comercialización de medicamentos de origen vegetal con potencialidades en la medicina. El propósito mencionado requiere de estudios sobre el aislamiento e identificación de los compuestos bioactivos de la planta de origen, su elucidación estructural, la demostración científica de su actividad biológica y seguridad, de manera que se faciliten investigaciones farmacológicas y toxicológicas, a través de los ensayos preclínicos y clínicos establecidos, así como los estudios de formulación farmacéutica.

Investigaciones precedentes^{7,8} en busca de plantas con propiedades antioxidantes, sugieren que la especie vegetal *Gymnanthes lucida* Sw. (Yaití, Aité) perteneciente a la familia Euphorbiaceae es una candidata potencial para la obtención de sustancias bioactivas con estas características. Como resultados de estudios fitoquímicos se

identificaron estructuralmente los siguientes compuestos de naturaleza fenólica: taninos^{7,8} (hoja y corteza): ácido elágico (sustancia mayoritaria), ácido 3,3',4'-tri-O-metilelágico, ácido 3,3',4'-tri-O-metilelágico-4-O-β-D-glucopiranosido, ácido 3,3'-di-O-metilelágico-4'-O-β-D-xilopiranosido, ácido 3,3'-di-O-metilelágico y la corilagina; así como las cumarinas (corteza):⁸ 6,7-metilendioxicumarina o ayapina, 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina, 6,7,8-trimetoxicumarina, 6,7-dimetoxicumarina o escoparona y la escopoletina.

Los referidos hallazgos evidencian la presencia de variados compuestos de naturaleza fenólica en esta especie, lo que permite justificar que esta planta podría poseer actividad antioxidante. En el caso de los taninos polifenólicos se atribuye a la capacidad de los grupos hidroxilos presentes en su estructura de secuestrar radicales libres;⁹ mientras que las cumarinas son capaces de captar radicales y ser protectores del daño tisular causado por la generación de las ERO, como puede ser el estrés oxidativo asociado al envejecimiento.¹⁰ En un estudio de relación estructura química-actividad farmacológica se comprobó la importancia de la sustitución pirogalol en los derivados del ácido benzoico (ácido gálico y ácido elágico). La sustitución orto-hidroxí confiere actividad secuestradora a los derivados del ácido cinámico (precursor de las cumarinas), ácido cafeico y ácido clorogénico.¹¹

Los antecedentes citados han permitido intuir el posible potencial antioxidante de esta especie, por lo que en el 2018¹² se llevó a cabo la evaluación de esta propiedad para extractos totales y elagitaninos aislados de *G. lucida*. Los resultados demostraron una mejor actividad del extracto total de la hoja con respecto al de la corteza frente a los radicales DPPH (CE_{50} $12,82 \pm 0,12$ $\mu\text{g/mL}$) y ABTS (CE_{50} $13,83 \pm 3,45$ $\mu\text{g/mL}$) y un poder reductor mayor que el ácido ascórbico (104 %). La actividad antioxidante de los elagitaninos evaluados demostró que estos contribuyen directamente, en dependencia de su estructura química, a la capacidad antioxidante de los extractos totales. El ácido elágico mostró la mayor actividad, superior al ácido ascórbico, con CE_{50} de $11,75 \pm 0,53$ $\mu\text{g/mL}$ (DPPH) y $11,28 \pm 0,28$ $\mu\text{g/mL}$ (ABTS) y un poder reductor mayor que el ácido ascórbico

(107 %), lo que lo señala como uno de los metabolitos secundarios de la hoja responsable de la actividad farmacológica.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y la necesidad de la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antioxidante para el tratamiento de enfermedades provocadas por el estrés oxidativo, esta planta podría constituir una alternativa terapéutica dentro del arsenal de fitoterápicos disponibles. Por consiguiente, se necesitan de estudios preclínicos farmacológicos que evalúen la capacidad antioxidante de otro grupo de metabolitos de naturaleza fenólica aislados de esta planta, como las cumarinas. Estas debido a su baja toxicidad, presencia en la dieta y en varios remedios herbolarios son excelentes candidatos para la evaluación de sus propiedades antioxidantes; por lo que este trabajo permitirá aportar las evidencias experimentales necesarias que sustenten su uso medicinal y posible aplicación médico-farmacéutica.

Problema científico: La especie vegetal *G. lucida* Sw. posee insuficientes evidencias científicas de su posible actividad antioxidante, la que ha sido estimada por la presencia de varios compuestos polifenólicos (taninos derivados del ácido elágico y cumarinas) aislados de la hoja y la corteza.

Hipótesis: Si los extractos etanólico y de diclorometano, así como las cumarinas aisladas de la corteza de *G. lucida* Sw. muestran actividad antioxidante, entonces podrán ser utilizados como materias primas para la preparación de formulaciones farmacéuticas destinadas al tratamiento de enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

Objetivo General:

Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico, de diclorometano (fase) y cumarinas aisladas de la corteza de la especie *Gymnanthes lucida* Sw.

Objetivos específicos:

1. Determinar la composición química cualitativa del extracto etanólico y de diclorometano (fase) obtenidos a partir de la corteza de la especie.
2. Determinar la actividad secuestradora de radicales libres y poder reductor *in vitro* del extracto etanólico, de diclorometano (fase) y cumarinas aisladas de la corteza de la especie.



Capítulo 1: Revisión Bibliográfica

CAPÍTULO I. Revisión Bibliográfica

I.1 Proceso de oxidación celular. Definición

El oxígeno (O_2) es necesario para la vida de la mayoría de los seres vivos, ya que actúa en la respiración mitocondrial como aceptor final de cuatro electrones, dando lugar a una molécula de agua. Cuando la reducción del oxígeno es parcial se generan especies reactivas derivadas, conocidas como radicales libres. Así, cuando captan un electrón, se produce el radical superóxido (O_2^-), que puede dar lugar a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al radical hidroxilo (OH^-), resultando este el más perjudicial de todos. A nivel biológico y fisiológico, la oxidación celular es el proceso de alimentación y desgaste de las células.¹³

I.1.1 Radicales libres y especies reactivas del oxígeno. Concepto y mecanismos fisiológicos de generación

Los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón no apareado o impar en el orbital externo. En estas condiciones buscan otro electrón para poder parearse, por lo que son muy reactivos y tienen una vida media corta, lo que condiciona que actúen cercano al sitio en que se forman. Estas pequeñas moléculas se producen mediante diferentes mecanismos que tienen lugar en la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos. De forma general, las reacciones de oxidación producen daño celular (oxidativo) al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. No obstante lo expresado anteriormente, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo, como es la de participar en la fagocitosis, favorecer la síntesis de colágeno y prostaglandinas. Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicálicas, que originan agentes prooxidantes y son las especies reactivas del oxígeno (EROS).¹⁴

Los radicales libres del oxígeno se clasifican de la forma siguiente:

1. Radicales libres inorgánicos o primarios: Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados en la reducción de

este y se caracterizan por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido, el radical hidroxilo y el óxido nítrico.

2. Radicales libres orgánicos o secundarios: Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de dos radicales primarios entre sí. Poseen una vida media un tanto más larga que los primarios y los principales átomos de las biomoléculas son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre.

3. Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno: Aquí se incluye un grupo de especies químicas que, sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito, el hidroperóxido orgánico.¹⁵

Los radicales libres se generan a nivel intracelular y extracelular. Entre las células relacionadas con la producción de radicales libres del oxígeno, están los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales. Las enzimas oxidantes involucradas son la xantina oxidasa, la indolamindioxigenasa, la triptófano dioxigenasa, la mieloperoxidasa, la galactosa oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, la monoaminoxidasa y la NADPH oxidasa. Se reconoce ampliamente la relación de productos cíclicos de naturaleza redox, como son el paraquat, diquat, alloxano, estreptozozina y doxorubicina con los radicales libres. También se producen radicales libres por la administración de paracetamol, tetracloruro de carbono y furosemida. No se deben olvidar agentes como el humo del cigarrillo, las radiaciones ionizantes, la luz solar, el shock térmico y las sustancias que oxidan el glutatión (GSH) como fuentes de radicales libres.¹⁵

Existen otras circunstancias en que también se producen radicales libres, como son:

- Dieta hipercalórica.
- Dieta insuficiente en antioxidantes.
- Procesos inflamatorios y traumatismos.
- Fenómenos de isquemia y reperfusión.

I.1.2 Estrés oxidativo. Fisiopatología y enfermedades asociadas

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de ERO. Todo esto trae como consecuencia alteraciones en la relación estructura-función de cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto, se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos.^{16,17}

Son numerosas las patologías que han sido asociadas con este desbalance entre oxidantes y antioxidantes: la aterosclerosis, trombosis, hipertrofia, el cáncer, la enfermedad de Alzheimer y Parkinson, la Diabetes mellitus, enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas, cataratas y retinopatía, situaciones de injuria por isquemia y repercusión en los tejidos, el síndrome de distrés respiratorio, asma, psoriasis, anemia de Falconi, así como otras de causas multiorgánicas como intoxicaciones, envejecimiento y cáncer.¹⁶⁻¹⁹

I.2 Antioxidantes. Generalidades

Los antioxidantes son compuestos químicos importantes en la prevención o reducción del daño oxidativo de los componentes celulares causados por las ERO. Estos tienen la capacidad de evitar o reducir la intensidad de las reacciones de oxidación a lípidos, proteínas, ADN, o cualquier otro tipo de molécula.²⁰ Los seres vivos desarrollan sistemas de defensa antioxidantes, que no es suficiente en ocasiones para combatir los procesos oxidativos.²¹ Estos sistemas complejos incluyen una amplia variedad de componentes, de origen endógeno y exógeno, que actúan de forma interactiva y sinérgica. La defensa antioxidante puede ser enzimática o no enzimática, así como ser un sistema reparador de moléculas.²²

No existe un único criterio para la clasificación de los antioxidantes, porque varios de ellos actúan por diversos mecanismos. Entre los que se reportan en la literatura, se pueden

citar: según fuentes de origen (natural y sintético), modo de acción (preventivas y bloqueadoras de cadena) y sobre organismos vivos (primarios, secundarios y terciarios).²³

Arrate Lacalle en el 2007, informó que los mecanismos de acción antioxidantes primarios previenen la formación de nuevos radicales libres (RL), convirtiendo a los existentes en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar y aumentar así su número (Ejemplos: antioxidantes de naturaleza enzimática, como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa). Por otro lado, los secundarios tienen la función de capturar los RL, evitando así que se produzcan reacciones en cadena (Ejemplos: Vitamina E, C y β -caroteno). Los terciarios son aquellos que reparan biomoléculas dañadas por los ataques mediados por RL (Ejemplos: Enzimas reparadoras de ADN, proteínas y lípidos).²³⁻²⁵

El uso de antioxidantes sintéticos está bajo estricta regulación, debido a la incertidumbre sobre su seguridad (carcinogénesis y hepatotoxicidad), lo que ha motivado en la actualidad el interés creciente en los productos naturales para atenuar el daño oxidativo.²⁶ Los antioxidantes vegetales funcionan como captadores de ERO, eliminadores de peróxidos e inhibidores de enzimas²³.

I.3 Métodos para evaluar actividad antioxidante

La medición de la actividad antioxidante resulta de gran interés para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

Los métodos de determinación de esta actividad se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad del compuesto o la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo.

Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en la medida del punto final, en la técnica instrumental utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción. Además, los objetivos de los diferentes métodos de medida son diversos. Entre ellos se señala la medida de la resistencia de un compuesto a la oxidación, la evaluación cuantitativa del aporte en sustancias antioxidantes o la

evaluación de la actividad antioxidante del plasma una vez ingerido un alimento. Los métodos *in vitro* son útiles para comparar la actividad antioxidante de diferentes muestras.²⁷

La gran diversidad de antioxidantes naturales hace difícil separar, detectar y cuantificar antioxidantes individuales de una compleja matriz biológica donde la actividad combinada de estos puede resultar de mayor relevancia. Por esta razón, generalmente se evalúa el poder antioxidante total directamente de extractos de plantas. Actualmente no existe un único ensayo para la evaluación de la capacidad antioxidante, por la falta de métodos de cuantificación estandarizados. Lo que significa que la actividad antioxidante de una muestra no puede ser determinada basándose solo en un ensayo de prueba.²⁸

Hoy en día se tienen en cuenta una cierta cantidad de modelos de test *in vitro* (Tabla I) para evaluar la actividad antioxidante de una muestra de interés.²⁹

Existe una batería de ensayos que permiten obtener información complementaria sobre el poder antioxidante, los que se desarrollan por diferentes mecanismos de reacción química. Estos se clasifican en dos categorías: ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), donde se monitorea una reacción cinética competitiva y generalmente están compuestos de un generador de radical libre sintético, una prueba molecular oxidable y un antioxidante. El otro ensayo se basa en la reacción por transferencia de electrones (ET), que involucra una reacción redox con el oxidante, como un indicador del punto final de la reacción. Los ensayos basados en HAT y ET miden la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra (Figura 1).³⁰

En función de estos se destacan diferentes ensayos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales. El uso de radicales estables coloreados como el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) o reactivos como el complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) se recomiendan como criterio preliminar para jerarquizar las distintas plantas, extractos o fracciones de éstas de acuerdo a su poder antioxidante.

Tabla 1. Métodos *in vitro* para medir capacidad antioxidante.²⁹

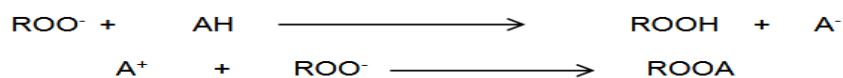
Método	Instrumentación ^a	Relevancia biológica ^b	Mecanismo ^c	Punto final	Quantificación ^d	Lipófilos -hidrófilos ^e
CARO	—	+++	TAH	Tiempo	ABC	+++
PATAR	++	+++	TAH	Fase de inducción	CE ₅₀ , Fase de inducción	--
CRHF	---	--	TE	Tiempo	Absorbancia	---
ABTS	—	—	TE-TAH	Tiempo	Absorbancia	+++
DPPH	—	—	TE-TAH	Tiempo	Absorbancia CE ₅₀	—

Leyenda:

CARO: Capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno, **PATAR:** Parámetro antioxidante total de atrapamiento de radicales, **CRHF:** Capacidad para reducir el hierro férrico.

^aDe la más (+++) a la menos (---) especializada, ^bDel más (+++) al menos (---) relevante, ^c-TAH: Transferencia de átomos de Hidrógeno, **TE:** Transferencia de electrones, ^d- ABC: Área Bajo la Curva, ^e- Del más (+++) al menos (---) adaptable.

1. Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT).



19

2. Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET).



Figura 1. Mecanismos de reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (TAH) y transferencia de electrones (TE).³⁰

I.4 Familia Euphorbiaceae. Características generales

En el mundo existen millones de especies pertenecientes a diferentes familias botánicas, cada una tiene su peculiaridad y de ahí su interés en la investigación relacionada a su uso. Una de estas es la Euphorbiaceae, con mayor amplitud en cuanto al número de especies que la componen y en lo que a su distribución mundial se refiere.³¹ Esta familia, descrita por Antoine Laurent de Jussieu, está integrada aproximadamente por 432 géneros y 8000 especies, distribuidas en diferentes regiones del mundo. En las Américas existen cerca de 2500 especies distribuidas en 92 géneros,^{32,33} siendo su mayor diversidad en las regiones tropicales y subtropicales, fundamentalmente en la región Indo-Malaya y la América tropical, existiendo también una amplia variedad en el África tropical, aunque no tan abundante ni variada como en las otras dos regiones.³³ Tanto la familia como los géneros que la integran, presentan una grande y compleja diversidad morfológica.³² Es la sexta familia más diversa de las plantas con flores. La familia Euphorbiaceae está representada en Cuba por 48 géneros y 330 especies.³⁴ Algunos de los géneros más importantes son: *Jatropha*, *Croton*, *Euphorbia*, *Hippomane*, *Aleurites*, *Sapium* y *Gymnanthes*.

I.4.1 Géneros *Gymnanthes* y *Excoecaria*. Aspectos generales

Gymnanthes es un género de plantas con flores. Posee 45 especies y es pantropical. Pertenece a la tribu Hippomaneae y fue establecido por Swartz (1788) a partir de *G. elliptica* y *G. lucida*.³⁵ Se considera uno de los géneros de mayor dificultad taxonómica de esta tribu, por poseer límites intra e intergenéricos poco comprendidos y por presentar diversos problemas de nomenclatura y de tipificación, lo que ha traído como consecuencia que algunas de sus especies a lo largo de varios años hayan sido reclasificadas al género *Excoecaria*, por ejemplo: *E. lucida*, *E. albicans*, *E. pallens*, *E. glandulosa*.³⁶

Debido a su complejidad taxonómica, el género *Gymnanthes* posee pocos reportes bibliográficos. Solo se reporta para *Gymnanthes pallens* (Griseb.) Muell. Arg. (*Excoecaria pallens* Griseb., *Excoecaria tenax* Griseb. sin"), ensayos químicos cualitativos para la identificación de saponinas y alcaloides por métodos convencionales³⁷ y para *Gymnanthes albicans* (Gris) Sw. (*Excoecaria albicans* Griseb "sin") (Amansaguapo), su empleo en Camagüey para baños y fines misteriosos.³⁸

En este trabajo se hace referencia a especies de *Excoecaria*, ya que posee los mayores reportes bibliográficos. *Excoecaria* es un género de Euphorbiaceae, descrito formalmente por Linnaeus en 1759. Es nativo de los trópicos del viejo mundo (África, Asia Meridional, norte de Australia y las diversas Islas Oceánicas). Comprende cerca de 40 especies, algunas de ellas utilizadas en la Medicina Herbolaria Tradicional.³⁹

I.4.1.1 Antecedentes de estudios científicos para el género *Excoecaria*

En el 2002, según reporte de Bandaranayeke, la infusión de las hojas de *E. agallocha* posee propiedades antioxidantes y antitumorales.⁴⁰ En el 2009, Hossain y colaboradores estudian extractos de la corteza, con el objetivo de determinar el contenido de polifenoles totales y evaluar la actividad antioxidante y antihistamínica. Los resultados obtenidos muestran que el mayor contenido de fenoles totales y la mayor actividad antioxidante (por el método de secuestro del radical estable DPPH[•]) y antihistamínica (según el ensayo de liberación de histamina inducida por el ionóforo A23187) fueron para la fracción acuosa, seguida de la fracción etanólica. La cromatografía en capa delgada realizada a las fracciones reveló la presencia de compuestos análogos al ácido elágico y al lupeol en las etanólicas y clorofórmicas, respectivamente. Estos resultados demuestran que la corteza de *E. agallocha* puede ser considerada como una fuente potencial de productos naturales antioxidantes y antihistamínicos.⁴¹

Un estudio desarrollado en la India en 2009 por Ku Patra evaluó la actividad antioxidante y antifilarial de los extractos de las hojas de *E. agallocha* L. empleando diferentes disolventes. Los resultados obtenidos arribaron que esta especie puede ser una fuente potencial de agentes para tratar el estrés oxidativo generado durante manifestaciones crónicas y para evitar la embriogénesis de parásitos.⁴²

Otro de los estudios encontrados para esta especie, fue en el 2012, donde Arumugam y colaboradores evaluaron la actividad antioxidante de los extractos metanólicos obtenidos de ejemplares de *E. agallocha*. Se utilizó el método de secuestro del radical DPPH[•] y se obtuvo resultados notables en torno a un 80 % de inhibición de este en los extractos de plantas micropropagadas, con un CE₅₀ en un rango 10,2 a 128 µg/mL. El contenido de fenoles totales, según el método colorimétrico de Folin Ciocalteu fue mayor para las

plantas cultivadas *in vitro*, obteniéndose una alta correlación entre la actividad antioxidante mostrada por ambos extractos y el contenido de fenoles totales.⁶

I.4.1.2 *Gymnanthes lucida* Sw. Sinonimias

Gymnanthes lucida Sw., 1788; *Excoecaria lucida* (Sw.), 1800; *Sebastiania lucida* (Sw.) Müll. Arg., 1866; *Ateramnus lucidus* (Sw.) Rothm., 1944 (Figura 2).³⁶

I.4.1.2.1 Nombres comunes

Yaití, aité, aceitillo, aité, nagrona, yaité bobo, yaitecillo, yaya macho (Cuba), crabwood, crabbush, oysterwood, poisonwood (Estados Unidos, Florida), crabwood (Bahamas, Jamaica), baboncillo (Perú), bois marbré, bois marbré greadilla (Haití), granadillo, greadilla, huevo de chivo, jabacón, juan prieto, palo de hueso, palo de tabaco, tabacón (República Dominicana), boisvert, casse haches, colas, ebène verte, ebène verte brune (Francia), false lignum-vitae (Belice), yaitil (México), ramón, yaití, tabaco (Puerto Rico), pij (Guatemala), kitwood (Antillas menores).^{36,38,39,43}

I.4.1.3 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Euphorbiales

Familia: Euphorbiaceae

Subfamilia: Euphorbioideae

Género: *Gymnanthes*

Especie: *Gymnanthes lucida* Sw.^{44,45}

I.4.1.4 Hábitat y distribución

Comúnmente se distribuye en los trópicos, fundamentalmente en la región Indo-Malaya y en la América tropical.^{46,32} Esta especie se encuentra en Bahamas, Cuba, Hispaniola, Jamaica, Puerto Rico, Islas Vírgenes, Anguilla, Antigua, Barbuda, Guadalupe, Marie



Figura 2. *Gymnanthes lucida* Sw.

Galante, Saba, St. Barthélemy, St. Eustatius y México. Se encuentra formando hamacas costeras en todo el sur de la Florida, las Antillas, el Caribe, Guatemala y Belice.⁴³

Crece en varias regiones de Cuba, como los macizos montañosos de la Sierra Maestra y Nipe-Sagua-Baracoa, en los cayos Las Vacas y Venado de la Ciénaga de Zapata,^{38,47} el Parque Nacional de Viñales en Pinar del Río, en la loma El Palenque, provincia Mayabeque; en la Sierra de Cubitas, específicamente en las localidades de Cerro Mirador de Limones, Cerro de Tuabaquey y Paso de Vigüeta, provincia de Camagüey;⁴⁸ en la Reserva Ecológica Siboney-Juticí y toda la zona costera de Ciudadamar en Santiago de Cuba.

I.4.1.5 Usos etnofarmacológicos

Se reporta el cocimiento de la corteza para el dolor de muelas. El látex cáustico y venenoso destruye los callos aplicándolo en esas partes de modo continuo. El humo de su leña se dice dañino para la vista.³⁸ Informaciones etnofarmacológicas reportan el uso de las hojas como antimicrobiano y antiasmático (zonas rurales y costeras de Santiago de Cuba).⁴⁹

I.4.1.6 Antecedentes de estudios químicos para la especie

En el 2005, Pino y colaboradores reportaron la composición química del aceite extraído a partir de la hoja, utilizando cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. Se identificaron un total de 99 compuestos, de los cuales el espatulenol (16,6 %), metilfarnesoato (11,4 %) y α -pineno (9,7 %) resultaron ser los componentes mayoritarios.⁵⁰

Ochoa en el 2015 llevó a cabo un estudio fitoquímico con las hojas, donde al extracto total se le determinó su composición química cualitativa y posteriormente se fraccionó con disolventes. La fase de mayor rendimiento fue estudiada por cromatografía líquida de alta resolución y aislada la sustancia mayoritaria. Esta fue caracterizada por espectroscopía infrarroja y de Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C a 500 MHz, uni y bidimensional (HMQC, HMBC, COSY y NOESY). Dicho procedimiento permitió la identificación cualitativa de alcaloides, triterpenos y esteroides, quinonas, flavonoides, cumarinas, lactonas sesquiterpénicas, fenoles y taninos. La fase de mayor rendimiento fue la butanólica (23,48

g) y se logró aislar e identificar el compuesto mayoritario perteneciente a un hemiterpenoide: (2E)-2-metil-2-buten-1,4-diol-1-O-β-D-glucopiranosido.⁴⁹

Otras investigaciones fitoquímicas que fueron llevadas a cabo a través de proyecto de investigación CAPES/MES/CUBA, involucraron la aplicación de diversas técnicas cromatográficas y espectroscópicas a extractos totales y fases derivadas de la hoja y la corteza, las que resultaron en el aislamiento y caracterización estructural de 41 compuestos bioactivos.^{7,8} Las principales familias de compuestos identificados estuvieron representadas por esteroides, diterpenos, triterpenos, taninos y cumarinas. Se reportó por primera vez para la hoja de la especie la presencia de taninos, tales como: el ácido 3, 3', 4'-tri-O-metilelágico-4-O-β-D-glucopiranosido, el ácido 3, 3', 4'-tri-O-metilelágico, el ácido elágico y la corilagina⁷; mientras que para la corteza, el ácido 3,3',4'-trimetoxielágico, el ácido 3,3'-di-O-metilelágico y el ácido 3,3'-di-O-metilelágico-4'-O-β-D-xilopiranosido (Figura 3).⁸ La corilagina ya ha sido aislada de *E. kawakamii*⁵¹ y el ácido elágico de *E. agallocha*.⁵² El tanino ácido elágico resultó ser la sustancia mayoritaria de las caracterizadas para la hoja (784,29 mg),⁷ lo que coincide con estudios previos realizados en *E. agallocha*.^{39,52}

Otros hallazgos fueron de estructuras cumarínicas (Figura 4), como la 5-metoxi-6,7-metilendioxicumarina, la 6,7-metilendioxicumarina o ayapina, la 6,7,8-trimetoxicumarina o dimetilfraxetina y la 6,7-dimetoxicumarina o escoparona, las que se reportaron por primera vez para la corteza de la especie.⁸ La escopoletina ha sido reportada para *E. acerifolia*.⁵³

Arró en el 2018 realizó una caracterización cualitativa y cuantitativa de los metabolitos secundarios presentes en los extractos totales de la hoja y la corteza. Se cuantificaron los fenoles, flavonoides y azúcares reductores totales por los métodos de Folin-Ciocalteu, de cloruro de aluminio y ácido dinitro-salicílico, respectivamente. Se identificaron cualitativamente triterpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, poliurónidos, quinonas, azúcares reductores, aceites esenciales, fenoles, taninos y flavonoides. Los metabolitos cuantificados fueron mayores en el extracto total de la hoja con respecto a la corteza.¹²

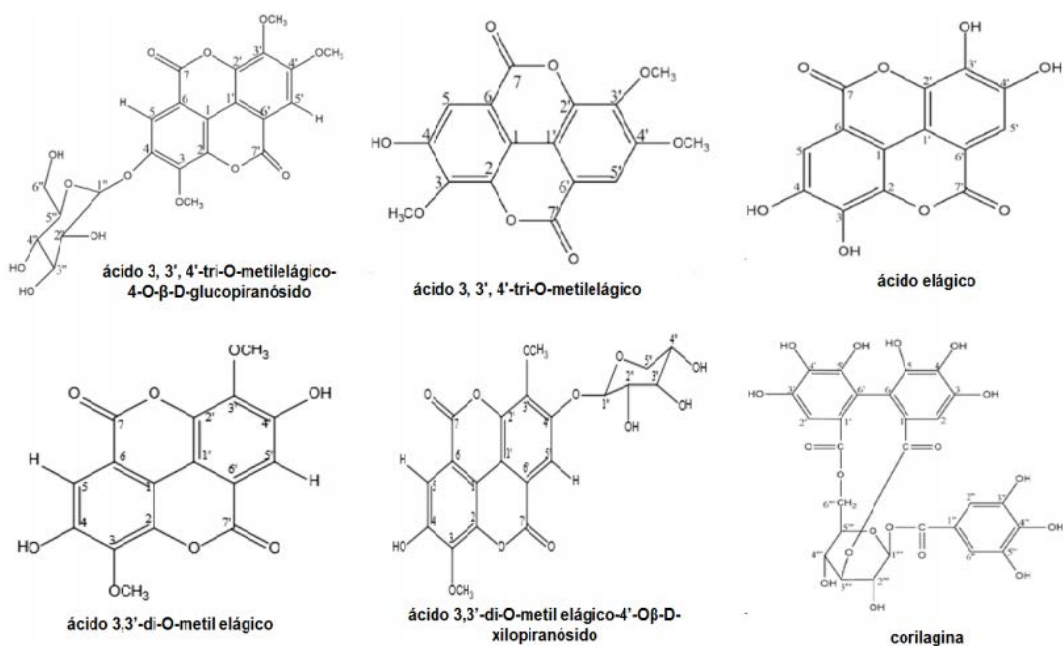


Figura 3. Taninos aislados de la hoja y la corteza de *Gymnanthes lucida* Sw.^{7,8}

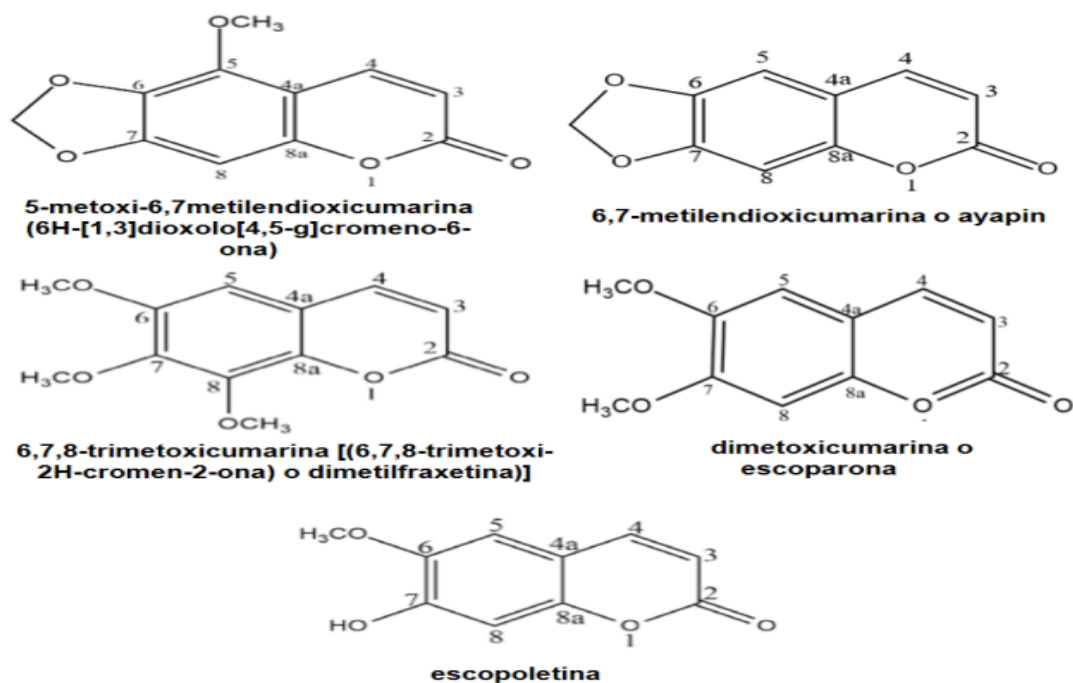


Figura 4. Cumarinas aisladas de la fase de diclorometano a partir del extracto total de la corteza de *G. lucida* Sw.⁸

I.4.1.7 Antecedentes de estudios farmacológicos para la especie

Pérez y colaboradores en el 2001 evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de la corteza de esta especie, utilizando el método de difusión en disco. Los resultados mostraron actividad del extracto metanólico frente a *S. choleraesuis*, *P. vulgaris* y *B. pumillis*; del extracto acuoso frente a *S. lutea* y de ambos frente a *S. epidermidis*. Los resultados negativos fueron para *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *V. cholerae*.⁵⁴

Un estudio publicado en la revista Pharmacognosy Research del 2017 informa sobre la evaluación de la citotoxicidad *in vitro* y la actividad antimicrobiana de las hojas, a través de un fraccionamiento bioguiado. Las muestras más activas fueron la fase de acetato de etilo y el ácido elágico con CE_{50} de 128 $\mu\text{g/mL}$ frente a siete y cinco cepas de microorganismos, respectivamente. El extracto total (CC_{50} = 512 $\mu\text{g/mL}$) y la fase de acetato de etilo (CC_{50} = 128 $\mu\text{g/mL}$) fueron citotóxicos en las líneas celulares: MRC-5 SV2 y RAW 264.7, mientras que la fase de butanol y el ácido elágico, ambos con CC_{50} > 2048 $\mu\text{g/mL}$, son más seguros. Los resultados que se obtuvieron indican que las hojas de *E. lucida* pueden ser usadas convencionalmente como antimicrobiano, pero hay que tener en cuenta la posible aparición de citotoxicidad.⁷

En el 2018, Da Silva y colaboradores publicaron en la Revista Medicinal Chemistry un artículo sobre la evaluación de la actividad anti-trypanosoma *in vitro* de fases, el ácido elágico (EL_1) aislado de las fases de acetato de etilo (AE) y de butanol y la mezcla 1:1 de estigmasterol-3-O- β -D-glucopiranosido y sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido (EL_2) de la fase de hexano (Hex), ambos de la hoja. Se demostró que los compuestos EL_1 y EL_2 fueron más activos frente a las formas tripomastigotas sanguíneas, con CE_{50} de $53,0 \pm 3,6$ y $58,2 \pm 29,0$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. El compuesto EL_1 y la fase AE mostraron un 70 % de inhibición de la forma intracelular del *Trypanosoma cruzi*. Los ensayos de toxicidad demostraron que después de 96 h de tratamiento, solamente las fases de Hex y AE presentaron citotoxicidad detectable a 200 $\mu\text{g/mL}$. EL_1 y EL_2 son reportados por primera vez para las hojas de la especie. Se concluyó que estos resultados sirven de base para futuras investigaciones sobre el tratamiento de la enfermedad de Chagas.⁵⁵

Arró en el 2018 realizó la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de extractos totales de la hoja y la corteza, así como elagitaninos aislados a partir de los mismos. Los ensayos de DPPH[•]; ABTS^{•+} y Poder reductor permitieron evaluar la actividad antioxidante de las muestras. El extracto total de la hoja manifestó una mejor actividad respecto al de la corteza frente a los radicales ABTS^{•+} y DPPH[•], con CE₅₀ de $13,83 \pm 3,45 \mu\text{g/mL}$ y $12,82 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$, respectivamente y para el poder reductor una absorbancia máxima de 1,887. La actividad antioxidante de los elagitaninos aislados demostró que estos contribuyen directamente, en dependencia de su estructura química, a la capacidad antioxidante de los extractos totales. El ácido elágico, componente mayoritario de las hojas, demostró poseer la mayor actividad antioxidante, lo que lo señala como uno de los metabolitos secundarios de este órgano responsable de la actividad.¹²

I.5 Cumarinas

I.5.1 Características generales

El nombre de cumarinas es derivado de “coumarou”, que es el nombre común de Tonka bean (*Dipteryx odorata* Willd, Fabaceae), de la cual fue aislada la cumarina en 1820.⁵⁶

Las cumarinas están distribuidas en varias familias de plantas, como Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Fabaceae, Oleaceae, Moraceae y Timelaeaceae. Están presentes en semillas, raíces, tallos, hojas, flores y frutos, aunque las concentraciones más altas se reportan en estos dos últimos órganos. También han sido aisladas de microorganismos y esponjas. Son producidas a partir de la fenilalanina, mediante la vía del ácido shikímico. Estas se pueden clasificar como simples, furanocumarinas, dihidrofuranocumarinas, piranocumarinas (lineales y angular), fenilcumarinas y biscumarina.⁵⁷

Químicamente son compuestos heterocíclicos oxigenados derivados de la α -pirona (benzo-1,2-pirona). En general son lactonas insaturadas y comprenden una clase de compuestos C₆-C₃. Prácticamente todas, a excepción de la cumarina de origen natural, poseen un sustituyente oxigenado en posición 7. La 7-hidroxycumarina es conocida como umbeliferona, la que puede ser considerada como el precursor de estas. Los grupos hidroxílicos pueden estar metilados o unidos a azúcares formando heterósidos.⁵⁸

Las cumarinas han atraído considerablemente la atención de los químicos farmacéuticos y farmacólogos en los últimos tiempos, ya que se le han demostrado actividades farmacológicas, como antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, analgésica, anticancerígena, ulcerogénica, antimalárica, antihiperlipidémica, inhibidor de la tirosina y de la colinesterasa, anticonvulsivante, antiparkinsoniana, antihepatitis, anticoagulante y vasorelajante.⁵⁶

Estudios reportados desde 1965 plantean que las cumarinas son una fuente primaria de sustancias con características antioxidantes. Las cumarinas 3,4-diheterosustituidas son análogos estructurales del ácido ascórbico. Dicha analogía puede explicar el mecanismo de acción antioxidante de estos compuestos.^{59,60}

1.5.2 Estudios farmacológicos de las cumarinas aisladas en *G. lucida* Sw.

La *escopoletina* es una cumarina que se encuentra en la raíz de las plantas del género *Scopolia* (*Scopolia carniolica* o *Scopolia japonica*), en *Cichorium intybus*, *Artemisia scoparia*, en el género *Passiflora* y *Brunfelsia*, en *Viburnum prunifolium*, *Kleinhovia hospita* y *Nicotiana glauca*. La biosíntesis de la *escopoletina* está relacionada con la de la umbeliferona y la esculetina.⁶¹ Estudios realizados en el 2009 demostraron que esta regula la presión sanguínea cuando está elevada, ha mostrado actividad bacteriostática frente a varias cepas, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, además de presentar actividad antiinflamatoria. Puede ser utilizada para el tratamiento de enfermedades bronquiales.⁶²

Malik y colaboradores en el 2011 publicaron la evaluación de sus propiedades antioxidantes *in vitro*, mediante los ensayos de DPPH[•], secuestro del radical peróxido de hidrógeno, anión superóxido, radical hidroxilo y la actividad quelante de iones ferrosos. Se utilizó α -tocoferol como antioxidante de referencia a un nivel de concentración de 45 μ g/mL. La *escopoletina* mostró 63,79 %, 70,21 %, 68,98 %, 39,97 % y 38,61 %, respectivamente, de actividad de captación de radicales libres en estos ensayos. Por otro lado, el α -tocoferol mostró 84,54 %, 92,51 %, 74,98 %, 49,76 % y 32,17 %, respectivamente. La *escopoletina* reveló una alta actividad secuestradora del radical peróxido de hidrógeno, seguida del anión superóxido y luego DPPH[•]. Este compuesto

puede desempeñar un papel importante en la regulación de los radicales libres generados a través de diversas actividades metabólicas corporales, como el transporte mitocondrial de ácidos grasos libres de cadena larga y la cadena de transporte citocromo-P450. Estos datos sugieren que este puede modular el estrés oxidativo endógeno y ser un nutracéutico eficaz para anular el estrés oxidativo en el cuerpo.⁶³

En el 2005 se llevó a cabo un estudio con la especie *Artemisia capillaris* (Compositae), la cual se ha utilizado en países orientales para el tratamiento de la hepatitis e infecciones del tracto biliar. Se reportó que la *escoparona* es un componente importante de esta especie y que no mostró ningún efecto citotóxico en macrófagos no estimulados, pero redujo la liberación de óxido nítrico (NO) y prostaglandina E2 (PGE2) tras la estimulación por interferón- γ plus (IFN- γ /LPS) o LPS. Se informó además que los efectos inhibitorios están relacionados con la supresión de las enzimas óxido nítrico sintetasa (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en células RAW 264.7 estimuladas por IFN- γ /LPS. Igualmente atenuó la producción del factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β e IL-6 en células RAW 264.7 estimuladas por lipopolisacáridos. Estos resultados sugieren que la *escoparona* disminuye la producción de mediadores inflamatorios como el NO y PGE2 en macrófagos al inhibir la expresión de iNOS y COX-2.⁶⁴

Otro estudio en el 2015, para esta misma especie, fue realizado con el objetivo de evaluar el efecto anti-osteoporosis de la *escoparona* y su mecanismo subyacente *in vitro*. Este compuesto demostró una potente capacidad antioxidante celular. Durante la diferenciación de los osteoclastos, la producción de especies reactivas del oxígeno (EROS), entre estos el anión superóxido, se redujo de forma dosis dependiente con la *escoparona*. Los resultados generales indican que el efecto inhibitorio de esta sustancia en la diferenciación de osteoclastos se atribuye a un efecto supresor en la producción de EROS y aniones superóxido, al inhibir la expresión y activación de la NADPH oxidasa, mientras que el efecto secuestrador de EROS resulta de una expresión elevada de la superóxido dismutasa 1 y la catalasa.⁶⁵

Witaicenis y colaboradores en el 2014 evaluaron las propiedades antioxidantes de seis cumarinas obtenidas a partir de fuentes vegetales, entre ellas, *escopoletina* y *escoparona*,

para correlacionarlas con la actividad antiinflamatoria intestinal. La *escoparona* produjo uno de los mejores efectos protectores en el proceso inflamatorio.⁶⁶

Konstantina y colaboradores informaron sobre la actividad relajante muscular en ratas de la *escoparona* y la relación de esta propiedad con un efecto secuestrador del anión superóxido y potenciación de la liberación de prostaciclina.⁶⁷

Sobre la *ayapina* se ha reportado que disminuye el tiempo de coagulación sanguínea y muestra actividad tripanocida, antifúngica y antibacteriana.⁶⁸



Capítulo II: *Materiales y Métodos*

CAPÍTULO II. Materiales y Métodos

II.1 Características generales de la investigación

Se realizó un estudio prospectivo, experimental, preclínico farmacológico *in vitro* para la evaluación de la actividad antioxidante del extracto etanólico, de diclorometano (fase) y cumarinas aisladas de la corteza de la especie *Gymnanthes lucida* Sw.

Los ensayos fueron realizados en los laboratorios MEDICUBA/SUIZA del Departamento de Farmacia de la Universidad de Oriente (UO), Cultivo Celular del proyecto VLIR del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) y Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED) de Santiago de Cuba, en el período de tiempo comprendido entre Enero-Mayo del 2019.

II.2. Obtención de las muestras

Las muestras que se evaluaron provienen de investigaciones⁸ del grupo de productos naturales del Departamento de Farmacia de la UO, conformando un total de seis a partir de la corteza de la especie.

- ✚ Muestra 1: Extracto total etanólico (ET).
- ✚ Muestra 2: Fase de diclorometano (FD).
- ✚ Muestra 3: Escopoletina (ESP).
- ✚ Muestra 4: Escoparona (SCP).
- ✚ Muestra 5: 6,7,8-trimetoxicumarina (TMX).
- ✚ Muestra 6: Ayapina (AYA).

II.3 Caracterización química de los extractos

Este estudio se realizó de forma cualitativa al extracto etanólico y de diclorometano (fase). Para llevar a cabo los ensayos químicos se prepararon disoluciones de 1 mg/mL a partir de 10 mg de los dos extractos en 10 mL de etanol 95 %.

II.3.1 Determinación cualitativa de los metabolitos

Para la determinación cualitativa se utilizaron los ensayos químicos descritos en la técnica de tamizaje fitoquímico,⁶⁹ para las siguientes clases de metabolitos secundarios: alcaloides (Dragendorff, Mayer y Wagner), triterpenos y esteroides (Liebermann-Burchard, Solkowski

y Rosemheim), quinonas (Borntrager), cumarinas (Baljet y Legal), saponinas (espuma), azúcares reductores (Fehling), fenoles y taninos (Cloruro férrico), carbohidratos (Molish), aminoácidos y aminas libres (Ninhidrina), flavonoides (Shinoda, ácido sulfúrico concentrado, álcalis y Rosemheim), resinas (ensayo de resinas) y aceites esenciales y sustancias grasas (Sudán III).

II.4. Evaluación de la actividad antioxidante

Debido a que no existe un único método capaz de medir la verdadera capacidad antioxidante de un compuesto, se decidió evaluar la actividad de las muestras objeto de estudio mediante tres metodologías: la capacidad de secuestro de los radicales DPPH[•] y ABTS^{•+} y la determinación del poder reductor.

II.4.1 Preparación de las disoluciones de las muestras a evaluar

Para todas las muestras se parte de una disolución madre de concentración 1 mg/mL en metanol absoluto (DPPH) o agua (ABTS y poder reductor), en dependencia de las metodologías que se emplearon.^{29,70} A partir de estas se derivaron las diluciones pertinentes para la realización de los ensayos antioxidantes. Para la definición del rango de concentraciones evaluadas se tuvieron en cuenta las cantidades disponibles para cada una de las muestras, así como reportes de investigación y bibliográficos.^{6,12}

II.4.2. Actividad antioxidante frente al radical DPPH[•]

Para la realización de este ensayo se tuvo en cuenta la modificación de Clarke y colaboradores, 2013.⁷¹ Se utilizó el radical 2,2 difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]) (Sigma-Aldrich®) a una concentración de 0,2 mM en metanol absoluto (EMSURE®). Este radical tiene un electrón desapareado y presenta una coloración violeta, pero cuando entra en contacto con un antioxidante capaz de donar un átomo de hidrógeno se reduce a DPPH-H con la consiguiente pérdida del color a amarillo tenue y por tanto una disminución de la absorbancia.

Se adicionaron 100 µL de cada una de las muestras (10-200 µg/mL) en una microplaca de 96-pocillos desde la primera hasta la última fila. Posteriormente un volumen de 100 µL de la solución del radical DPPH (0,2 mM) fue adicionado a cada pozo de la microplaca. Luego

de homogeneizar suavemente, la placa fue cubierta con papel metálico, incubada a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 30 min. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 517 nm en un lector de microplacas (FLUORstar Optima, Suiza). Cada muestra fue ensayada por triplicado y se utilizó ácido ascórbico en metanol (9-200 µg/mL) como control positivo. Se consideró como blanco, pocillos conteniendo 200 µL de la solución de DPPH y metanol.

La capacidad de secuestro del radical se determinó mediante el cálculo del porcentaje de inhibición (PI) de este a través de la ecuación 1:

Ecuación 1:

$PI\ DPPH\ \% = (AB - AM) / AB * 100$, donde:

AB = Absorbancia del blanco.

AM = Absorbancia de la muestra.

Un porcentaje de inhibición mayor al 50 % se definió como una muestra activa.

La capacidad antioxidante ante este radical se expresó como la concentración efectiva para secuestrar el 50 % del radical DPPH[•] (CE₅₀).

II.4.3. Actividad antioxidante frente al radical ABTS^{•+}

Este ensayo se rigió según la metodología diseñada por Choi *et al.*, 2002.⁷² El radical ABTS^{•+} [(2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico)] se obtuvo por la mezcla de 7 mM de ABTS y 2,45 mM de persulfato de potasio en agua destilada, dejando reposar la mezcla durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. Para ello se tomó 6 mL de la mezcla y se diluyó con 500 mL de agua destilada, luego a 50 µL de cada muestra se le añadieron 3 mL de solución de ABTS^{•+} diluido y transcurrido 90 minutos se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S. Como blanco de absorbancia se utilizó 50 mL de agua destilada y 3 mL de disolución diluida de ABTS^{•+}. Este ensayo se basa en la capacidad de captura del radical ABTS^{•+} de color azul intenso. La capacidad antioxidante de los compuestos de prueba se midió como la inhibición óptica complementaria a la absorbancia (disminución del color), al reaccionar directamente con dicho radical.

Las concentraciones de las muestras 1 y 2 fueron de 10-250 µg/mL, mientras que de la 3-6 (compuestos puros) de 350-700 µg/mL.

Como control positivo se utilizó el ácido ascórbico (AA) a concentraciones de 9-200 µg/mL en agua destilada.

La capacidad de secuestro del radical se calculó por el porcentaje de inhibición (PI) de este mediante la ecuación 2:

Ecuación 2:

$PI\ ABTS\ \% = (AB - AM) / AB * 100$, donde:

AB = Absorbancia del blanco.

AM = Absorbancia de la muestra.

Un porcentaje de inhibición mayor al 50 % se define como una muestra activa.

La capacidad antioxidante ante este radical se expresó como la concentración efectiva para secuestrar el 50 % del radical ABTS (CE_{50}).

Para los ensayos de DPPH[•] y ABTS^{•+}, se consideró para todas las muestras como criterio de evaluación: una elevada actividad cuando la $CE_{50} < 100\ \mu\text{g/mL}$.⁷³

II.4.4. Determinación del Poder reductor

Se utilizó la técnica referida por Benzie y Strain.⁷⁴ Este ensayo busca comparar los antioxidantes, basado en su capacidad para reducir el ion férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}) por una transferencia electrónica directa, produciendo un complejo ferroso que absorbe a una longitud de onda de 700 nm. El incremento de la absorbancia a esta longitud de onda es proporcional a la cantidad de Fe^{3+} reducido a Fe^{2+} por la especie antioxidante evaluada. Para ello se tomaron 680 µL de las muestras y se le añadió 680 µL de ferricianuro de potasio (Reachim®) (10 g/L). Se incubó durante 20 min a 50 °C y una vez frescas las muestras, se añadió 680 µL de ácido tricloroacético (UNI-CHEM®) (100 g/L). A continuación, se procedió a centrifugar a 2000 rpm durante 10 min. Posteriormente se tomaron 1,36 mL del sobrenadante, al cual se le añadió 1,36 mL de agua destilada y 1 mL de cloruro férrico (Sigma-Aldrich®) (1 g/L). Luego se pasó a leer a 700 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S) contra un blanco preparado con agua destilada.

Las concentraciones evaluadas de las muestras y el control positivo en agua destilada (Ácido ascórbico) fueron de 75-375 $\mu\text{g/mL}$.

El poder reductor de cada muestra evaluada se expresó como la absorbancia máxima alcanzada por los extractos a las concentraciones evaluadas y se calculó el porcentaje de actividad antioxidante de las muestras 1-6 respecto al ácido ascórbico (100 %).

II.5. Análisis estadístico y procesamiento de los resultados

Para el procesamiento matemático y análisis estadístico de los resultados se emplearon los softwares Microsoft Excel contenido en el paquete Microsoft Office 2016 y el software Statgraphics Plus Versión 5,1.

La capacidad secuestradora de las muestras ante los radicales evaluados se expresó como la media de los resultados obtenidos. Las CE_{50} calculadas para cada muestra en los ensayos de $\text{DPPH}^\bullet$ y $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se compararon empleando un análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA), auxiliados del software Statgraphic. Las diferencias entre las muestras fueron determinadas por el Test de Mínimas Diferencias Significativas de Tukey (LSD). En todos los casos se consideró un 95 % de intervalo de confianza.

Se realizó además una correlación estadística entre los tres ensayos de evaluación de la actividad antioxidante con un 95 % de intervalo de confianza.



Capítulo III: Resultados y Discusión

CAPÍTULO III. Resultados y Discusión

III.1 Caracterización química de los extractos. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios

Los resultados de la determinación cualitativa se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de la composición química cualitativa

Metabolitos	Ensayos	Resultados /Evidencias	
		Extracto etanólico total	Fase de diclorometano
Alcaloides	Dragendorff	+++/precipitado rojo	++/turbidez y partículas rojas
	Mayer	++/turbidez	+/opalescencia
	Wagner	-	-
Triterpenos esteroides y	Lieberman-Burchard	+++/coloración verde negruzco	+++/cambio de coloración de rosado-azul
	Solkowski	+++/amarilla rojiza	+++/amarilla rojiza fuerte
	Rosemheim	-	-
Quinonas	Borntrager	++/coloración roja clara	+++/coloración rojo oscuro
Cumarinas	Baljet	+++/precipitado rojo	+++/precipitado rojo
	Legal	++/marrón rojizo	+++/coloración roja intensa
Saponinas	Espuma	-	-
Resinas	Resinas	-	-
Aceites esenciales y sustancias grasas	Sudán III	-	-
Azúcares reductores	Fehling	+++/precipitado rojo	-
Fenoles y taninos	Cloruro férrico	+++/coloración verde oscura	++/color verde
Aminoácidos libres y aminas en general	Ninhidrina	+++/aparición de coloración violácea	+++/ aparición de un coloración violácea
Flavonoides	Ácido sulfúrico	+++/coloración marrón rojiza	+++/ cambio de coloración, marrón oscuro
	Shinoda	-	-
	Álcalis	++/coloración amarilla-naranja (flavanonas y flavonol) ⁶⁹	++/ coloración amarilla (flavonas, flavanolol e isoflavonas) ⁶⁹
	Rosemheim	+++/coloración rojo-anaranjado (antocianidinas) ⁶⁹	++/coloración rojo marrón
Carbohidratos	Molish	+++/aparición de anillo violáceo	-

Leyenda: (+++) indica evidencia positiva clara; (++) indica evidencia positiva, (+) indica evidencia positiva con posibilidades de interferencias o no definida; (-) indica resultado negativo

Como se observa en esta tabla, de las disoluciones de ambos extractos se obtuvieron resultados positivos para triterpenos y esteroides, quinonas, cumarinas, fenoles y taninos, flavonoides, aminoácidos libres y aminos en general; mientras que alcaloides, carbohidratos y azúcares reductores solo para el extracto etanólico.

El mayor número de resultados positivos en cuanto a composición química cualitativa se obtuvo para el extracto etanólico total, donde se apreciaron mejor las evidencias de los ensayos. Esto puede estar relacionado con la reconocida capacidad del etanol para extraer metabolitos de diferentes índices de polaridad, tanto de naturaleza apolar, como polar. Sin embargo, en el otro extracto se utilizó el diclorometano, disolvente de naturaleza apolar, lo que limita la extracción de constituyentes de naturaleza polar.

Los resultados positivos para triterpenos y esteroides, quinonas, cumarinas, fenoles y taninos, flavonoides y azúcares reductores del extracto etanólico total coinciden con reportes de investigación y bibliográficos.^{7,8,12}

Los ensayos de Lieberman-Burchard y Salkowski para triterpenos y esteroides resultaron positivos para ambos extractos. En el primer ensayo se observó un rápido cambio de color verde a negro al final de la reacción para el extracto total (posibles compuestos esteroidales)⁶⁹ y una aparición de color rosado a azul en la fase de diclorometano. El resultado negativo del ensayo de Rosemheim evidenció la ausencia de dienos.⁶⁹ Estas evidencias coinciden con resultados obtenidos en el estudio fitoquímico desarrollado por Ochoa en 2017⁸ y tamizaje fitoquímico por Arró en 2018¹², así como reportes bibliográficos para dos especies del género *Excoecaria*. En el primer reporte⁸ se informa el aislamiento e identificación estructural de estructuras triterpénicas pentacíclicas (Taraxerona, moretenol y moretenona) y esteroidales (β -sitosterol glucosilado) en la corteza. Para *Excoecaria agallocha* se reportó la presencia de la taraxerona, taraxerol, 3-epilupeol, β -amirina, β -sitosterol, entre otros^{75,76} así como en *E. parvifolia*, el lupeol.⁷⁷

En el ensayo de Borntrager, la coloración roja visualizada sugiere la posible presencia de antraquinonas libres y naftoquinonas,⁶⁹ con prevalencia de las primeras.

El precipitado rojo obtenido para el ensayo de Baljet, indica la presencia de cumarinas en ambos extractos, obteniéndose resultados similares en el ensayo de Legal. En este último, la evidencia positiva es más significativa para la fase de diclorometano, lo que pudiera estar relacionado con los resultados obtenidos en estudio fitoquímico desarrollado por Ochoa en 2017⁸ con esta fase, donde se reportó el aislamiento e identificación estructural de cumarinas, como escoparona, escopoletina, ayapina, 6,7,8-trimetoxicumarina y 5-metoxi-6,7-metilendioxycumarina. Estos resultados también coinciden con estudios realizados en *E. acerifolia* que revelan el aislamiento de la escopoletina de sus partes aéreas.⁵³

El precipitado rojo obtenido en el ensayo de Fehling para el extracto total sugiere la presencia de azúcares con grupo carbonilo libre. Este resultado coincide con lo reportado por Ochoa y colaboradores en 2015⁸ y Arró en 2018.¹² En este último reporte,¹² además se cuantificaron los azúcares reductores, obteniéndose un valor de $220,23 \pm 0,003$ mg de equivalente de glucosa/g extracto seco.

La coloración verde obtenida en el ensayo del cloruro férrico para ambos extractos sugiere la posible presencia de taninos del tipo catecólicos. Este resultado coincide con los obtenidos en el estudio fitoquímico desarrollado por Ochoa en 2017⁸ para la fase de diclorometano de la corteza de la especie, donde se reportó el aislamiento e identificación estructural del ácido 3,3',4'-tri-O-metilelágico; así como para el estudio de composición química cualitativa desarrollado por Arró¹² en 2018. En este último reporte¹² se cuantificaron los fenoles totales, obteniéndose un valor de $621,2 \pm 2,2$ mg de equivalente de ácido gálico/g extracto seco. Para especies de *Excoecaria* sp., como *E. agallocha*⁵² y *E. kawakamii*⁵¹ también se han reportado la presencia de estos taninos.

Especies del género *Excoecaria* han sido más estudiadas y se ha determinado la presencia de diterpenos, flavonoides, cumarinas, fenoles, triterpenos, taninos, esteroides y alcaloides en *E. acerifolia*,^{53,78} *E. parvifolia*⁷⁷, *E. kawakamii*,⁵¹ *E. agallocha*,^{75,76,79} así como en *G. pallens*.³⁷

III.2. Evaluación de la actividad antioxidante

No existen métodos mundialmente unificados para medir los efectos antioxidantes, en parte, debido a la disparidad de condiciones en las cuales se desarrollan estas metodologías, además de la complejidad de los sistemas y de la diversidad de matrices que necesitan ser evaluadas. Ningún método refleja por sí solo la “capacidad antioxidante total de una muestra”, puesto que este parámetro deberá expresar la propiedad de compuestos lipofílicos e hidrofílicos, reflejar y diferenciar los diferentes mecanismos y evaluar la reactividad frente a diversas especies reactivas.⁸⁰

El uso de ensayos químicos (*in vitro*) es una alternativa para determinar la capacidad antioxidante de muestras complejas, a través de metodologías que siguen procedimientos experimentales sencillos basados en diferentes mecanismos de reacción. Los resultados de los ensayos *in vitro* pueden usarse como un indicador directo de la actividad antioxidante *in vivo*.⁸¹

III.2.1 Actividad antioxidante frente al radical DPPH[•]

Este método es el clásico para la evaluación de la actividad antioxidante de compuestos químicos y sus mezclas, fundamentalmente de naturaleza fenólica y extractos naturales. El radical DPPH[•] absorbe intensamente en la región visible (517 nm), presentando un color violeta debido a su electrón desapareado y la deslocalización parcial de la densidad electrónica a través del sistema conjugado de anillos aromáticos que lo conforman.⁸⁰

Las muestras evaluadas revelaron un cambio de coloración de violáceo a amarillo luego de añadir la solución de DPPH[•], esto es indicativo del potencial antioxidante de estas, que son capaces de donar un átomo de hidrógeno y transferir electrones, mientras que este radical le permite aceptar un electrón o dicho átomo para convertirse en un compuesto diamagnético estable (hidrazina) de color amarillo,⁸¹ provocando una disminución de la absorbancia, que se interpreta como la desaparición del radical producto de la acción del antioxidante.

La figura 5 muestra los porcentajes de inhibición de la actividad secuestradora del radical DPPH[•] y la CE₅₀ para las muestras 1-6 y el antioxidante de referencia a las concentraciones evaluadas (9-200 µg/mL).

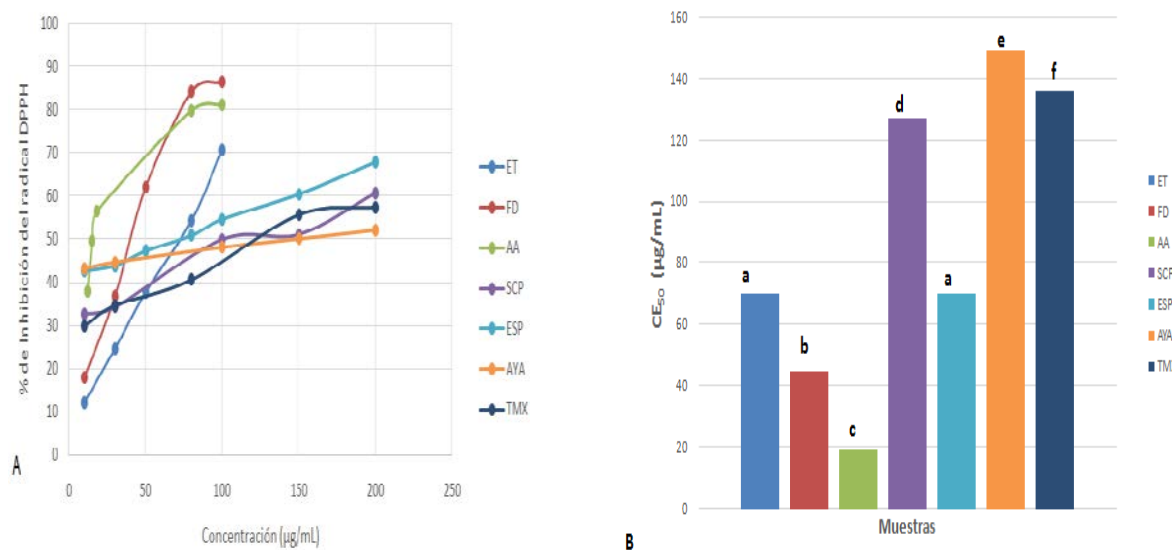


Figura 5. A) Porcentaje de inhibición de la actividad secuestradora del radical DPPH[•] para las muestras 1-6 y el antioxidante de referencia. B) Valores de CE₅₀ en el ensayo de inhibición del radical DPPH[•]. AA: ácido ascórbico, ET: extracto etanólico total, FD: fase de diclorometano, SCP: escoparona, ESP: escopoletina, AYA: ayapina, TMX: 6,7,8-trimetoxicumarina. Letras en supraíndice diferentes: presenta diferencias estadísticas significativas entre las medias de las muestras evaluadas. Nivel de significación: $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos para todas las muestras y el control positivo indican que existe una relación actividad-concentración dependiente, a medida que aumenta la concentración va aumentando el poder de captación del radical DPPH[•] por los compuestos presentes. Este resultado coincide con el informado por Ravi y colaboradores.⁸²

El efecto secuestrador decreció en el siguiente orden: fase de diclorometano (18-87 %) > ácido ascórbico (38-82 %) > extracto etanólico total (12-71 %) > escopoletina (43-68 %) > escoparona (33-60,1 %) > 6,7,8-trimetoxicumarina (30-57 %) > ayapina (43-52 %).

Como se observa en la Figura 5-A, todas las muestras revelaron actividad secuestradora del radical DPPH[•], por lo que presentan constituyentes activos capaces de transferir un átomo de hidrógeno o un electrón.

El extracto total etanólico mostró ser activo y con porcentajes de inhibición menores que el ácido ascórbico, resultado este que coincide con lo obtenido por Arró.¹²

De las muestras evaluadas, la mayor capacidad secuestradora frente a este radical se obtuvo para la fase de diclorometano, con un CE₅₀ de $44,7 \pm 0,13$ µg/mL (Figura 5-B); resultando esta concentración efectiva inferior a la del ácido ascórbico (CE₅₀ de $19,43 \pm 0,1$ µg/mL), con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), para un 95 % de confianza (Anexo I).

A su vez, esta fase mostró la mayor capacidad secuestradora con respecto a todos los compuestos puros (Figura 5-B), con diferencias estadísticamente significativas para un 95 % de confianza (Anexo I). Este resultado sugiere el posible sinergismo que existe entre las cumarinas presentes en esta fase, sin descartar la influencia de otros constituyentes en la actividad.

La actividad secuestradora del radical DPPH[•] de las cumarinas puras fueron evaluadas individualmente para determinar su posible contribución a la actividad de la fase de diclorometano y el extracto total etanólico. Aunque las cuatro cumarinas son activas, la escopoletina es la que muestra una actividad elevada, reflejada en su valor de CE₅₀ menor de 100 µg/mL ($70,03 \pm 0,5$ µg/mL)⁷³ y por tanto la mayor contribución a ambos extractos, como uno de los principales responsables de esta actividad.

El valor de la CE₅₀ de la escopoletina no muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto al extracto etanólico ($69,8 \pm 0,1$ µg/mL) a un nivel del 95 % de confianza (Anexo I), lo que confirma la mejor actividad secuestradora de este compuesto.

Estructuralmente es reconocido el marcado incremento de la actividad antioxidante de los polifenoles de acuerdo al grado de los grupos hidroxilos fenólicos libres presentes en la molécula.²⁹ También se ha reportado que la actividad secuestradora de radicales libres y

antioxidante de las cumarinas depende principalmente del número y la posición de los grupos hidroxilos donadores de hidrógeno en el anillo aromático de estas moléculas fenólicas, lo que puede verse afectado por otros factores, como la glicosilación de agliconas y grupos que donen hidrógenos (-NH, -SH).⁸³

De acuerdo a estos planteamientos, la escopoletina es la única de las muestras evaluadas que posee hidroxilo fenólico libre y la mayor capacidad secuestradora de DPPH de los compuestos puros.

Para analizar la magnitud de la influencia de los sustituyentes en la actividad frente a este radical, se realizó un análisis de regresión simple, tomando como variable dependiente los valores de $1/CE_{50}$ de las muestras (teniendo en cuenta que a menor CE_{50} mayor es la actividad secuestradora de radicales libres) y como variable independiente, el número de grupos hidroxilos fenólicos libres y metoxilos presentes en la estructura molecular, respectivamente. Solo se obtuvo una correlación aceptable para el modelo de análisis de los grupos hidroxilos fenólicos libres, mostrando que existe una relación estadísticamente significativa entre ambas variables ($p=0,0371$), con un coeficiente de correlación de 0,962944 y un R^2 de 92,7, lo que permite confirmar los planteamientos anteriores.^{29,83}

A pesar de este criterio general aplicado a la mayoría de los compuestos con hidroxilos fenólicos libres, como uno de los requisitos fundamentales para la actividad antioxidante, los químicos farmacéuticos han desarrollado diferentes modificaciones estructurales⁸² en el esqueleto cumarínico, que han conllevado a la síntesis de diversos derivados con elevada actividad antioxidante. Por tanto, son variados los requisitos estructurales en este grupo de metabolitos secundarios necesarios para esta actividad farmacológica y se requiere profundizar en estos estudios para poder establecer todos los aspectos de relación estructura química-actividad antioxidante (REA) para este grupo de metabolitos secundarios.

La actividad antioxidante de la escopoletina ha sido informada por varios autores, como Della Greca y colaboradores en el 2009, donde obtuvieron un 58 % de inhibición del radical superóxido frente a un 12 % del α -tocoferol como referencia.⁸⁴ Otras publicaciones

revelan para el ensayo de DPPH[•], valores de CE₅₀ de 0,560 μ M⁶⁶ y mayor a 200 μ M.⁸⁵ Malik y colaboradores en el 2011 publicaron la evaluación de sus propiedades antioxidantes *in vitro*, mediante los ensayos de DPPH[•] y otros. En este ensayo se obtuvo un 63,79 % de inhibición a la concentración de 45 μ g/mL y una CE₅₀ de 34,86 μ g/mL, menor que el α -tocoferol.⁶³

La escoparona no posee grupos hidroxilos fenólicos libres, pero mostró actividad, con una CE₅₀ de 126,8 $\pm$ 0,24. Esta cumarina ha sido reportada como antioxidante. Lee y Jang en el 2015 informaron su capacidad antioxidante celular. Mostró un efecto inhibitorio en la diferenciación de los osteoclastos, lo que se atribuyó a un efecto supresor en la producción de EROS y anión superóxido, al inhibir la expresión y activación de la NADPH oxidasa. El efecto secuestrador de EROS se atribuyó a una expresión elevada de las enzimas superóxido dismutasa 1 y la catalasa.⁶⁵ En otro estudio, se reportó una potente actividad en el ensayo de DPPH, con valores de CE₅₀ de 0,192 μ M. Se argumenta que este compuesto posee un amplio rango de actividades farmacológicas relacionadas a los procesos inflamatorios, particularmente como supresor del óxido nítrico sintetasa y la ciclooxygenasa-2, inhibidor de la 5-lipooxygenasa, entre otros. Se ha propuesto que la ruta metabólica en ratas incluye la escopoletina, isoescopoletina, fraxidina e isofraxidina como metabolitos microsomales y que las propiedades farmacológicas de la escoparona han sido atribuidas a la escopoletina, su metabolito bioactivo.⁶⁶

Especies como *Excoecaria agallocha* Sw., también han demostrado una marcada actividad secuestradora del radical DPPH[•] con más de 80 % de inhibición de este radical para varios extractos metanólicos a concentraciones entre 7-250 μ g/mL⁸⁶ y acuosos de 50-100 μ g/mL,⁵² apoyando los usos tradicionales antioxidantes de la misma en varios países. En el 2012 Arumugam *et. al.* evaluaron la actividad secuestradora del radical DPPH[•] de extractos metanólicos de las hojas a concentraciones de 50-250 μ g/mL, obteniendo valores de CE₅₀ entre 10,2 a 128 μ g/mL.⁶ Otro estudio demostró que de cinco extractos evaluados de la corteza, el etanólico y el acuoso son los que poseen el mayor contenido de fenoles totales equivalentes a ácido gálico (160,5 $\pm$ 1,1 y 348,0 $\pm$ 5,2 mg,

respectivamente), la mayor actividad secuestradora del radical DPPH[•] a 12,5 µg/mL con $89,7 \pm 0,1$ y $91,0 \pm 0,2$ %, respectivamente y valores de CE₅₀ de 4,7 µg/mL y 2,1 µg/mL, respectivamente.⁸⁷ En el 2015, Sofía y colaboradores evaluaron la actividad antioxidante de extractos metanólicos de las hojas, la corteza y las raíces de esta especie mostrando valores máximos en la hoja (CE₅₀= 141,56 µg/mL) y mínimos en la corteza (CE₅₀ = 931,3 µg/mL).⁸⁸ Reddy y Grace en el 2016 publicaron sus resultados de la evaluación antioxidante de un extracto metanólico de las hojas, obteniéndose un porcentaje de inhibición del DPPH[•] de $41,43 \pm 0,34$ mg/mL a la concentración de 1 mg/mL.⁸⁹

Se resume, que en este ensayo, la fase de diclorometano, el extracto total etanólico y la escopoletina mostraron una elevada actividad, con valores de CE₅₀ <100 µg/mL.⁷³

III.2.2 Actividad antioxidante frente al radical ABTS^{•+}

Este método al igual que el anterior es altamente utilizado debido a su fácil montaje, mecanismos de acción tanto por transferencia de electrones, como por transferencia de átomos de hidrógeno y que sirve tanto para antioxidantes lipófilos como hidrófilos.²⁸ Se fundamenta en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado ABTS^{•+}. La técnica requiere de la generación previa del cromóforo azul verdoso ABTS^{•+} por oxidación de ABTS^{•+} con persulfato de potasio. Este radical presenta cinco longitudes de onda de máxima absorción diferentes, de las cuales 414 nm y 734 nm son las más utilizadas. Sin embargo, en este estudio se realizaron las mediciones a 734 nm debido a que se ha reportado que las mediciones a 414 nm pueden subestimar la capacidad antioxidante de muestras vegetales por interferencia con varios compuestos como antocianinas y carotenoides.⁸⁰

En el ensayo se corroboró visualmente como positivo el evidente cambio de color azul a verde claro para algunas muestras y total desaparición del color para otras luego de añadir la solución de ABTS^{•+}. Este fenómeno indica el potencial antioxidante de las muestras evaluadas, ya que la estructura de este radical provoca que se reduzca en presencia de compuestos donadores de hidrógeno.

La figura 6 muestra los porcentajes de inhibición de la actividad secuestradora del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y la CE_{50} para las muestras 1-2 (75-250 $\mu\text{g/mL}$), 3-6 (350-700 $\mu\text{g/mL}$) y para el antioxidante de referencia a las concentraciones evaluadas.

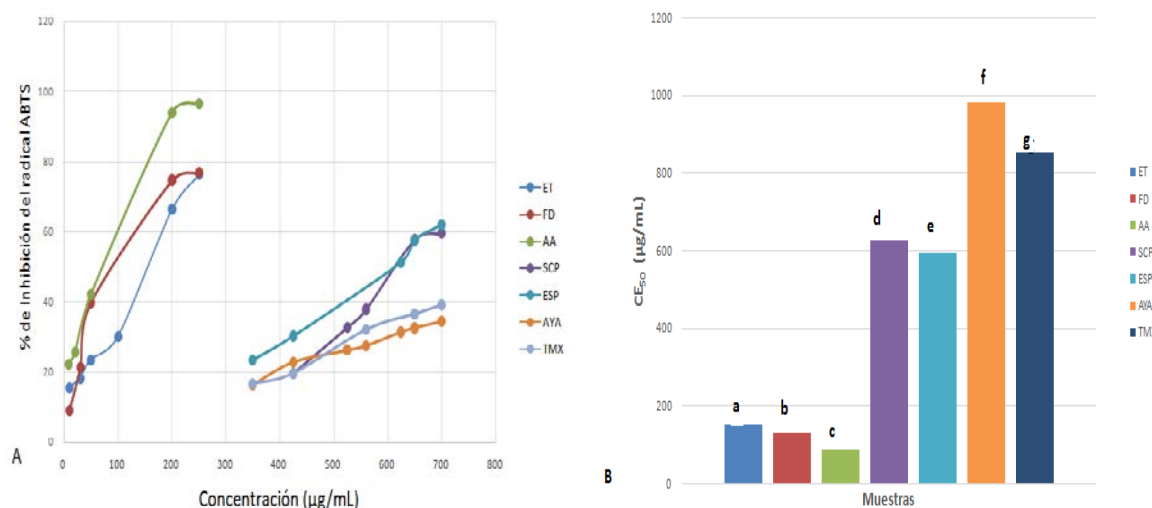


Figura 6. A) Porcentaje de actividad secuestradora del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ para las muestras 1-6 y el antioxidante de referencia. B) Valores de CE_{50} en el ensayo de inhibición del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. AA: ácido ascórbico, ET: extracto etanólico total, FD: fase de diclorometano, SCP: escoparona, ESP: escopoletina, AYA: ayapina, TMX: 6,7,8-trimetoxicumarina. Letras en supraíndice diferentes: presenta diferencias estadísticas significativas entre las medias de las muestras evaluadas. Nivel de significación: $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos para este método coinciden con los del $\text{DPPH}^{\bullet}$, en cuanto a que existe una relación de actividad-concentración dependiente.

Los porcentajes de inhibición de la actividad secuestradora del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ decrecieron en el siguiente orden: ácido ascórbico (22-97 %) > fase de diclorometano (9-77 %) > extracto etanólico total (16-76 %) > escopoletina (23-63 %) > escoparona (20-60 %) > 6,7,8-trimetoxicumarina (17-39 %) > ayapina (16-35 %) (Figura 6-A).

Se observó que en el ensayo de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se obtuvieron porcentajes de actividad secuestradora menores que en $\text{DPPH}^{\bullet}$ para todas las muestras, excepto para el compuesto de referencia. Esto puede estar relacionado con la baja solubilidad en agua de los extractos y las cumarinas evaluadas, ya que los diferentes medios de reacción de estos

ensayos *in vitro* (agua y metanol absoluto) condicionan que estas sustancias reflejen mejor su potencial antioxidante en DPPH[•]. También el radical catión ABTS^{•+} debe ser generado previamente, es menos estable y más transitorio, la cinética de reacción con algunos antioxidantes suele ser bastante lenta y, por lo tanto, el punto final de medición debe fijarse de manera arbitraria.⁹⁰

Como se observa en la Figura 6-A, todas las muestras revelaron actividad secuestradora de este radical, excepto ayapina y 6,7,8-trimetoxicumarina; probablemente influenciado por ser las de más baja solubilidad en agua.

El extracto total etanólico mostró ser activo y con porcentajes de inhibición menores que el ácido ascórbico, comportamiento similar al obtenido en el ensayo de DPPH[•], coincidiendo también con lo reportado por Arró para este método.¹²

Al igual que en el ensayo del DPPH[•], se confirma que de las muestras evaluadas, la fase de diclorometano es la que posee la mayor actividad secuestradora de este radical, reflejada en su CE₅₀ de 128,16 ± 0,03 µg/mL, aunque igualmente inferior al ácido ascórbico (CE₅₀ 86,35 ± 0,02 µg/mL), con diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) para un 95 % de confianza (Anexo II) (Figura 6-B). Se confirma una vez más con este ensayo, que las cumarinas de forma individual, no muestran una actividad superior a la de sus extractos de partida (etanólico y diclorometano) donde el efecto sinérgico parece tener su protagonismo, sin descartar el posible aporte de otros compuestos presentes a esta actividad.

Entre las cumarinas puras, nuevamente la escopoletina presentó la principal actividad (CE₅₀ 593,62 ± 0,01 µg/mL) a las concentraciones evaluadas, aunque con resultados menos significativos que en el ensayo de DPPH (Figura 6-B). Reportes bibliográficos muestran pocos estudios para este compuesto por el método de ABTS con respecto a DPPH y entre estos se reporta la actividad secuestradora del radical ABTS^{•+} con una CE₅₀ de 1,57 µM.⁸⁴

La menor actividad de la escoparona respecto a la escopoletina, tanto en el ensayo de DPPH como de ABTS, puede deberse a que la metilación de los dos grupos hidroxilos

fenólicos puede dificultar la capacidad de donar átomos de hidrógeno/electrones. No obstante, reportes bibliográficos sobre este compuesto han informado de sus propiedades antioxidantes y sequestradora de radicales libres.^{65,66}

Para los compuestos 5 y 6 fueron estimados sus CE_{50} ($982,52 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ para ayapina y $852,45 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ para 6,7,8-trimetoxicumarina).

En el 2015, Mundekkad y colaboradores evaluaron la actividad antioxidante de varias fracciones de las hojas de la especie *Excoecaria agallocha* Sw. por diferentes métodos, incluyendo los ensayos de secuestro de los radicales DPPH[•] y ABTS^{•+}, revelando el potencial antioxidante de los extractos de la planta. La fracción de acetato de etilo fue la que presentó el mayor efecto sequestrador en ambos ensayos.⁹¹

III.2.3 Determinación del Poder reductor

Varios estudios han demostrado que los antioxidantes y quelantes de metales pueden ser beneficiosos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer. Se conoce que metales como el cobre y el hierro, son capaces de agravar el estrés oxidativo.⁹²

El poder reductor está relacionado con el grado de hidroxilación y conjugación en polifenoles; sin embargo, la capacidad para reducir el ion férrico (CRIF) no puede detectar compuestos que actúan por mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno, subestimando el potencial antioxidante de mezclas que contengan, por ejemplo, tioles. Se ha argumentado que la capacidad para reducir el hierro se correlaciona poco con la estabilización de radicales libres; sin embargo, la oxidación o reducción de radicales para formar iones puede detener la oxidación en cadena y por lo tanto el poder reductor reflejaría la capacidad de un compuesto para regular el estado redox del plasma o tejidos. Este método sigue un mecanismo típicamente de transferencia de electrones y por lo tanto, en combinación con otros métodos puede ser útil para distinguir el mecanismo dominante de diferentes antioxidantes. Adicionalmente, como los metales reducidos son propagadores de reacción en cadena de peroxidación lipídica por el rompimiento de hidroperóxidos a radicales alcóxilo, esto podría ser interesante para evaluar si altos

valores de CRIF correlacionan con la tendencia de algunos antioxidantes para actuar como prooxidantes bajo algunas condiciones.⁷⁷

Durante el ensayo se observó un cambio de color de amarillo pálido a verde intenso en algunas muestras y azul oscuro para otras luego de añadir la solución de cloruro férrico. Este fenómeno es indicativo del potencial reductor de las muestras evaluadas que pueden actuar como donantes de electrones. Los resultados obtenidos se expresaron según la absorbancia máxima alcanzada por cada muestra a las concentraciones evaluadas (Figura 7).

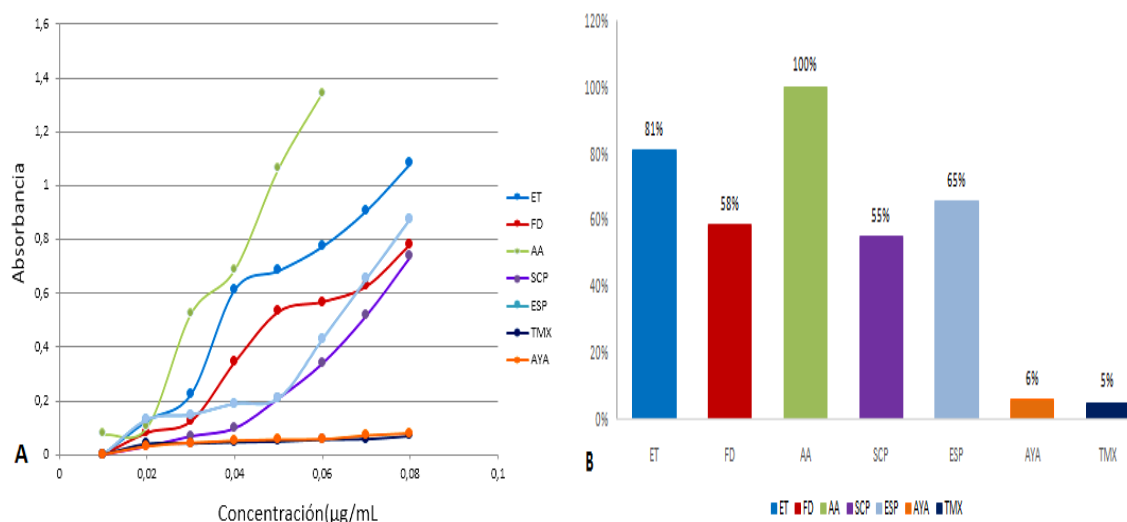


Figura 7. A) Poder reductor de las muestras 1-6 y el antioxidante de referencia en función de la absorbancia. B) Porcentaje de actividad antioxidante de las muestras 1-6 respecto al ácido ascórbico (100 %) en el ensayo de estimación del poder reductor: AA: ácido ascórbico, ET: extracto etanólico total, FD: fase de diclorometano, SCP: escoparona, ESP: escopoletina, AYA: ayapina, TMX: 6,7,8-trimetoxicumarina.

Como se observa, a medida que aumenta la concentración de los extractos, aumenta la absorbancia, lo cual indica que existe una relación de absorbancia-concentración dependiente entre la cantidad de muestra y el poder reductor mostrado por estas.

Los valores del poder reductor alcanzados por las muestras y la sustancia de referencia, a las concentraciones evaluadas (75-375 µg/mL), decrecieron en el siguiente orden: ácido

ascórbico > extracto etanólico total > escopoletina > fase de diclorometano > escoparona > ayapina > 6,7,8-trimetoxicumarina, mostrando diferencias entre ellos (Figura 7-A).

La actividad mostrada por el extracto total etanólico coincide con los resultados obtenidos por Arró en el 2018 para este ensayo.¹²

Entre las seis muestras evaluadas, el extracto etanólico total y la escopoletina fueron los que mostraron un mayor poder reductor en base al ácido ascórbico a las concentraciones ensayadas (Figura 7-B), con prevalencia del primero (81 %).

La mejor capacidad de reducir el ion férrico para el extracto etanólico total puede estar relacionado con la presencia de otros constituyentes que posean un poder reductor mayor que las cumarinas. Como por ejemplo, se pueden citar los taninos derivados del ácido elágico que han sido aislados de la corteza, como el ácido 3,3',4'-tri-O-metilelágico y el ácido 3,3'-di-O-metilelágico.⁸ Estos dos compuestos en el estudio desarrollado por Arró en el 2018 mostraron un 69 % de capacidad reductora en base al ácido ascórbico.¹² Estudios desarrollados por Atta Ur Ramman en el año 2000, revelaron la presencia de cinco elagitánicos en la corteza del tallo de *Pteleopsis hylodendron*, entre ellos el ácido 3,3'-di-O-metilelágico y el ácido 3,3',4'-tri-O-metilelágico. El primero mostró una actividad antioxidante significativa por el método de secuestro del radical DPPH[•], con CE₅₀ de 0,39 mM comparado con CE₅₀ de 0,044 mM del patrón BHA (butilhidroxianisol).⁹³

Nuevamente la escopoletina resultó ser el principal responsable de la actividad del extracto total y la fase de diclorometano, al mostrar el más alto porcentaje de todas las sustancias puras (65 %) en base al ácido ascórbico.

La escopoletina posee un efectivo poder reductor cuando se compara con compuestos de referencia. Malik y colaboradores en el 2011 evaluaron la habilidad de este compuesto para reducir el ion férrico a ferroso usando el método de Oyaizu. Se utilizaron concentraciones de 15–45 g/mL y esta demostró una potente habilidad reductora, con diferencias estadísticamente significativas con el α -tocoferol (R^2 : 0,9937, $p < 0,01$) (escopoletina > α -tocoferol). Los resultados demostraron sus propiedades de donar

electrones para neutralizar radicales libres por la formación de productos estables y una efectiva capacidad quelante de iones Fe^{2+} .⁶³

En el 2008, Subhan y colaboradores evaluaron la actividad antioxidante de un extracto hidroalcohólico de *Excoecaria agallocha* (Euphorbiaceae) obteniendo como resultado que el poder reductor aumentó de forma dependiente con la dosis, siendo capaz este de reducir la mayoría de los iones Fe^{3+} .⁹⁴ Este comportamiento también fue descrito en el 2015 por Mundekkad y colaboradores que evaluaron el poder reductor de cuatro fracciones obtenidas del extracto total de las hojas de esta especie, resultando la fase de acetato de etilo la que demostró mayor actividad.⁹¹

El análisis estadístico realizado para los tres ensayos, mostró correlación estadísticamente significativa entre los métodos de DPPH $\bullet$ y ABTS $\bullet^+$ [coeficiente de correlación (R) de 0,778523; $p < 0,05$] para un nivel de confianza del 95 %; sin embargo no se obtuvo correlación entre el ensayo de DPPH $\bullet$ y el poder reductor ($R = 0,707751$) con un $p > 0,05$, siguiendo un modelo de proporcionalidad inversa. Lo mismo ocurre con los resultados obtenidos para el método del ABTS $\bullet^+$ ($R = 0,647871$) con un $p > 0,05$. Según Apak (2013), la naturaleza compleja del nitro-radical ABTS $\bullet^+$ puede provocar falta de correlación con otros ensayos que miden la capacidad antioxidante enlenteciendo la reacción con polifenoles, como es el caso del ensayo del poder reductor.²⁹ Otros autores plantean que esta falta de correlación puede radicar en la naturaleza no selectiva de la reacción entre el radical ABTS $\bullet^+$ y los compuestos aromáticos hidroxilados.⁹⁵

Un análisis integral de los resultados obtenidos en los tres ensayos permite confirmar la actividad secuestradora de radicales libres y el poder reductor de la escopoletina y la escoparona, coincidiendo con reportes bibliográficos.^{63,66,84,85} Estos dos compuestos puros son los que presentan la mejor capacidad para actuar por mecanismos de transferencia de electrones y de protones con respecto a la 6,7,8-trimetoxicumarina y ayapina.

A través del programa Gaussian versión 3,07, empleando el método de cálculo Ab initio y la base de datos H.F. 6,316, con la opción NBO, se calcularon las energías de los orbitales HOMO (orbital molecular ocupado de más energía) de las cuatro cumarinas evaluadas. Los

orbitales HOMO con mayores valores de energía fueron de -0,349 para ESP y SCP (Figura 8-A1 y 8-A2), -0,354 para TMX y -0,364 para AYA (Figura 8-B). Estos valores muestran que las dos primeras cumarinas tienen similares energías del orbital HOMO y el mismo se localiza en las posiciones 7 y 8 del núcleo cumarínico (Figura 8-A1 y 8-A2), por lo que teóricamente se espera un comportamiento antioxidante y de reactividad por transferencia de electrones similares. Mientras que los otros dos compuestos serían diferentes, resultando la ayapina la que posee el valor de energía más negativo (-0,364) y por tanto tendrá una mayor dificultad para ceder electrones. Esto justificaría teóricamente la más baja actividad antioxidante para TMX y AYA en los ensayos de ABTS y poder reductor, así como los menores valores de actividad en el ensayo de DPPH[•], bajo las condiciones estudiadas; sin descartar el comportamiento de la solubilidad en agua explicado anteriormente para estas dos cumarinas.

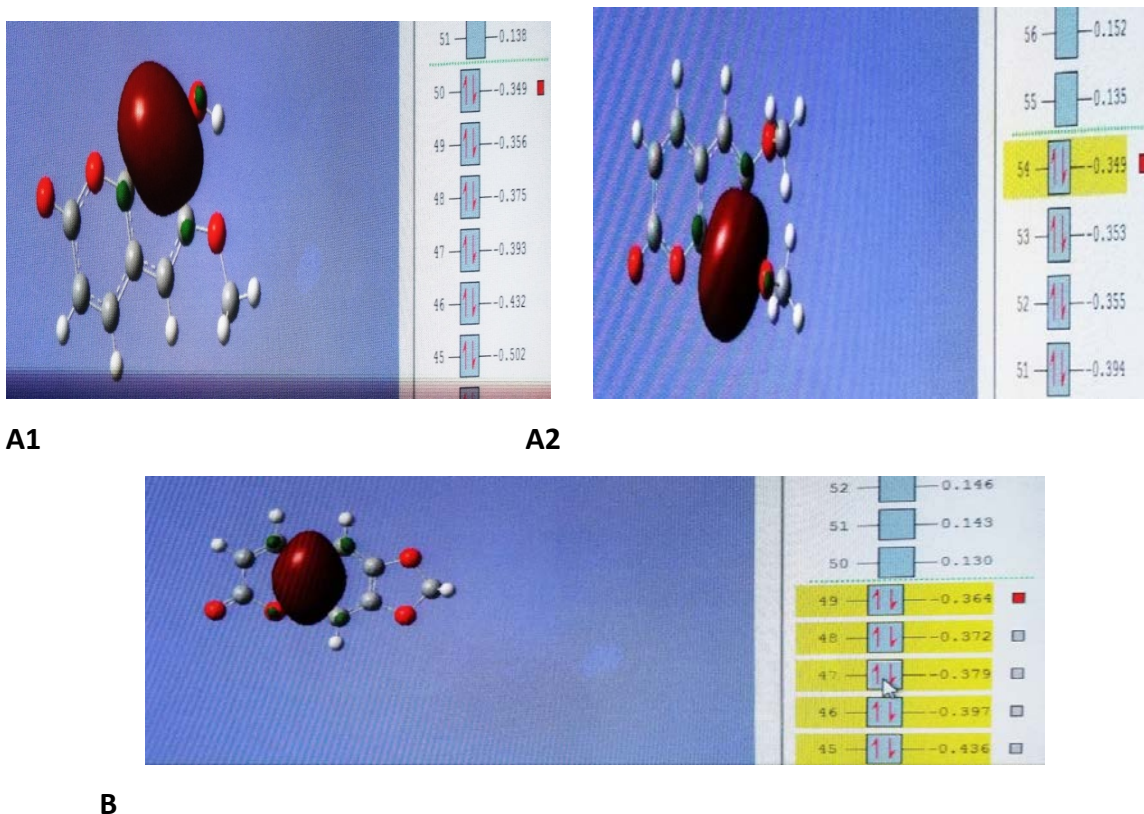


Figura 8. Representación de los orbitales HOMO de mayor energía para ESP (A1), SCP (A2) y AYA (B)

Este análisis teórico está en concordancia con lo planteado por Thakur y Shah, con respecto a la mayor densidad de electrones sobre los carbonos 6 y 8 de las estructuras B y C (Figura 9).

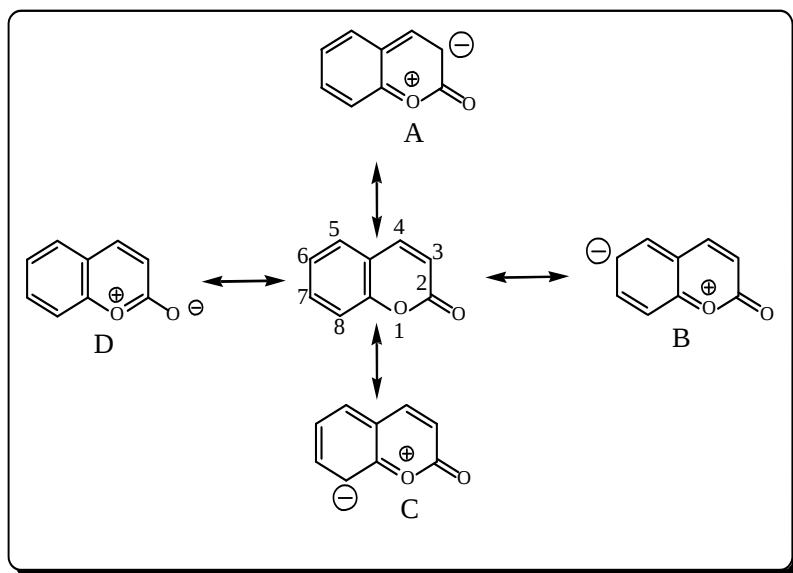


Figura 9. Movimiento de electrones sobre el esqueleto cumarínico.

El núcleo de las cumarinas, debido a su estructura básica tienen la habilidad de ejercer interacciones no covalentes (electrostáticas, enlace por puente de hidrógeno, coordinación de metal, Van de Waals) con muchos receptores en los organismos vivos y por lo tanto exhiben un amplio rango de actividades biológicas.⁹⁶

Un resumen integral del potencial farmacológico de las muestras de la corteza de la especie *G. lucida* permite plantear que la fase de diclorometano es la que posee la mayor actividad secuestradora de radicales libres, reflejado en los menores valores de CE_{50} obtenidos en ambos ensayos y justificado por la coexistencia y efecto sinérgico de todas las cumarinas presentes. El extracto etanólico total demostró una mayor actividad reductora de metales, expresado en el mayor valor de la absorbancia y del porcentaje de actividad con respecto al ácido ascórbico, justificado por la coexistencia de diversos constituyentes de naturaleza fenólica ($621,2 \pm 2,2$ mg de ácido gálico/g del extracto seco).

Entre las cumarinas puras, la escopoletina resultó poseer la mejor actividad antioxidante por los tres métodos evaluados, lo que lo señala como uno de los principales metabolitos secundarios de la corteza de esta especie responsable de esta actividad. Esta podría constituir un ingrediente farmacéutico activo para el desarrollo de un nuevo medicamento con aplicaciones en el manejo de las enfermedades inducidas por el estrés oxidativo. De forma general, los dos extractos evaluados muestran actividad secuestradora de radicales libres y poder reductor superior a las cumarinas puras, reafirmando el hecho de que la actividad combinada de muchos metabolitos secundarios puede resultar de mayor relevancia, que los componentes aislados.²⁸ Ninguna de las muestras evaluadas presentó mayor actividad antioxidante que el ácido ascórbico, con diferencias estadísticamente significativas.

Comparando los resultados de la actividad de las cumarinas evaluadas con respecto a la de los taninos derivados del ácido elágico,¹² se puede plantear que estos últimos contribuyen en mayor medida al potencial antioxidante de la especie, con valores de CE_{50} del ácido elágico similares y superiores al ácido ascórbico bajo las condiciones estudiadas.



Conclusiones

Conclusiones

1. La composición química cualitativa determinada para ambos extractos, mostró la presencia de triterpenos y esteroides, quinonas, cumarinas, fenoles y taninos, flavonoides, aminoácidos libres y aminos; adicionalmente para el extracto etanólico: alcaloides, carbohidratos y azúcares reductores.
2. La fase de diclorometano resultó ser la de mayor capacidad secuestradora de radicales libres, mientras que el extracto etanólico total el de mayor poder reductor.
3. La escopoletina es el componente más activo de los compuestos puros evaluados, resultando el principal responsable de la actividad secuestradora de radicales libres y poder reductor mostrada por la fase de diclorometano y el extracto etanólico total de la corteza, bajo las condiciones estudiadas.



Recomendaciones

Recomendaciones

1. Evaluar la actividad antioxidante de las muestras ensayadas en otros modelos *in vitro* e *in vivo*.
2. Realizar estudios SAR y QSAR que permitan establecer los aspectos de relación estructura química-actividad antioxidante para estas cumarinas.
3. Cuantificar el contenido de fenoles totales en la fase de diclorometano de la corteza.



Referencias Bibliográficas

Referencias Bibliográficas

1. Coba P, Tivi LM, Vidari G. Importancia de la actividad antioxidante y evaluación de extractos en etanol del género *Oryctanthus*. La granja 2010; 11(1): 22-30.
2. Bauer ME, De la Fuente M. The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. Mechanisms of ageing and development 2016; 158: 27-37.
3. Pastene ER. Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 2009; 8(6): 449-455.
4. Leos C, Rivas C, García Hernández DG. Actividad antioxidante y toxicidad. Omnia Science Monographs. Barcelona, España 2016.
5. Ramos MKO. Actividad antioxidante *in vitro* y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* sp. (Rutaceae). Revista Cubana de Plantas Medicinales 2012; 17(4): 368-379.
6. Arumugam M, Ramachandra UP, Gomathinayagam M. Antibacterial and antioxidant activity between micropropagated and field grown plants of *Excoecaria agallocha* L. International Research Journal of Pharmacy 2012; 3(3): 235-240.
7. Ochoa A, Escalona JC, Beaven M, Pérez-Roses R, Gámez YM, Camacho Pozo MI *et al.* Bioassay-guided *in vitro* study of the antimicrobial and cytotoxic properties of the leaves from *Excoecaria lucida* Sw. Phcog. Res. 2017; 9(4): 396-400.
8. Ochoa A. Evaluación fitoquímica de hoja y corteza de *Gymnanthes lucida* Sw. (Yaití) (Euphorbiaceae). [Tesis de Doctorado]. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana. La Habana, Cuba 2017. 20-30 p.
9. Hatano T. Effect of interaction of tannins with co-existing substances VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. Chemical Pharmacy 1980; 37(8): 2016-21.
10. Apagón SM. Cumarinas en la prevención del estrés oxidativo dependiente de la edad. [Tesis de Doctorado]. Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España 1994.

- 11.** Montesinos C, Ubeda A, Ferrándiz ML, Alcaraz MJ. Superoxide scavenging properties of phenolic acids. *Planta Médica* 1991; 57(2): 54-54 A.
- 12.** Arró DJ. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos totales y elagitaninos aislados de la hoja y la corteza de *Gymnanthes lucida* Sw. [Trabajo de Diploma]. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba; 2018. 27-54 p.
- 13.** Cabiscol E. Oxidación celular y envejecimiento. Radicales libres: doctor Jekyll y mister Hyde. SEBBM Divulgación ciencia al alcance de la mano. Artículo disponible en: https://www.sebbm.es/web/images/archivos/archivos_tinymce/junio2014_elisacabiscol.pdf. Revisado 14 de Junio de 2019. 2014.
- 14.** Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* 2006; 494: 161-172.
- 15.** Venereo JR. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar* 2002; 31(2):126-133.
- 16.** Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90(17): 7915-7922.
- 17.** Constanza L. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Revista Nova* 2012; 10(18): 135 – 250.
- 18.** Mayor O. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2010; 5(2): 23-9.
- 19.** Gutteridge J, Halliwell B. Reactive oxygen species in biological systems. Tercera Edición. New York: D.L. Gilbert and C.A. Colton; 1999.
- 20.** Frankel E. In search for the better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends Food Sci. Technol.* 1993; 4: 220-225.
- 21.** Gutteridge J, Halliwell B. Free radicals in Biology and Medicine. Tercera edición. New York: ClarendonPress Oxford; 2000.
- 22.** Gil del Valle L. Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans. *Biomedicine and Aging Pathology* 2011; 1(1): 1-7.

- 23.** Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2009; 681: 51–67.
- 24.** Doria E, Buonocore D, Focarelli A, Marzatico F. Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012; 4:13.
- 25.** Lacalle A. Antioxidantes en alimentación: Diferentes formas de expresar su actividad antioxidante. Tipos de unidades y métodos de análisis. Barcelona; 2007.
- 26.** Jaitak V, Sharma K, Kalia K, Kumar N, Singh HP, Kaul VK *et al.* Antioxidant activity of *Potentilla fulgens*: An alpine plant of Western Himalaya. *Journal of Food Composition and Analysis* 2010; 23(2): 142–147.
- 27.** Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS letters* 1985; 187(1), 33-37.
- 28.** Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53(10):4290-302.
- 29.** Apak R. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Applied Chemistry* 2013; 85(5): 957–98.
- 30.** Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53(6): 1841–1856.
- 31.** Mwine JT, Van Danme P. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011; 5(5): 652-662.
- 32.** Sousa MJT, Alves OL. Species from the Euphorbiaceae family used for medicinal purposes in Brazil. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2014; 19(1): 292-309.
- 33.** Webster Grady L. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 1994; 81(1):332.
- 34.** Coy C, Gómez D, Castiblanco F. Importancia medicinal del género *Croton* (Euphorbiaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2016; 21(2): 234-247.

- 35.** Swartz O. Nova genera et species plantarum seu Prodomus description um vegetabilium maximam parte min cognitorum quae subitinere in Indiam occidentale mannis. Stockholm: M. Swederi; 1788. 95-96.
- 36.** Acevedo RP, Strong MT. Catalogue of Seed Plants of the West Indies. Smithsonian Institution Scholarly Press, Washington DC: Smithsonian contributions to botany 2012; 98: 337-338.
- 37.** Fernández HC, Batista MB, Sarduy RD. Tamizaje de alcaloides y saponinas en plantas que crecen en Cuba. III. Sierra del Rosario. Revista Cubana Enfermería 1995; 11(3): 10-15.
- 38.** Roig JT. Plantas Medicinales, Aromáticas o Venenosas de Cuba. Ciencia y Técnica, Editorial. La Habana: Cuba; 1974.
- 39.** Yin B, Li-Ru Shen, Zhang M, Zhao L, Wang Y, Huo C *et al.* Chemical Constituents of Plants from the Genus *Excoecaria*. Chemistry and Biodiversity 2008; 5(11): 2356-2371.
- 40.** Bandaranayake WM. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. Wetlands Ecology and Management 2002; 10(6): 421-452.
- 41.** Hossain SJ, Ahmed F, Hitoshi A, Magdi El-Sayed. Antioxidative and anti-histamine release activities of *E. agallocha* L. Pharmacologyonline 2009; 2: 927-936.
- 42.** Patra JK. Screening of antioxidant and antifilarial activity of leaf extracts of *E. agallocha* L. International Journal of Integrative Biology 2009; 7(1): 9-15.
- 43.** Little EL, Wadsworth FH, Marrero J. Arboles comunes de Puerto Rico y las islas Vírgenes. 2da ed. Universidad de Puerto Rico Editorial, Capítulo Euforbiáceas; 2001, 3263-28 p.
- 44.** Roskov Y, Abucay L, Orrell T, Nicolson D, Kunze T, Flann C *et al.* World Checklist of Selected Plant Families. In: Species 2000, ITIS Catalogue of life, 27th February 2016. [Internet]. Artículo disponible en: <http://apps.kew.org/wcsp/compilersreviewers.do>.
- 45.** Wunderlin RP, Hansen BF, Franck AR, Essig FB. Atlas of Florida Plants (<http://florida.plantatlas.usf.edu/>). [Landry SM and Campbell KN. (application development), USF Water Institute.] Institute for Systematic Botany, University of South Florida, Tampa. 2019.

46. Steinmann VW. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. Acta Botánica Mexicana 2002; 61: 61-96.
47. Borroto RP, Labrada MP, Mancina CA, Oviedo R. Valoración rápida de la biodiversidad en cayos al sureste de la Ciénaga de Zapata (Cuba). Orsis 2007; 22: 9-33.
48. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA). Museo Nacional de Historia Natural de Cuba, Ciénaga de Zapata Cornell Lab of Ornitholog. Rapid Biological Inventories, Apéndices, 2005. 151, 117 p.
49. Ochoa AP, Escalona JCA, Fechine JT, Sobral Da Silva M. Evaluación fitoquímica de hojas de *Excoecaria lucida* Sw. (Aité) Euphorbiaceae) y Aislamiento e identificación de un hemiterpenoide. Revista Cubana de Plantas Medicinales 2015; 20(1): 117-130.
50. Pino JA, Marbot R, Payo A, Chao D, Herrera P, Marti MP. Aromatic plants from Western Cuba. I. Composition of leaf oil of *Gymnanthes lucida* Sw. and *Eugenia rhombea* (Berg) Krug et Urban. Journal of Essential Oil Research 2005; 17(3): 278-280.
51. Lin JH, Takashi T, Nonaka GI, Nishioka I, Chen IS. Tannins and related compounds. XCVIII. Structures of three new dimeric ellagitannins, Excoecarianin and Excoecarinins A and B, Isolated from the leaves of *Excoecaria kawakamii* HAYATA. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1990; 38(8): 2162-2171.
52. Masuda T, Yonemori S, Oyama Y, Takeda Y, Tanaka T, Andoh T *et al.* Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1999; 47(4): 1749-54.
53. Zhao YL, Qiu-Xia H, Yang L, Wang SF, Liu KC, Yang YP *et al.* Chemical Constituents of *E. acerifolia* and their Bioactivities. Molecules 2010; 15(4): 2178-2186.
54. Pérez GS, Zavala SMA, Arias GL, Pérez GC, Pérez GRM. Antimicrobial study of bark from five tree species. Phytotherapy Research 2001; 5(4):356-359.
55. Da Silva CF, Ochoa AP, Alves RN, Tavares JF, Da Silva MS, Arranz JC. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity *in vitro* of phases and isolated compounds from *Excoecaria lucida* Leaves. Medicinal Chemistry 2018, 14(6):556-562.

56. Singh D, Dharam PP, Dharam PA. Coumarins: An overview of Medicinal Chemistry. Potential for new drug molecules. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2016; 7(2): 482-504.
57. Hussain MI, Qamar AS, Reigosa MJ. Activities and novel applications of secondary metabolite coumarins. Planta Daninha 2018; 36(1):1-13.
58. Valencia E. Validación y actualización del uso de plantas medicinales presentes en la selva valdiviana. [Disertación de Tesis Químico Farmacéutico]. Universidad Austral de Chile, Chile; 2013.
59. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. Free Rad. Res. Comms 1990; 9(1):1-32.
60. Vladimirov I, Parfenov EA, Epanchintseva OM, Smirnov LD. The antiradical activity of coumarin reductones. Biol. Med. 1991; 112(11):475-478.
61. Tabana YM, Hassan L, Elsir A *et al.* Scopoletin, an active principle of tree tobacco (*Nicotiana glauca*) inhibits human tumor vascularization in xenograft models and modulates ERK1, VEGF-A, and FGF-2 in computer model. Microvascular Research 2016; 107: 17-33.
62. Dewick PM. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley and Sons; 2009.
63. Malik A, Kushnoor A, Vipin S, Sarita S, Sharad K, Yogesh CY. *In vitro* antioxidant properties of Scopoletin. J. Chem. Pharm. Res. 2011; 3(3): 659-665.
64. Jang SII, Jun YK, Yiel LW, Chell KK, Hwa BS, Kwak GB. Scoparone from *Artemisia Capillaris* inhibits the release of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells upon stimulation cells by interferon- γ plus LPS. Archives of Pharmacal. Research 2005; 28:203.
65. Lee SH, Jang HD. Scoparone attenuates RANKL-induced osteoclastic differentiation through controlling reactive oxygen species production and scavenging. Experimental cell Research 2015; 331(2): 267-277.
66. Witaicenis A, Noboru LS, Silveira ACh, Domingues LAJ, Luchini AC, Rodrigues PO *et al.* Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. Phytomedicine 2014; 21:240–246.

- 67.** Konstantinos FC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas E, Nicolaides DN. Natural and Synthetic Coumarin Derivatives with Anti-Inflammatory/Antioxidant Activities. *Current Pharmaceutical Design* 2004; 10(30): 3813-3833.
- 68.** Scio E, Ribeiro AT, Alves MA, Romanha AJ, Souza JDF, Cordell GA *et al.* Diterpenes from *Alomia myriadenia* (Asteraceae) with cytotoxic and trypanocidal activity. *Phytochemistry* 2003; 64: 1125–1131.
- 69.** Ochoa A, López T, Colombat M. Farmacognosia y Química de los productos naturales. Monografía. Cuba 2000: 14-15, 15-30 p.
- 70.** Huang D, Boxin OU, Prior R. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53(6): 1841-56.
- 71.** Clarke G, Ting KN, Wiart C, Fry J. High Correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging, Ferric Reducing Activity Potential and Total Phenolics Content Indicates Redundancy in Use of All Three Assays to Screen for Antioxidant Activity of Extracts of Plants from the Malaysian Rainforest. *Antioxidants* 2013; 2: 1-10.
- 72.** Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY *et al.* Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* 2002; 163(6): 1161– 1168.
- 73.** Osorio E, Arango GJ, Jiménez N, Alzate F, Ruiz G, Gutiérrez D. *et al.* Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. *J Ethnopharmacol.* 2007; 111: 630–635.
- 74.** Benzie I, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay. En: *Analytical Biochemistry* 1996; 239: 70-6.
- 75.** Zou JH, Dai J, Chen X, Yuan JQ. Pentacyclic triterpenoids from leaves of *Excoecaria agallocha*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2006; 54(6):920-921.
- 76.** Tian MQ, Bao GM, Ji NY, Li XM, Wang BG. Triterpenoids and steroids from *Excoecaria agallocha*. *Zhongguo Zhong Yao ZaZhi* 2008; 33(4): 405-408.
- 77.** Grace MH, Faraldos JA, Lila MA, Coates RM. ent-Beyerane diterpenoids from the heartwood of *Excoecaria parvifolia*. *Phytochemistry* 2007; 68(4):546–553.

- 78.** Sheng-ZH, Zhang X, Qing-Yun M, Peng H, Yong-Tang Z, Jiang-Miao et al. Anti-HIV-1 tigliane diterpenoids from *Excoecaria acerifolia* Didr. *Fitoterapia* 2014; 95:34-4.
- 79.** Chiang EWC, Oshiro N, Kezuka M, Kimura N, Baba K, Tuck HC. Pharmacological potentials and toxicity effects of *Excoecaria agallocha*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2018; 8 (5): 166-173.
- 80.** Londoño JL. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. PARTE III, Capítulo 9. 143p.
- 81.** Marco GJ. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1968;45: 594-598.
- 82.** Al-Majedy Y, Al-Amiery A, Kadhum AA, Mohamad AB. Antioxidant Activity of Coumarins. *Sys. Rev. Pharm.* 2017;8(1):24-30.
- 83.** Kostova I, Bhatia S, Grigorov P, Balkansky S, Parmar VS, Prasad AK et al. Coumarins as Antioxidants. *Current Medicinal Chemistry* 2011; 18 (25): 3929-3951.
- 84.** DellaGreca M, Cutillo F, D'Abrosca B, Fiorentino A, Pacifico S, Zarrellia A. Antioxidant and Radical Scavenging Properties of *Malva sylvestris*. *Natural Product Communications* 2009; 4 (7): 893-896.
- 85.** Thuong PT, Hung TM, Ngoc TM, Ha do T, Min BS, Kwack SJ et al. Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure-activity relationships. *Phytother. Res.* 2010, 24(1): 101-106.
- 86.** Thirunavukkarasu P, Ramanathan T, Shanmugapriya R, Saranya AR, Muthazagan K, Balasubramanian T. Screening of antioxidant status in selected mangrove plants in Pichvaram mangrove forest (south east coast of India). *International Journal of Bioassays* 2013; 2(3): 537-541. 97.
- 87.** Hossain MA, Shah MD, Gnanaraj C, Iqbal M. *In vitro* total phenolics, flavonoids contents and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts from the leaves of tropical medicinal plant *Tetrastigma* from Sabah. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2011; 4(9): 717-721.

- 88.** Sofía S, Merlee TMV. Investigation of bioactive compounds and antioxidant activity of *Excoecaria agallocha* L. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2016; 7(12): 5062-5066.
- 89.** Reddy ARK, Grace JR. *In Vitro* Evaluation of antioxidant activity of methanolic extracts of selected mangrove plants. Med. Aromat. Plants 2016; 5(3): 1-5.
- 90.** Apak R, Capanoglu E, Shahidi F. Measurement of antioxidant activity and capacity. Recent trends and applications. 1st ed. Professor Fereidoon Shahidi P, Department of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, St John's, Newfoundland, Canada 2018.
- 91.** Mundekkad DMBD, Chidambaram R. *In Vitro* Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative activities of the leaf extracts of *Excoecaria agallocha* L. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2015; 7(11): 346-52.
- 92.** Jian-Ming Lü, Lin PH, Qizhi Y, Changyi Chen. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. J. Cell. Mol. Med. 2010; 14 (4): 840-860.
- 93.** Atta-Ur-Rahman F, Ngounou M, Choudhary M, Malik S, Makhmoor T, Nur-E-Alam M, *et al.* New antioxidant and antimicrobial ellagic acid derivatives from *Pteleopsis hylodendron*. Plantas Medicinales 2001; 67(4): 335-339.
- 94.** Subhan N, Alam MA, Ahmed F, Awal MA, Nahar L, Sarkar SD. *In vitro* antioxidant property of the extract of *Excoecaria agallocha* (Euphorbiaceae). DARU 2008; 16 (3): 149-154.
- 95.** Descalzo AM, Sancho AM. A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. Meat Science 2008; 79(3), 423-436.
- 96.** Moreira TP, Portella DF, Vitorio F, Kümmerle AE. Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry: Some Important Examples from the Last Years. Current Topics in Medicinal Chemistry 2018; 18: 124-148.



Anexos

Anexos

Anexo I. Comparación de valores de CE_{50} para el ensayo de DPPH

Prueba de Múltiple Rangos, Método: 95,0 porcentajes LSD

	Casos	Medias	Grupos Homogéneos
AA	3	19,43	X
FD	3	44,70	X
ESP	3	70,03	X
ET	3	69,8	X
SCP	3	126,88	X
TMX	3	135,89	X
AYA	3	148,98	X

Anexo II. Comparación de valores de CE_{50} para el ensayo de ABTS

Prueba de Múltiple Rangos, Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	Medias	Grupos Homogéneos
AA	3	86,35	X
FD	3	128,16	X
ET	3	150,03	X
ESP	3	593,62	X
SCP	3	624,98	X
TMX	3	852,45	X
AYA	3	982,52	X

Anexos Fichas de datos de seguridad (FDS) de sustancias químicas y peligrosas utilizadas en el Trabajo de Diploma

Identificación de la sustancia y firma comercial	Radical 2,2 difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (MERCK)	Radical ABTS* (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico) (Sigma-aldrich)	Ferricianuro de potasio (Reachim)	Ácido sulfúrico 98% (EMSURE®)
Identificación de peligros	Nocivo en caso de ingestión. Nocivo en contacto con la piel. Nocivo en caso de inhalación. Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Puede provocar una reacción alérgica en la piel.	Provoca irritación cutánea, irritación ocular grave y puede irritar las vías respiratorias.	Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos. Evitar su liberación al medio ambiente.	Corrosivo cutáneo (Categoría 1 A). Corrosivo para metales.
Composición, Información sobre	No hay presentes componentes adicionales.	No. CAS 30931-67-0.	Potasio hexaciano ferrato (II) trihidrato ($\geq 50\% - \leq 100\%$)	H ₂ SO ₄ No. CAS 7664-93-9

ingredientes	CAS1898-66-4.		No. CAS 14459-95-1.	
Medidas de primeros auxilios	En caso de contacto con la piel y/o mucosas: Lavar con agua y jabón abundantes. En caso de contacto con los ojos: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Procurar atención médica. Inhalación: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar. Si no hay respiración el personal capacitado debe proporcionar respiración artificial u oxígeno. Llamar a un centro de información toxicológica o a un médico. Es posible que la persona expuesta tenga que estar bajo vigilancia médica por un período de 48 horas.	Recurrir a un médico de inmediato. Suministrar aire fresco; eventualmente hacer respiración artificial. Si los trastornos persisten consultar al médico. Las personas desmayadas deben tenderse y transportarse de lado con la suficiente estabilidad. En caso de contacto con la piel: Aclarar con abundante agua. En caso de irritaciones continuas de la piel, consultar un médico. En caso de los ojos: Limpiar los ojos abiertos durante varios minutos con agua corriente. En caso de trastornos persistentes consultar un médico. En caso de ingestión: Enjuagar la boca. Proporcionar asistencia médica a la persona afectada.	Tras inhalación: aire fresco. Tras contacto con la piel y ojos: lavar con abundante agua. Eliminar ropa contaminada. Tras ingestión: Hacer beber agua (máximo dos vasos). Consultar al médico.	Tras inhalación aire fresco. Llamar al médico. Tras contacto con la piel: aclarar con abundante agua. Extraer la sustancia por medio de algodón impregnado con polietilenglicol 400. Despojarse inmediatamente de la ropa contaminada. Tras contacto con los ojos: aclarar con abundante agua. Llamar inmediatamente al oftalmólogo. Tras ingestión: hacer beber agua (máximo 2 vasos), evitar el vómito por peligro de perforación. No proceder a pruebas de neutralización.
Medidas contra incendios	No existe un peligro específico de incendio o explosión. Use un agente de extinción adecuado para el incendio circundante.	Posible formación de gases tóxicos en caso de calentamiento o incendio. Puede ser combustible a altas temperaturas. En caso de incendio pequeño usar polvo químico seco y en caso de gran incendio utilizar agua pulverizada, niebla de agua o espuma, pero no usar chorro de agua.	Usar medidas de extinción que sean adecuadas según el local y sus alrededores. No existen limitaciones de agentes extinguidores para esta sustancia. No combustible.	Usar medidas de extinción adecuadas según el local y sus alrededores. No es combustible. Posibilidad de formación de vapores peligrosos. Usar equipode protección especial.
Medidas en caso de vertido accidental	No debe realizarse acción alguna que suponga un riesgo personal o sin una formación adecuada. Evacuar los	Usar lentes anti-salpicaduras, ropa de protección completa, aparato de respiración anti-polvos, botas,	Evitar la formación de polvo, no inhalar el polvo. Evacuar el área de peligro. Usar equipo de protección. No tirar los residuos	No respire los vapores. Evitar contacto con la sustancia. Asegure una ventilación adecuada. No tirar los

	alrededores. No toque o camine sobre el material derramado. Proporcione ventilación adecuada. Llevar un aparato de respiración apropiado cuando el sistema de ventilación sea inadecuado. Llevar puestos equipos de protección personal.	guantes. Utilizar los instrumentos necesarios para poner el sólido vertido en un recipiente de recuperación apropiado.	por el desagüe. Cubra las alcantarillas. Recoja, una y aspire los derrames.	residuos por el desagüe.
Almacenamiento y Manipulación	Consérvese en su envase original. No conservar a temperaturas superiores a: -20°C. Conservar de acuerdo con las normativas locales. Almacenar en el contenedor original protegido de la luz directa del sol en un área seca, fresca y bien ventilada, separado de materiales incompatibles y comida y bebida.	Conservar alejado del calor y de toda fuente de ignición. Los recipientes vacíos pueden suponer un riesgo de incendio, evaporar los residuos bajo una campana de humos. Poner a tierra todo el equipo que contiene material. Manténgase el recipiente bien cerrado. Mantenga el contenedor en un área fresca y bien ventilada. No almacenar encima 4°C. Utilizar el contenedor original.	Almacenar protegido de la luz, seco y bien cerrado.	Almacenar bien cerrado, en lugar seco y fresco.
Controles de exposición/ protección personal	Use equipo protector personal adecuado	Utilizar recintos de proceso, sistemas de ventilación locales, u otros procedimientos de ingeniería para conservar la cantidad de partículas aerotransportadas por debajo de los límites de exposición recomendados. Lávese las manos después de manejar los compuestos y antes de comer, fumar, utilizar los lavabos y al final del día.	Usar equipos de protección personal.	Valor límite ambiental-exposición de corta duración: 3 mg/m³. Valor límite ambiental-exposición diaria: 1 mg/m³.
Propiedades físicas y químicas	Apariencia: Polvo sólido de color negro. Fórmula química: C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆ . Masa molar: 394,32 g/mol. No hay otras informaciones	Polvo amarillo claro, masa molar 548,7 g/mol, fórmula química C ₁₈ H ₂₄ N ₆ O ₆ S ₄ . No hay más información	Sólido amarillo claro inodoro, pH 9,5 a 100 g/L a 20°C. Punto de fusión 70°C. Solubilidad en agua 289 g/L a 20°C.	Líquido incoloro e inodoro, pH 0,3 a 49 g/L a 25°C. Punto de fusión -20°C. Punto de ebullición 335°C. Presión de vapor

	disponibles	disponible.	Temperatura de descomposición > 70°C. Densidad aparente 950-1050 kg/m ³ .	0,0001 hPa a 20°C. Densidad relativa del vapor 3,4. Densidad 1,84 g/cm ³ a 20°C. Soluble en agua con desprendimiento de calor.
Estabilidad y reactividad	El producto es estable. En condiciones normales de almacenamiento y uso, no se producen reacciones peligrosas.	El producto es estable.	Sensible a la luz. Eliminación del agua de calefacción por calefacción. Incompatible con ácidos fuertes, oxidantes, gas cloruro de hidrógeno, nitritos. Evitar calentamiento.	Evitar calentamiento fuerte. Higroscópico, corrosivo. Peligro de explosión y formación de gases tóxicos con agua, metales alcalinos, amoníaco, aldehídos, acetonitrilo, metales alcalinotérreos, álcalis, ácidos, metales y sus aleaciones, óxidos de fósforo, fósforo, hidruros, halogenuros y halogenatos, permanganato, nitratos, sustancias inflamables, solventes orgánicos, aminas y otros.
Información toxicológica	Nocivo para el organismo. La exposición a los productos de degradación puede producir riesgos para la salud. Es posible que los efectos graves surjan a largo plazo tras la exposición.	Peligroso en caso de contacto cutáneo (irritante), del contacto con los ojos (irritante), de inhalación (irritante pulmonar).	Toxicidad oral aguda en ratas DL50 3,613 mg/kg. Irritante ocular, de piel y mucosas. No carcinogénico ni genotóxico.	CL ₅₀ rata 510 mg/kg. Irritante ocular, cutáneo y de mucosas.
Información ecológica	Evite la dispersión del reactivo. Avisar a las autoridades pertinentes si el producto ha causado contaminación medio ambiental (alcantarillas, canales, tierra o aire).	El producto y sus productos de degradación no son tóxicos.	Tóxico para los peces, dafnias, algas e invertebrados acuáticos. La descarga en el ambiente debe ser evitada.	Tóxico para animales marinos. Forma mezclas causticas a pesar de estar diluido. Efecto perjudicial por desviación del pH. Peligro para el agua potable por filtración en suelos y acuíferos.
Consideraciones de Disposición Final	Elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.	Los desperdicios deben ser desechados de acuerdo con las regulaciones federales, estatales y de control ambiental local.	Los residuos deben de eliminarse de acuerdo con la directiva sobre residuos y otras normativas locales y nacionales. Deje los productos químicos	Eliminar según las normativas nacionales.

			en sus recipientes originales. No mezclar con otros residuos. Maneje los recipientes sucios como el propio producto.	
Transporte	Como este material no está regulado, no hay información de transporte será dado.	Como este material no está regulado, no hay información de transporte será dado.	Producto no peligroso según los criterios de reglamentación del transporte.	Clase 8 Grupo de embalaje II. Peligrosas ambientalmente. Precauciones particulares para los usuarios si Código de restricciones en túneles E. Transporte fluvial (ADN) No relevante. Transporte aéreo (IATA).