

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA - LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**  
**CARRERA DE FARMACIA**



**“ A la libertad por la universidad “**

Ensayo biodirigido del extracto etanólico del fruto *Cocos nucifera* con actividad antioxidante.

Monografía para optar al título de Lic. Químico farmacéutico.

**Autor:** Br. Noelia Marina Rojas Mayorga.

**Tutor:**

Msc. Fernando Emilio Baca Escoto.

Profesor titular del Dpto. de Farmacia Industrial.

**León-Nicaragua Abril del 2014.**

## **Dedicatoria**

A Dios sobre todas las cosas que es la fuente infinita de sabiduría por concederme vida, paciencia y por darme todos los medios necesarios para llegar a concluir una etapa más en mi vida.

A mis padres: Sr. Antonio Rojas y Sra. Olga Marina Mayorga Téllez, por todo el apoyo, cariño, comprensión y amor que siempre me han brindado, a quienes les demuestro que sus esfuerzos no han sido en vano, sino que su responsabilidad como padres han sido correspondidos satisfactoriamente para ellos mi respeto y admiración.

A mis hermanos: Ramón Antonio, Celia Cristina y José Exequiel por todo el apoyo moral y entusiasmo que me han brindado para seguir adelante y alcanzar todo lo que me he propuesto.

A mis familiares que de una u otra forma siempre me apoyaron y me guiaron por el mejor camino.

## **Agradecimiento**

A Dios nuestro señor por iluminarnos y guiarnos con sabiduría y fortaleza en cada instante de nuestras vidas y permitirnos culminar nuestra carrera.

A nuestros padres por todo el amor y apoyo incondicional que nos han brindado.

A todo el colectivo de profesores y en especial al tutor Msc. Fernando Emilio Baca Escoto por su abnegada labor de guiarnos en la realización del presente trabajo monográfico e impulsarnos a la investigación científica y a ser mejores profesionales cada día.

A todas aquellas personas que de una u otra forma nos brindaron su apoyo en el transcurso de este trabajo para salir adelante.

## ÍNDICE

<b>Introducción.....</b>	<b>1-2</b>
<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>3</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>4</b>
<b>Marco teórico.....</b>	<b>5-28</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>29</b>
<b>Material y método.....</b>	<b>30-33</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>34-35</b>
<b>Análisis de Resultados.....</b>	<b>36</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>37-40</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>41-43</b>



## **Introducción**

El uso de plantas medicinales es una costumbre de alcance mundial y con un origen milenario ya que se reporta la existencia de recetas de plantas para la cura de enfermedades desde la época del antiguo Egipto. (García. J. M, 1999).

En Nicaragua el uso de plantas medicinales es una práctica muy común ya que constituye los diferentes elementos fitoterapéuticos disponibles a nuestro alcance para subsanar enfermedades comunes como no comunes; se han encontrado plantas que poseen un amplio campo de propiedades curativas por lo que permite descubrir nuevas drogas con propiedades medicinales; hay que intentar extraer en las mejores condiciones posibles las sustancias activas de las hojas, frutos y semillas de la corteza o de las raíces. Esto implica como condición previa el empleo del material de gran calidad. (Pallow. M, 1999).

La población utiliza una serie de plantas para curar sus enfermedades entre las cuales se encuentra el coco (*Cocos nucifera*). El grado de toxicidad se refleja en un determinado agente mediante el cual se determina su actividad biológica siendo esta una de las primeras utilidades para la ejecución del presente estudio de investigación. (García. J. M 1999)

El aislamiento e identificación de los compuestos químicos de plantas medicinales, llamados metabolitos secundarios, representan el más exitoso acercamiento al descubrimiento de nuevas drogas y moléculas para el beneficio de la humanidad, así mismo derivados de la plantas sirven como agentes potenciales que puedan ser utilizadas frecuentemente, muchas plantas acumulan sustancias orgánicas extraíbles para su uso comercial ya que poseen gran utilidad con estructuras simples y complejas.(Lock.O,1994).

Un estudio sobre el coco realizado en el año 2012, demuestra que la temperatura es un factor que durante el secado y la extracción afecta la estabilidad de compuestos activos, debido a la participación de reacciones de degradación química, volatilización o descomposición térmica. (Ruiz, J.2012)



Del mismo modo el estudio reveló que aumenta el metabolismo, que ayuda a la gente que está intentando perder el peso y erradicar el sufrimiento de problemas de la tiroides. El coco estabiliza los niveles de azúcar de sangre. También protege las células del corazón contra daño y releva los síntomas de menopausia y el síndrome pre-menstrual. (Mercola. S, 1981)

Los resultados publicados en el diario Americano de Nutrición Clínica demostraron que ambas poblaciones presentaron salud vascular positiva. No se encontró evidencia de que la ingesta de grasas saturadas tuviera algún efecto nocivo en estas poblaciones. (Mercola.S, 1981)

Por otra parte un estudio reciente, realizado por José Valdés vinculan al coco con tratamientos para diversas enfermedades, como la neumonía. También se considera benéfico para tratar la diabetes, ya que estimula la absorción de insulina y tiene cualidades antiinflamatorias, antivirales y antibacteriales. (Valdés. J, 2011).

Un estudio sobre el aceite de coco indica que este incluye propiedades antioxidantes, previniendo enfermedades degenerativas, también se informó que un grupo de científicos de la Universidad de Oxford descubrieron que el uso de aceite de coco puede ayudar a producir una cierta mejoría en las personas que sufren de la enfermedad de Alzheimer, sugieren que las cetonas en aceite de coco pueden ayudar a recuperar la memoria temporal y estos hallazgos pueden ser muy prometedores para el tratamiento de la demencia como los trastornos cerebrales. (Defer. E, 2011).

La biodiversidad de plantas que se encuentran en Nicaragua y el uso medicinal que tienen abre la posibilidad de encontrar nuevos principios activos por tanto el conocimiento de la actividad biológica de plantas es un punto importante en la investigación de nuevos fármacos. La planta *Cocos nucifera* tiene reportes químicos que exhiben su potencial como agente terapéutico debido al importante papel que ejercen los antioxidantes en el cuerpo humano el presente estudio se orienta a la búsqueda de antioxidantes es por esto que dicho trabajo proporcionará validez científica de la planta en estudio.



### **Planteamiento del problema**

Las acciones nocivas de los radicales libres sobre el organismo han promovido la búsqueda de moléculas con propiedades antioxidante es por esto que es necesario investigar ¿Qué fracción del fruto de coco presenta mayor actividad antioxidante?



### **Objetivo General**

- Evaluar la actividad antioxidante del *Coco nucífera* mediante el ensayo del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH).

### **Objetivos específicos**

1. Recolectar el material vegetal y preparar extractos etanólicos.
2. Determinar la actividad biológica mediante técnica DPPH de cada fracción.





## **Marco Teórico**

El uso de plantas medicinales para la prevención y cura de enfermedades ha incrementado el interés en la búsqueda de antioxidantes naturales, generalmente constituidos por las mezclas de compuestos con elevada diversidad molecular y funcionalidad biológica. Las plantas poseen compuestos antioxidantes, involucrados mediante diferentes mecanismos de acción en la prevención del cáncer por ello son de interés en la salud, nutrición y medicina. (García. G. J, 2011).

## **Los antioxidantes**

Son compuestos químicos que inhiben los procesos de oxidación, por lo que los radicales libres de oxígeno y sus derivados son importantes en el metabolismo de las células, por el empleo de oxígeno como fuente de energía, los compuestos extra e intercelulares, antioxidantes en la naturaleza forman una barrera en el organismo contra la generación excesiva de los radicales y su propagación a los peróxidos, manteniendo un equilibrio oxidativo. (García. G. J, 2011)

En concentraciones moderadas los radicales libres desempeñan un importantes funciones fisiológicas en el organismo pero en concentraciones elevadas pueden dañar todo tipo de biomolécula, alterando la actividad celular a nivel de membrana, metabolismo o expresión génica. (García. G.J, 2011)

## **Especie reactiva de oxígeno**

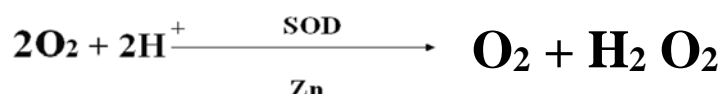
Las **especies reactivas del oxígeno (ERO)** incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos inorgánicos como orgánicos. Son moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen importancia a nivel celular. En épocas de estrés ambiental sus niveles pueden aumentar lo cual resulta en daños significativos a las estructuras celulares; esto lleva al estrés oxidativo. (Sen.K, 2003).



Normalmente las células son capaces de defenderse a sí mismas contra los daños de las especies reactivas del oxígeno mediante el uso de enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa. Pequeñas moléculas antioxidantes como el ácido ascórbico (vitamina C), ácido úrico, y glutatión también desempeñan un rol importante como antioxidantes celulares. (Sen.K, 2003)

### **Súper-oxido-dismutasa (SOD)**

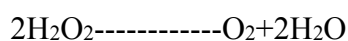
Actúa neutralizando los radicales súper-oxido convirtiéndolos en peróxido de hidrógeno en concentraciones inferiores a 10 siempre en presencia de Zinc. (Pérez .L, 2002)



La SOD es imprescindible para todos los organismos aerobios, habiéndose establecido una correlación entre los niveles de SOD y el índice la longevidad.

### **Catalasas**

Reducen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular, eliminando esta agua oxigenada casi al mismo tiempo que se va formando.



Estos enzimas se encuentran en el interior de unos orgánulos citoplasmáticos llamados Peroxisomas. (Pérez.L, 2002)

### **Mecanismo del oxígeno dañino**

En general, los efectos nocivos de las especies reactivas del oxígeno en la célula son:

1. Daños al ADN.
- 2-Oxidación de ácidos grasos poliinsaturados.
- 3-Oxidación de aminoácidos en las proteínas t.



Para evitar estos daños, las células tienen varios mecanismos de eliminación y transformación de las ROS como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa así sustancias antioxidantes como el glutatión o la vitamina C que se encargan de reducir las ROS. (Pérez. L, 2002)

La alteración del balance en los mecanismos de producción y eliminación de las ROS, en favor de la producción, origina el estado de estrés oxidativo en la célula. Además de provocar daños celulares, el estrés oxidativo influye en la regulación de ciertos genes habiéndose involucrado en la aceleración de los procesos de envejecimiento. (Wu. D, Hugenholtz.P & Mavromatis.K, 2009).

Los efectos de las especies reactivas del oxígeno sobre el metabolismo celular han sido bien documentadas en una gran variedad de especies. Estos incluyen no sólo los roles en la muerte celular programada y la necrosis, sino también efectos positivos, tales como la inducción de genes de defensa y la movilización de los sistemas de transporte de iones. Las especies reactivas del oxígeno están implicadas en la actividad celular a una variedad de respuestas inflamatorias incluyendo las enfermedades cardiovasculares. (Wu, et. al, 2009)

### **Radicales oxidantes**

Los radicales libres son moléculas inestables de alta energía con un electrón desapareado en sus órbitas exteriores, que tienden a reaccionar con compuestos, en especial con los ácidos grasos poliinsaturados; esto debido a que las moléculas estables tienen electrones en parejas, sin embargo si un electrón no se encuentra en pareja con otro se vuelve muy reactivo e inestable, por lo que buscará a otro electrón para emparejarse con él; lo que ocurre con los radicales libres (Hernández. F, 2004).

Cuando los radicales especialmente  $(OH)^{\cdot}$  y  $O_2^{\cdot-}$  producen radicales alquilperóxido, facilitan la perpetuación de la cadena de reacciones de oxidación de los lípidos, con daños similares sobre las proteínas y los ácidos nucleicos (Córdova. A, 2000).



Los radicales libres son producidos fundamentalmente por células fagocíticas activadas como los monocitos, macrófagos y neutrófilos; incluyendo diversos compuestos oxidados como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el óxido nítrico (NO) . Otras fuentes muy importantes en la producción de radicales libres son: la exposición a ciertos compuestos químicos, el estrés oxidativo típico del ejercicio físico intenso, exposición a contaminantes del aire, radiaciones ionizantes y no ionizantes, drogas, bacterias, virus. (Abdollahi.M .Ranjbar.AShadnia.S Nikfor.S & Rezaice.A2004).

Los radicales libres pueden encontrarse en el interior o en el exterior de las células o incluso diseminados por todo el organismo, manteniendo actividad biológica al oxidarse, dañando principalmente el tejido conjuntivo, proteínas, enzimas, lípidos, membranas celulares , fibras de colágeno, ADN y ARN, entre otros; y su acción también la pueden ejercer sobre los leucocitos favoreciendo su activación anómala , por lo cual están implicados en la producción de enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares .(Hernández. F, 2004)

Nuestro organismo bajo el curso normal de su metabolismo, produce radicales libres y aunque puede canalizarlos hacia la producción de energía e incluso en algunas células ser utilizados como armas para destruir virus y bacterias, lamentablemente cuando son generados en cantidades excesivas su energía extremadamente alta puede dañar los tejidos normales (Hernández. F, 2004).

### **Estrés oxidativo**

En determinadas circunstancias, la producción de radicales libres puede aumentar en forma descontrolada, situación conocida con el nombre de estrés oxidativo. El concepto expresa la existencia de un desequilibrio entre las velocidades de producción y de destrucción de las moléculas tóxicas que da lugar a un aumento en la concentración celular de los radicales libres. (Desmarchelier. C y Ciccía. G1998).



En las células normales permanentemente se generan derivados de oxígeno que son neutralizados o eliminados por los mecanismos antioxidantes de la célula como: enzimas antioxidantes (glutación, peroxidasas, superóxido dismutasa y catalasa) agua o grasas solubles, antioxidantes no enzimáticos (vitamina C, E glutación, selenio). Estas interacciones determinan el buen funcionamiento en el ambiente; sin embargo estas condiciones externas o internas pueden incrementar la producción de sustancias reactivas de oxígeno. Este desequilibrio se le conoce como estrés oxidativo de oxígeno y es responsable del ADN, proteínas y lípidos; esto puede derivar de un proceso de necrosis celular o transformación neoplásica. (Desmarchelier et. al, 1998).

Existen evidencias que sugieren la existencia de una relación entre el estrés oxidativo y el origen de numerosas enfermedades. Por ejemplo, las células fagocíticas del sistema inmune (neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos) que defienden al organismo contra la agresión de agentes extraños, producen grandes cantidades de radicales libres como parte del mecanismo que les permite destruir dichos agentes. (Desmarchelier et. al, 1998).

Por otra parte, se ha demostrado que el incremento del estrés oxidativo, acompaña a la infección por VIH. . Investigadores canadienses sugirieron que un sistema de defensa antioxidante débil es un factor significativo al considerar el alto estrés oxidativo que se observa en la población infectada por dicho virus. El aumento de la producción de moléculas de oxígeno reactivo podría estimular la replicación del VIH y la inmunodeficiencia asociada, además, los pacientes VIH positivos también presentaban concentraciones en plasma, más bajas de selenio y vitaminas antioxidantes. (Allard.P y Kotler.P1998).

Se ha podido apreciar que los radicales libres se forman en condiciones fisiológicas en proporciones controlables por los mecanismos defensivos de las células, pero en situaciones de enfermedad se incrementa sustancialmente, así como el estado de estrés oxidativo. Los radicales libres, producidos por el metabolismo celular normal, con el tiempo dañan el ADN y otras macromoléculas, originan enfermedades degenerativas, lesiones malignas y la muerte eventual de células vitales, que llevan al envejecimiento y la muerte. (Allard et. al, 1998).



Al conocer los efectos negativos que provocan los radicales libres, podemos entender mejor la función y efecto que tienen los antioxidantes en la salud, que como su nombre lo indica, es evitar la oxidación de sustancias que puedan provocar alteraciones fisiológicas, facilitar el uso fisiológico del oxígeno por parte de las mitocondrias ayudando a reducir los efectos del estrés oxidativo y la falta de oxígeno ); formando complejos que mitigan las reacciones productoras de radicales libres y por consiguiente desempeñando una función fundamental en la prevención de las enfermedades derivadas del estrés oxidativo (Kleiner. S, 1996).

Los radicales libres, producidos por el metabolismo celular normal, con el tiempo dañan el ADN y otras macromoléculas que originan enfermedades degenerativas, lesiones malignas y la muerte eventual de células vitales, que llevan al envejecimiento y la muerte; la acumulación de radicales libres es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que los neutralicen, los antioxidantes (Kleiner.S, 1996).

El antioxidante, al chocar con el radical libre cede un electrón que oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico (Kleiner.S, 1996).

### **Fuentes de radicales libres**

- La mitocondria resulta la principal fuente de radicales libres. Este fenómeno se verifica a nivel de la cadena de transporte de electrones, última etapa de la producción de protones de alta energía para formar el ATP (Ferreira, n. d).
- Los peroxisomas, organelas del citosol, ricas en oxidasas y que generan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ferreira, n. d).
- Los leucocitos polimorfo nucleares neutrófilos, son células claves en la respuesta protectora contra los microorganismos y realizan una función importante en la fisiopatología de la respuesta inflamatoria. (Ferreira, n.d).
- Enzima xantina deshidrogenasa, predominante en los endotelios.(Ferreira, n. d).



### **Antioxidantes y enfermedades cardiovasculares**

Las partículas de colesterol LDL oxidadas contribuyen al desarrollo de la placa aterosclerótica, además de que estas partículas pueden inducir la apoptosis directamente. Se sabe que un aumento en los procesos apoptóticos en los vasos con lesiones ateroscleróticas que puede originar displasia fibromuscular focal y degeneración de la capa media de las arterias coronarias (Watson, Cai.J & Jones.D, 2000).

También las partículas LDL oxidadas pueden modificar la inflamación y los mediadores trombogénicos; por lo que la prevención de la oxidación de las LDL con antioxidantes podría usarse para inhibir la progresión de la enfermedad (Watson, et. al, 2000).

Dos componentes alimentarios que inhiben el potencial de oxidación del colesterol LDL son el nivel de ácido linoleico en las partículas y la disponibilidad de antioxidantes, siendo la vitamina E el nutriente más importante. (Watson, et. al, 2000).

In vitro la vitamina E inhibe la oxidación de las LDL y su acción es superior si la suplementación combina ésta vitamina con la vitamina C y el betacaroteno (Watson, et. al, 2000).

La suplementación de 100 mg/día de vitamina E, ha permitido disminuir los niveles de LDL tanto en hombres como en mujeres, sin embargo la suplementación no produce ningún efecto de cambio en personas que hayan sufrido ataques al corazón o en la calidad de vida de pacientes que hayan manifestado varios ataques al corazón (Feldman.H y Butrum.E,2003).

Referente a la vitamina C, las concentraciones de ésta vitamina en el plasma descienden con el aumento de la edad al igual que otros antioxidantes, por lo que los ancianos son más propensos a tener bajos niveles de antioxidantes debido en la mayoría de los casos a una alimentación insuficiente y mal balanceada. Los carotenoides, sugieren que desempeñan un papel posterior y no anterior en el proceso aterosclerótico, al prevenir la formación de la placa arterial. Se ha comprobado que el carotenoide licopeno tiene una función antioxidante



previniendo las enfermedades cardiovasculares; además se ha encontrado que personas que presentaban elevadas concentraciones de licopeno en el tejido, disminuían en un 60% los riesgos de infarto (Zhang & Farthing.M, 2005).

### **Antioxidantes y el cáncer**

Se ha demostrado que la vitamina E induce la muerte celular en células del cáncer colorectal y aumenta la inhibición del crecimiento de éstas células por el 5-fluorouracilo (posiblemente el único tratamiento más eficaz para el cáncer colorectal avanzado), lo que sugiere que es útil como tratamiento complementario para éste tipo de cáncer; también se ha descubierto que el consumo de alimentos con beta-caroteno, protege contra los daños producidos por los rayos x ; además de que el consumo de alimentos con vitamina C y beta-carotenos disminuyen el riesgo de desarrollar algunos tipos de cánceres.(Zhang, et. al, 2005).

Con respecto a las posibles funciones protectoras de la vitamina C en la carcinogénesis gástrica asociada al *Helicobacter pylori*, no se está claro el mecanismo por el cual la vitamina C reduce el riesgo de cáncer gástrico ; sin embargo hay estudios que sugieren que su acción antioxidante contra el estrés oxidativo de la mucosa gástrica puede deberse a la vitamina C, al ser un potente antioxidante soluble en agua atrapa y neutraliza una variedad de especies reactivas del oxígeno, como hidroxilo, alcòxilo, peróxido, anión superóxido, radicales hidropéroxido y radicales reactivos del nitrógeno a concentraciones muy bajas; además puede regenerar otros antioxidantes como el alfa-tocoferoxilo y el beta-caroteno a partir de sus especies radicales (Zhang, et. al, 2005).

### **Prevención de enfermedades**

Los antioxidantes pueden anular los efectos perjudiciales de los radicales libres en las células y la gente con una dieta de frutas y vegetales ricos en polifenoles y antocianinas tienen un riesgo más bajo de contraer cáncer, enfermedades cardíacas y algunas enfermedades neurológicas. Esta observación sugirió que estos compuestos pudieran prevenir





enfermedades tales como degeneración macular, inmunidad suprimida debido a una nutrición pobre y neurodegeneración, que son causados por el estrés oxidativo. Sin embargo, a pesar del papel claro del estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares, estudios controlados usando vitaminas antioxidantes no han mostrado ninguna reducción clara en el progreso o riesgo de contraer enfermedades cardíacas. Esto sugiere que otras sustancias en las frutas y los vegetales (posiblemente los flavonoides) por lo menos expliquen parcialmente la mejor salud cardiovascular de quienes consumen más frutas y vegetales (García. J.M,1999).

Los Antioxidantes han demostrado que pueden ser la protección efectiva y eficaz para prevenir el envejecimiento prematuro y enfermedades crónicas degenerativas, como hipertensión, artritis reumatoide, lupus, diabetes mellitus, arteriosclerosis, entre otras. Se piensa que la oxidación de lipoproteínas de baja densidad en la sangre contribuye a las enfermedades cardíacas y en estudios de observación iniciales se encontró que gente que tomaba suplementos de la vitamina E tenía riesgos más bajos de desarrollar enfermedades cardíacas. Por consiguiente se realizaron por lo menos siete grandes ensayos clínicos conducidos para probar los efectos del suplemento antioxidante con vitamina E, en dosis que se extendían desde los 50 a los 600 mg por día. Sin embargo, en ninguno de estos ensayos se encontró un efecto estadístico significativo de la vitamina E sobre el número total de muertes o en las muertes debido a enfermedades cardíacas (García. J.M,1999).

Los investigadores encontraron que no había ningún efecto estadístico significativo de los antioxidantes en la esperanza de vida media, cáncer, o enfermedades cardíacas. Sin embargo, un análisis de un subgrupo demostró una reducción del 31% en el riesgo de cáncer en hombres, pero no en mujeres (García.J.M,1999).

La producción de antioxidantes naturales y los antioxidantes que se obtienen con la alimentación, no es suficiente para la mayoría de las personas, por esa razón muchas compañías alimentarias y de nutracéuticos venden formulaciones de antioxidantes como suplementos dietéticos y estos son ampliamente consumidos en los países industrializados. Estos suplementos pueden incluir químicos específicos antioxidantes, como el resveratrol(de las semillas de uva), productos que contienen beta-caroteno (provitamina **A**), vitamina **C**,



vitamina E y Selenio, o hierbas especiales que se sabe que contienen antioxidantes, como el té verde y el jiaogulan. Aunque algunos de los niveles de vitaminas antioxidantes y minerales en la dieta son necesarios para la buena salud, hay considerables dudas sobre si los suplementos antioxidantes son beneficiosos y, en caso afirmativo, que antioxidantes lo y en qué cantidades (García.J.M,1999).

### **Compuestos fenólicos**

Este tipo de compuestos es encontrado en arroz, trigo, avena, tomate, frutas cítricas. Los compuestos de este tipo son incapaces de iniciar o propagar una cadena de reacción (Sargo. A, Lanza.M, Marzullo.D,Bonina y Castelli.F, 1995).

Dentro de estos compuestos tenemos:

### **Flavonoides**

Los flavonoides son conocidos por poseer diferentes actividades biológicas, principalmente en el avance de antioxidantes y la habilidad de captura de radicales libres. La propiedad antiradical del flavonoide es comúnmente dirigida hacia el grupo OH (Sargo, et. al, 1995).

La protección hacia el daño depende de la capacidad de donar hidrogeno de un grupo hidroxilo de cada molécula. Sin embargo, la efectividad de protección por antioxidantes fenólicos es bien fundada en relación a la incorporación dentro de la célula y de la orientación en la biomembrana. (Sargo, et. al, 1995).

El efecto antioxidante de los flavonoides está bien relacionado con la estructura característica de ellos. La actividad antioxidante de los flavonoides no solo está en su estructura sino también en su localización en la membrana.(Sargo, et. al, 1995).

El radical hidroxil generado cerca o próximo al ADN puede eventualmente resultar en la ruptura de la fibra de ADN y contribuir a un significativo efecto biológico, tal puede ser:



carcinogénesis, mutación, citotoxicidad. El daño causado por la toxicidad debido al efecto del radical libre OH es disminuido por la captura de ese radical, tal capturador puede ser un flavonoide. (Sargo, et. al, 1995).

La actividad de captura puede no ser vista directamente por el número de grupos OH sustituyendo al anillo, especialmente si se localizan en el carbono 3. Cuando el número de grupos OH decrece la habilidad de romper la cadena rápidamente decrece.(Sargo, et. al, 1995).

Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia el radical hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación. (Martínez, González. M. y Tuñón, 2002).

Además de sus conocidos efectos antioxidantes, los flavonoides presentan otras propiedades que incluyen la estimulación de las comunicaciones a través de las uniones en hendidura, el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación tales como las monooxigenasas dependientes de citocromo P-450, entre otras.(Martínez, et.al, 2002).

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. (Martínez, et.al, 2002).

Las repercusiones de la carga negativa son sumamente importantes en la evaluación del potencial antioxidante de los flavonoides. Primero, el radical cargado negativamente no es probable que pase a través de la membrana celular con carga negativa. Segundo, la reacción de los radicales flavonoides con la vitamina E, que es termodinámicamente factible para algunos radicales flavonoides, tiene un obstáculo adicional a causa de la repulsión electrostática entre el anión del radical flavonoide y la membrana fosfolipídica cargada

---



negativamente, donde la vitamina E se incrusta. Tercero, la oxidación de un solo electrón de los flavonoides por cualquier oxidante tendrá una barrera entrópica, porque por lo menos dos protones se intercambian en la reacción. Los protones pueden intercambiarse entre los reactantes o con el solvente en el estado de transición, en este caso, la interfase del enlace con hidrógeno debe tenerse en cuenta. (Martínez, et.al, 2002).

Los flavonoides se encuentran también en extractos de plantas como arándano, ginkobiloba, cardo, mariano o crataegus. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre. (Martínez, et.al, 2002).

Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo; representan, pues, una contribución importante al potencial antioxidante de la dieta humana. (Martínez, et.al, 2002).

### **Acción antioxidante de los flavonoides**

La capacidad de los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue ya reconocida en los años treinta; sin embargo, el mecanismo antioxidante fue ignorado en gran medida hasta hace poco tiempo. El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatoria. (Martínez, et.al, 2002).



La función antioxidante de la quercitina muestra efectos sinérgicos con la vitamina C. El ácido ascórbico la oxida a la quercitina, de manera tal que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo. Por otra parte, la quercitina protege de la oxidación a la vitamina E, con lo cual también presenta efectos sinergizantes. (Martínez, et.al, 2002).

Los flavonoides retiran oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células. Sus efectos citoprotectores son, por ejemplo, bien patentes en fibroblastos de la piel humana, queratinocitos, células endoteliales y ganglios sensoriales cultivados en presencia de sulfoxina butionina, un inhibidor irreversible de la glutatión sintetasa. Diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos o la autooxidación de los homogeneizados de cerebro. Asimismo, se ha comprobado su potente capacidad de inhibir *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos y reducir la citotoxicidad de las LDL oxidadas. (Martínez, et.al, 2002).

En ensayos clínicos, se ha comprobado que la administración profiláctica de flavonoides disminuye la producción de radicales libres en la reperusión después del bypass en cirugía de reemplazamiento vascular. Además, flavonoides como la quercitina y el kaempferol son capaces de aumentar el nivel en un 50%, induciendo el sistema antioxidante celular y contribuyendo así a la prevención de enfermedades. (Martínez, et.al, 2002).

En estudios epidemiológicos se ha demostrado que con el consumo incrementado de frutas y vegetales se experimenta una reducción del 50% en el riesgo de cánceres digestivos y de las vías respiratorias. Así, la genistéina bloquea el desarrollo de tumores al prevenir la formación de nuevos vasos impidiendo con ello la llegada del oxígeno y nutrientes a las células neotumorales. También modula la reacción de los estrógenos ligándose a sus receptores con lo que disminuye el riesgo de cáncer de mama. De hecho, se ha puesto de manifiesto que diversos flavonoides pueden inhibir monooxigenasas dependientes del citocromo P-450, lo



que indicaría un papel potencial en la regulación de la activación de carcinógenos<sup>59</sup> y que chalconas y flavononas en concreto son inductoras de las quinonas reductasas y podrían tener un papel preventivo en la progresión de los hepatomas. (Martínez, et.al, 2002).

Los flavonoides protoantocianídicos pueden ser absorbidos por las membranas celulares y protegerlas de la acción de los radicales libres. Tienen la ventaja de ser liposolubles e hidrosolubles: es decir, se disuelven en lípidos o en agua. Por eso, en contraste con otros antioxidantes que no poseen esa doble cualidad, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y pueden proteger a las células cerebrales, que son muy sensibles a las lesiones producidas por los radicales libres. (Martínez, et.al, 2002).

Los flavonoides no constituyen un grupo homogéneo de compuestos y las mismas propiedades que caracterizan su actividad antioxidante, determinan que puedan presentar efectos prooxidantes. Los mecanismos moleculares que determinan la actividad de los flavonoides en ese sentido, se basan en la formación de un radical aroxilo lábil o de un complejo flavonoide hierro redox lábil. En el primer caso, la autooxidación del radical aroxilo genera anión superóxido ( $O_2^-$ ) que, siguiendo la secuencia conocida, genera el dañino radical hidroxilo (HO $\cdot$ ). Estos mecanismos pueden constituir la base de las acciones mutagénicas y citotóxicas descritas para algunos flavonoides. Debe destacarse que las propiedades prooxidantes y mutagénicas de los flavonoides se hallan unidas a la acción de eliminar radicales libres que tienen estos compuestos. Sin embargo, lo que determina el carácter antioxidante o prooxidante de esta reacción inicial es, como ya se mencionó previamente, estabilidad/labilidad redox del compuesto radical formado a partir del flavonoide original. (Martínez, et.al, 2002).

La autotoxidación del radical aroxilo o la formación de compuestos ternarios entre el ADN, el cobre y los flavonoides, son posibles explicaciones de la mutagenicidad mediada por los flavonoides; ahora bien, dichas acciones sólo parecen producirse cuando las dosis de flavonoides utilizadas son muy altas. (Martínez, et.al, 2002).



## **Terpenos**

Este tipo de compuestos es encontrado en frutas, vegetales y granos de cereales. Científicamente se conoce que los terpenos tienen una variedad de actividades biológicas. Dado que los terpenos los encontramos en las frutas y vegetales se consideran constituyentes de la dieta humana. Por eso es que se puede citar que “la dieta humana contiene un sinnúmero de antimutagenos y anticancerígenos” por lo que esta premisa puede ser aplicada también a los terpenos (Sargo, et. al, 1995).

Entre los terpenos comunes se pueden citar el limoneno, geraniol y carvona. Los terpenos antioxidantes son muy importantes en el rol de prevención de la formación de los radicales libres por vía no enzimática en el proceso de protección(Sargo, et. al, 1995).

## **Metabolitos secundarios**

Los organismos varían ampliamente en su capacidad para sintetizar y transformar compuestos químicos. Las plantas destinan gran parte de sus genomas para la producción de metabolitos secundarios, mostrando un mayor potencial para dichos compuestos en comparación con los animales. Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular con gran importancia ecológica, son utilizados por las plantas como defensa contra los herbívoros o microorganismos patógenos; atracción de polinizadores o dispersores de semillas entre los más sobresalientes. Se ha estimado que las plantas producen más de 100,000 tipos de metabolitos secundarios de los cuales se han aislado más de 40,000. La variedad de estructuras de metabolitos secundarios está dada por modificaciones de una estructura básica. En la actualidad se conoce una gran variedad de estructuras químicas de metabolitos secundarios; para algunos de ellos se conoce la actividad biológica incluyendo el efecto que presentan en el organismo humano (García.J.M, 1999).



La importancia relativa y las interacciones entre estos diferentes antioxidantes constituye un área compleja, con varios metabolitos y sistemas de enzimas teniendo efectos sinérgicos e interdependientes unos de otros. La acción de un antioxidante puede depender de la función apropiada de otros miembros del sistema antioxidante. La cantidad de protección proporcionada por cualquier antioxidante depende de su concentración, de su reactividad hacia la especie reactiva del oxígeno y del estado de los antioxidantes con los cuales interactúa (García.J.M, 1999).

Algunos compuestos contribuyen a la defensa antioxidante quelando los metales de transición y evitando que catalicen la producción de radicales libres en la célula. Particularmente importante es la capacidad de secuestrar el hierro, que es la función de proteínas de unión al hierro tales como la transferrina y la ferritina. El selenio y el zinc son comúnmente mencionados como nutrientes antioxidantes pero estos elementos químicos no tienen ninguna acción antioxidante ellos mismos sino que se requieren para la actividad de algunas enzimas antioxidantes (García.J.M, 1999).

### **Principios activos**

Los principios activos son sustancias que se presentan en alguna parte de la planta y que son capaces de modificar el funcionamiento del cuerpo humano. Se estima que los productos naturales y sus derivados representan el 50% de fármacos utilizados en el mundo. Actualmente se conocen las vías de formación de los principios activos de la planta, agrupándose en la función del precursor a partir del cual se biosintetizan (Herrera.M,2010).

- **Ruta de acetyl coenzima – A o de los poliacetato:** Responsable de la formación de metabolitos policíclicos aromáticos, tales como los heterosidos como los antraquinonicos (axantes) y las antraciclina (antibióticos y antitumorales) (Herrera.M,2010).
- **Ruta del acidocimico:** Da lugar a compuestos con anillos aromáticos frecuentementepolifenolicos, lignanos, algunos derivados de podifilotoxina





(actividad antitumoral), taninos (propiedades astringentes) cumarinas, flavonoides y antocianinas (Herrera.M,2010).

- **Ruta del ácido mevalónico:** Por esta vía se forman moléculas que forman unidades isoprenicas como heterosidoscardiotónicos; saponinas triterpenicas o esteroides (antiinflamatorios y expectorantes) o diterpenos nitrogenados (antitumorales del tipo del taxol) (Herrera.M,2010).
- **Ruta de los aminoácidos:** En esta ruta son sintetizados los alcaloides tales como la morfina, codeína, cocaína, atropina, entre otros (Herrera.M,2010).
- **Derivados del metabolismo primario:** Se forman por la condensación de unidades de monosacáridos o aminoácidos. Entre los compuestos que son producidos por esta ruta se pueden destacar el dextrano,( utilizado como expansor del plasma)(Herrera.M,2010).

### **Aislamiento de fitoquímicos**

Las plantas poseen una amplia variedad de componentes que pueden servir como fármacos, así como revelar nuevos mecanismos de acción para el control de enfermedades (Herrera.M, 2010).

El aislamiento de un compuesto activo requiere de proceso de investigación y desarrollo interdisciplinario, siguiendo los pasos que se describen a continuación:

### **Selección del material vegetal**

La selección de la planta puede ser al azar cuando se elige una planta cualquiera o biorracional cuando se encuentra con referencias acerca de las propiedades de la especie. En la selección biorracional se incluye la etnobotánica, cuando se conoce el uso medicinal de la planta; fotoquímica cuando se obtiene un metabolito del cual se obtiene reportes de bioactividad; ecológica búsqueda de plantas expuestas a estrés ambiental y taxonómica



elección de especies más emparentadas taxonómicamente a otras que presentan actividad biológica (Herrera.M,2010).

### **Extracción**

Una vez seleccionada la planta, se hace la extracción de compuestos, para ello las técnicas más comunes son la maceración, decocción, percolación y extracción de ácido – base. La maceración es un proceso solido- líquido, donde se aprovecha que la planta posee una serie de compuestos solubles en el líquido extrante (disolvente). Los disolventes mas utilizados son hexano, éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo, cloroformo, acetona, alcohol, metanol y agua dependiendo de la polaridad de los componentes que se deseen extraer (Herrera.M,2010).

### **Separación de compuestos**

La cromatografía es el método más común de separación, en el que los componentes a separar son distribuidos en la fase estacionaria a través de la fase móvil, los componentes de la muestra tienen propiedades particulares que permitirán la interacción entre la fase estacionaria y la móvil, de esta forma cada uno de ellos se retrasa de forma diferente. Las características de la fase estacionaria y la móvil deben ser las adecuadas para tener una separación completa de todos los componentes de la muestra. En la separación de compuestos vegetales se utiliza la combinación de dos o más técnicas cromatografías como cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía en columna abierta (CCA), cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), cromatografía gas – líquido y cromatografía de gases. (Herrera.M,2010).

### **Elucidación de compuestos**

La identificación y caracterización de los compuestos se realiza fundamentalmente por espectrometría de masas, espectroscopia infrarrojo, ultravioleta y magnética nuclear (RMN)(Herrera.M,2010).

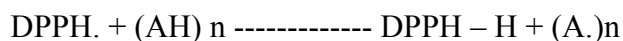


## **Ensayo antioxidante**

El estudio de los antioxidantes se ve desarrollado debido a que el radical oxígeno y otras especies de oxígeno activadas son continuamente producidas en las células y muchas se ven envueltas en algunos procesos de enfermedades por daño celular, molecular y estructural ya que se considera que tienen una importante función en la producción tumoral. El potencial antioxidante de los extractos de plantas puede ser basado en la capacidad de capturar radicales libres tal como DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidrazil) (Herrera.M, 2010).

La determinación de la actividad antioxidante es realizada por métodos que se basan en comprobar como un agente oxidante es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Actualmente uno de los métodos más utilizados para la determinación de los antioxidantes es el método de eliminación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). En su forma de radical libre, el DPPH absorbe a 515nm y cuando es reducido por un antioxidante, esta absorción desaparece. La disminución de la absorbancia del DPPH proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales (Herrera.M, 2010).

El modelo que explica la actividad de un compuesto como antioxidante se ejemplifica con la siguiente ecuación: (Herrera.M, 2010).



Ecuación 1. Reacción del DPPH con un antioxidante. Donde AH es un antioxidante que actúa donando radicales de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables de (DPPH-H) que destacan la reacción en cadena. El nuevo radical formado (A.) puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A). (Herrera.M, 2010).

La reacción entre el DPPH y un compuesto depende de la conformación estructural del mismo, por lo que las comparaciones cuantitativas no siempre son apropiadas. (Herrera.M, 2010).



## Taxonomía

### 1) Información básica.

**Nombre común:** Cocotero, Coco, Palmera de coco

**Nombre científico:** *Cocos nucifera*

**Familia:** Arecaceae.

**Especie:** *Cocos nucífera* L.

### 2) Descripción botánica.

Es una palmera monoica de tronco único, con frecuencia inclinado, de 10-20 metros de altura y de 50 centímetros de grosor en la base y estrechándose hacia la parte superior. En el ápice presenta un grupo de hojas que protegen el único punto de crecimiento o yema terminal que posee la planta. Hojas pinnadas, de 1.5-4 metros de longitud, con foliolos coriáceos de 50-70 centímetros de longitud, de color verde amarillento sus flores poseen inflorescencias paniculadas que nacen en las axilas de las hojas inferiores, protegidas por una bráctea llamada espata de hasta 70 centímetros de longitud y se desarrolla en 3 o 4 meses (Las frutas en nuestro cuerpo , 2001).

El coco es una drupa, cubierto de fibras, de 20-30 centímetros de longitud con forma ovoidal, pudiendo llegar a pesar hasta 2.5 kilogramos; están formados por una cáscara externa amarillenta, correosa y fibrosa (exocarpo) de 4 o 5 centímetros de espesor con forma de pelos fuertemente adheridos a la nuez; una capa intermedia fina (mesocarpo) y otra más dura (endocarpo) que dispone de tres orificios próximos en disposición triangular, situados en el ápice, dos cerrados y el otro frente a la raicilla del embrión (Las frutas en nuestro cuerpo , 2001).

La pulpa blanca es comestible conteniendo en su cavidad central un líquido azucarado conocido como agua de coco y que en cantidad aproximada de 300 gramos se encuentra encerrada en el interior del fruto. (Las frutas en nuestro cuerpo, 2001).



### **3) Ensayos biológicos reportados.**

El cocos nucífera es una especie que reporta del aceite y del agua de coco actividad neutralizante y mineralizante en la acidez útil en la arterosclerosis, la cubierta fibrosa da buenos resultados para la tos. También reporta actividad antiparasitaria, antiasmática, astringente, laxante y diurético (Duraffourd.C, Hervicourt.D y Lapraz.C, 1986).

### **4) Composición química**

El zumo (agua) de fruto contiene azúcar: sorbitol; ácidos orgánicos: ácido málico; aminoácidos y una aminopurina. La copra (semilla secada artificialmente) contiene 20% de carbohidratos, 8% de proteínas y 65% de lípidos (Germosen, 2005).

El endospermo contiene sorbitol; proteínas: alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina y valina; alcanoles: 2,3-butano-diol; lípidos: ácido laurico, octanoico; alcaloides: 2, 3,5-trimetil amino-pirazina; hidratosalcanona C4 y carbohidratos: galactitol (Germosen.R, 2005).

En el aceite de semilla se encuentran entre otras las siguientes sustancias: triterpenos:  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, esteroides: campesterol, estigmasterol; alcanos: n-decosano, n-cicosano y lípidos como el ácidocaproico y vitamina E (Germosen.R, 2005).

### **Técnicas de extracción**

La existencia de componentes activos en las plantas ha llevado a la elaboración de extractos etanólicos o hidroalcohólicos de las plantas de donde se extraen los componentes que reportan actividad. Estos componentes activos se encuentran por el orden del 0.1% - 2.0% y en algunos casos es menor al 0.01% (Lock, 1994).

La extracción de los componentes activos da lugar a que se puedan diseñar derivados sintéticos y estos nos pueden ser útiles en el mercado (Lock.O,1994).



La elaboración de los extractos permite realizar ensayos biológicos para extraer posteriormente sus componentes activos. Los extractos pueden ser elaborados por diferentes técnicas entre las más comunes están: maceración, digestión, infusión, lixiviación y percolación.(Lock.O,1994).

En la técnica de **maceración** el material seco se pone en contacto con el disolvente a temperatura ambiente por un periodo de 2 – 30 días, para hacer ensayos biológicos en cantidades pequeñas se utiliza la **maceración acelerada** la cual difiere en que el material a estudiar se pone en contacto con el disolvente en baño maría por un periodo de 30-45 minutos a una temperatura no mayor de 45 °C. (Lock.O,1994).

La técnica de **percolación** consiste en poner el material de estudio en contacto con el disolvente a temperatura ambiente por un periodo de 48h-72h. (Lock.O,1994).

La técnica de **partición o extracción** con disolvente es el proceso mediante el cual un material que está en una fase se hace pasar por otra fase. Aunque existen diferentes métodos para la elaboración de la particiones se utiliza el convencional que es la relación 1:1 extracto solvente (Lock.O,1994).

**Aislamiento**, consiste en separar el principio activo totalmente puro de la especie vegetal que se está estudiando lo cual es importante ya que el tratamiento por ingestión oral del preparado de hojas debería tener menor efecto que el principio activo puro (Lock.O,1994).

Para aislar componentes se han utilizado diferentes técnicas a través del tiempo. Entre ellas están: cromatografía de capa fina, cromatografía de columna, cromatografía líquido- líquido, cromatografía gas – líquido, cromatografía líquido – líquido por particiones, por absorción, por exclusión, por intercambio iónico, por HPLC, por el contrario corriente, por electroforesis. Al igual para la identificación de los componentes las técnicas cromatográficas son útiles. Para el aislamiento de compuestos puro las técnicas de cromatografía en columna por gravedad y la técnica de capa fina han sido las más utilizadas.(Lock.O, 1994).



**Cromatografía:** es un procedimiento físico – químico que permite separar los componentes o sustancias integrantes de una mezcla en movimiento por absorción o separación diferencial de los componentes sobre una superficie estacionaria o inmóvil (Jirón.Z, 1998).

La fase estacionaria está constituida por un sólido absorbente que se empaqueta en una columna de vidrio (Burriel.M, Lucena.C, Arriba. y Hernández.M,1982).

Se llama absorción al depósito o retención selectiva de las sustancias sobre las superficies de los sólidos finamente divididos por efecto de fuerzas físico – químicas. Los componentes a separar se añaden en forma soluble por la parte superior de la columna quedándose retenidos la misma, posteriormente en los componentes se desplazan arrastrados por una fase móvil líquida. (Burriel, et.al, 1982).

Nuevas adiciones de disolventes arrastran las moléculas de soluto a través de la columna en una sucesión continua de transferencia entre las dos fases dado que el movimiento del soluto solo puede ocurrir en la fase móvil la velocidad media a la que el soluto migra depende de la fracción de tiempo que permanece en esta fase. Esta fracción es pequeña para los solutos que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria y es grande para aquellos cuya retención en la fase móvil es mayor. Para una separación efectiva de los componentes su velocidad a través de la columna debe ser suficientemente diferente y la longitud de la columna adecuada. (Burriel, et.al, 1982).

Para cromatografía de columna las fases estacionarias más comúnmente utilizadas es gel de sílica. Para terminar de identificar y purificar lo que se utiliza es cromatografía de capa fina o capa delgada (TLC) esta ofrece una fase inmóvil para el rápido desplazamiento de los componentes y la posibilidad de usar agentes cromogénicos, como reveladores, tal es el caso del ácido sulfúrico puro o mezclado, ácido nítrico y vapores de bromo.(Domínguez. A,1978).

La sílica gel o gel de sílica es el absorbente más utilizado. Para obtener una buena separación es recomendado que se impregne la sílica con el 1 – 20 % de nitrato de plata. Para localizar las manchas, además de los reactivos ya citados se usan vapores de yodo, solución al 70% de



sulfato cérico con ácido sulfúrico 2N, se recomienda luego calentar la placa cromatografica. De este sistema se obtienen los Rf, los cuales sirven de orientadores ya que tienen que ser reproducibles.(Domínguez.A,1978).

El Rf (Factor de desplazamiento o índice de retención) es las relaciones del soluto y la del disolvente en la fase móvil, medidas ambas por el avance desde el frente. (Domínguez.A, 1978).

Puesto que la distancia recorrida en un tiempo es la velocidad, el factor Rf puede ser expresado como la distancia recorrida por el soluto y el disolvente en un mismo tiempo.
$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el frente del soluto}}{\text{Distancia recorrida por el frente del disolvente}}$$
(Domínguez.A, 1978).





## **Hipótesis**

Las fracciones del extracto de fruto de coco fraccionado tienen mayor actividad antioxidante que el extracto de fruto de coco crudo.



## **Material y método**

**Tipo de estudio:** Experimental

**Unidad de análisis:** Los frutos de Cocos secos a temperatura ambiente.

**Universo:** *Cocos nucifera*

**Muestra:** Extracto etanólico del *Coco nucifera*

**Especie:** *Cocos nucifera*

**Reactivos:**

1. Etanol
2. AcOET
3. hexano
4. Dimetilsulfóxido (DMSO)
5. Radical DPPH
6. Ácido ascórbico

**Equipo:**

1. Balanza analítica
2. Espectrofotómetro UV-VIS

**Cristalería:**

1. Agitador, balones, beakers de 100 ml, capsulas de porcelana, columna cromatografica, tubos de ensayo, embudo separador, cocina, espátula.

## **Procedimiento**

**Selección del material:** El material se escogió al azar, en este paso se elige una planta cualquiera y de ellas se toman muestras correspondientes.

## **Colecta del material vegetal**

La colecta del material vegetal se realizó dentro de los límites del campus médico tomando en cuenta que los frutos estuvieran en buenas condiciones ambientales así mismo que tuvieran buena apariencia, tomando en cuenta que recolecté veinticuatro frutos pequeños de coco.



### **Obtención de los Extractos.**

1. Los frutos del Coco se secaron a temperatura ambiente para evitar la degradación de los compuestos.
2. Una vez seco el material se colocó en contacto con etanol 96<sup>0</sup> por 5 días a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.
3. Se agitará al menos una vez al día.
4. El extracto crudo se separó por decantación y filtración simple eliminándose el residuo.
5. Se aplicó el método de 2,2-1-difeni-pricrihidrazilo, para determinar la actividad del extracto crudo, para tener una actividad base de referencia del extracto.

### **Separación de compuesto**

1. El extracto se fraccionara por Cromatografía de columna abierta, usando como soporte fase normal.
2. El extracto crudo se agitó con acetato de etilo hasta formar un precipitado blanquecino el extracto se recuperara por filtración y se someterá a una cromatografía de exclusión molecular en columna abierta utilizando como soporte sílica gel mesh 60 y fase móvil n-hexano acetato de etilo incrementando su polaridad hasta llegar al etanol.
3. Se monitoreara la cromatografía en columna abierta por medio de una cromatografía en capa fina, las fracciones que presenten las mismas bandas se juntaran y se aplicara el bioensayo de 2,2-difenil-1-pricril-hidrazilo.

### **Actividad biológica con DPPH**

1. Cada extracto crudo y fracción se disolverán en dimetilsulfoxido antes de realizar el bioensayo.
2. Se tomó una alícuota se dejaran secar y se disolverán completamente cada muestra.



3. El disolvente a utilizar para el bioensayo será etanol.
4. La actividad antioxidante se realizara utilizando el 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo.

### **Ensayo de la Actividad Antioxidante.**

#### **Preparación del radical de DPPH.**

Se pesó aproximadamente 0.014234 g del reactivo DPPH, se colocó en un balón de 100 ml y se aforó con Etanol (EtoH), como diluyente.

#### **Preparación del Ácido Ascórbico (Vitamina C)**

Se pesó 0.1 g de Ácido Ascórbico se llevó a un balón de 100 ml y luego se aforo con etanol.

#### **Preparación de la muestra**

Se lavó y se limpió las cápsulas con alcohol para evitar cualquier contaminación de la muestra luego se procedió a secar las cápsulas a temperatura ambiente; una vez secas se esperó 30 minutos a temperatura ambiente para luego proceder a pesar y anotar su peso. Una vez pesadas se le adicionaron 200 mcl de extractos, estos se dejaron 24 horas para el secado del extracto, una vez secos se pesaron las cápsulas con el extracto seco se procedió a realizar la diferencia de la cápsula llena y cápsula vacía para saber cuánto es la cantidad de extracto seco que se obtuvo.

Se realizaron cálculos para saber cuánto se le añadió de DMSO 3.5% para diluir el extracto seco, igual se realizaron los cálculos para saber la cantidad de extracto que se añadió a cada celda para contener una concentración de 3.5 mg del activo y luego completar con el reactivo de DPPH para llegar a 3500 mcl.



### **Preparación del patrón positivo**

En celdas desechables con una capacidad de 4000 mcl se adicionaron 175 mcl ácido ascórbico (Vit. C) disuelto en etanol preparado anteriormente. Seguidamente se adiciono 175 mcl de dimetilsulfóxido (DMSO) completando a 3500 mcl de DPPH.

### **Preparación del patrón negativo**

Se adiciono a la celda 175 mcl de dimetilsulfoxido (DMSO) seguidamente se le agregaron 3325mcl de DPPH.

### **Preparación del Blanco**

Se agregó en una celda 175 mcl de Dimetilsulfoxido (DMSO) + 3325mcl de Etanol.

### **Medidas de absorbancias**

A los extractos obtenidos se les realizo el bioensayo de captura de radicales libres DPPH (1,1Diphenyl -2- picrylhydrazyl) se leyeron las muestras a una Absorbancia a 515 nm (luz visible) utilizando el espectrofotómetro.

El reactivo obtuvo un color violeta, la actividad atrapadora de radicales libre se hizo evidente cuando la solución se decoloro presentando un color amarillento.

El % inhibición se calculó por la siguiente fórmula:

$$\%Inhibicion = \left( - \left( \frac{abs. Muetsra}{abs. patron} \right) \right) + 1 * 100$$

Todos los cálculos se realizaron en la hoja de cálculo de Excel utilizando la formula anterior.



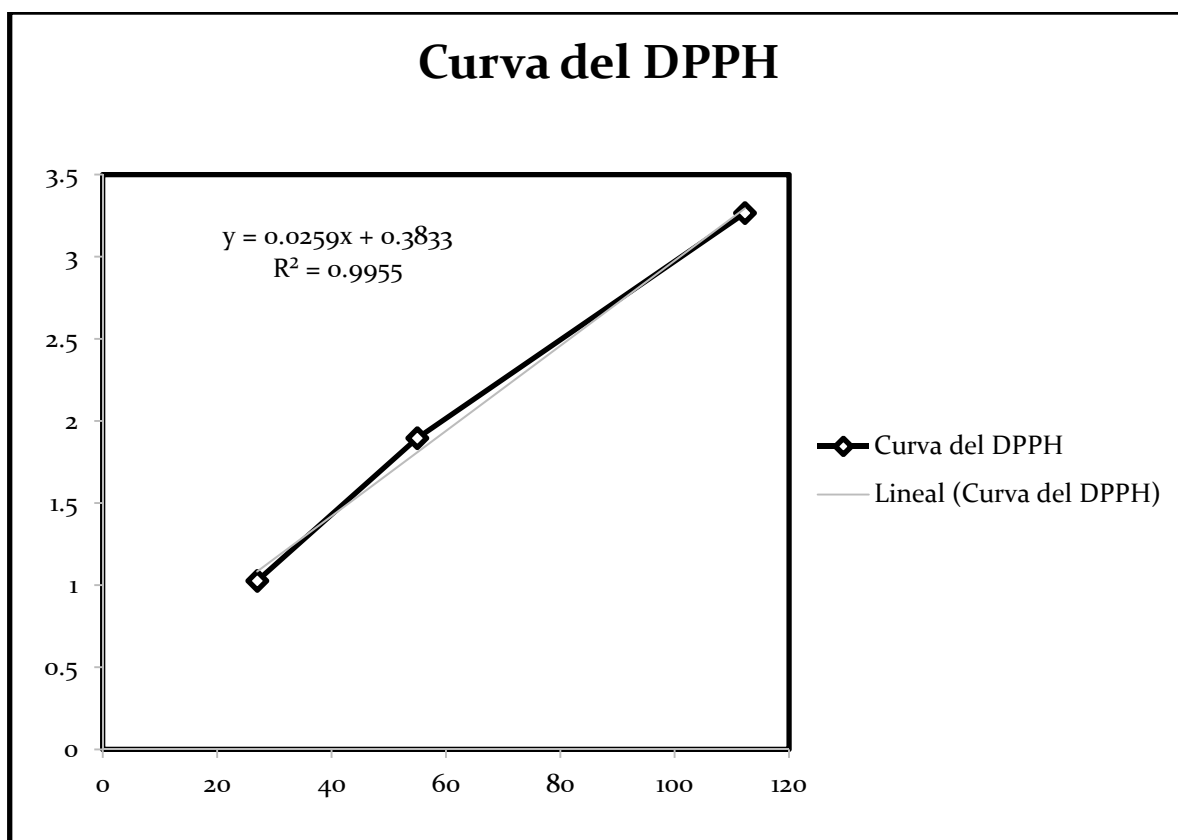
**RESULTADOS**

		% Recuperado de DPPH	Absorbancias	% de inhibición
HEXANO	1	99.696	2.6009	20.37167437
	2	100.98	2.6344	19.34604905
D+H	3	96.628	2.5209	22.82092888
	4	96.664	2.5218	22.79337477
	5	98.213	2.5622	21.55650124
	6	97.871	2.5533	21.8289808
	7	98.065	2.5584	21.67284083
D	8	95.54	2.4925	23.69041423
	9	97.392	2.5408	22.21167682
	10	97.652	2.5476	22.00349019
	11	96.271	2.5116	23.10565472
ACETATO + D	12	89.17	2.3263	28.77874047
	13	98.044	2.5578	21.69121024
	14	99.298	2.5905	20.69007746
	15	100.79	2.6294	19.49912745
	16	98.298	2.5644	21.48914674
D + ACETATO	17	95.798	2.4992	23.48528917
	18	98.903	2.5802	21.00541898
	19	91.398	2.3844	26.99996938
	20	82.41	2.1499	34.17934666
ACETATO	21	88.174	2.3003	29.57474819
	22	66.543	1.736	46.85117717
	23	94.207	2.4577	24.75583994
	24	86.354	2.2528	31.02899305
ACETATO + ETOH	25	79.403	2.3097	29.28696078
	26	78.094	2.2716	30.45341824
	27	78.474	2.2827	30.11358418
	28	69.863	2.0322	37.78281236
AC + ETOH	29	85.947	2.5	23.46079662
	30	77.085	2.2423	31.3504577
	31	75.554	2.1977	32.71591709
ETOH	32	80.523	2.3423	28.28888957
	33	84.452	2.4566	24.78951719
	34	84.075	2.4456	25.12628969
	35	82.187	2.3907	26.80709059

**Ensayo biodirigido del extracto etanólico del fruto *Cocos nucífera* con actividad antioxidante.**



ETOH + H2O	36	81.221	2.3626	27.66739124
	37	79.073	2.3001	29.58087132
	38	81.816	2.3799	27.13773995
	39	92.958	2.704	17.21519762
ETOH + H2O	40	90.212	2.6241	19.66139056
	41	88.277	2.5678	21.38505342
	42	93.851	2.73	16.41918991
H2O destilada	43	94.254	2.7417	16.06098644
	44	89.975	2.6172	19.87263877
	Ácido ascórbico		0.086918	97.33894621
		70.747	2.0579	36.99598935
DPPH	112.29	3.2663		





## **ANALISIS DE RESULTADOS**

Se observó que las fracciones combinadas muestran una actividad de inhibición del radical libre muy por debajo que la muestra del ácido ascórbico y comparada con el extracto etanólico de los frutos se ve que hay mayor sinergia en el extracto que en la fracciones, lo que quiere decir que los compuestos separados disminuyen su actividad atrapadora de radicales. Entre las fracciones crudas mostro mejor actividad protectora la fracción que muestra un porcentaje de 46.85 %, la que posiblemente sea porque arrastro los compuesto con mayor actividad protectora. Entre las fracciones crudas y el ácido ascórbico se observa que hay mayor actividad del ácido ascórbico.

## **CONCLUSION**

El efecto antioxidante de las fracciones del extracto etanólico de coco puede atribuirse, en forma parcial, a la presencia de algunos compuestos fenólicos, cuya actividad antioxidante puede ser incrementada por la presencia de otros componentes no fenólicos en el extracto. Que las fracciones del extracto no muestran actividad protectora mayor o igual a la del extracto crudo.





## BIBLIOGRAFIA

- Allard J.P y Kotler D.P. (1998). Un estrés oxidativo incrementado acompaña a la infección por VIH.; 67:143-147.Disponible: <http://www.foro-vih.org/drfaq/drfa17/drfl76.html>. Obtenida el 10 de febrero del 2013.
- Abdollahi, M.; Ranjbar, A.; Shadnia, S.; Nikfor, S. & Rezaie, A. (2004).Pesticides and oxidative stress. *Med Sci Monit*, 10 (6): RA 141-147
- Burriel. F. M. , Lucena. F C. ,Arribas. J. y Hernández. J. M. (1982). Química analítica cuantitativa. Undécima ed.
- Córdova, A., y Álvarez, M.(2000). Inmunidad en el Deporte. (1ª Edición). España, Madrid
- Defer.E.(2011).Beneficios para la salud del agua y aceite. Disponible en: <http://www.tarotvidenciaelisedefer.com/beneficios-para-la-salud-a>. Recopilada el 12 de febrero del 2013.
- Desmarchelier, C. y Ciccía, G.(1998). *Antioxidantes de Origen Vegetal. Ciencia Hoy*; 8 (44).
- Domínguez. X. A. (1978).Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa, 1ª edición, México.
- Duraffourd C, Hervicourt L.D y Lapraz JC.(1986). Cuadernos de fitoterapia clínica. Barcelona: (Ed). Masson, Barcelona 1986:86. Disponible en: <http://www.sld.cu/fitomed/coco.htm>. Recopilada el 23 de febrero del 2013.
- Feldman H. y Butrum, R, E. (2003) . The role of dietary supplements during cancer therapy. 133 (11): 3794 S- 3799 S.



- Ferreira R. Estrés oxidativo y antioxidantes. De las ciencias básicas a la medicina aplicada. Buenos Aires: Laboratorios Bagó, s.a. 24 p. Obtenida el 4 de Marzo del 2013.
- García .G.J. (2011) Evaluación de actividad de extractos de la planta ardisia compresa kunt y las macroalgas *Padinadurvillae* Bory, *chlorodesmishildebranti* Gepp y *ulva lactucalinnæus*.
- García. P. J .M.(1999). Fraccionamiento Biodirigido del extracto etanólico de *cedrellaodorata* con actividad antioxidante y citotóxica. UNAN-LEON.
- Germosén.L.R.(2005).Farmacopea vegetal caribeña 2ª ed. 486p. ISBN: 99924-56-25-6. León, Nicaragua.
- Hernández, F. (2004). Nutrientes esenciales en la práctica deportiva. Cuadernos PsicDep (4) 1 y 2: 215-221.
- Herrera M. M.(2010). Actividad biológica de las especies del estado de Oaxaca: *Syciusbolbosus* (curcubitaceae), *Encycliamichoacacna* (orchidaceae) y *Acaliphacuspadata* (Euforbiaceae), Oaxaca, México. Pag.2, 3, 4, 5, 6, 8. Disponible en: [http://www.umar.mx/tesis\\_PA/tesis.../TESIS\\_universidad%20FINAL.pdf](http://www.umar.mx/tesis_PA/tesis.../TESIS_universidad%20FINAL.pdf).
- Jialal, I.; & Grundy, S.(1993). Effect of combined supplementation with alfa-tocopherol, ascorbate and beta-caroteno on low-density lipoprotein oxidation. *Circulation*; 88: 2780-2786.
- Jill.S (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *ProcSocExpBiol Med Dec*; 222(3):283-92.



- Jirón. A. Z. (1998). Separación de una mezcla de pigmentos verdes por cromatografía de presión media. UNAN-LEON.
- Kleiner,S.(1996). *The Physician and Sports medicine; Antioxidant Answers* 24 (8).
- Lock .O. (1994). Investigación fotoquímica .Métodos en el estudio de productos naturales. 2ª edición, fondo editorial PUCP, Lima, Perú.
- Martínez. J. González J. M. y Tuñón. M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes.Nutr. Hosp. (2002) XVII (6) 271-278 ISSN 0212-1611, León, España.
- Mercola (1981).Productos para una buena alimentación. Estados Unidos 12 (1). Disponible en:<http://productos.mercola.com/aceite-de-coco/>.
- Pallow. M (1979) El gran libro de las plantas medicinales . 2ªed.ISBN:84-241-2105-8. León, España.
- Pérez D, L (2002). Instituto biológico de la salud. *Seminario de Radicales Libres*. Disponible en <http://www.institutobiologico.com/seminarios/radicales%20libres.htm>.
- Sargo, A, .Saclese, Lanza, M. Marzullo, D. ; Bonina, F. Castelli, F.(1995). Free radical biology and medicine, Vol. 19 No. 4, pp 481-486.
- Sen., C.K. (2003). The general case for redox control of wound repair, *Wound Repair andRegeneration*,11,431-43Disponible en:[http://es.wikipedia.org/wiki/Especie\\_reactiva\\_de\\_ox%C3%ADgeno](http://es.wikipedia.org/wiki/Especie_reactiva_de_ox%C3%ADgeno)
- Valadés. J. (2011) Guía de About.comremediosnaturalesUpdated Disponible en:[remediosnaturales.about.com](http://remediosnaturales.about.com). > Remedios naturales > Dietas y terapias.



- Watson, W.; Cai, J.; & Jones, D.(2000). Diet and apoptosis. *Nutrition*; (20):485-505.
- Wu. D., Hugenholtz , P., y Mavromatis, K (2009). A phylogeny-driven Genomic Encyclopedia of Bacteria and Achaea. *Nature* (462), 1056-60.
- Zhang, Z.; & Farthing, M.(2005) .The roles of vitamin C in Helicobacter pylori associated gastric carcinogenesis. *Chinese J Digest Diseases* 6: 53-58.



ANEXOS

CORTE Y EXTRACCION DEL FRUTO



MUESTRA SECA A T° AMBIENTE



ALMACENAMIENTO DEL EXTRACTO



EXTRACTO FILTRADO





**FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO EN TUBOS DE ENSAYO**



**FRACCIONAMIENTO DE MUESTRAS 80:20 DICLOROMETANO HEXANO.**



**PREPARACION DEL BLANCO, MUESTRA Y NEGATIVO**





### PREPARACION DE MUESTRAS EN CELDAS DESECHABLES



### LECTURA DE LAS MUESTRAS

