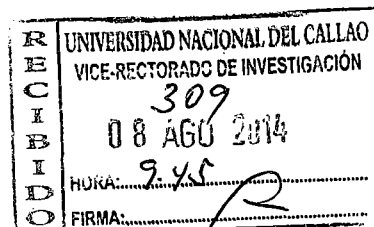
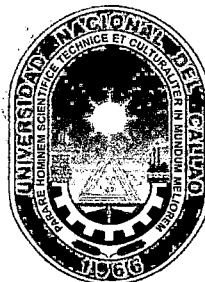
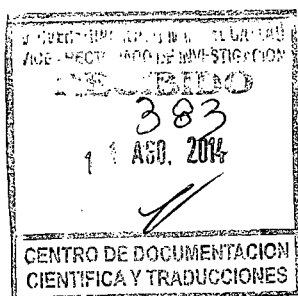


**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO**  
**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y DE ALIMENTOS**



7 AGO 2014



**INFORME FINAL**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIELASTASA Y  
ANTIOXIDANTE DEL FRUTO DE DIFERENTES VARIETADES DE  
UVA (*Vitis vinifera*)”**

**Q.F NESTOR GOMERO OSTOS**

( PERIODO: 01 Mayo 2013 – 30 Abril 2014 )  
(Resolución Rectoral N° 524-2013-R, de fecha 5 de junio del 2013)

**2014**

a)	INDICE	
b)	RESUMEN	01
c)	INTRODUCCIÓN	02
	c.1 Descripción y análisis del tema.	03
	c.2 Importancia y justificación de la investigación.	06
	c.3 Objetivos y alcance de la investigación	09
	c.3.1 Objetivo general	09
	c.3.2 Objetivos específicos	10
	c.3.3 Alcances de la investigación	10
d)	MARCO TEORICO	12
	d.1 TEJIDO CONJUNTIVO:	12
	d.1.1 Células propias de los tejidos conjuntivos (estables)	12
	d.1.1.1 Fibroblastos:	13
	d.1.1.2 Condrioblastos:	13
	d.1.1.3 Osteoblastos:	13
	d.1.1.4 Lipoblastos:	14
	d.1.2 Células conjuntivas libres (migratorias)	14
	d.1.3 Matriz extracelular	15
	d.1.3.1 Cadenas de polisacáridos:	15
	d.1.3.2 Proteínas fibrosas:	15
	d.1.3.3 Glicoproteínas:	15
	d.2 FIBRAS ELÁSTICAS:	16
	d.2.1 Alimentos que participan en la formación de elastina:	19
	d.2.2 Funciones de la elastina:	20
	d.3 GENERALIDADES DEL PROCESO INFLAMATORIO	21
	d.3.1 Patologías relacionadas con la inflamación:	21
	d.3.2 Fases del proceso inflamatorio:	23
	d.3.2.1 Primera fase:	23
	d.3.2.2 Segunda Fase:	25
	d.3.2.3 Tercera Fase	25
	d.4 MEDIADORES INFLAMATORIOS	26
	d.4.1 Citocinas:	26
	d.4.2 Quimiocinas:	27
	d.4.3. Óxido Nítrico:	28
	d.4.4 Derivados de Ácido Araquidónico (AA):	28
	d.4.5 Fosfolipasa A2:	29
	d.5 CÉLULAS PRESENTES EN LA INFLAMACIÓN	30
	d.5.1 Monocitos:	30
	d.5.2 Linfocitos:	30
	d.5.3 Mastocitos:	31
	d.5.4 Macrófagos:	31
	d.5.5 Leucocitos Polimorfonucleares (PMNs):	32

*Handwritten signature or mark.*

d.5.5.1	Eosinófilo:	32
d.5.5.2	Basófilo:	34
d.5.5.3	Neutrófilo:	34
d.6	<b>MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS</b>	36
d.6.1	Migración:	36
d.6.2	Diapédesis:	37
d.6.3	Quimiotaxis:	37
d.6.4	Fagocitosis:	38
d.6.5	Muerte intracelular:	39
d.6.5.1	Explosión respiratoria:	39
d.6.5.2	Desgranulación leucocitaria:	41
d.6.6	Apoptosis:	44
d.7	<b>PATOLOGÍAS ASOCIADAS CON LOS NEUTRÓFILOS</b>	45
d.7.1	Neutropenia:	45
d.7.2	Tratamiento del cáncer:	46
d.7.3	Mieloperoxidasa:	46
d.7.4	Elastasa:	47
d.8	<b>ENVEJECIMIENTO Y ESTRÉS OXIDATIVO:</b>	51
d.9	<b>COMPUESTOS FENÓLICOS EN LAS PLANTAS</b>	53
d.9.1	Clasificación de los compuestos fenólicos:	54
d.9.1.1	Extraíbles:	54
d.9.1.2	No extraíbles:	56
d.9.2	Mecanismo de acción de los polifenoles:	57
e)	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	61
e.1	Materiales:	61
e.2	Equipos:	61
e.3	Reactivos:	62
e.4	Muestras:	62
e.5	Métodos:	62
e.5.1	Determinación de su capacidad antielastasa:	62
e.5.2	Determinación de la capacidad antioxidante:	63
e.6	Procesamiento de la muestra:	64
e.6.1	Concentración de los extractos:	65
e.6.1.1	Muestra 01:	65
e.6.1.2	Muestra 02:	65
e.6.1.3	Muestra 03:	65
e.6.1.4	Muestra 04:	65
e.6.1.5	Muestra 05:	65
e.6.1.6	Muestra 06:	65
e.6.2	Preparación de las diluciones:	65
e.6.2.1	Muestra 01:	66
e.6.2.2	Muestra 02:	66
e.6.2.3	Muestra 03:	66
e.6.2.4	Muestra 04:	66

e.6.2.5	Muestra 05:	66
e.6.2.6	Muestra 06:	66
f)	RESULTADOS	67
g)	DISCUSION: CONCLUSIONES	69 70
h)	REFERENCIALES	71
i)	APENDICES	83
	Apéndice 01:	83
	Apéndice 02:	83
	Apéndice 03:	84
	Apéndice 04:	84
j)	ANEXOS	85
	Anexo 01:	85
	Anexo 02:	85
	Anexo 03:	86

*CP*

**b) RESUMEN**

Para desarrollar esta investigación preparamos extractos de dos formas: licuado y percolado directamente para determinar la actividad antielastasa y licuado con solvente semipolar, percolado y luego dejando correr un solvente de mayor polaridad para optimizar la extracción y determinar la capacidad antioxidante.

Obtenido los extractos se efectuaron los respectivos ensayos que permitieron llegar a conclusiones como que las tres variedades de uva presentan actividad de inhibición de la enzima elastasa utilizando 100 microlitros del extracto correspondiente, pero más la uva negra y luego la uva roja; además, también se pudo determinar que las tres variedades de uva presentan considerable actividad antioxidante utilizando diluciones definidas del extracto metanólico concentrado, mayores en negra y roja pero destacamos que es casi hasta tres veces mayor cuando se trata del fruto entero.

Si bien la relación en cuanto a ambos efectos no fue con la misma tendencia, encontraremos entre las discusiones que si bien es cierto los flavonoides tienen actividad antioxidante, no todos los núcleos de flavonoides tienen capacidad de inhibir a la enzima elastasa.

### c) INTRODUCCIÓN

La inflamación es uno de los mecanismos básicos de defensa de los organismos pluricelulares frente a una agresión, en donde el tejido conjuntivo vascularizado reacciona frente a un daño tisular con el propósito de localizar y eliminar el agente nocivo e iniciar la reparación tisular. La inflamación está regulada por varios mediadores químicos como la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, formación de óxido nítrico por el macrófago y el endotelio, formación de radicales libres, activación de la vía del ácido araquidónico y la consecuente formación de prostaglandinas y tromboxanos.

La inflamación está implicada en múltiples patologías tales como artritis, asma, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal y aterosclerosis. Durante esta respuesta del organismo los leucocitos polimorfonucleares (PMNs), son las primeras células móviles en llegar al área afectada para liberar productos tóxicos tales como enzimas proteolíticas (elastasa), especies de oxígeno reactivas (EOR) y proteínas catiónicas capaces de destruir los patógenos invasores, pero potencialmente nocivo si el proceso es exagerado, porque puede dañar el tejido normal. Encontrar la forma de limitar la desgranulación leucocitaria equivale a encontrar un antiinflamatorio útil de tipo inmunomodulador. La elastasa y los radicales libres representan los indicadores a medir en extractos de diferentes tipos de uva como posibles "inmunomoduladores".

CP

### **c.1 Descripción y análisis del tema.**

Consciente de que la salud es el patrimonio máspreciado que posee el ser humano, Hipócrates lanza el conocido aforismo que prescribe:

**"Que tu alimento sea tu medicina, y que tu medicina sea tu alimento".**

El avance de la ciencia y sus métodos de investigación, permiten en la actualidad conocer plenamente la composición química de los alimentos y no solo eso sino también las propiedades nutritivas y/o terapéuticas que tiene cada uno de estos componentes. Se tiene, por tanto, disponible mucha información sobre alimentos que ayudan a las funciones del hígado, riñones, piel, sistema circulatorio y otros, actuando para tal efecto como inhibidores de muchas reacciones químicas oxidativas que provocarían degeneración celular e histológica que afectarían importantes órganos y expondría nuestra salud a tal punto de poner en riesgo nuestra vida.

Se ha postulado que la pared venosa perdería su elasticidad como consecuencia de una disminución en el contenido tanto de elastina como de laminina y en el desequilibrio entre la cantidad de colágeno-I (rígido) y la de colágeno-III (elástico). Esto daría lugar a la disfunción de la pared venosa que provoca reflujo, disminución de la velocidad o estancamiento de la circulación sanguínea y como

consecuencia disminuye el aporte de oxígeno a los tejidos asociados a su lecho vascular.

La isquemia de los tejidos representa un estímulo que induce la activación de los leucocitos, particularmente los neutrófilos que por degranulación liberan enzimas (elastasa, lactoferrina) y producen radicales libres, lo que constituye parte del mecanismo normal de defensa contra el material biológico extraño al organismo solo que en esta situación la respuesta de los neutrófilos agrede al tejido vascular.

La hialuronidasa y la elastasa, de los sistemas enzimáticos lisosomales de la degranulación de los neutrófilos, serían probablemente las enzimas responsables de la génesis de la insuficiencia venosa crónica. Ambas enzimas están involucradas en la degradación del proteoglicano que constituye uno de los principales componentes del endotelio capilar y de la matriz extravascular.

Un radical libre es una especie química con uno o más electrones desapareados en su orbital externo, por lo cual constituye una molécula altamente inestable. Entre los radicales libres más importante, están los derivados del oxígeno: El anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singulete.



Debido a que las defensas antioxidantes naturales para prevenir el daño oxidativo son insuficientes, el aporte de antioxidantes naturales provenientes de la dieta es fundamental, para revertir gran parte de los procesos de destrucción al que inducen los radicales libres. El vino como extracto vegetal vivo, el tomate crudo y mejor en pasta o zumo previa cocción y el brócoli como extracto crudo o al vapor, han demostrado tener propiedades de protección de la salud, reduciendo significativamente la incidencia de enfermedades y muertes causadas por estos radicales, donde el stress oxidativo, participa en su desarrollo. Este beneficio está atribuido al contenido de antioxidantes, que es un valor agregado que el público consumidor cada vez aprecia con mayor interés.

“Que tu alimento sea tu medicamento señaló Hipócrates, y se sabe que una dieta rica en fibra disminuye la incidencia de sangrados y puede aliviar también la comezón, así como los polifenoles de ciertas frutas alivian procesos inflamatorios y la fragilidad capilar. Por ello cabe la posibilidad de demostrar en el presente trabajo que paralelamente a nuestra alimentación podemos ir previniendo, aliviando e inclusive curando, una y muchas enfermedades.

Se escucha con frecuencia que **“somos lo que comemos”**, y es que es una afirmación totalmente cierta, puesto que los alimentos determinarán muchos aspectos de nuestra salud. Por tanto mantener una alimentación equilibrada entre frutas y verduras, huevos y

pescados, nos ayudará a dotar al organismo de nutrientes como **las vitaminas, los minerales, antioxidantes y demás sustancias que el cuerpo necesita para poder realizar correctamente sus funciones habituales** entre las que se considera el buen estado de la mente.

## **c.2 Importancia y justificación de la investigación.**

Con el pasar de los años y de manera inevitable se pone de manifiesto en nuestro organismo las consecuencias de su envejecimiento. Quizá por lo que hacemos o por lo que no hacemos, o tal vez por lo que comemos o por lo que no comemos y, sumado a todo ello la exposición a un ambiente cada vez más contaminado, las manifestaciones de este envejecimiento se aceleran.

La insuficiencia venosa crónica es uno de los desórdenes vasculares más comunes, representa un importante problema de salud, calculándose que afecta del 20 al 30 % de la población adulta y al 50 % de los mayores de 50 años. Afecta más a las mujeres que a los hombres, en una proporción de 5:1<sup>(1)</sup>.

El problema hemorroidal representa una de estas manifestaciones y que se muestra sin diferenciar en personas de diferente oficio, tanto en vigilantes, choferes, oficinistas u otros que mayoritariamente

esconden el problema ante el temor de la burla por la región de nuestra anatomía que involucra este problema de salud y por el tratamiento que se debe recibir.

Sin embargo se tiene conocimiento que problemas como la fragilidad capilar, la inflamación y la resistencia de los tejidos se pueden aliviar mediante el consumo de ciertos alimentos y buscamos demostrar si el consumo de uva, motivo del presente trabajo, permite lograr estos beneficios, considerando que se sabe que la elastasa y los radicales libres están involucrados en las alteraciones mencionadas a inicios del presente párrafo es que utilizaremos la inhibición de estos indicadores para confirmar los posibles beneficios. De esta manera se podría difundir un adecuado consumo de este producto ya sea para el tratamiento de hemorroides así como también para que a partir de cierta edad se consuma como preventivo de la patología mencionada y de otras que presenten relación.

Los flavonoides son un grupo de polifenoles ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se han descrito muchos efectos biológicos de los flavonoides, entre ellos cabe destacar sus acciones antiinflamatoria, antialérgica, antimutágena, antineoplásica, hepatoprotectora y venotónica. De todos los flavonoides de los que se ha reportado actividad vascular, los más citados son diosmina, diosmetina, hesperidina, neohesperidina, rutina y narirutina.

Las proantocianidinas son polifenoles derivados de flavan-3-oles. Incluyen monómeros (catequinas, leucoantocianidinas), pero más frecuentemente por oligómeros resultantes de la unión de varios de estos monómeros. Algunos compuestos de este grupo son potentes inhibidores de la elastasa leucocitaria, como es el caso de galato de 3-epigallocatequina.

Entre los preparados con proantocianidinas empleados en la insuficiencia venosa crónica destacan el picnogenol y los extractos de la hoja de vid roja y de semilla de uva.

La semilla de uva contiene cantidades importantes de (+) catequina y (-) epicatequina, flavanos que también son abundantes en otras partes de la planta. Además, estos compuestos forman dímeros, trímeros y tetrameros (proantocianidinas), que también se encuentran en diferentes partes de la planta<sup>(2)</sup>.

Entre las numerosas proantocianidinas identificadas en la semilla, destacan por su abundancia, el dímero procianidina B<sub>2</sub> y el trímero procianidina C<sub>1</sub>. Otras procianidinas presentes en la semilla de la uva son los dímeros procianidinas B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> y A<sub>2</sub>, el trímero procianidina C<sub>2</sub>, el 3-o-galato de triepicatequina, la tetraepicatequina y la tetracatequina.

Las proantocianidinas poseen una absorción oral incompleta pero rápida, alcanzándose la concentración plasmática máxima a los 45

Cite

minutos. La vida media, tras administración única, es de 5 horas. Sus metabolitos son excretados fundamentalmente por el riñón (20 % a través de la orina) aunque un porcentaje importante también se excreta por la bilis (14 %), un 45 % de la dosis administrada se elimina intacta a través de las heces<sup>(3)</sup>.

Lo último que se señala en el párrafo anterior, podría ser considerado para poder explicar la mejora en la tonicidad venosa (bajo un efecto local) que se manifiesta como consecuencia del consumo de determinados alimentos caracterizados por presentar en su composición una o más de las sustancias señaladas, tal como sucede con la uva.

Ante la problemática expuesta, surge la alternativa de la presente investigación:

CS

**¿Contienen los frutos de diferentes variedades de uva entre sus componentes, metabolitos que puedan provocar con mayor o menor intensidad actividad antielastasa y antioxidante?.**

### **c.3 Objetivos y alcance de la investigación**

#### **c.3.1 Objetivo general**

Evaluar la capacidad antielastasa y antioxidante para diferentes variedades de uva.

### **c.3.2 Objetivos específicos**

- i. Obtener extracto hidroalcohólico del licuado del fruto entero de tres variedades diferentes de uva.
- ii. Evaluar la actividad inhibitoria de cada uno de los extractos obtenidos sobre la enzima elastasa por el método de James y col.
- iii. Evaluar la capacidad antioxidante de cada uno de los extractos por el método FRAP.
- iv. Relacionar la capacidad inhibitoria de elastasa y la capacidad antioxidante con la variedad de uva evaluada.

*Che*

### **c.3.3 Alcances de la investigación**

El presente trabajo se proyecta no solo al conocimiento en el ámbito académico, también a:

- Poder establecer una relación entre diferentes variedades de uva, desde el punto de vista de su capacidad antielastasa y antioxidante, respecto a su utilidad en la prevención y/o tratamiento de patologías relacionadas a la insuficiencia venosa crónica que se manifiesta por ejemplo en los problemas de

hemorroides y varices, los mismos que se agudizan con el paso de los años.

- Poder utilizar los resultados del presente trabajo como una referencia que junto a otras permitiría la obtención de determinadas formulaciones que incluirían a la uva (yogurt, mermeladas u otros) como parte de un alimento funcional que ofrezca como beneficio la no manifestación prematura de las alteraciones que se citan en el planteamiento del problema de esta investigación.
- Proyectar a la comunidad el carácter antielastasa y antioxidante que presentan las diferentes variedades de uva evaluadas, así como también la forma de consumo que mejor convenga para lograr los beneficios farmacológicos ya sea solo la pulpa de la fruta e inclusive la necesidad de tener que consumirlas con pepa y cáscara para de esta manera aprovechar todas sus bondades preventivas y/o curativas de patologías relacionadas con el desequilibrio elastasa- $\alpha$ -antitripsina.



## d) MARCO TEORICO

### d.1 TEJIDO CONJUNTIVO:

El tejido conjuntivo, derivado del mesénquima, constituye una familia de tejidos que se caracterizan porque sus células están inmersas en un abundante material intercelular, llamado la matriz extracelular.

Existen 2 variedades de células conjuntivas:

- Células estables, las que se originan en el mismo tejido y que sintetizan los diversos componentes de la matriz extracelular que las rodea.
- Población de células migratorias, originadas en otros territorios del organismo, las que llegan a habitar transitoriamente el tejido conjuntivo.

La matriz extracelular es una red organizada, formada por el ensamblaje de una variedad de polisacáridos y de proteínas secretadas por las células estables, que determina las propiedades físicas de cada una de las variedades de tejido conjuntivo.

#### d.1.1 Células propias de los tejidos conjuntivos (estables)

Las células llamadas estables o de sostén corresponden a un grupo de células diferenciadas cuyo principal rol es producir la matriz intercelular propia de cada tipo de tejido conjuntivo.



Ellas se forman a partir de células mesenquimáticas localizadas en los sitios del organismo en que van a formar al tejido conjuntivo.

Estas células se caracterizan por encontrarse en proceso de activa diferenciación para sintetizar a la matriz extracelular que caracteriza al tipo de tejido conjuntivo que corresponda <sup>(4)</sup>.

Estas células pueden diferenciarse como:

**d.1.1.1 Fibroblastos:** Producen los tejidos conjuntivos fibrosos cuya matriz extracelular está constituida por fibras colágenas y fibras elásticas, asociadas a glucosaminoglucanos, proteoglucanos y glucoproteínas.

**d.1.1.2 Condrioblastos:** Producen el tejido cartilaginoso, cuya matriz extracelular se caracteriza por la presencia de una cantidad importante de proteoglicanos asociados a ácido hialurónico y a microfibrillas de colágeno tipo II. Al quedar totalmente rodeados por la matriz cartilaginosa ellos pasan a llamarse condrocitos.

**d.1.1.3 Osteoblastos:** Producen el tejido óseo, sintetizando el componente orgánico de la matriz extracelular ósea que se caracteriza por un alto contenido en colágeno tipo I, glicosaminoglucanos

y glicoproteínas. Al quedar totalmente rodeados por la matriz ósea pasan a llamarse osteocitos.

**d.1.1.4 Lipoblastos:** Producen el tejido adiposo. Ellas se diferencian a células almacenadoras de grasa, sintetizan su matriz extracelular y se rodean de una lámina basal. Ellos pasan así a formar los adipocitos o células adiposas.

#### **d.1.2 Células conjuntivas libres (migratorias)**

Estas células se originan en la médula ósea hematopoyética y usan la circulación sanguínea como un medio de transporte hacia los tejidos conjuntivos, donde realizan sus principales funciones.

Entre ellas se encuentran las células cebadas (o mastocitos) y los macrófagos (o histiocitos) que son componentes estables del tejido conjuntivo al que llegan.

Un grupo distinto lo forman las células plasmáticas, los linfocitos y los granulocitos, todos ellos células de vida media relativamente corta y que tienden a concentrarse en las zonas de tejido conjuntivo en que ocurren reacciones relacionadas con la defensa <sup>(4)</sup>.

La descripción de las funciones de cada una de estas células conjuntivas libres se dará más adelante en lo que corresponde a generalidades de la inflamación.

### **d.1.3 Matriz extracelular**

El análisis microscópico de la composición molecular del espacio intercelular demuestra que las tres principales clases de macromoléculas extracelulares son:

d.1.3.1 Cadenas de polisacáridos: de la clase de los glicosaminoglicanos, que pueden unirse covalentemente a proteínas, formando macromoléculas más complejas llamadas proteoglicanos. Estas moléculas forman el gel altamente hidratado que constituye la sustancia fundamental en la cual están embebidas las células y fibras conjuntivas. La fase acuosa del gel de polisacáridos permite una rápida difusión de nutrientes, metabolitos y hormonas entre la sangre y las células tisulares.

d.1.3.2 Proteínas fibrosas: que se organizan para formar estructuras bien definidas de la matriz extracelular como son las fibrillas colágenas, la lámina densa de las láminas basales y las fibras elásticas.

d.1.3.3 Glicoproteínas: de adhesión como fibronectina que asocian entre sí a células, fibras y

proteoglicanos del tejido conjuntivo y como laminina que asocia la lámina basal a las células que están rodeadas por ella.

Las variaciones en las cantidades relativas de las distintas macromoléculas presentes y en la forma en que están organizadas dan origen a variedades tan diversas de matriz como son la dura matriz extracelular del hueso y la transparente matriz extracelular de la córnea.<sup>(4)</sup>

#### **d.2 FIBRAS ELÁSTICAS:**

El tejido conjuntivo elástico forma capas en la pared de los órganos huecos sobre cuyas paredes actúan presiones desde adentro, como es el caso de los pulmones y de los vasos sanguíneos y forma algunos ligamentos como los ligamentos amarillos de la columna vertebral.

El principal componente de las fibras elásticas es la elastina, material proteico muy insoluble. Se caracteriza por un alto contenido en aminoácidos apolares como prolina y valina y tiene un alto contenido en aminoácidos no cargados como la glicina. Contiene además dos aminoácidos exclusivos: desmosina e isodesmosina.

La elastina se forma por las interacciones entre moléculas solubles de tropoelastina, proteína de unos 70.000 de peso molecular que contiene el aminoácido lisina y carece del aminoácido desmosina. La interacción entre las lisinas de 4 moléculas de tropoelastina (catalizada por la enzima lisiloxidasas, en presencia de cobre) pueden dar origen a la desmosina y unir en puntos específicos a estas hebras polipeptídicas, ricas en aminoácidos hidrofóbicos.

Se ha propuesto que en estado de reposo la hebra polipeptídica rica en aminoácidos apolares se encuentra plegada sobre sí misma y que al tensionar la fibra elástica se induce el estiramiento de esta zona en cada una de las hebras polipeptídicas las que son obligadas a ponerse paralelas entre sí, enfrentándose al medio acuoso del extracelular, permaneciendo unidas sólo a nivel de las desmosinas. Al desaparecer la fuerza deformante cada una de estas zonas de las hebras polipeptídicas recuperan su conformación plegada en forma espontánea y la fibra elástica recupera su longitud inicial.

Las microfibrillas tienen como principal componente una glicoproteína llamada fibrilina, rica en aminoácidos hidrofílicos y que contiene residuos de cistina los cuales pueden formar puente disulfuro, estabilizando la estructura de las microfibrillas. En las fibras elásticas juegan un rol estructural, formando una especie de vaina alrededor de la elastina, permitiendo así la formación de estructuras fibrilares elásticas. En ausencia de microfibrillas la elastina se deposita

formando láminas elásticas, como ocurre por ejemplo en la pared de las arterias.

La elastina es una proteína que se encuentra presente de manera natural en nuestro cuerpo. La elastina juega un papel importante dentro de la firmeza y flexibilidad de la piel. Es al final de la adolescencia cuando el cuerpo comienza a dejar de producir elastina de manera propia.

Existen diversas recomendaciones para preservar la tasa de elastina en el cuerpo, entre las que se incluyen el evitar la exposición al sol, alejarse del cigarrillo y el prestar especial atención a los alimentos que se ingieren con objeto de decidirse por aquellos que favorecen a la elastina.

Por ejemplo, los alimentos ricos en Omega 3 como las nueces, salmón, aceite de oliva y aguacates ayudan a mantener una cantidad óptima de elastina en nuestro cuerpo. Las semillas de uva son ricas en polifenoles, unos potentes antioxidantes, son aquéllas vitaminas que ayudan directamente a luchar contra el envejecimiento. Dichos polifenoles promueven la síntesis de la elastina, actuando directamente sobre la firmeza de la piel, además ayuda a estimular la microcirculación.

Bien vale la pena comenzar a optar por alimentos ricos en cobre, como las nueces y las avellanas, ya que el cobre tiene una función

Dr

de antiinflamatorio, pero además interviene directamente en la síntesis de la elastina.

Los alimentos que son ricos en Zinc apoyan directamente en la construcción de las fibras de elastina, además las mantiene fuertes, asimismo permite que la elastina se combine con otros bloques de proteínas para formar nuevos compuestos. Los alimentos que representan una verdadera fuente de Zinc son los mariscos, el salmón, el atún y el bacalao. También se puede encontrar en la carne magra, yogur, queso y leche.

#### **d.2.1 Alimentos que participan en la formación de elastina:**

- Paltas: rico en Treonina que es el aminoácido que participa directamente en la formación de la elastina.
- Bayas: como moras, frambuesas, fresas, arándanos, estos representan una poderosa ayuda en la síntesis de la elastina.
- Brócoli: rico en vitamina C que produce colágeno y que en combinación con el cobre ayuda a producir elastina.
- Cítricos: de la misma manera que el brócoli su alto contenido en vitamina C lleva a la producción indirecta de elastina.

de

- Otros alimentos como espinacas, repollo, col, tomates y zanahorias son benéficos tanto para la salud en general como para la producción y síntesis de la elastina.

#### **d.2.2 Funciones de la elastina:**

La elastina desempeña un papel estructural en los tejidos elásticos, en los que se incluyen las arterias, piel, ligamentos, cartílagos y tendones. La elastina tiene parte activa en diversos procesos fisiológicos, por ejemplo es la principal responsable de la elasticidad y fuerza necesarias para la expansión y regulación del flujo sanguíneo, en el pulmón actúa como una celosía que permite el soporte de la apertura y cierre de los alvéolos. Por su parte, en la piel, las fibras de elastina actúan en la dermis donde aporta la elasticidad y flexibilidad de la piel.

Aunque la elastina como proteína tiene un tiempo medio de residencia de 74 años, es decir, es extremadamente durable, sucede que a partir de los 30 años se deja de producir, y los efectos se comienzan a ver no sólo en la piel sino en el resto de los órganos, y es entonces cuando llega el momento en el que la flexibilidad y su producción natural comienzan a ir a la baja, lo que representa el momento de comenzar a buscar



ayuda de manera externa, tal es el caso de lo que utilizamos como alimentos.

### **d.3 GENERALIDADES DEL PROCESO INFLAMATORIO**


La inflamación es un proceso bioquímico básico para eliminar estímulos que comprometen el organismo vivo (estímulos infecciosos, físicos, químicos o traumáticos). Es una respuesta del organismo que se produce cuando células pertenecientes al sistema inmunológico se activan en respuesta a estos estímulos <sup>(5)</sup>.

#### **d.3.1 Patologías relacionadas con la inflamación:**

La inflamación está implicada en múltiples patologías tales como artritis, asma, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal y aterosclerosis. Los signos macroscópicos cardinales de la inflamación son: calor, rubor (eritema), tumor (edema) y dolor (hiperalgesia), acompañados muchas veces de deterioro o pérdida de una función (ej. Insuficiencia hepática en la hepatitis, inmovilidad articular en la artritis). El calor y el eritema se deben a los eventos vasculares tempranos de vasodilatación y aumento del riego sanguíneo. El edema está relacionado estrechamente con el aumento de la permeabilidad capilar que permite la formación de exudado (plasma y proteínas plasmáticas más acúmulo de células inflamatorias). El dolor es causado por estimulación de

fibras sensoriales ante el aumento de presión en el foco inflamatorio y la liberación de neurocininas. En general, estos signos y síntomas resultan de la acción de mediadores tales como histamina, bradicinina, neurocininas, factores del complemento y óxido nítrico, que se originan localmente o provienen de células infiltradas al sitio de la agresión. Una elevada producción de prostaglandinas resalta y prolonga el efecto de los mediadores proinflamatorios iniciales <sup>(6)</sup>.

La respuesta inflamatoria del hospedador involucra una interacción de alta complejidad entre múltiples factores a nivel humoral, celular y neuronal, que se refleja en una serie de fenómenos microscópicos integrados: vasodilatación arteriolar y aumento de la permeabilidad vascular, e interacciones entre leucocitos y endotelio que permitan la diapédesis y migración leucocitaria hacia el tejido lesionado (foco o “escenario” inflamatorio). El proceso inflamatorio tiene por objetivo destruir o inactivar el agente pro-inflamatorio que haya desencadenado la inflamación, facilitando la reparación de los tejidos lesionados <sup>(7)</sup>.



En el proceso inflamatorio participan diversos tipos celulares y mediadores químicos que interaccionan entre sí en una red compleja y altamente coordinada. Básicamente, se distinguen

dos tipos de eventos: los vasculares y los celulares. Los eventos vasculares (vasodilatación arteriolar, con la consiguiente hiperemia tisular e incremento de la permeabilidad vascular en capilares y vénulas) son el requisito previo para que las células circulantes puedan acceder al foco inflamatorio <sup>(8)</sup>.

### **d.3.2 Fases del proceso inflamatorio:**

**d.3.2.1 Primera fase:** Se inicia gracias a los PMNs y macrófagos liberados, los cuales liberan TNF, IL-1 y otros mediadores que activan el endotelio de los vasos que irrigan el sitio afectado y a los mastocitos cercanos que a la vez liberan histamina que refuerza la activación del endotelio. La activación del endotelio libera quimiocinas que atraen a los PMNs, los cuales se adhieren al endotelio y migran a tejidos, para asegurar la llegada de fagocitos al sitio de la lesión <sup>(7)</sup>. Ante un estímulo inflamatorio, la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad capilar tienen un inicio inmediato y permanecen durante las primeras horas del proceso inflamatorio. La finalidad subyacente a estos eventos es permitir el mayor flujo sanguíneo



portador de células inflamatorias circulantes y la extravasación de plasma con proteínas para la formación de exudado. La vasodilatación y el aumento de la permeabilidad capilar son provocados por “mediadores de acción directa” que son liberados por células del tejido circundante y que interactúan con receptores específicos sobre las células endoteliales. Entre estos mediadores químicos se encuentran histamina, bradicinina, serotonina, leucotrienos C4 y D4 (LTC4 y LTD4), factor de agregación plaquetaria (PAF) y sustancia P<sup>(8)</sup>. Las prostaglandinas E2 e I2 (PGE2 y PGI2) producen relajación de la musculatura lisa vascular y, aunque en muchos tejidos no aumentan la permeabilidad vascular, potencian el edema producido por otros mediadores iniciales como la histamina y la bradicinina (BK).

A la amplificación de la respuesta inflamatoria contribuyen en forma importante la interacción de múltiples mediadores plasmáticos generados en cuatro sistemas enzimáticos de activación en cascada: el del complemento, el de la

coagulación, el de la fibrinólisis y el de las cininas<sup>(8)</sup>. Las células endoteliales de los vasos sanguíneos, ubicadas en la pared de las arteriolas, regulan el tono y permeabilidad de los vasos, además participan en el control de la coagulación y la agregación plaquetaria. Producen óxido nítrico, también conocido como factor relajante derivado del endotelio, el cual produce vasodilatación al relajar la musculatura lisa de la pared de los vasos; también producen cantidades importantes de prostaciclina, PAF, factores activadores del plasminógeno y citocinas como IL-1 e IL-8, además de expresar distintas moléculas de adhesión fundamentales para la migración celular. Se activan por diversos mediadores químicos especialmente histamina y acetilcolina

**d.3.2.2 Segunda Fase:** Participan los macrófagos y linfocitos que también se adhieren al endotelio y migran a tejidos.

**d.3.2.3 Tercera Fase (Fase de Resolución):** Interactúan los macrófagos y fibroblastos buscando reparar los daños causados por el agente invasor o la lesión. La inflamación aguda finaliza por la

apoptosis de las células participantes y por la fagocitosis del microorganismo invasor, cuando el proceso es de origen infeccioso. Si esto no sucede o fallan mecanismos homeostáticos, el proceso conlleva a una inflamación crónica acompañada de daño tisular <sup>(7)</sup>.

#### **d.4 MEDIADORES INFLAMATORIOS**

##### **d.4.1 Citocinas:**

Son proteínas (usualmente glicoproteínas) comunicadores primarios en la respuesta inmune innata que sirven como mensajeros químicos entre las células, y están involucradas en procesos como crecimiento celular y diferenciación, reparación y remodelación tisular así como regulación del sistema inmune. Son producidas por la mayoría de las células nucleadas. No existen como moléculas almacenadas. Inician su acción al unirse a receptores específicos de superficie en las células blanco con transducción de señales extracelulares y cambios en procesos intracelulares. La expresión de los receptores de citocinas está regulada por señales celulares permitiendo retroalimentación positiva o negativa. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- alfa), interleucina 1 (IL- 1) e IL- 6 son las tres citocinas que al parecer juegan un papel

2

importante en la iniciación y regulación de la respuesta inmune adquirida, especialmente sobre respuestas de linfocitos colaboradores tipo 1 (LT helper, LTh1) <sup>(10)</sup>.

Desde el punto de vista de la inflamación, las citocinas se dividen en dos grupos: citocinas proinflamatorias y citocinas antiinflamatorias. Las primeras son producidas por macrófagos activados y están involucradas en la regulación positiva de la reacción inflamatoria. Las citocinas antiinflamatorias se derivan de las células T y están involucradas en la regulación negativa de la reacción inflamatoria.

#### **d.4.2 Quimiocinas:**

Las quimiocinas son citocinas con gran capacidad quimiotáctica, son proteínas de bajo peso molecular involucradas en diferentes procesos fisiológicos y patológicos: tráfico de linfocitos, reparación de heridas, desarrollo de linfocitos Th1 y Th2, angiogénesis y angiostaxis, metástasis, desarrollo de órganos linfoides y propagadores de reacciones inflamatorias. En relación con migración leucocitaria, la acción de las quimiocinas se traduce en activación de integrinas, permitiendo la adhesión y migración. Las quimiocinas inflamatorias son producidas por diferentes tipos celulares: endotelio, epitelio, células estromales y leucocitos. Todas las

quimiocinas son moléculas secretadas, excepto fractalcina (proteína transmembrana) <sup>(11)</sup>.

#### **d.4.3. Óxido Nítrico:**

El óxido nítrico (NO) al ser producido en cantidades elevadas pierde su papel protector en oxidación celular, adquiriendo carácter oxidativo y lesivo, ya sea por acción directa o mediante la acción de especies reactivas de nitrógeno (ERN). Por la importancia del NO en procesos inflamatorios, se han desarrollado estrategias farmacológicas tales como inhibición selectiva de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), atrapadores de peroxinitrito, acción sobre blancos retardados de citotoxicidad por NO/peroxinitrito <sup>(12)</sup>.

#### **d.4.4 Derivados de Ácido Araquidónico (AA):**

La enzima COX, o prostaglandina H sintetasa, emplea ácido araquidónico (AA) como sustrato, formando mediadores llamados eicosanoides (prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) y leucotrienos (LT)). Los eicosanoides se unen a receptores de superficie celular vía receptores acoplados a proteínas G (GCRP) y AMP cíclico. Se han descrito dos isoformas: COX-1 o constitutiva, localizada a nivel subcelular en la membrana del retículo endoplasmático. COX-2 o inducible que se produce en eventos inflamatorios y



predomina en células inflamatorias, localizada en la membrana nuclear. El Ácido Araquidónico AA es un ácido graso, en el organismo este ácido es almacenado en forma esterificada en la membrana celular de casi todas las células y es liberado en respuesta a un estímulo como histamina, entre otros <sup>(13)</sup>.

#### **d.4.5 Fosfolipasa A2:**

El término fosfolipasa se refiere a un grupo heterogéneo de enzimas que poseen la capacidad de hidrolizar una o más uniones éster en glicerofosfolípidos. Las fosfolipasas A2 comprenden una amplia familia de enzimas lipolíticas que hidrolizan la unión éster de glicerofosfolípidos para producir ácidos grasos libres y lisofosfolípidos. La membrana celular posee AA esterificado en fosfolípidos de membrana, el cual es movilizado por la fosfolipasa A2 (PLA2), permitiendo que el AA sea posteriormente sustrato de COX. La producción de AA es el paso limitante en la producción de PG <sup>(12)</sup>.

La PLA2 participa en una variedad de procesos fisiológicos tales como digestión de fosfolípidos, señalización lipídica, remodelamiento de membranas celulares, entre otros.

## **d.5 CÉLULAS PRESENTES EN LA INFLAMACIÓN**

En los eventos celulares de acuerdo con el estatus de movilidad, las células participantes en el proceso inflamatorio pueden considerarse como residentes (asentadas permanentemente en los tejidos, ej. células endoteliales vasculares y células perivasculares como mastocitos, macrófagos, eosinófilos y fibroblastos) o circulantes (acceden al foco inflamatorio desde el torrente sanguíneo, ej. plaquetas, neutrófilos, monocitos) <sup>(8)</sup>.

### **d.5.1 Monocitos:**

Son células móviles de acción tardía, que actúan varias horas después de que lo han hecho los PMNs. En el tejido afectado, se transforman en macrófagos y fagocitan cualquier resto celular o bacteriano del área. Son "recicladores" que limpian los restos de la batalla citoquímica desatada durante la inflamación. También son capaces de secretar enzimas y mediadores químicos <sup>(9)</sup>.

### **d.5.2 Linfocitos:**

Son las células de la respuesta inmunitaria específica que se desencadena en gran parte del proceso inflamatorio. Se desarrollan a partir de progenitores linfoides inmaduros y se dividen en dos grupos, linfocitos B y linfocitos T, dependiendo de si los progenitores linfoides maduran en la médula ósea (B) o en el timo (T), respectivamente. Participan en la inflamación

por medio de las moléculas que producen: anticuerpos (activan el sistema de complemento) y linfocinas (activan la producción y función de las demás células que participan en la inflamación <sup>(9)</sup>).

#### **d.5.3 Mastocitos:**

Están situados estratégicamente en los lugares más susceptibles de penetración de agentes patógenos como las proximidades a la piel, alrededor de los vasos sanguíneos y en las mucosas. Se activan por diversos estímulos como traumatismos o agresiones físicas o químicas. Esta activación conlleva a su desgranulación liberando grandes cantidades de histamina y serotonina lo que incrementa la permeabilidad vascular y también liberan algo de heparina. Pueden llegar a vivir varias semanas. También producen algunas prostaglandinas como la PGD<sub>2</sub> y leucotrienos y factor activador de las plaquetas (PAF) <sup>(14)</sup>.

#### **d.5.4 Macrófagos:**

Llamados así por su importante papel en la fagocitosis tanto de agentes infecciosos como de los complejos antígeno-anticuerpo y restos celulares, son fundamentales en los procesos de reparación. Constituyen una de las más importantes células efectoras en la respuesta inflamatoria, donde juegan un papel importante en la iniciación,

mantenimiento y control de la respuesta inmune primaria y secundaria <sup>(9)</sup>.

#### **d.5.5 Leucocitos Polimorfonucleares (PMNs):**

Son las células leucocitarias predominantes o más abundantes en la inflamación aguda y son las primeras células móviles en llegar al área afectada. Se adhieren a las células epiteliales y atraviesan la pared de los vasos sanguíneos atraídos por factores quimiotácticos. Existen tres tipos de leucocitos polimorfonucleares denominados neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Contienen lisosomas con un contenido rico de enzimas hidrolíticas muy agresivas; son capaces de generar una gran cantidad del radical superóxido y si su acción no se limita, estos radicales no solo son capaces de destruir el agente agresor sino también a las células normales del tejido inflamado <sup>(9)</sup>.

Of

**d.5.5.1 Eosinófilo:** Es un leucocito de tipo granulocito pequeño derivado de la médula ósea, es característico su núcleo bilobulado, al igual que sus distintivos gránulos citoplásmicos.

Son principalmente células residentes que abundan en tejidos con superficie epitelial, tiene una vida media en la circulación sanguínea de 3 a 4 días antes de migrar a los tejidos en donde permanecen durante varios días. Su desarrollo

en la médula ósea es estimulado por diversas interleucinas, como la IL-5, la IL-3 y el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago. Podrían sobrevivir varios días ante estímulos como la IL-5 (esencial para la eosinofilia tisular o sanguínea) y el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF). La patogénesis de la inflamación alérgica humana (en piel, ojos, nariz y pulmones) se asocia frecuentemente con la mayor presencia de eosinófilos y sus productos, y se correlaciona con la severidad de enfermedades como el asma. La acumulación de eosinófilos en los tejidos es característica de las reacciones locales de defensa del hospedador frente a infecciones por parásitos como los helmintos, para cuya eliminación el eosinófilo cuenta con gránulos que secretan agentes tóxicos como la proteína básica mayor, la cual es además tóxica para el epitelio pulmonar. En el reclutamiento selectivo de eosinófilos participa el agente quimiotáctico eotaxina, una quimiocina específica para los eosinófilos pero no para los neutrófilos <sup>(15)</sup>.



**d.5.5.2 Basófilo:** Esta célula se tiñe fácilmente con colorantes. Los gránulos de los basófilos son gruesos pero escasos. Son células de unas 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y su núcleo tiene una forma que recuerda a una S. Se originan en el mismo lugar que el resto de los granulocitos (médula ósea), y son los menos numerosos, ya que constituyen sólo el 0,5% del total. Al activarse y pasar a los tejidos, se les llaman células cebadas o mastocitos. Tienen una activa participación en la respuesta inmunitaria, a través de la liberación de histamina, serotonina en bajas concentraciones y otras sustancias químicas. Son los granulocitos no fagocíticos más pequeños circulantes <sup>(16)</sup>.

**d.5.5.3 Neutrófilo:** Los neutrófilos son glóbulos blancos de tipo granulocito, miden de 12 a 18  $\mu\text{m}$  y es el tipo de leucocito más abundante en la sangre humana (60 a 75%), se denominan neutrófilos debido a que no se tiñen con colorantes ácidos ni básicos. Participan activamente en la respuesta del huésped en su defensa natural <sup>(17)</sup>. Son un componente central del proceso inflamatorio teniendo la habilidad para migrar hacia el sitio de la inflamación para liberar productos tóxicos tales

como enzimas proteolíticas, especies de oxígeno reactivas (EOR) y proteínas catiónicas capaces de destruir los patógenos invasores. Los blancos del neutrófilo incluyen bacterias, hongos, virus, células infectadas por virus y células tumorales. Los neutrófilos son la primera línea de defensa entre todos los elementos celulares implicados en la reacción inflamatoria frente al ataque por microorganismos a los cuales fagocitan, destruyen y digieren. También son capaces de destruir células tisulares y organismos mayores convenientemente opsonizados <sup>(8)</sup>. Aunque la respuesta del neutrófilo para estimular diferentes condiciones y agentes patógenos es generalmente beneficiosa para la defensa del huésped, pueden ser perjudiciales para el organismo si estas células son inadecuadamente activadas. **En este sentido, la sobreproducción de radicales libres y enzimas proteolíticas usadas como defensa contra bacterias y microorganismos pueden ser altamente tóxicos para células y tejidos.**



## **d.6 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS:**

La respuesta del neutrófilo en la defensa del organismo contra microorganismos invasores o daños tisulares incluye: la migración, la diapédesis, la quimiotaxis, la fagocitosis, la muerte intracelular y la apoptosis.

### **d.6.1 Migración:**

Los leucocitos migran desde los vasos sanguíneos hacia el foco inflamatorio y se sitúan en la periferia a lo largo de la superficie endotelial. El inicio de la migración comienza con la "captura" por parte de las paredes del vaso sanguíneo de leucocitos circulantes y es seguida por el rodamiento (rolling) de los leucocitos a lo largo del endotelio, de esta manera el endotelio queda revestido de leucocitos. Tanto la captura, selección de leucocitos de la sangre circulante, como el enrollamiento a través de paredes de células endoteliales involucra glicoproteínas adhesivas denominadas selectinas, integrinas e inmunoglobulinas. Las integrinas junto con las inmunoglobulinas son fundamentales en el proceso de adherencia y migración del leucocito a través del endotelio. Las integrinas son proteínas heterodiméricas constituidas por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Estas glicoproteínas se expresan sobre la

N7



superficie de los leucocitos para mediar adhesiones leucocito-endotelio pocos minutos después de la activación por mediadores como PAF, IL-8, fMLP, C5a, citocinas y factores de crecimiento (TNF o GMCSF).

#### **d.6.2 Diapédesis:**

La salida al espacio extravascular de PMNs a través de células endoteliales se conoce como diapédesis. El paso del leucocito a través del endotelio vascular ocurre preferencialmente en uniones tricelulares. Aunque no se conocen los mecanismos de extravasación, se sabe que la selectina se regula corriente abajo y que la molécula de adhesión celular plaqueta-endotelio (PECAM-1) llega a un lugar un papel fundamental para el paso de PMNs.

#### **d.6.3 Quimiotaxis:**

Una vez en los tejidos, el neutrófilo se mueve por quimiotaxis (migración dirigida), en la dirección del gradiente de concentración de quimioatrayente. Los neutrófilos exhiben múltiples receptores para quimioatrayentes que pueden activar la adhesión, migración celular directa y promover la desgranulación y las respuestas oxidativas. La unión de los

quimioatrayentes a tales receptores activan fosfolipasas vía proteína G, resultando en la liberación de calcio intracelular, apertura de los canales de calcio y activación de PKC, lo cual está involucrado en las vías que conducen a desgranulación y activación de NADPH oxidasa.

#### **d.6.4 Fagocitosis:**

Es el proceso por el cual células especializadas buscan, localizan, identifican e introducen a su citoplasma partículas o microorganismos extraños para destruirlos y digerirlos <sup>(7)</sup>. Los microorganismos son reconocidos hasta que son recubiertos por opsoninas, las cuales se unen a receptores específicos situados en los leucocitos. En el neutrófilo, la fagocitosis involucra los receptores FcR que reconocen el fragmento de la inmunoglobulina provocando la extensión de protrusiones de membrana del neutrófilo sobre la partícula opsonizada para internarla y los receptores del complemento que interaccionan con C3b y C3bi, donde la adhesión de partículas a los receptores CR1 y CR3 no es suficiente para promover la fagocitosis a menos que los neutrófilos sean activados por formilpéptidos. Durante el englobamiento, el citoplasma emite

pseudópodos los cuales rodean el microorganismo a ser fagocitado, resultando que el microorganismo quede en el interior de un fagosoma, lo cual activa vías de señalización y a la activación de la “explosión respiratoria”.

#### **d.6.5 Muerte intracelular:**

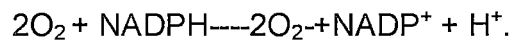
El contacto del neutrófilo con el microorganismo inicia dos eventos involucrados en la muerte intracelular: la “explosión respiratoria” y la desgranulación leucocitaria.



**d.6.5.1 Explosión respiratoria:** Desde el reconocimiento de la sustancia a fagocitar o del estímulo soluble, tanto neutrófilos como macrófagos experimentan una “explosión respiratoria”, la cual consiste en un incremento de consumo de oxígeno, la generación de EOR (especies de oxígeno reactivas) seguida por la activación de un complejo NADPH oxidasa, que incluye anión superóxido y peróxido de hidrogeno, que en presencia de factores desencadenantes como MPO producen ácido hipocloroso el cual es un potente

antioxidante que puede aumentar el daño tisular por parte del neutrófilo activado. De esta manera, los componentes de los gránulos lisosomales pueden potenciar la contribución en la generación de EOR <sup>(8)</sup>. Tanto el proceso de desgranulación como la formación de EORs se reconocen como frentes bactericidas que las células fagocíticas producen y aunque en principio esto es beneficio como mecanismo de defensa del hospedero, un desbalance en la producción de EORs puede generar un efecto deletéreo en los tejidos comprometidos en el foco inflamatorio y se produce así un daño tisular severo. Además de formar una variedad de EOR, el sistema NADPH oxidasa promueve la afluencia de cationes en el fagosoma, se cree que estos procesos permiten la actividad microbicida durante la fagocitosis <sup>(13)</sup>. Las EORs son moléculas que se encuentran en un estado más reactivo que el oxígeno molecular, en el cual, el oxígeno es reducido. El principal EOR es

el anión superóxido el cual es formado por la reducción de un electrón del oxígeno molecular. En el neutrófilo esta reacción es catalizada por NADPH oxidasa:



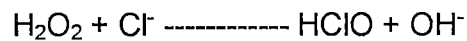
**d.6.5.2 Desgranulación leucocitaria:** Parte de los efectos inflamatorios provocados por la presencia de los leucocitos polimorfonucleares en los tejidos deben ser atribuidos a la liberación del contenido de sus gránulos, en el fagolisosoma o en el medio extracelular. Los neutrófilos emplean péptidos antimicrobianos y proteínas, los cuales destruyen microorganismos invasores. Los neutrófilos poseen tres tipos de gránulos: los gránulos primarios o azurófilos que captan el colorante básico Azur A (de allí su nombre) que contienen Mieloperoxidasa, Elastasa, Betaglucuronidasa, Lisozima y otras enzimas hidrolíticas; los gránulos secundarios o específicos, que contienen

Lisozima, Lactoferrina y Colagenasa juegan un papel importante en la fase inicial de la respuesta inflamatoria y los gránulos terciarios o de gelatinasa, contienen colagenasa y glicoproteínas que participan en la adherencia celular. La capacidad de inhibir la desgranulación leucocitaria podría ser un mecanismo de acción interesante de nuevos productos antiinflamatorios. Como indicadores del proceso de desgranulación leucocitaria se tiene en cuenta la determinación de los niveles de las enzimas MPO y elastasa, las cuales están mayoritariamente presentes en los gránulos azurófilos <sup>(8)</sup>. Las proteasas derivadas del neutrófilo tienen la habilidad para degradar la mayoría de los componentes de la matriz extracelular, por esto juegan un papel importante en procesos fisiológicos.

Es bien conocido y aceptado que el nivel de actividad de la MPO está directamente relacionado con la concentración de neutrófilos en el tejido inflamado; por lo

que la medición de esta actividad enzimática ha sido considerada un sensible marcador cuantitativo de la quimiotaxis e infiltración de neutrófilos en el proceso inflamatorio y también es considerada como un indicativo de estrés oxidativo. Esta enzima utiliza el peróxido de hidrógeno, generado tras la activación del neutrófilo, para oxidar los iones Cl<sup>-</sup> presentes en el medio y dar lugar al ácido hipocloroso, un potente agente oxidante al cual se le atribuye la capacidad bactericida del neutrófilo.

#### MPO



Entre las especies de oxígeno reactivas producidas por el neutrófilo se considera al ácido hipocloroso como el oxidante más reactivo; ya que es capaz de dañar estructuras proteicas y de reaccionar con los ácidos grasos insaturados originando la desestabilización de las membranas celulares <sup>(8)</sup>.

La Elastasa es una metaloproteína con actividad enzimática proteasa, es capaz de degradar el colágeno y los proteoglicanos del cartílago, la elastina y la membrana basal. Además, puede convertir el fibrinógeno en fibrina y actuar sobre el complemento a distintos niveles. La elastasa está presente dentro de las placas arterioscleróticas y contribuye a los procesos de degradación de la matriz y el debilitamiento de la pared del vaso responsable de las complicaciones de la formación de aneurismas y la ruptura de placas. Es una proteasa con una amplia gama de sustratos y existe la posibilidad de un rápido incremento en la actividad elastasa asociada a la infiltración y desgranulación de neutrófilos en los síndromes coronarios agudos <sup>(19)</sup>.

#### **d.6.6 Apoptosis:**

La fase de resolución se cumple por la interacción entre macrófagos y fibroblastos y busca reparar los daños causados por la agresión. Generalmente, la inflamación aguda termina



en resolución por apoptosis de las células participantes y por fagocitosis y lisis del microorganismo responsable, cuando el proceso es de origen infeccioso. Si el antígeno no es eliminado o fallan mecanismos homeostáticos, el proceso se hace crónico y se acompaña de daño tisular <sup>(16)</sup>. Existen variables que pueden modificar el proceso de resolución de la inflamación como la naturaleza e intensidad de la lesión, la zona y tejidos afectados y el tipo de respuesta del huésped. La apoptosis se conoce como muerte celular programada. La apoptosis de los neutrófilos y su posterior ingestión por los macrófagos es el mecanismo principal por el cual el organismo elimina células normales innecesarias o que han cumplido su función o su ciclo de vida.

#### **d.7 PATOLOGÍAS ASOCIADAS CON LOS NEUTRÓFILOS**

El neutrófilo es muy importante por su papel de defensa ante una invasión microbiana. Sin embargo, ante una respuesta no específica pueden lesionar el tejido normal pasando a contribuir con el daño tisular.

##### **d.7.1 Neutropenia:**

La alta incidencia de infecciones bacterianas que presentan los pacientes neutropénicos evidencian la importancia del neutrófilo, la neutropenia es una enfermedad autosómica

recesiva, donde el recuento absoluto de polimorfonucleares (PMNs) desciende un 25% en 24 horas. Hereditariamente existen defectos que afectan la estructura de los gránulos de neutrófilos: uno es la deficiencia específica del gránulo, es un desorden en el que se presentan infecciones bacterianas severas debido a la poca actividad bactericida. El otro defecto hereditario es el síndrome de Chediak-Higashi, donde se presenta un incremento de enfermedades infecciosas, debido a se ve alterada la actividad microbicida de los PMNs <sup>(7)</sup>.

#### **d.7.2 Tratamiento del cáncer:**

El tratamiento de diferentes tipos de cáncer genera agranulocitosis, donde se presenta la carencia de PMNs, lo cual conduce a graves infecciones, lo que podría causar la muerte si no existe tratamiento administrando factores estimulantes para la formación de colonias o transfusión de leucocitos <sup>(7)</sup>.

#### **d.7.3 Mieloperoxidasa:**

El exceso de actividad de la MPO produce un daño en el tejido, por ello su inhibición es un importante blanco terapéutico en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas. En la literatura, aparecen reportados productos de origen natural como el ácido gálico y zanhasaponinas de

*Zanha africana* las cuales son capaces de inhibir la actividad de la MPO, lo cual es importante pues el exceso de actividad de la enzima produce daño tisular exagerado.

#### **d.7.4 Elastasa:**

El exceso de elastasa está relacionado con enfermedades respiratorias como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística y enfisema pulmonar, insuficiencia venosa crónica, entre otras. Por lo tanto, es un posible blanco terapéutico en enfermedades inflamatorias crónicas. La elastasa está presente dentro de las placas arterioscleróticas y contribuye a los procesos de degradación de la matriz y el debilitamiento de la pared del vaso responsable de las complicaciones de la formación de aneurismas <sup>(19)</sup>.

La integridad de las paredes alveolares se mantiene gracias al balance entre dos sustancias: la elastasa y la  $\alpha$ -1-antitripsina. La elastasa contribuye a la degradación de las paredes alveolares alterando su estructura, mientras que la  $\alpha$ -1-antitripsina (AAT) es un factor protector de la pared que permite mantener la tensión superficial de la misma, necesaria para la entrada de aire y el posterior intercambio de gases. En el fumador crónico, el mencionado balance se encuentra alterado a favor de la elastasa. Se entiende por tanto que la

función de la elastasa de neutrófilo es destruir las células dañadas y las bacterias, pero si no es neutralizada por la AAT, digiere el tejido conjuntivo y células pulmonares sanas <sup>(19)</sup>.

La Insuficiencia venosa crónica es una manifestación patológica relacionada con los problemas de várices y hemorroides, se evidencia por uno o más de los siguientes síntomas:

- Pesadez de piernas, prurito, calambres musculares, parestesias y edemas.
- Lesiones dérmicas: dermatitis eccematosa, dermatitis ocre, atrofia blanca, lipoedema.



La gravedad de los síntomas no siempre está relacionada directamente con el tamaño y la extensión de las várices, pudiendo manifestarse en pacientes sanos. Los síntomas mejoran con el decúbito y el frío y empeoran con el calor, el ortostatismo prolongado, en las mujeres se intensifica con el embarazo, la menstruación y el uso de anticonceptivos.

La etiología de la insuficiencia venosa crónica (IVC) no está del todo comprendida, pese a que por mucho tiempo se ha postulado que la incompetencia de las válvulas venosas es la causa primera de la formación de las venas varicosas, la más

común de las manifestaciones de la IVC<sup>(20)</sup>. Sin embargo, hay evidencia de que es posible observar dilatación de las venas antes de manifestarse la disfunción de las válvulas, lo que sugeriría una disfunción previa de la pared venosa. Se ha postulado que la pared venosa perdería su elasticidad <sup>(21)</sup> como consecuencia de una disminución en el contenido tanto de elastina como de laminina y en el desequilibrio entre la cantidad de colágeno-I (rígido) y de colágeno III (elástico) <sup>(22)</sup>.

Sea por la disfunción de la pared venosa, de las válvulas o por ambas, la circulación sanguínea venosa presenta reflujo, disminuye su velocidad y tiende a estancarse. El estásis sanguíneo disminuye el aporte de oxígeno a los tejidos asociados a su lecho vascular, pero además las células endoteliales vasculares se ven sometidas a una prolongada hipoxia. El daño desencadena una respuesta inflamatoria a nivel de células endoteliales y leucocitos.

Las células endoteliales responden a la hipoxia con una disminución en los niveles de ATP, activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y el subsecuente aumento de la adherencia de neutrófilos. En pacientes con incompetencia venosa superficial y profunda, se han reportado niveles elevados de moléculas de adhesión endotelial ICAM1 (molécula de adhesión intercelular), VCAM1 (moléculas de adhesión vascular), que permanecen elevados

ab

aún después de reposo en posición supina <sup>(23,24)</sup>. Todos estos factores determinan una respuesta inflamatoria, liberación de factores de crecimiento y daño venoso, los cuales perpetúan la insuficiencia venosa contribuyendo a la formación de venas varicosas <sup>(25)</sup>.

La isquemia de los tejidos es un estímulo que induce la activación de los leucocitos, particularmente los neutrófilos, que por degranulación liberan enzimas (elastasa, lactoferrina) y producen radicales libres, lo que constituye parte del mecanismo normal de defensa contra el material biológico extraño al organismo, solo que en esta situación la respuesta de los neutrófilos agrede al tejido vascular.

La hialuronidasa y la elastasa, de los sistemas enzimáticos lisosomales de la degranulación de los neutrófilos, serían probablemente las enzimas responsables de la génesis de la IVC. Ambas enzimas están involucradas en la degradación del proteoglicano que constituye uno de los principales componentes del endotelio capilar y de la matriz extravascular <sup>(26)</sup>.

La degradación enzimática del proteoglicano de las paredes de las venas facilita el paso de electrolitos, proteínas y agua hacia el espacio intersticial, lo que produce el edema. De este

modo la acción enzimática de la hialuronidasa y la elastasa no solo reducen la fuerza de la pared vascular, sino que además inducen su dilatación <sup>(8)</sup>.

#### **d.8 ENVEJECIMIENTO Y ESTRÉS OXIDATIVO:**

El envejecimiento es un proceso complejo caracterizado por cambios morfológicos y funcionales en la piel influenciado por varios factores tanto intrínsecos (envejecimiento cronológico) como extrínsecos (fotoenvejecimiento).

Estos desórdenes son causados principalmente debido a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) generando estrés oxidativo y la activación desbalanceada de proteasas dérmicas teniendo como consecuencia la degradación de la matriz extracelular (MEC) y la aparición de arrugas, pérdida de elasticidad y firmeza en la piel, señales notorias del avance en el envejecimiento <sup>(27)</sup>. El daño en la piel inducido por la radiación ultravioleta (UV) acelera la degradación de las proteínas de MEC, incluyendo colágeno, elastina, proteoglicanos, y fibronectina, entre otras <sup>(28,29)</sup>. Se ha demostrado que la radiación UV conlleva a la formación de ROS que activan la vía de la proteína MAP (mitogen-activated protein) quinasa, la cual subsecuentemente induce la expresión y activación de las matrix metaloproteinasas (MMPs) en la piel humana in vivo <sup>(30)</sup>. Las MMPs se sobre expresan en los fibroblastos humanos en cuestión de horas

luego de la exposición a la radiación UV, y por ello se consideran factores claves en el proceso de fotoenvejecimiento. Por consiguiente, principios activos con la habilidad de inhibir las principales enzimas que degradan la MEC (MMPs y elastasa), son útiles en el desarrollo de agentes antiedad efectivos.

Se ha reportado que el fruto de *Vaccinium meridionale* Swartz (Ericaceae) posee propiedades antioxidantes y terapéuticas para el tratamiento de la diabetes, y se usa en la producción de vino <sup>(31)</sup>. Esta especie crece de forma silvestre en las zonas andinas de Sudamérica, desde Ecuador hasta Venezuela, y también está presente en los bosques de montaña de Jamaica. En un estudio reciente, los autores observaron que los extractos de *V. meridionale* y *H. heterophylla* poseen actividad captadora de radicales libres in vitro, acción inhibitoria de las actividades colagenasa IV de *Clostridium histolyticum* y elastasa pancreática porcina in vitro, así como alto contenido de polifenoles <sup>(35)</sup>.

En dicho estudio se investigó el efecto de los extractos de hojas y frutos de ambas especies sobre las actividades colagenasa (MMPs) y elastasa presentes en sobrenadantes de cultivos de fibroblastos dérmicos humanos (FDH $\alpha$ ) estimulados con UVB; se prepararon 2 formulaciones con los extractos que presentaron mayor efecto inhibitorio de las actividades colagenasa y elastasa de fibroblastos humanos, y se analizaron imágenes de alta resolución del área periorbicular de voluntarias que usaron dichas formulaciones.



Todos los extractos evaluados presentaron un efecto sobre la actividad elastasa. Los mayores porcentajes promedio de inhibición de esta enzima, se presentaron en los sobrenadantes de fibroblastos estimulados con UVB, en presencia de los diferentes extractos, con porcentajes de inhibición de  $69,06 \pm 11\%$ ,  $63,5 \pm 8\%$  y  $62,5 \pm 10\%$ , respectivamente.

#### **d.9 COMPUESTOS FENÓLICOS EN LAS PLANTAS.**

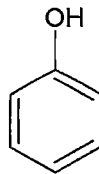
Las plantas vasculares sintetizan una gran cantidad de moléculas orgánicas, como consecuencia de su metabolismo secundario.

Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente.

Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe a la reactividad del grupo fenol <sup>(32)</sup>.

### d.9.1 Clasificación de los compuestos fenólicos:

El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol -un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo.



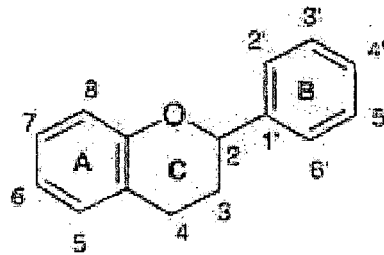
Los polifenoles alimentarios se pueden clasificar en dos grupos:

**d.9.1.1 Extraíbles:** Son compuestos de pesos moleculares bajos o medios que se pueden extraer empleando diferentes disolventes acuosos y acuoso-orgánicos.

Por lo que se refiere a los polifenoles extraíbles, se pueden clasificar, en función de su estructura química, en ácidos fenólicos, estructuras simples (y que pueden aparecer libres, como el caféico, el ferúlico, el p-cumárico y el sináptico, o esterificados, como el clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico) y flavonoides, estructuras mucho más complejas, que a su vez se

subdividen en flavonas (crisina, rutina), flavonoles (quercetina, miricetina), flavanoles o catequinas (epicatequina, galato de epicatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina), flavanonas (hesperidina, naringenina), antocianinas (delfinidina, malvidina, cianidina), taninos condensados con un número bajo de monómeros, etc. Los flavonoides se forman a partir de fenilalanina, tirosina y grupos acetato.

2



Estructura general de un flavonoide

Los grupos de flavonoides más extendidos son las flavonas y los flavonoles. Los flavonoles forman O-glucósidos, pero las flavonas pueden formar O-glucósidos y C-glucósidos, que no se pueden romper por hidrólisis ácida, a diferencia de los O-glucósidos. Lo mismo ocurre con las flavanonas <sup>(33)</sup>.

**d.9.1.2 No extraíbles:** Son compuestos con un elevado peso molecular, o polifenoles unidos a fibra dietética o proteínas que se pueden encontrar en los residuos de las extracciones <sup>(33)</sup>.

Los polifenoles no extraíbles incluyen taninos hidrolizables y taninos condensados con un elevado número de unidades en la cadena polimérica. Los taninos hidrolizables son estructuras poliméricas que pueden derivar del ácido gálico o de su producto dimérico de condensación, el ácido hexahidroxidifénico.

Los taninos condensados o proantocianidinas, por su parte, son estructuras poliméricas, formadas por la unión de flavan-3-oles, y pueden ser: procianidinas, con una sustitución 3,4-dihidroxi en el anillo B (sólo están formadas por unidades de epicatequina); prodelfinidinas, con una sustitución 3,4,5-trihidroxi en el anillo B; propelargonidinas, con una sustitución 4-hidroxi en el anillo B, aunque éstas últimas son mucho menos frecuentes en alimentos. Los carbonos 2,3 y 4 del anillo B son asimétricos y pueden aparecer con diferentes configuraciones. Generalmente, las uniones se producen entre el

C4 de la unidad superior y el C6 o el C8 de la unidad inferior, aunque en ocasiones puede aparecer otro enlace entre el C2 de la unidad superior y el C5 o el C7 de la inferior. Además, las unidades de flavanoles pueden llevar sustituyentes acilos o glucosilos, y uno de los más frecuentes sustituyentes acilo es el ácido gálico, que forma un enlace éster con el grupo hidroxilo en la posición C3 <sup>(34)</sup>.

26

#### **d.9.2 Mecanismo de acción de los polifenoles:**

En cuanto al modo de acción de los polifenoles, los grupos OH del anillo B pueden donar un hidrógeno y un electrón a radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito, estabilizándolos y transformándose el flavonoide en una molécula radicalica relativamente estable. También son capaces de quelar metales, formando complejos que, aun así, mantienen la capacidad antioxidante. En cualquier caso, éste sería un efecto adverso en personas con deficiencias crónicas de algunos metales <sup>(36)</sup>.

Finalmente, algunos polifenoles, además de su propia acción antioxidante, pueden potenciar las actividades de enzimas antioxidantes, como la genisteína, una isoflavona que potencia

la catalasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa y la SOD provocando que se hayan publicado un gran número de trabajos estudiando este aspecto <sup>(37)</sup>. De manera general, se puede señalar que la presencia de sustituyentes hidroxilo aumenta la capacidad antioxidante. En el caso de los flavonoles, la mayor capacidad antioxidante se produce con una estructura orto-dihidroxi en el anillo B y un OH en la posición 3, un doble enlace 2,3 y una función oxo en el C4, lo que ocurre con la quercetina. Por otro lado, la glucosilación de los flavonoides reduce su capacidad antioxidante en relación a las correspondientes agliconas.

Por otro lado, algunos autores han señalado el hecho de que, dado que a pH fisiológico algunos de los grupos fisiológicos de los polifenoles pueden estar desprotonados, lo que reduciría la capacidad antioxidante respecto a la forma protonada <sup>(38)</sup>.

En lo que se refiere a los taninos condensados, no hay resultados concluyentes sobre el efecto que puede tener el número de monómeros en la cadena sobre la capacidad antioxidante del compuesto <sup>(34)</sup>.

En cualquier caso, siempre hay que tener en cuenta el tipo de medio en el que actuarán los antioxidantes como punto de partida para definir su acción; así, se ha observado en ensayos en liposomas que los ácidos dihidroxifenólicos son

26

más antioxidantes que los trihidroxifenólicos, al contrario de lo que ocurre en medio acuoso, debido a sus mayores coeficientes de partición. Igualmente, en este medio parece ser que el sustituyente del anillo fenólico tiene una importancia menor que en el medio acuoso <sup>(37)</sup>.

Igualmente, se debe considerar que estructuras polifenólicas que presentan una mayor capacidad antioxidante *in vitro*, no necesariamente la tendrán *in vivo*; así, un reciente estudio demostró que ciertos polifenoles metilados, que *in vitro* presentan una capacidad antioxidante muy inferior a la de sus formas no metiladas, mostraban después una mayor capacidad para proteger a cultivos celulares de la toxicidad inducida por peróxido de hidrógeno <sup>(39)</sup>. De la misma manera, los compuestos fenólicos más abundantes en los alimentos no son necesariamente los más absorbidos; el ácido gálico, por ejemplo, presente en general en concentraciones mucho más bajas que otros polifenoles, es uno de los que presenta mayores tasas de absorción.

Precisamente, el metabolismo de los polifenoles, las tasas de absorción y las posibilidades de que puedan ejercer sus efectos antioxidantes *in vivo* tras ser absorbidos, han sido también profusamente estudiados. Los glucósidos de flavonoides son absorbidos en el intestino tras degradarse, dado lugar a las agliconas, que van al hígado, donde



experimentan procesos de metilación, sulfatación y glucuronidación, y de ahí pasan a la sangre, dependiendo del compuesto en cuestión el tiempo necesario para alcanzar máximos en sangre, y estando entre 30 minutos y 9 horas. El grado de glicosilación influye en la absorción intestinal.

of



## e) MATERIALES Y MÉTODOS

### e.1 Materiales:

- Beaker de 50, 250, 500 y 1000 mL.
- Pipeta de 1, 5 y 10 mL.
- Peras de bromo de 250 mL
- Tubos de centrifuga.
- Tubos de ensayo
- Gradilla para tubos de ensayo
- Papel filtro
- Matraz erlenmeyer 125 y 250 mL
- Fiola de 10 mL
- Micropipeta regulable para 50, 75, 150, 500 y 1000  $\mu$ L
- Papel aluminio
- Espátula
- Probeta 25 y 100 mL
- Lunas de reloj
- Placas Petri.

### e.2 Equipos e instrumentos:

- Balanzas analítica y de precisión.
- Espectrofotómetro UV / Vis. Spectroquant pharo 300 M.
- Baño María.
- Centrifuga.
- Rotavapor modelo IKA RV 10 Control.
- Estufa de aire circulante marca Venticell.

CB

### e.3 Reactivos:

- Agua destilada.
- Metanol.
- N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA).
- Porcine Pancreatic Elastase Sigma Chemical Co. (PPE)
- Tris-HCl buffer (pH 8,0).
- 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina  $5 \times 10^{-3}$  M.

### e.4 Muestras:

- Tres variedades de uva con pepa (negra, roja o red globe y verde o Italia). A partir de cada una de ellas se obtendrán extractos de la forma que se señala más adelante para poder ensayar y comparar sus actividades antielastasa y antioxidante.

### e.5 Métodos:

#### e.5.1 Determinación de su capacidad antielastasa:

Se prepararon soluciones de Suc-Ala-Ala-Ala-pNA (0,8mM) y PPE (1ug/mL) disolviéndolas en buffer Tris-HCl 0,2M (pH 8,0). Se analizó la actividad e inhibición de PPE por espectrofotometría por el **método de James y col.**, usando Suc-Ala-Ala-Ala-pNA como sustrato y monitorizando la liberación de p-nitroanilina cada 30 minutos a 25°C.

	Volumen			
	1	2	3	4
Sustrato 8 $\mu$ M	0.9 mL	0.9 mL	0.9 mL	0.9 mL
Preincubar a 25 °C por 3 minutos				
Extracto (licuado)	-	0.1 mL	-	-
Buffer	0.1 mL	-	-	-
Enzima 1 $\mu$ g/mL	70 $\mu$ L	70 $\mu$ L	70 $\mu$ L	70 $\mu$ L

Para esta determinación se utilizó extracto percolado del licuado.

*M*

#### e.5.2 Determinación de la capacidad antioxidante:

##### Método "Ferric reducing / antioxidant power" (FRAP):

consiste en la reducción de un compuesto o mezcla de compuestos sobre el  $\text{Fe}^{+3}$  presente en el complejo orgánico Tripyridyltriazine (TPTZ). Cuando el hierro del complejo es reducido a la forma ferrosa toma un color azul que presenta un máximo de absorción a 593 nm y cuya intensidad de color es proporcional a la capacidad reductora de los compuestos ensayados. (Benzie y col., 1996).

	BLANCO	X
TPTZ	1 mL	1 mL
H <sub>2</sub> O	1 mL	950 $\mu$ L
MUESTRA	-	25 $\mu$ L
BAÑO MARIA A 37 °C POR 10 MINUTOS		

#### **e.6 Procesamiento de la muestra:**

Para el desarrollo del presente trabajo se consideró la compra de 200 gramos de cada una de las variedades de uva con pepa (negra, roja y verde). Después de lavar con abundante agua corriente se enjuagó en un depósito donde se colocó 5 litros de agua potable clorada (agua con 5 mL de clorox). Finalmente se procedió a un nuevo enjuagado pero en esta ocasión utilizando agua destilada.

De cada una de las variedades se retiraron las bayas del racimo y se separaron 125 gramos de cada una de ellas, considerando principalmente las que se encontraban en mejor estado. Cada una de las muestras enteras (cáscara, pulpa y pepa), así como también las muestras a quienes se les quitó la pepa, fueron sometidas a licuado por espacio de un minuto agregándole 100 mL. de etanol al 96 % v/v para después ser trasvasado cada licuado a una pera de bromo de 250 mL. que previamente se había acondicionado con un tapón de algodón en el fondo que actuaría como filtro asegurando un compactado del algodón de tal manera que permita un flujo lento del extracto.

Una vez agotado el flujo del extracto obtenido mediante licuado, al marco que me va quedando en la pera se le agregó 100 mL. más de solvente extractor pero esta vez consistente en etanol al 40 % v/v. Este solvente se desplazó por el marco arrastrando componentes de la uva y descendiendo también a flujo lento para ser colectado y

reunido con el extracto anterior. Estos extractos fueron concentrados dejando en estufa por 24 horas a 40 °C para eliminar humedad y luego se mantuvo en desecador hasta momentos previos de su uso. Para la determinación de inhibición de elastasa se preparó extracto licuando la misma cantidad de muestra entera y dejando percollar el zumo del cual se utilizó directamente 0.1 mL

#### **e.6.1 Concentración de los extractos:**

Se obtuvo aproximadamente 250 mL de extracto de cada muestra, de los cuales se separó 50 mL para efectuar la referida concentración obteniéndose las siguientes cantidades:

- e.6.1.1 Uva negra con pepa 3.1483 gramos.
- e.6.1.2 Uva negra sin pepa 3.0893 gramos.
- e.6.1.3 Uva roja con pepa 4.3456 gramos.
- e.6.1.4 Uva roja sin pepa 3.8751 gramos.
- e.6.1.5 Uva verde con pepa 4.5407 gramos
- e.6.1.6 Uva verde sin pepa 3.1359 gramos

#### **e.6.2 Preparación de las diluciones:**

Después del pesado de los extractos concentrados fueron almacenados por corto tiempo en un deshidratador para luego utilizar las cantidades especificadas debajo en 10 mL de metanol como dilución para la determinación de la capacidad antioxidante:

- e.6.2.1 Uva negra con pepa 0.1426 gramos.
- e.6.2.2 Uva negra sin pepa 0.1121 gramos.
- e.6.2.3 Uva roja con pepa 0.1428 gramos.
- e.6.2.4 Uva roja sin pepa 0.1192 gramos.
- e.6.2.5 Uva verde con pepa 0.1094 gramos
- e.6.2.6 Uva verde sin pepa 0.1118 gramos

Tomar 1 mL de cada dilución para centrifugar en equipo Mikro 22R (Hettich) a 15,000 G por 10 minutos a 4 °C antes de destinarse al ensayo (25 µL) y lectura en espectrofotómetro Génesis 10 UV a 593 nm..



f) **RESULTADOS**

**INHIBICION DE ELASTASA POR EXTRACTO DE FRUTO COMPLETO:**

**TABLA 01**

<b>TIEMPO (MIN)</b>	<b>S+E</b>	<b>ITALIA</b>	<b>NEGRA</b>	<b>RED GLOB</b>
0	0.2521	0.1815	0.1597	0.1563
30	0.3191	0.2235	0.1917	0.1549
60	0.3287	0.2268	0.1614	0.1102
90	0.3289	0.1962	0.1324	0.0723
120	0.3297	0.1819	0.1138	0.0316

Se observa que donde no hay extracto (E+S) se detecta mayor liberación de nitroanilina (mayor actividad enzimática).

*M*

**CAPACIDAD ANTIOXIDANTE: TABLA 02**

	<b>LECTURA 01</b>	<b>LECTURA 02</b>	<b>LECTURA 03</b>	<b>PROMEDIO</b>
<b>NEGRA C/P</b>	0.621	0.642	0.661	<b>0.641</b>
<b>NEGRA S/P</b>	0.178	0.157	0.169	<b>0.168</b>
<b>ROJA C/P</b>	0.188	0.216	0.206	<b>0.203</b>
<b>ROJA S/P</b>	0.209	0.196	0.191	<b>0.198</b>
<b>VERDE C/P</b>	0.199	0.234	0.222	<b>0.218</b>
<b>VERDE S/P</b>	0.071	0.061	0.074	<b>0.069</b>

Son lecturas de diluciones de diferentes concentraciones que en las 2 tablas siguientes, mediante factor de conversión se podrá observar la capacidad antioxidante.

**CONVERSIÓN DE GRÁFICA Y DILUCIONES: TABLA 03**

	<b>LECTURA PROMEDIO</b>	<b>EN GRAFICA TPTZ nM Fe<sup>2+</sup></b>	<b>25 µl a 10 mL nM Fe<sup>2+</sup></b>	<b>PARA 50 mL DE EXTRACTO µM Fe<sup>2+</sup></b>
<b>NEGRA C/P</b>	0.641	61.28	24512	<b>541.172</b>
<b>NEGRA S/P</b>	0.168	17.62	7048	<b>194.231</b>
<b>ROJA C/P</b>	0.203	20.68	8272	<b>251.728</b>
<b>ROJA S/P</b>	0.198	19.92	7968	<b>259.033</b>
<b>VERDE C/P</b>	0.218	22.98	9192	<b>381.518</b>
<b>VERDE S/P</b>	0.069	7.66	3064	<b>85.943</b>

*Handwritten mark*

**CONVERSIÓN A µM Fe<sup>2+</sup> POR GRAMO DE MUESTRA: TABLA 04**

	<b>PARA 50 mL DE EXTRACTO µM Fe<sup>2+</sup></b>	<b>PARA EXTRACTO TOTAL (250 mL = 125 g. de MUESTRA)</b>	<b>µM Fe<sup>2+</sup> / g. DE MUESTRA</b>
<b>NEGRA C/P</b>	541.172	2705.86	<b>21.64</b>
<b>NEGRA S/P</b>	194.231	971.155	<b>7.77</b>
<b>ROJA C/P</b>	251.728	1258.64	<b>10.07</b>
<b>ROJA S/P</b>	259.033	1295.165	<b>10.36</b>
<b>VERDE C/P</b>	381.518	1907.59	<b>15.26</b>
<b>VERDE S/P</b>	85.943	429.715	<b>3.44</b>



**g) DISCUSIÓN:**

Para efectuar la determinación de inhibición de la enzima elastasa utilizamos el extracto obtenido del percolado del licuado del fruto entero en lugar de extractos hidroetanólicos concentrados ya que estos últimos deberían disolverse previamente en solventes (ejemplo glicerina) pero ya este disolvente podría mostrar interferencia con la actividad de la enzima y leer erróneamente como si este efecto correspondieran a los extractos (Facino, R.)

De manera categórica podríamos señalar que evaluando ambas actividades (antielastasa y antioxidante) en el fruto entero es mayor que en las muestras donde se retiró la pepa lo que nos permite considerar que si existen núcleos de flavonoides responsables de las actividades mencionadas, estas se encuentran en cantidad importante en dicha parte de la uva, aun cuando los resultados de la uva roja no confirmen lo señalado pero se observa durante el trabajo algo particular que se describe a continuación (Heim, K).

Una vez obtenido los percolados se dejó en refrigeración hasta el día siguiente y se pudo notar que en los extractos correspondientes a la uva roja se había formado una cantidad apreciable de sedimento blanco opaco. Este sedimento podría ser responsable de una posible variación en las lecturas para la determinación de la actividad antioxidante debido a que no sucedió en los extractos de las demás muestras.

## CONCLUSIONES

g.1 En la determinación de la capacidad de inhibición de la enzima elastasa, se observa esta actividad en las tres variedades de uva evaluadas pero se destaca lo que se manifiesta en la uva negra y en la uva roja donde se leen menores concentraciones de p-nitroanilina con respecto a lo que se puede leer para la muestra que solo contiene enzima y sustrato (control o sin extracto de uva) ya sea después de 30 o de 60 minutos de actividad (TABLA 01), por lo que llegamos a la **conclusión de que este fruto entero tiene la propiedad de inhibir la actividad de la enzima elastasa.**

g.2 En la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de las tres variedades de uva, habiendo tenido la posibilidad de trabajar con fruto entero y con fruto sin pepa, observamos que la uva negra destaca por su capacidad antioxidante, luego la uva roja y con menor actividad la uva verde pero sobre todo cuando se trata de fruto entero a excepción de lo que se aprecia en la uva roja, sin embargo llegamos a la **conclusión de que los extractos de las tres variedades de uva presentan apreciable capacidad antioxidante y mejor aún si se trata de los extractos del fruto entero (TABLAS 02, 03 y 04)**, lo que nos dice que en las semillas se encuentra importante cantidad de metabolitos con esta propiedad.

## h) REFERENCIALES

Ager, A. Inflammation: Border crossings. (2003). Nature, 421: 703-705.

Bombardelli, E., Marazzoni, P. Vitis vinífera L: a review. Fitoterapia 1995; 66:291-317.

Bouaziz, N., Michiels, C., Janssens, D., Berna, N., Eliares, F., Panconi, E., et al. Effect of Ruscus extract and hesperidin methylchalcone on hypoxia-induced activation of endothelial cells. Int Angiol 1999; 18: 306-312

Bravo, L., Abia, R., et al. Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1994. 42(7): 1481-1487.

CARRASCO, EDUARDO. Manejo de las vasculopatías periféricas en atención primaria. Barcelona: Edika Med; 2006.

Coleridge-Smith, P. From skin disorders to venous leg ulcers: Pathophysiology and efficacy of daflon in ulcer healing. Angiology 2003; 54: S45-S50.

Cortázar, T., Guzmán, M. Extractos de Vaccinium meridionale Swartz y Hesperomeles heterophylla Hook como potenciales activos cosméticos con efecto antiedad, Arte y Ciencia Cosmética Enero, 2011 (in press)

Costa, D., Marques, A., Reis, R., Lima, J.L., Fernandes, E. Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives. 2005. Free Radical Biology & Medicine, 40: 632-640.

Deng, D., Zhang, J., et al. Methylated polyphenols are poor "chemical" antioxidants but can still effectively protect cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. 2006. FEBS Letters 580(22): 5247-5250.

Facino, R., Carini, M., Stefani, R., Aldini, G., Saibene, L. Antielastase and antihyaluronidase activities of saponins and sapogenins from *Hedera hélix*, *Aesculus hippocastanum*, and *Ruscus aculeatus*: Factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency. Arch Pharm (Weinheim) 1995; 328: 720-724.

Ferrández, M. Subprograma X. Programa X.6. Técnicas in vitro para el estudio de Fármacos Antiinflamatorios. CYTED. 2002, Impreso por Collado Oliver. España.

Fisher, G., Wang, Z., Datta, S., Varani, J., Kang, S., Voorhees, J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light, New England J Medicine. 1997 337(20):1419-1428.

Franco, L. Estudio de la actividad antiinflamatoria de los principios activos de los cálices de *Physalis peruviana*". Tesis Doctoral. 2006. Universidad Nacional de Colombia.

CM

Gaviria, C. Propiedades antioxidantes de los frutos de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz), En: Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz) en la zona altoandina de Colombia. 2012

Gelse, K., Poschl, E., Aigner, T. Collagens: structure, function and biosynthesis, Advanced Drug Delivery Reviews. 2003. 55(12):1531–1546,  
Goldsby, R., Kindt, T., Osborne, B., Kudy, J. Immunology. Fifth edition. Chapter 15: Leukocyte migration and inflammation. Editorial Mc Graw Hill. 2004. New York. Pp 368.

Heim, K., Tagliaferro, A., et al. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry. 2002. 13(10): 572-584.

Henriksen, P., Sallenave, J. Human neutrophil elastasa: Mediator and therapeutic target in atherosclerosis. 2008. The international Journal of Biochemistry & Cell Biology, 40: 1095-1100.

KOENIG, CECILIA. Histologia UC módulo autoinstrutivo. Pontificia Universidad Católica de Chile. Escuela de Medicina.puc.cl. 2005.

Lemanska, K., Szymusiak, H., et al. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. Free Radical Biology and Medicine. 2001. 31(7): 869-881.

Liaudet, L., García, F., Szabo, C. Biology of nitric oxide signaling. 2000. Critical Care Medicine, 28: 37-52.

Masquelieur, J. Flavonoids on phlebology. Bull Soc Pharmac (Bordeaux), 1990; 118:95-109.

Oberholzer, A., Oberholzer, C., y Moldawer, L. Cytokine signaling-regulation of the immune response in normal and critically ill states. 2000. Critical Care Medicine, 28 (Suppl): N3-N12.

Oliveira, S., Quintal, S., Farias, V., Sayori, S., Campa, A. Melatonin and its kynurenin-like oxidation products affect the microbicidal activity of neutrophils. 2005. Microbes and infection, 8: 420-425.

Ospina, L. Estudio de la actividad antiinflamatoria de una benzoquinona de origen natural: Rapanona. Tesis Doctoral. 2000. Universidad de Valencia, España.

Rittié, L., Fisher, G. UV-light-induced signal cascades and skin aging, Ageing Research Reviews. 2002. 1(4):705–720.

Robbins, R. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003). 51(10): 2866-2887.

ROJAS, WILLIAM. "Inmunología". Capítulo 5. 14° edición. 2007. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín – Colombia. Pp. 78-100.

Rose, S., Ahmed, A. Some thoughts on the etiology of varicose vein. J Cardiovasc Surg. 1986; 27:534-543.

Saharay, M., Shields, D., Georgiannos, SN., Porter, J., Scurr, J., Coleridge-Smith, P. Endothelial activation in patients with chronic venous disease. Eur J Vasc Endovasc Surg. 1998; 15: 342-349.

Sallusto, F., y Lanzavecchia, A. From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. Review Article. 2000. Current Opinion in Immunology, 12: 92-98.

Sansilvestri-Morel, P., Rupin, A., Badier-Commander, C., Kern, P., Fabiani, J., Verbeuren, T., et al. Imbalance in the synthesis of collagen type-I and collagen type-III in smooth muscle cells derived From human varicose veins. J Vasc Res. 2001; 38: 560-568.

Santos-Buelga, C., Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000. 80(7): 1094-1117.

Siquet, C., Paiva-Martins, F., et al. Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids - A structure-activity relationship study. 2006. Free Radical Research 40(4): 433-442.

Srinivasan, K., Muruganandan, S., Lal, J., Chandra, S., Tandan, S., Ravi Prakash, V. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Pongamia pinnata* leaves in rats. (2001). Journal of Ethnopharmacology, 78: 151-157.

Texeira, M., Williams, T., Hellewell, P. Mechanisms and pharmacological manipulation of eosinophil accumulation in vivo. 1995. Trends Pharmacol. Sci. 16: 418-423.

Tibodeau, A. The crucial role of metalloproteinase inhibitors and regenerating antioxidants in the age-related alterations of the skin. 2005. Sofw J 131:10-20.

Valenzuela, A. Estudio sobre la ruta del metabolismo del Ácido Araquidónico como posible mecanismo de actividad antiinflamatoria para principios bioactivos de Plantas Medicinales Colombianas. Tesis Doctoral. 2007. Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.

Vanhoutte, P., Corcaud, S., de Montrion, C. Venous disease: From pathophysiology to quality of life. Angiology 1997; 48:559-567.



### Referencias bibliográficas según número de cita:

1. CARRASCO, EDUARDO. Manejo de las vasculopatías periféricas en atención primaria. Barcelona: Edika Med; 2006.
2. Bombardelli, E., Marazzoni, P. Vitis vinífera L: a review. Fitoterapia 1995; 66:291-317.
3. Masquelieur, J. Flavonoids on phlebology. Bull Soc Pharmac (Bordeaux), 1990; 118:95-109.
4. KOENIG, CECILIA. Histología UC módulo autoinstruccion. Pontificia Universidad Católica de Chile. Escuela de Medicina. puc.cl. 2005.
5. Srinivasan, K., Muruganandan, S., Lal, J., Chandra, S., Tandan, S., Ravi Prakash, V. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Pongamia pinnata* leaves in rats. (2001). Journal of Ethnopharmacology. 78: 151-157.
6. Ager, A. Inflammation: Border crossings. (2003). Nature, 421: 703-705.
7. ROJAS, WILLIAM. "Inmunología". Capítulo 5. 14° edición. 2007. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín – Colombia. Pp. 78-100.

8. Ospina, L. Estudio de la actividad antiinflamatoria de una benzoquinona de origen natural: Rapanona. Tesis Doctoral. 2000. Universidad de Valencia, España.
9. Franco, L. Estudio de la actividad antiinflamatoria de los principios activos de los cálices de *Physalis peruviana*". Tesis Doctoral. 2006. Universidad Nacional de Colombia.
10. Oberholzer, A., Oberholzer, C., y Moldawer, L. Cytokine signaling-regulation of the immune response in normal and critically ill states. 2000. Critical Care Medicine, 28 (Suppl): N3-N12.
11. Sallusto, F., y Lanzavecchia, A. From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. Review Article. 2000. Current Opinion in Immunology, 12: 92-98.
12. Liaudet, L., García, F., Szabo, C. Biology of nitric oxide signaling. 2000. Critical Care Medicine, 28: 37-52.
13. Valenzuela, A. Estudio sobre la ruta del metabolismo del Ácido Araquidónico como posible mecanismo de actividad antiinflamatoria para principios bioactivos de Plantas Medicinales Colombianas. Tesis Doctoral. 2007. Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.
14. Ferrándiz, M. Subprograma X. Programa X.6. Técnicas in vitro para el estudio de Fármacos Antiinflamatorios. CYTED. 2002, Impreso por Collado Oliver. España.

15. Texeira, M., Williams, T., Hellewell, P. Mechanisms and pharmacological manipulation of eosinophil accumulation in vivo. 1995. Trends Pharmacol. Sci., 16: 418-423.
16. Goldsby, R., Kindt, T., Osborne, B., Kuby, J. Immunology. Fifth edition. Chapter 15: Leukocyte migration and inflammation. Editorial Mc Graw Hill. 2004. New York. Pp 368.
17. Costa, D., Marques, A., Reis, R., Lima, J.L., Fernandes, E. Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives. 2005. Free Radical Biology & Medicine, 40: 632-640.
18. Oliveira, S., Quintal, S., Farias, V., Sayori, S., Campa, A. Melatonin and its kynurenin-like oxidation products affect the microbicidal activity of neutrophils. 2005. Microbes and infection, 8: 420-425.
19. Henriksen, P., Sallenave, J. Human neutrophil elastase: Mediator and therapeutic target in atherosclerosis. 2008. The international Journal of Biochemistry & Cell Biology, 40: 1095-1100.
20. Rose, S., Ahmed, A. Some thoughts on the etiology of varicose vein. J Cardiovasc Surg. 1986; 27:534-543.
21. Vanhoutte, P., Corcaud, S., de Montrion, C. Venous disease: From pathophysiology to quality of life. Angiology 1997; 48:559-567.
22. Sansilvestri-Morel, P., Rupín, A., Badier-Commander, C., Kern, P., Fabiani, J., Verbeuren, T., et al. Imbalance in the synthesis of

collagen type-I and collagen type-III in smooth muscle cells derived  
From human varicose veins. J Vasc Res. 2001; 38: 560-568.

23. Saharay, M., Shields, D., Georgiannos, SN., Porter, J., Scurr, J., Coleridge-Smith, P. Endothelial activation in patients with chronic venous disease. Eur J Vasc Endovasc Surg. 1998; 15: 342-349.
24. Coleridge-Smith, P. From skin disorders to venous leg ulcers: Pathophysiology and efficacy of daflon in ulcer healing. Angiology 2003; 54: S45-S50.
25. Bouaziz, N., Michiels, C., Janssens, D., Berna, N., Eliares, F., Panconi, E., et al. Effect of Ruscus extract and hesperidin methylchalcone on hypoxia-induced activation of endothelial cells. Int Angiol 1999; 18: 306-312
26. Facino, R., Carini, M., Stefani, R., Aldini, G., Saibene, L. Antielastase and antihyaluronidase activities of saponins and sapogenins from *Hedera hélix*, *Aesculus hippocastanum*, and *Ruscus aculeatus*: Factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency. Arch Pharm (Weinheim) 1995; 328: 720-724.
27. Gelse, K., Poschl, E., Aigner, T. Collagens: structure, function and biosynthesis, Advanced Drug Delivery Reviews. 2003. 55(12):1531–1546,

28. Fisher, G., Wang, Z., Datta, S., Varani, J., Kang, S., Voorhees, J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light, New England J Medicine. 1997 337(20):1419–1428.
29. Rittié, L., Fisher, G. UV-light-induced signal cascades and skin aging, Ageing Research Reviews. 2002. 1(4):705–720.
30. Tibodeau, A. The crucial role of metalloproteinase inhibitors and regenerating antioxidants in the age-related alteration of the skin. 2005. Sofw J 131:10-20.
31. Gaviria, C. Propiedades antioxidantes de los frutos de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale Swartz*), En: Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale Swartz*) en la zona altoandina de Colombia. 2012
32. Robbins, R. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003). 51(10): 2866-2887.
33. Bravo, L., Abia, R., et al. Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1994. 42(7): 1481-1487.
34. Santos-Buelga, C., Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. Journal of the Science of Food and Agriculture 2000. 80(7): 1094-1117.

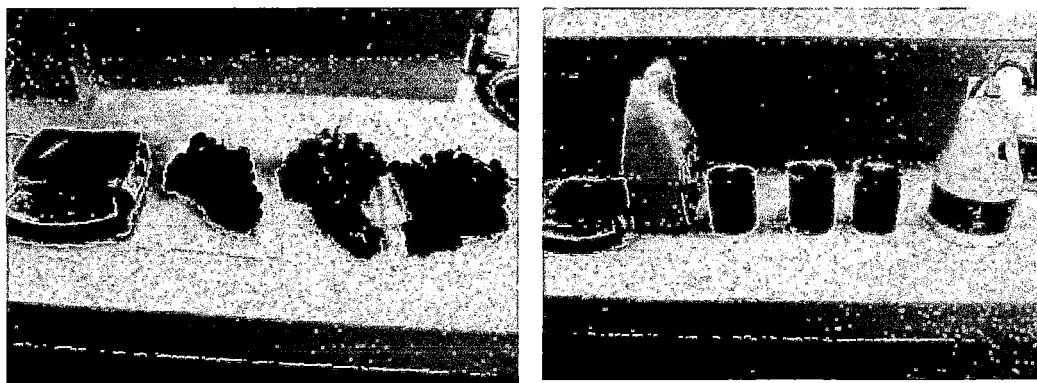
35. Cortázar, T., Guzmán, M. Extractos de *Vaccinium meridionale* Swartz y *Hesperomeles heterophylla* Hook como potenciales activos cosméticos con efecto antiedad, Arte y Ciencia Cosmética Enero, 2011 (in press)
36. Heim, K., Tagliaferro, A., et al. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry. 2002. 13(10): 572-584.
37. Siquet, C., Paiva-Martins, F., et al. Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids - A structure-activity relationship study. 2006. Free Radical Research 40(4): 433-442.
38. Lemanska, K., Szymusiak, H., et al. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. Free Radical Biology and Medicine. 2001. 31(7): 869-881.
39. Deng, D., Zhang, J., et al. Methylated polyphenols are poor "chemical" antioxidants but can still effectively protect cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. 2006. FEBS Letters 580(22): 5247-5250.

## VII. APÉNDICES

Todas las fotos apéndices son de mi autoría

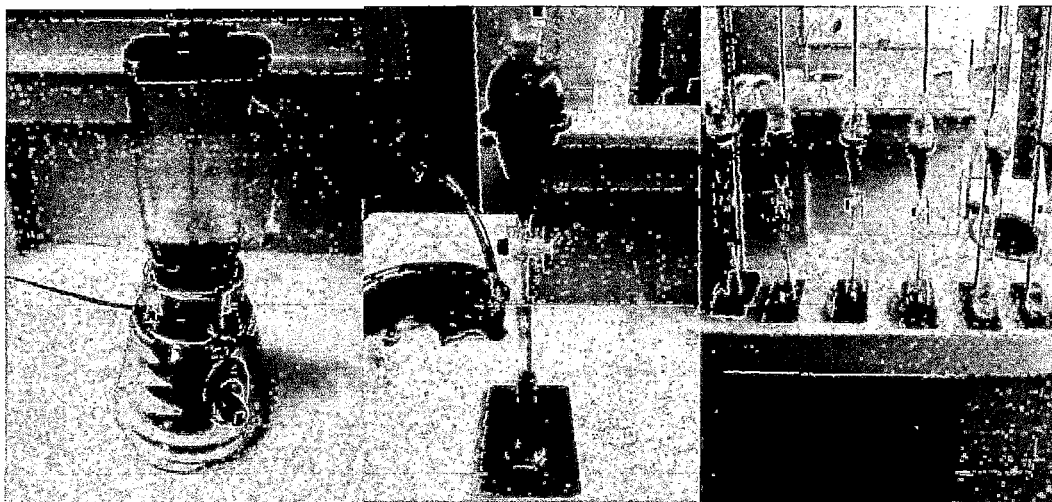
### Apéndice 01:

Pesado, lavado químico y enjuagado de las muestras.



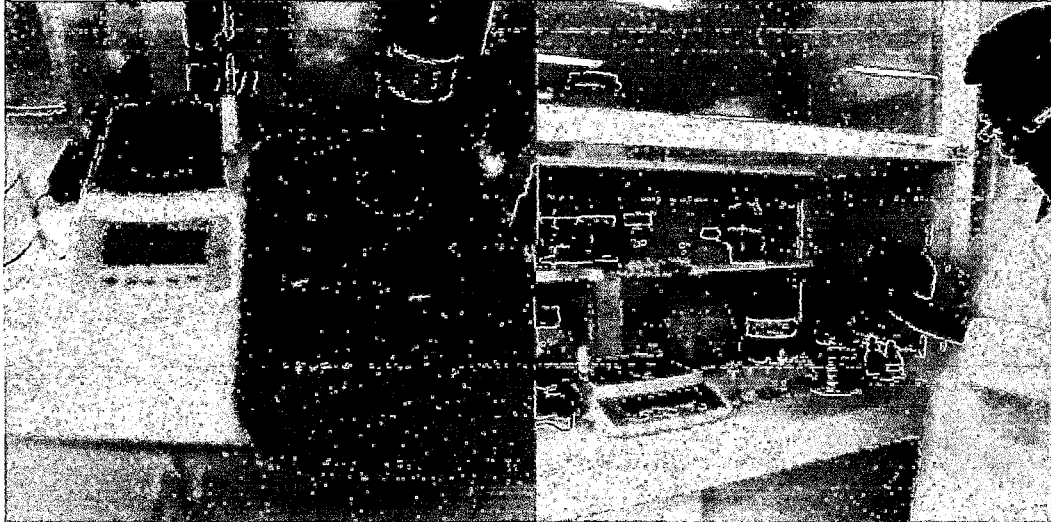
### Apéndice 02:

Licuada y obtención de los extractos por percolado para las determinaciones de actividad antielastasa y antioxidante.



### Apéndice 03:

Pesada de los extractos y preparación de las diluciones



27

### Apéndice 04:

Centrifugando a 4 °C para eliminar partículas no disueltas y sometiendo a baño maría para efectuar las lecturas espectrofotométricas. Se contó con el valioso apoyo del Ing. Oscar Reátegui Arévalo.

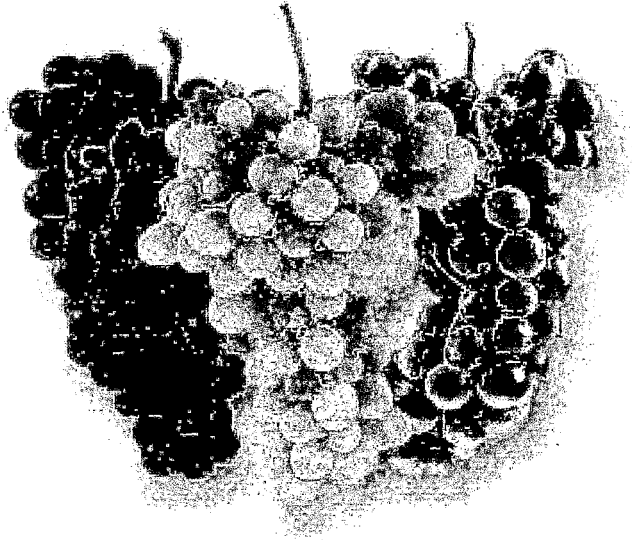




## VIII. ANEXOS

### Anexo 01:

Variedades de uva estudiada

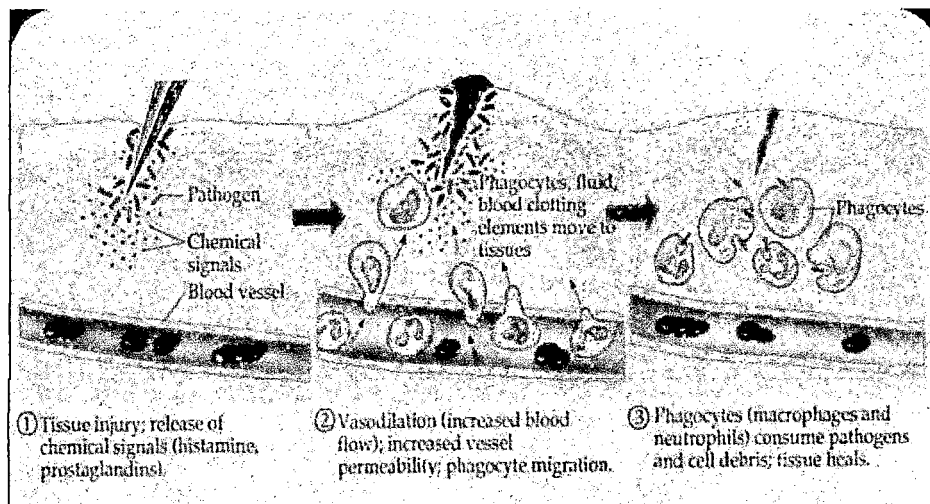


Tomado de [saludnatural.biomanantial.com](http://saludnatural.biomanantial.com)

25

### Anexo 02:

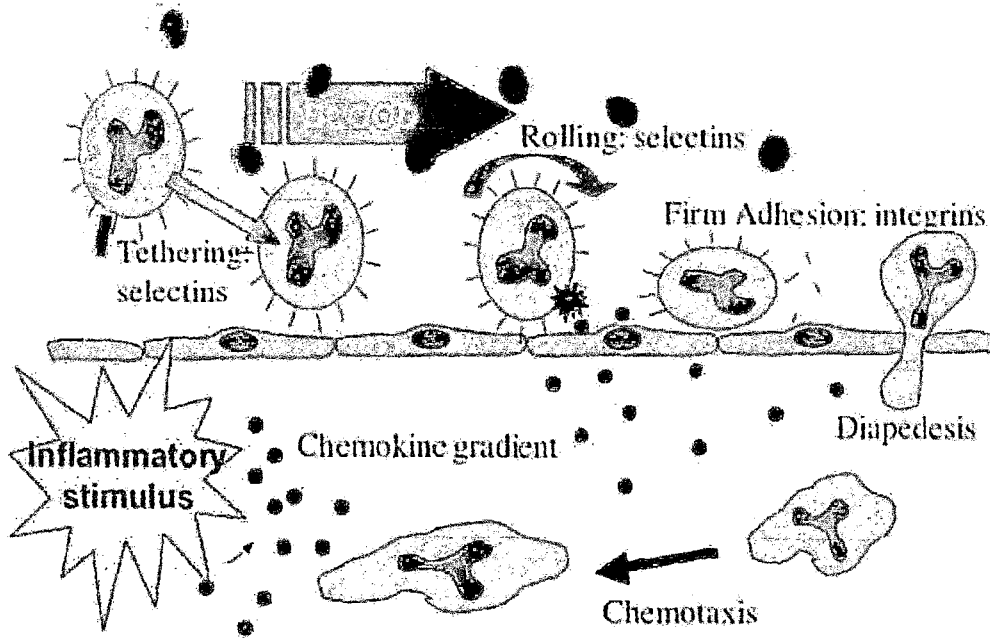
Papel central del neutrófilo como respuesta inmune.



Tomado de [www.sci.ccny.cuny.edu/~lima/case6.html](http://www.sci.ccny.cuny.edu/~lima/case6.html)

**Anexo 03:**

Respuesta inflamatoria aguda.



Tomado de [www.sci.ccny.cuny.edu/~lima/case6.html](http://www.sci.ccny.cuny.edu/~lima/case6.html)