

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ANÁLOGOS DEL BHT

Rubio Cortés, Javier Eduardo (1), López Martínez, Julio César (2), Vázquez Guevara, Miguel Ángel (2), Alcaraz Contreras, Yolanda (1)

1 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [javcort.jc@gmail.com], [yolaalca@ugto.mx]

2 [Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [jclmtz@hotmail.com], [mvazquez@ugto.mx]

Resumen

El estudio de los radicales libres y los antioxidantes ha generado una serie de conocimientos e incertidumbres en diversas áreas de la ciencia, prometiendo así una nueva era para la salud y el control de diversas enfermedades. El análisis de los antioxidantes es de gran relevancia en estos días, ya que estas moléculas son importantes para la prevención de reacciones oxidantes en productos de interés comercial como los farmacéuticos, los alimentos y los cosméticos, además de ser de gran ayuda para comprender el papel que desempeñan las especies reactivas (principalmente de oxígeno), sobre diversos padecimientos que repercuten en la salud humana y como contrarrestarlos. Por ello, en este trabajo se evaluó la actividad antioxidante de una serie de compuestos sintéticos análogos del BHT mediante la técnica del ABTS. Todas las moléculas evaluadas mostraron dicha propiedad y en algunas de ellas, la actividad fue mayor que la producida por el Trolox.

Abstract

The study of free radicals and antioxidants has generated a series of knowledge and uncertainties in various areas of science, thus promising a new era for health and control of various diseases. The analysis of antioxidants is very relevant these days, as these molecules are important for preventing oxidative reactions in products of commercial interest such as pharmaceuticals, food and cosmetics, as well as being a great help to understand the role played by reactive species (primarily oxygen) on various diseases that affect human health and how to counter them. Therefore, in this work we evaluated the antioxidant activity of a series of synthetic analogs of BHT compounds by the ABTS technique. All tested molecules showed that property and in some of them, activity was greater than that produced by the Trolox.

Palabras Clave

1 Antioxidantes; 2 Radicales libres; 3 ABTS; 4 BHT; 5 Trolox

INTRODUCCIÓN

Los radicales libres

Se puede definir a un radical libre como una especie que posee un electrón desapareado en su último orbital molecular, esto le confiere ciertas propiedades como una alta inestabilidad y gran reactividad, así como la capacidad para interactuar con diversas biomoléculas como los lípidos, las proteínas y el DNA, lo que finalmente conlleva a un daño celular y disrupción homeostática. Los radicales libres pueden donar un electrón o aceptar uno de otras moléculas para estabilizarse, por ende actúan como agentes oxidantes o reductores dependiendo de las condiciones. [1]

El estrés oxidativo

La mayoría de los radicales libres que afectan los sistemas biológicos son radicales libres de oxígeno, mejor conocidos como: especies reactivas de oxígeno (ROS, reactive oxygen species).

Por lo tanto, el término estrés oxidativo es empleado para describir la condición del daño oxidativo como resultado del desbalance natural entre los radicales libres generados y las defensas antioxidantes. [2]

Los antioxidantes y los cofactores

El organismo posee distintos mecanismos para neutralizar los radicales libres y proteger a las células del efecto tóxico de los mismos; los antioxidantes. Algunos antioxidantes son generados in situ y se conocen como antioxidantes endógenos; otros ingresan a través de la dieta o por suplementos alimenticios, son los antioxidantes exógenos.

El término antioxidante también es aplicable para compuestos que no neutralizan radicales libres, pero promueven la actividad endógena de los mismos. También se aplica el término pro-antioxidante. Los cofactores en base a su definición bioquímica, son iones o moléculas que se unen al sitio catalítico de la apoenzima para activarla. Muchas enzimas poseen como requerimiento iones metálicos para presentar su actividad, por ende a estos iones se les brinda el nombre de cofactores. [3]

Cuando un antioxidante destruye un radical libre, este se oxida. De ahí que los antioxidantes deben ser restaurados constantemente. Los dos mecanismos de acción principales que ha sido propuestos son [4]:

- El primero mediante la acción del antioxidante sobre la detención de la reacción en cadena, donando un electrón a la especie reactiva presente en el organismo. Antioxidantes primarios.
- El segundo mediante la remoción de los generadores de especies reactivas ROS/ RNS, debido a la extinción del catalizador iniciador de la reacción en cadena. Antioxidantes secundarios.

Derivados del fenol

Se ha reportado que las estructuras polifenólicas, han resultado más eficientes contra el estrés oxidativo a niveles tisulares, que la vitamina C. [5]

Dentro de las múltiples características que poseen, destaca su actividad: citoprotectora, antibacteriana, antiviral, antienvjecimiento, antiinflamatoria, antialérgica, antimutagénica, vasodilatadora, ansiolítica, antidepresiva y mejoramiento de los efectos cognitivos. Por ello, es importante someter a prueba estas estructuras tanto naturales como sintéticas para ampliar la gama de fuentes donde pueden ser obtenidos debido a la gran variedad de propiedades y aplicaciones que poseen.

Butilhidroxitolueno (BHT)

El butilhidroxitolueno, mejor conocido como BHT por sus siglas en inglés. Es un compuesto orgánico lipofílico, químicamente un derivado del fenol, que es empleado como antioxidante.

La especie se comporta como un análogo sintético de la vitamina E, que actúa principalmente como un agente de terminación al suprimir la autooxidación, un proceso por el cual compuestos orgánicos insaturados generalmente son atacados por el oxígeno atmosférico.

Por ende, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar y comparar la actividad antioxidante de compuestos sintéticos derivados del fenol mediante el método de ABTS, posteriormente realizar la evaluación antioxidante en células, para determinar nuevamente dicha actividad y dirigirla hacia algún sector en específico, gracias a la gran variedad de campos de aplicación que posee.

MATERIALES Y MÉTODOS

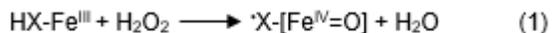
Para determinar el efecto antioxidante, se siguió la técnica del Kit Antioxidant Assay No. CS0790 de Sigma-Aldrich.

El ensayo antioxidante se basa en la formación de un radical ferrilo de mioglobina a partir de la metamioglobina y el peróxido de hidrógeno, que oxida el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3 - etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) para producir un catión radical ABTS⁺, un cromógeno soluble de color verde que puede ser determinado a 405 nm.

Los antioxidantes bloquean la producción del catión radical ABTS⁺, por lo que la intensidad del color disminuye proporcionalmente a la concentración y efectividad que estos poseen.

El Trolox, es un análogo soluble en agua de la vitamina E y sirve como un estándar o control antioxidante.

Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes:



En esta ecuación, HX-Fe^{III} es la metamioglobina y X-[•][Fe^{IV}=O] es el ferrilo de mioglobina. Donde los antioxidantes intervienen en la reacción 2.

Los 11 compuestos de origen sintético, fueron disueltos en DMSO para ser evaluados a una concentración de 0.42 mM. La capacidad antioxidante fue comparada con la del Trolox y con el BHT, ya que estos son análogos de esta última molécula.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se muestra el porcentaje de inhibición de la formación del radical ABTS. Los compuestos Phe 1, Phe 2, Phe 3, Phe 6, Phe 8 y Phe 10 mostraron una capacidad antioxidante mayor que la producida por el Trolox. Los compuestos Phe 7 y Phe 9 mostraron una capacidad antioxidante inferior a la producida por el Trolox. Los compuestos Phe 4, Phe 5 y Phe 11 no mostraron diferencia significativa con el Trolox.

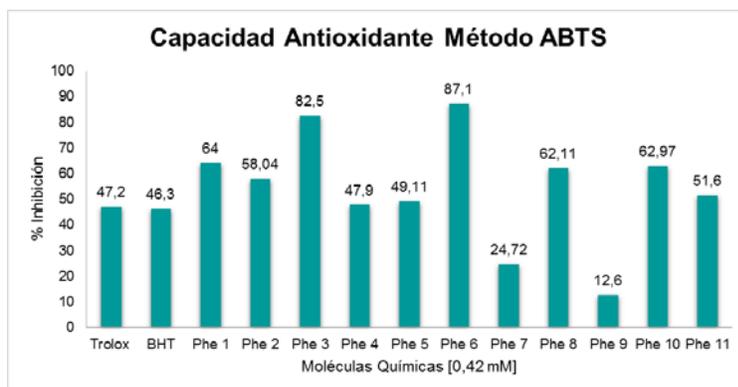


Figura 1: Porcentaje de inhibición del radical ABTS. Los compuestos fueron evaluados a una concentración de 0.42mM.

Al comparar los resultados con la actividad antioxidante producida por el BHT se observó un comportamiento similar que para el caso del Trolox, es decir, los compuestos Phe 1, Phe 2, Phe 3, Phe 6, Phe 8 y Phe 10 mostraron una capacidad antioxidante mayor que la producida por el BHT. Los compuestos Phe 7 y Phe 9 mostraron capacidad antioxidante inferior a la producida por el BHT. Los compuestos Phe 4, Phe 5 y Phe 11 no mostraron diferencia significativa con el BHT.

Es importante considerar, que a medida que la concentración aumenta, de la misma forma debe aumentar proporcionalmente el porcentaje de inhibición hasta llegar a un valor constante.

Dependiendo de las reacciones implicadas, los ensayos de actividad antioxidante, pueden ser clasificados de forma general en dos tipos: los basados en las reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) y los basados en la transferencia de electrones (ET).

Para esta determinación se empleó el método basado en transferencia de electrones, ya que se midió la capacidad de un antioxidante para reducir a un oxidante, que cambia de color al ser reducido. [6]

Se empleó este método químico ya que posee una serie de virtudes como son: es útil para hacer calibraciones, bajo costo, alto rendimiento y obtención de valores (expresado como equivalentes de Trolox) que nos permite comparar diferentes productos analizados. Sin embargo, los índices de capacidad antioxidante obtenidos mediante metodologías químicas no pueden

extrapolarse a un rendimiento de la muestra in vivo, por lo que es necesario el estudio con metodologías de actividad antioxidante celular. [7]

Los compuestos fenólicos y los derivados del fenol, como los compuestos evaluados en este experimento, se encuentran entre las sustancias más activas provenientes de fuentes naturales, mostrando una gran variedad de propiedades. Desde la conservación de productos de interés comercial hasta la promoción de la salud, motivo por el cual se han convertido en un centro de atención. Por ello el poder mimetizar sus propiedades y características mediante la síntesis orgánica, nos permite generar nuevos compuestos con una amplia gama de aplicaciones, así como profundizar en su conocimiento.

Finalmente es importante remarcar que el equilibrio entre los radicales libres y los antioxidantes es sumamente crucial para el organismo del ser humano, ya que ambos son importantes para mantener la armonía de este mismo.

CONCLUSIONES

Los compuestos derivados de fenol análogos al BHT mostraron actividad antioxidante similar a la producida por el Trolox cuando fueron evaluados mediante el método del ABTS. Lo anterior los convierte en candidatos importantes para continuar con otro de tipo de evaluaciones para poder postularlos como moléculas antioxidantes.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Apoyo a la Investigación y Posgrados (DAIP) de la Universidad de Guanajuato a través del programa "Veranos de Investigación Científica UG 2016" por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto. Y a los doctores Miguel Ángel y Yolanda de quienes he adquirido grandes aprendizajes.

REFERENCIAS

1. Cheeseman KH¹, Slater TF. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*; 49(3):481-93.
2. Rock CL¹, Jacob RA, Bowen PE. (1996). Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids; 96(7):693-702; quiz 703-4.
3. Khalid Rahman. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*; 2(2): 219–236.
4. Rice-Evans CA¹, Diplock AT. (1993). Current status of antioxidant therapy. *Free radical biology & medicine*; 15(1):77-96.
5. Petti S¹, Scully C.(2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of dentistry*; 37(6):413-23. doi: 10.1016/j.jdent.2009.02.003. Epub 2009 Mar 19.
6. Huang D¹, Ou B, Prior RL.(2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53(6):1841-56. doi: 10.1021/jf030723c
7. López-Alarcón C¹, Denicola A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays *Analytica chimica acta*. 763:1-10. doi: 10.1016/j.aca.2012.11.051. Epub 2012 Dec 5.