

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE *N*-METIL-2-FENIL-INDOL EN LA
CUANTIFICACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO COMO BIOMARCADOR DE
PEROXIDACIÓN LIPIDICA EN *Pisum sativum* POR COLORIMETRIA

TRABAJO DE GRADO

Requisito para optar al título de Químico

Presentado por:

MARÍA JULIANA RESTREPO VEGA

Director:

JOSÉ HIPÓLITO ISAZA MARTÍNEZ, Ph.D

Universidad del Valle

Facultad de Ciencias Naturales y Exactas

Departamento de química

Santiago de Cali

2015

Agradecimientos

Primeramente agradezco a ti Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado. A mi familia por su amor y apoyo incondicional. A la Universidad del Valle por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional. A mi director de trabajo de grado, Dr. Jose Hipólito Isaza Martinez, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación me ha guiado para terminar mis estudios con éxito, formándome como persona e investigador. Al Grupo de Investigación en Productos Naturales y alimentos (GIPNA) desde profesores hasta compañeros (as) de laboratorio, por su invaluable colaboración y amistad. Al Grupo de Investigación en Compuestos Heterocíclicos por la colaboración prestada y a Pablo Romo por tu interés, tiempo y colaboración para el desarrollo del presente trabajo.

También agradezco a mis profesores amigos durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado con un granito de arena a mi formación; al profesor José Fernando Barona Mesías por disponibilidad para realizar observaciones a mi trabajo. A Ronny Fernando Orobio por su tiempo para la discusión de procedimientos y diseño experimental.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Esquema de la peroxidación lipídica y los productos secundarios de la misma.	12
Figura 2 a)Reacción de reducción de radicales mediante donación de un átomo de hidrógeno de los flavonoides b)Lugares de unión de un metal en anillos de estructuras tipo flavonoide	15
Figura 3. Compuesto tipo piridopirimidina utilizado: ácido 3-metil-2-metiltio-5-(4-metoxifenil)-4-oxo-3,4,5,8-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-7-carboxílico	18
Figura 4. Reacción entre <i>N</i> -metil-2-fenil-indol y 1,1,3,3 tetrametoxipropano y la carbocianina producto de la reacción.	22
Figura 5. a) Lector de microplacas b) Microplaca con curva de calibración realizada con estándares de 1,1,3,3 TMOP	23
Figura 6. En azul, plantas procesadas el día octavo. En verde: plantas procesadas el día treceavo. En sombreado oblicuo: plantas control.	26
Figura 7.. Espectro de absorción de la carbocianina producto de la reacción de de 1,1,3,3 tetrametoxipropano y <i>N</i> -metil-2-fenilindol.	28
Figura 8. Curva de calibración en el rango de 0,0078 – 1,0 μ M TMOP.	30
Figura 9. Curva de Ringbom para el 1,1,3,3 tetrametoxipropano: a) tendencia general b) rango óptimo.	30
Figura 10. Promedio de tres curvas de calibración realizadas en tres días diferentes.	31
Figura 11. Curva de calibración utilizada para el análisis de la reproducibilidad del método preparada el 20 de Noviembre.	34
Figura 12. Curva de calibración utilizada para el análisis de la reproducibilidad del método preparada el 19 de Noviembre de 2014.	34
Figura 13. Comparación entre las curvas de adición de patrón y la curva de calibración promedio en el rango de 0,078 – 1 μ M.	35
Figura 14. Curva de calibración realizada bajo condiciones iniciales de temperatura (T) y tiempo (t).	36
Figura 15. Curva de calibración realizada bajo condiciones de temperatura (T) y	37

tiempo (t) de 60 grados celsius y tres horas respectivamente.

Figura 16. Efecto macroscópico del estrés oxidativo generado por cobre en el sustrato de crecimiento para <i>Pisum sativum</i> .	38
Figura 17. Tendencia lineal de la altura de plantas de <i>Pisum sativum</i> según cantidad de cobre a la que fueron expuestas	38
Figura 18. Mecanismo de reacción sugerido para la reacción entre malondialdehído y <i>N</i> -meil-2-fenil-indol.	40
Figura 19. Comparativo para MDA (promedio y desviación estándar) según tratamiento: ausencia de cobre, cobre 2,0 mM, y cobre 2,0 mM en presencia de compuesto tipo piridopirimidina.	41
Figura 20. Resultados del diseño experimental de dos factores: Tiempo y tratamiento.	42
Figura 21. Comparativo para MDA (promedio y desviación estándar) según tratamiento: ausencia de cobre, cobre 2,0 mM, y cobre 2,0 mM en presencia de fracción rica en flavonoides.	44
Figura 22. Comparativo para MDA según tratamiento: ausencia de cobre, cobre 2,0 mM, y cobre 2,0 mM en presencia de compuesto tipo piridopirimidina.	46

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Resultados de la prueba t en parejas	29
Tabla 2. Resultados para el análisis de repetibilidad.	33
Tabla 3. Resumen del test de Tukey tras realizar un anova de un factor para concentración de cobre utilizada en el tratamiento.	41
Tabla 4. Resumen del análisis de varianza de dos factores: tiempo y tratamiento.	42
Tabla 5. Resumen del post test de Bonferroni	43
Tabla 6. Resumen del test de Tukey tras realizar un anova de un factor para evaluar la inhibición de peroxidación lipídica de una fracción rica en flavonoides.	45

Tabla 7. Resumen del test de Tukey tras realizar un anova de un factor evaluar la inhibición de peroxidación lipídica de un compuesto tipo piridopirimidina. 46

ABREVIATURAS

MDA: Malondialdehído; **TMOP:** 1,1,3,3 Tetrametoxipropano; **GIPNA:** Grupo de investigación en productos naturales y alimentos; **ROS:** Especies reactivas de oxígeno

LOD: Limit of Detection; **LOQ:** Limit of Quantitation

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
ABREVIATURAS	5
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	10
1. OBJETIVOS	11
1.1. General	11
1.2. Específicos	11
2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	12
3. MÉTODOS	19
3.1. Validación del método de N-metil-2-fenil-indol para cuantificar malondialdehído en Pisum sativum	19
3.1.1. Rango Lineal	19
3.1.2. Linealidad	19
3.1.3. Limite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)	20
3.1.4. Precisión	20
3.1.5. Reproducibilidad	20
3.1.6. Evaluación de interferencias por efecto de matriz	21
3.1.7. Sensibilidad	21
3.1.8. Selectividad	21
3.2. Método de cuantificación de malondialdehído en Pisum sativum bajo estrés oxidativo	21
3.3. Análisis estadísticos en las cuantificaciones	24
4. RESULTADOS Y DISCUSION	28
4.1. VALIDACION DEL METODO DE N-METIL-2-FENIL-INDOL PARA CUANTIFICAR MALONDIALDEHIDO EN Pisum sativum	28
4.1.1. Determinación de la longitud de onda	28
4.1.2. Rango lineal	28
4.1.3. Linealidad	31
4.1.4. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)	32
4.1.5. Repetibilidad	32
4.1.6. Reproducibilidad	34
4.1.7. Evaluación de interferencias por efecto de matriz	35
4.1.8. Sensibilidad	36

4.2.	Cuantificación de malondialdehído en <i>Pisum sativum</i> expuesta a cobre por el método de N-metil-2-fenil-indol	37
5.	CONCLUSIONES	48
6.	BIBLIOGRAFÍA	49

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se llevó a cabo la validación del método de *N*-metil-2-fenil indol para cuantificar malondialdehído en *Pisum sativum* expuesta a cobre como biomarcador de peroxidación lipídica. En primer lugar se realizó la reacción entre el estándar de malondialdehído y 1,1,3,3 tetrametoxipropano evaluando la temperatura y tiempo de reacción citados en la literatura. Una vez obtenida la carbocianina producto de la reacción se determinó la longitud de onda a la cual se encontraba el máximo de absorción de la misma mediante un espectrofotómetro obteniéndose un máximo a 586 nm.

De la cuantificación se obtuvo que había una cantidad de MDA significativamente diferente a la medida en las plantas control al ser estresadas con 5 mL de solución de sulfato de cobre pentahidratado 2,0 mM, es decir, que el efecto inducido por el cobre en el estrés oxidativo de la planta cuantificado a través de la reacción de peroxidación lipídica se hacía evidente con tal tratamiento. Mediante un anova de dos factores se determinó que tal tratamiento generaba una cuantificación significativamente diferente de las de las plantas control en el día octavo. Así, se obtuvo que expuestas a 4 mL de una solución 300 µg/mL de una fracción rica en flavonoides, las plantas estresadas a 2,0 mM retornaron a los valores de MDA en plantas donde no se indujo estrés oxidativo con cobre. De igual manera, plantas estresadas con cobre 2,0 mM al haber sido expuestas simultáneamente a una solución 400 µM de un compuesto tipo piridopirimida redujeron significativamente la cantidad de MDA producido. En ambos casos se verificó la capacidad inhibitoria de peroxidación lipídica, el resultado fue que tanto el compuesto de origen natural como el compuesto de origen sintético devolvieron las plantas al nivel de malondialdehído ó estrés oxidativo de los procesos metabólicos naturales de la planta (en ausencia de cobre).

De la validación se obtuvo un rango lineal de 0,0078 - 1 mM mediante una prueba de correlación t student y un r^2 de 0,9988. Se verificó parámetros como la linealidad obteniéndose correlación lineal mediante el anova de la regresión de la curva promedio de tres curvas de calibración realizadas en días diferentes. Se verificaron también la repetibilidad obteniéndose un coeficiente de variación total de 7,842%. La reproducibilidad se verificó mediante el análisis de dos curvas de calibración realizadas en diferentes días (bajo el mismo analista y en el mismo laboratorio) que fueron comparadas para verificar

que no había diferencia significativa entre sus pendientes e interceptos. La sensibilidad se mejoró en el proceso de validación en un factor de doce veces respecto a la curva de calibración inicial.

Se concluyó que el método de cuantificación de malondialdehído mediante la reacción de *N*-metil-2-fenilindol es satisfactorio para medir malondialdehído como biomarcador de estrés oxidativo por peroxidación lipídica en *Pisum sativum* expuesta a cobre; el proceso de validación realizado lo constituye en un test rápido, fácil y sensible para este subproducto de la reacción de peroxidación lipídica. Se concluye que existe capacidad inhibitoria de peroxidación lipídica en moléculas extraídas de forma natural como los flavonoides de la fracción utilizada y en moléculas de origen sintético como el compuesto tipo piridopirimidina ácido 3-metil-2-metiltio-5-(4-metoxifenil)-4-oxo-3,4,5,8-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-7-carboxílico.

INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas de oxígeno incluyen ambos, radicales libres como el $O_2^{\cdot-}$, radicales superóxido, radicales hidroxilo, radicales alcoxilo y formas moleculares no radicales como el H_2O_2 , el 1O_2 oxígeno singulete [1]. Las especies reactivas de oxígeno pueden ocasionar un amplio rango de daño a las plantas, ejemplos de esto son la inhibición enzimática, la oxidación de proteínas, la peroxidación lipídica y el daño de ADN y ARN. Se ha reportado que el efecto indirecto de los metales pesados en las macromoléculas de las plantas vía producción de especies reactivas de oxígeno es más tóxica y rápida que su efecto directo. Las especies reactivas de oxígeno están involucradas en las etapas tempranas de la toxicidad inducida por metales pesados en plantas, y por tanto actúan como iniciadores de la toxicidad de metales pesados.[2]

Aunque los metales pesados no suelen abundar en estado natural, salvo en zonas muy localizadas (explotaciones mineras), el creciente uso de fertilizantes, plaguicidas y productos residuales en la actividad agrícola es una vía de entrada importante de estos contaminantes en el compartimiento suelo. Se ha reportado uso frecuente de superfosfatos y otros fertilizantes fosforados que contienen altas concentraciones de Cr, Cu, Ni, Pb, Cd y Zn, además de plaguicidas que aportan cantidades de Cu y Zn, como también herbicidas y fungicidas que pueden aportar contenidos de Hg [3].

En la búsqueda de tests rápidos para cuantificar el estrés oxidativo en plantas de suelos de agricultura expuestos a metales pesados, surge la necesidad de validar el método de la reacción de N-metil-1fenil indol con 1,1,3,3 tetrametoxipropano en medio ácido usando ácido clorhídrico, de modo que se favorezca la selectividad de la reacción del subproducto malondialdehído frente a otros compuestos producto de la descomposición de hidroperóxidos, como se ha reportado para tal reacción en dichas condiciones [4].

1.OBJETIVOS

1.1. GENERAL

Validar el método de *N*-metil-2-fenilindol mediante colorimetría para la cuantificación de MDA en *Pisum sativum*

1.2 ESPECÍFICOS

Cuantificar el malondialdehído producto de la descomposición de hidroperóxidos en *Pisum sativum* en presencia y ausencia de cobre mediante el método de la reacción de 1-metil-2-fenilindol con malondialdehído

Validar el método de la reacción de 1-metil-2-fenilindol con malondialdehído como un test rápido y fácil para la cuantificación de malondialdehído en *Pisum sativum*.

Determinar si hay actividad inhibitoria en la reacción de peroxidación lipídica en *Pisum sativum* expuesta a cobre de un compuesto tipo piridopirimidina y una fracción rica en flavonoides.

2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

Es conocido que la peroxidación lipídica es un proceso que deteriora células animales y vegetales. Los lípidos ricos en ácidos grasos poliinsaturados, que están presentes en membranas celulares, son sometidos fácilmente a la remoción de hidrógeno en la presencia de radicales libres, convirtiéndose en radicales en sí mismos que reaccionan rápidamente con el oxígeno para formar radicales peroxilo. Estos últimos remueven otro átomo de hidrógeno de otras moléculas de lípidos para crear más radicales, de esta manera dan lugar a un ciclo de autooxidación con la destrucción sistemática de lípidos y daño serio a membranas, comprometiendo la supervivencia de la célula. La Figura 1 representa un esquema de la peroxidación lipídica y los productos secundarios de la misma.

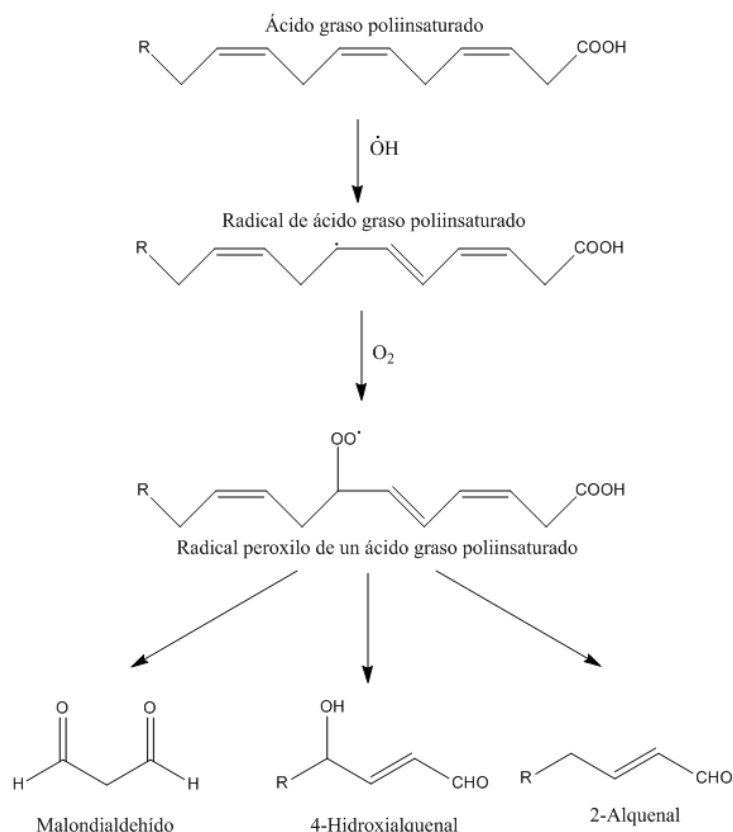


Figura 1. Esquema de la peroxidación lipídica y los productos secundarios de la misma.

Se han estudiado métodos espectrofotométricos, cromatográficos, e inmunoquímicos en donde el análisis se remite a cuantificar o detectar productos primarios de la reacción como dienos conjugados e hidroperóxidos lipídicos, ó productos secundarios producto de la descomposición de hidroperóxidos como el malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-2-nonenal

(4-HNE) que ocasionan daño celular al unirse a grupos libres amino de los aminoácidos de proteínas.

Long y colaboradores aplicaron el método FOX2 a la determinación de hidroperóxidos en tejidos de plantas; se utiliza la oxidación de iones ferrosos a férricos mediante la actividad de los hidroperóxidos, en la prueba de naranja de xilenol. Los hidroperóxidos fueron cuantificados mediante el método FOX2, la prueba con ácido tiobarbitúrico y el método iodométrico, encontrándose buenas correlaciones para el método FOX2 y el método iodométrico. Sin embargo, este último tiene limitaciones en la determinación de bajas concentraciones de hidroperóxidos [5].

La concentración de MDA como biomarcador del daño oxidativo se ha llevado a cabo principalmente mediante el ensayo de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (SRATB); este consiste en cuantificar por espectrofotometría, el complejo rosado MDA-(TBA)₂ a 532 nm. Se ha cuantificado SRATB en plantas de colza expuesta a cobre obteniendo cierta correlación entre la cantidad de cobre utilizada en el tratamiento y la cantidad de malondialdehído cuantificado por TBA, representada en un coeficiente de determinación (r^2) de 0,924 [6]. El test de ácido tiobarbitúrico tiene una limitación asociada al hecho de que otros aldehídos, y otras sustancias como proteína, sacarosa y urea pueden reaccionar con el TBA dando lugar a especies coloreadas y por tanto contribuyendo a la sobre estimación en la medida de peroxidación lipídica; se ha intentado solucionar problemas de inespecificidad con técnicas de HPLC para la separación del complejo de interés de otros cromógenos,[7] sin embargo, se requiere de más estudios para estandarizar un método fácil, rápido, y selectivo basado en la reacción de MDA con ácido tiobarbitúrico para cuantificar MDA como biomarcador de peroxidación lipídica.

Bajo condiciones específicas de acidez, tanto el malondialdehído como el 4-hidroxinonanal reaccionan con N-metil-2-fenil-indol produciendo la misma carbocianina con máxima absorbancia a 586 nm. Estudios sobre el mecanismo de reacción muestran que las reacciones estuvieron marcadamente influenciadas por la naturaleza del ácido. En contraste con la reacción rápida del cromogénico con 4-HNE observada en presencia de ácido metansulfónico, la reacción de 4-HNE inducida por ácido clorhídrico no dio lugar al cromoforo con máximo de absorción a 586 nm. Al comparar las mezclas de reacción bajo

ambas condiciones de ensayo se confirmó que se forman los mismos intermediarios de reacción, por lo tanto se ha concluido que la naturaleza del ácido juega un rol crucial en la fragmentación oxidativa de intermediarios en cromóforos [4].

En el Grupo de Investigación de Productos Naturales y Alimentos de la Universidad del Valle (GIPNA), se ha estudiado los metabolitos secundarios con actividad antioxidante de *Psychotria macrophylla* encontrándose una dependencia de la actividad antioxidante en relación al contenido fenólico para algunas fracciones obtenidas. [8] Los contenidos fenólicos de los extractos de plantas pueden contrarrestar la peroxidación lipídica en el paso de iniciación o propagación. Los mecanismos posibles son la quelación de metales de transición (Fe_2^+), la reducción de Fe^{3+} y la neutralización de radicales intermediarios de la peroxidación lipídica mediante la transferencia de un hidrógeno ó un electrón. Estos mecanismos han sido estudiados en flavonoides como mecanismos de defensa ante el deterioro oxidativo.

Los flavonoides protegen los lípidos contra el deterioro oxidativo mediante varios mecanismos. Debido a sus bajos potenciales de reducción, los flavonoides son termodinámicamente capaces de reducir radicales libres altamente oxidantes (potenciales de reducción en el rango de 2.13 – 1.0 V) como el superóxido, peroxilo, alkoxilo, y radicales hidroxilo mediante donación de átomo de hidrógeno como se muestra en la Figura 21(a). Debido a su capacidad de quelar iones metálicos (hierro, cobre, etc), los flavonoides también inhiben la generación de radicales libres. La quercetina en particular es conocida por sus propiedades queladoras y estabilizadoras de hierro. Los metales traza se enlazan en posiciones específicas de diferentes anillos de estructuras tipo flavonoide. Los lugares de unión se muestran en la Figura 2(b). [9]

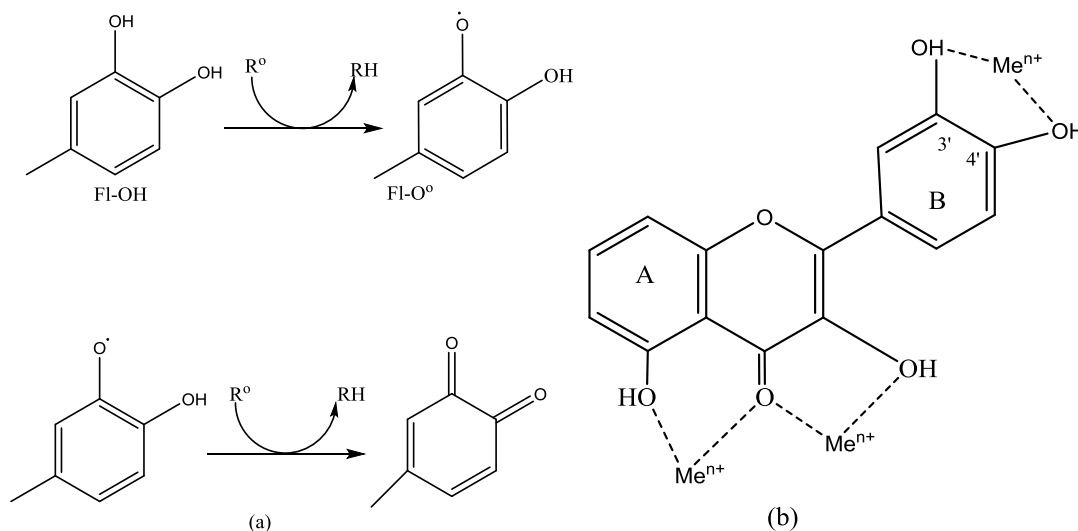


Figura 2 a) Reacción de reducción de radicales mediante donación de un átomo de hidrógeno de los flavonoides b) Lugares de unión de un metal en anillos de estructuras tipo flavonoide

Sin embargo, algunos flavonoides pueden inhibir la peroxidación lipídica a concentraciones muy bajas como para quelar los iones suplementados. Por lo tanto, los flavonoides parecen actuar como antioxidantes en sistemas biológicos vía neutralización de radicales, que termina la reacción en cadena de la peroxidación lipídica, que bloquea por tanto la reacción de iniciación. [10]

Bors y colaboradores han propuesto tres claves determinantes en la estructura química de los flavonoides: 1) Una configuración 3,4 catecol en el anillo B que da lugar a radicales fenoxi más estables después de la donación del átomo de hidrógeno 2) El 2,3 enlace doble en conjunto con el 4-grupo carbonilo en el anillo C, que permite una deslocalización al anillo C de un electrón de radicales fenoxi en el anillo B 3) el grupo 3-hidroxi en combinación con el 2,3 enlace doble, que incrementa la estabilización por resonancia para deslocalización de un electrón a través de la molécula.[9]

Una estructura 3,4 catecol en el anillo B mejora la inhibición de peroxidación lipídica. Debido la oxidación en el anillo B de los flavonoides que tienen el grupo catecol se forma un radical de cierta estabilidad con capacidad de neutralizar (un radical ortosemiquinona).

Estudios en hepatocitos de ratas muestran que la mircetina, la quercetina y la fisetina, que son flavonoides que contienen el grupo catecol, suprimen de manera más efectiva la peroxidación lipídica inducida por metales, lo que se refleja en sus bajos IC_{50} en comparación a otros flavonoides que no contienen el grupo catecol como kaempferol y morin que resultaron ser en el mismo experimento antioxidantes débiles contra la peroxidación lipídica inducida por iones de hierro y vanadio [anti and pro]. Las flavonas que carecen del sistema catecol dan lugar a la formación de radicales inestables con bajos potenciales de “scavenging” en la oxidación. [9]

No obstante, los flavonoides han mostrado una acción pro-oxidativa, resultando en un incremento en la peroxidación lipídica. Experimentos en hepatocitos de ratas reportan que las flavonas, la luteolina, la apigenina, y el chrysin mostraron un perfil antioxidante a bajas concentraciones de hierro, sin embargo fueron pro-oxidantes a altas concentraciones de hierro. El mecanismo mediante el cual ocurre esto puede ser el resultado de una disminución en el potencial de reducción de los complejos metal-flavona tras la quelación del metal dependiendo de la relación molar del flavonoides al ión metálico [pro]

Por otro lado, varios estudios han demostrado la capacidad de algunos flavonoides de interaccionar con la XOD, disminuyendo su nivel de actividad en una acción inhibidora competitiva. La xantina oxidasa es una enzima que cataliza la transformación hipoxantina a xantina y finalmente, la xantina es transformada en urato. Durante la reoxidación de XOD, el oxígeno molecular actúa como un aceptor de electrones, produciendo el radical superóxido y peróxido de hidrógeno; consecuentemente, XOD está entre las fuentes más importantes de radicales superóxido. La inhibición de XOD resulta en la disminución en la producción de ácido úrico y en una producción disminuida de aniones superóxido.

Los 7-hidroxiflavonoides han sido propuestos como potentes inhibidores de la XOD. La insaturación en el anillo C y el grupo hidroxilo libre en el C-7 incrementan la actividad. Se ha propuesto que el OH en el C-7 de los flavonoides puede tomar el lugar del OH en el C-2 o el C-6 de la xantina en el sitio activo de la enzima. [9]

Del mismo modo, isoflavonas del fríjol de soya han sido examinadas por su potencia antioxidante midiendo cuánto inhiben la lipoxigenasa. Las lipoxigenasas (LOXas) constityen una amplia familia de dioxigenasas de ácidos grasos que contienen hierro, que son ubicuas en plantas y animales. Las LOXas catalizan dioxigenación regio y estéreo selectiva de ácidos grasos poliinsaturados que contienen un sistema (1Z,4Z)-pentadieno, como el ácido linoléico, ácido linolénico ó ácido araquidónico. La formación inicial de hidroperóxidos puede ocurrir por oxidación química ó por la acción de enzimas como la lipoxigenasa. [11] El grado de inhibición de la actividad de la enzima en el frijol de soya fue correlacionado positivamente con el numero de grupos hidroxilo en el núcleo de la isoflavona. Varias isoflavonas y sus derivados reducidos (isoflavanonas y isoflavanos) fueron examinado por sus efectos inhibitorios de peroxidación lipídica en microsomas de hígado de rata. Las isoflavonas y los isoflavanos fueron en ese entonces los inhibidores más potentes, algunas isoflavanas (6,7,4'-trihidroxi- and 6,7-dihidroxi-4-methoxiisoflavanos) superaron el α -tocoferol en términos de efecto inhibitorio.[11]

Conociendo que los flavonoides podrían contrarrestar la reacción de peroxidación lipídica mediante algunos de los mecanismos que siguen los compuestos fenólicos, resulta factible determinar si existe actividad inhibitoria de peroxidación lipídica por parte de una fracción rica en flavonoides provista por el Grupo de Investigación de Productos Naturales y Alimentos de la Universidad del Valle.

Por otro lado, en el Grupo de Investigación de Compuestos Heterocíclicos se ha estudiado el potencial antitumoral, antifúngico y antioxidante de compuestos tipo piridopirimidinas sintetizados. Se ha encontrado que el ácido 3-metil-2-metiltio-5-(4-metoxifenil)-4-oxo-3,4,5,8-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-7-carboxílico (Figura 3) presenta un comportamiento sobresaliente como antioxidante en la reacción con el DPPH con IC50 (mg/L) de 367 ± 37.3 . En el mecanismo para la reacción con el DPPH se produce abstracción de un protón de los grupos hidroxilos del agente antioxidante (AH) por parte del DPPH, formando así la especie DPPHH y el radical A.

Dado que un antioxidante puede estabilizar radicales donando un átomo de hidrógeno rápidamente para formar un nuevo radical más estable que el primero deteniendo así la fase

de propagación en una oxidación [117], es pertinente evaluar si este compuesto tipo piridopirimidina presenta actividad inhibitoria de peroxidación lipídica pues en esta reacción radicalaria hay una fase de propagación que puede ser detenida mediante la donación de un protón.

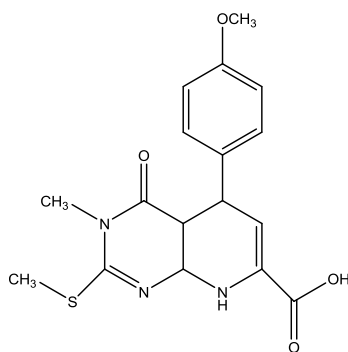


Figura 3. Compuesto tipo piridopirimidina utilizado: ácido 3-metil-2-metiltio-5-(4-metoxifenil)-4-oxo-3,4,5,8-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-7-carboxílico

3. MÉTODOS

3.1 Validación del método de *N*-metil-2-fenil-indol para cuantificar malondialdehído en *Pisum sativum*

Con el fin de verificar que la cuantificación de malondialdehído en *Pisum sativum* expuesta a cobre y que la determinación de la capacidad inhibitoria de peroxidación lipídica de una fracción rica en flavonoides y de un compuesto tipo piridopirimidina eran confiables se validó el método.

A continuación se describen los diferentes ensayos realizados para validar el método.

3.1.1 Rango Lineal

Se evaluó la linealidad en el rango de concentraciones de 0,0078 μMol a 2,0 μMol a partir de una curva de calibración obtenida promediando el sextuplicado de cada estándar. Los estándares de 1,1,3,3 TMOP se prepararon a partir de la solución stock del mismo tomando una alícuota de ésta, adicionando 1,5 mL de HCl (1N) en metanol y enrasando en un balón aforado de 10 mL con una mezcla de acetonitrilo-metanol (3:1).

La ecuación de la recta se determinó mediante regresión no lineal con eliminación automática de outliers en el software de análisis estadístico Graphpad Prism Versión 5. Con la ecuación de la recta se determinó el porcentaje de transmitancia y el logaritmo de la concentración. A partir de estos datos se construyó una curva de Ringbom en donde se grafica la magnitud %T versus el logaritmo de la concentración. De la curva de Ringbom con forma de S se determinó el rango lineal como el rango de concentraciones en donde existe linealidad mediante una segunda gráfica de la curva de Ringbom excluyendo valores, usualmente de los extremos.

3.1.2 Linealidad

Para este ítem se realizaron tres curvas de calibración en días diferentes con cada estándar por sextuplicado en el rango de concentraciones establecido como el rango lineal. Se determinó de éstas su pendiente e intercepto mediante una regresión no lineal con eliminación automática de outliers. Se evaluó la linealidad de estas curvas según su

coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de correlación (R) entre la señal analítica y la concentración de 1,1,3,3 TMOP mediante una regresión lineal de cada curva y comparación de parámetros: pendiente e intercepto. Lo anterior en el software Graphpad Prism Versión 5. Teniendo en cuenta que una distribución aleatoria alrededor de una línea recta confirma la linealidad [13] se realizó un análisis de varianza de la regresión para comparar el cuadrado medio de la regresión y el cuadrado medio residual.

3.1.3 Limite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

Los límites de detección y cuantificación se determinaron de acuerdo con la definición de la guía de Eurachem para validación de métodos analíticos [13]. El procedimiento consistió en medir 10 blancos y calcular la desviación estándar de los mismos. El límite de detección se expresó como $0 + 3s$ (donde s es la desviación estándar de los blancos). El límite de cuantificación se expresó como $0 + 10s$ (donde s es la desviación estándar de los blancos).

3.1.4 Precisión

La precisión se determinó mediante la repetibilidad de acuerdo a la definición de la guía de Eurachem para validación de métodos analíticos [13]. Se determinó la desviación estándar relativa de la absorbancia de seis estándares a cada concentración preparados de manera independiente el mismo día. Se calculó el coeficiente de variación total. Se consideró aceptable la repetibilidad del método con un coeficiente de variación inferior a 10 %.

3.1.5 Reproducibilidad

Se determinó la reproducibilidad mediante la comparación de los parámetros pendiente e intercepto de dos curvas de calibración realizadas en días distintos (en un mismo laboratorio y por un mismo analista) mediante un análisis por regresión lineal con comparación de parámetros en el software Graphpad Prism versión 5. Este compara pendientes primero. Calcula un valor de P (dos colas) testeando la hipótesis nula de que las pendientes son idénticas (las líneas son paralelas). El valor de P responde la siguiente pregunta: Si las pendientes fueran idénticas, ¿cuál es la probabilidad de que información seleccionada aleatoriamente tenga pendientes tan diferentes (ó más diferentes) que las observadas?

Si el valor de P es menor a 0,05, Graphpad Prism concluye que las líneas son significativamente diferentes. Si el valor de P es alto, GraphPad Prism concluye que las pendientes no son significativamente diferentes y calcula una única pendiente para los dos sets de datos [14].

3.1.6 Evaluación de interferencias por efecto de matriz

Se determinó si existen interferencias por efecto de matriz mediante la comparación de una curva de adición de estándar y una curva sin adición de estándar.

3.1.7 Sensibilidad

El cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en el analito mide la sensibilidad [12].

3.1.8 Selectividad

La selectividad de un método usualmente es investigada mediante el estudio de su habilidad para medir el analito de interés en porciones test a las cuales han sido añadidas interferencias específicas (aquellas que se piensa que más comúnmente estarán en las muestras). Cuando no está claro si están o no están presentes interferencias, la selectividad del método puede ser investigada estudiando su habilidad para medir el analito comparando con otras técnicas ó métodos. Cuando la técnica bajo evaluación es específica, el uso de otras técnicas confirmatorias puede no ser necesario.[13]

3.2 Método de cuantificación de malondialdehído en *Pisum sativum* bajo estrés oxidativo

La cantidad de malondialdehído determinada en *Pisum sativum* bajo estrés oxidativo por exposición a cobre fue estimada mediante la interpolación en una curva de calibración realizada con el método de reacción del malondialdehído con *N*-metil-2-fenil-indol de Chaudière *et al* [4], estudio en el cual se verifica la selectividad del método para el malondialdehído con respecto a otros subproductos de la peroxidación lipídica como el 4-hidroxinonenal. Se realizaron algunas modificaciones en la temperatura y tiempo de reacción manejados.

En este método, reaccionan 2 equivalentes del indol (*N*-metil-2-fenil-indol) con un equivalente de MDA generado in situ de tetrametoxipropano (TMOP) en una solución de acetonitrilo-metanol en presencia de ácido hidroclorehídrico o metansulfónico a 40-45 °C durante una hora para generar una carbocianina. La reacción se muestra en la Figura 4.

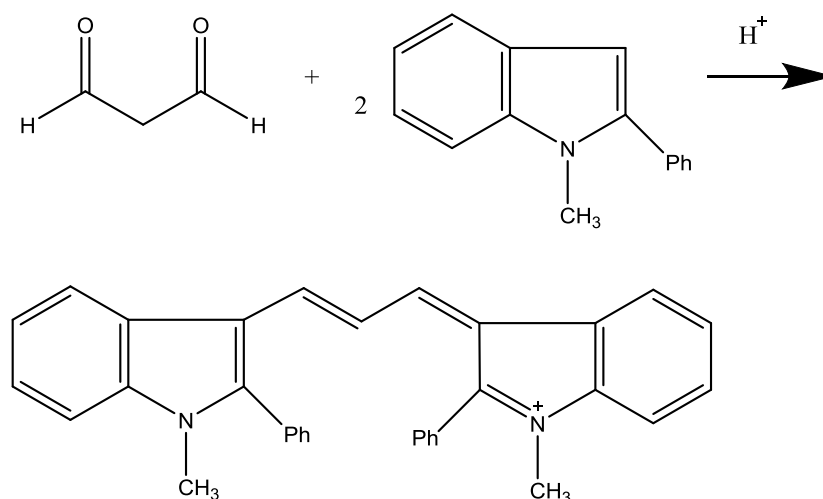


Figura 4. Reacción entre *N*-metil-2-fenil-indol y 1,1,3,3 tetrametoxipropano y la carbocianina producto de la reacción.

La carbocianina obtenida absorbe radiación a 586 nm, por lo tanto se construyó una curva de calibración que se leyó en el lector de microplacas (Accuread M965+, marca Metertech.) en microplacas de 96 pozos.

Para la preparación de los estándares de TMOP de la curva de calibración se preparó una solución stock de 1,1,3,3 TMOP 100 μ M a partir de 164 μ L de 1,1,3,3 TMOP disueltos en 10mL de acetonitrilo en un balón volumétrico. Con esta solución se preparó una solución 10 μ M de TMOP adicionando 1,5 mL de HCl 1 M en metanol a 1 mL de la solución 100 μ M y se enrasó con acetonitrilo-metanol (3:1). Se preparó una solución stock 2000 μ M del reactivo cromogénico para lo cual se pesan 414 mg de *N*-metil-2-fenil-indol y se disolvieron en 15 mL de HCl (37%), 20 mL de agua desionizada y 65 mL de acetonitrilo/metanol (3:1) en un balón volumétrico de 50mL (clase A). Con esta solución se preparó una solución 200 μ M de cromogénico adicionando 1,5mL de HCl 1 M en metanol a 1 mL de la solución 100 μ M y se enrasó con acetonitrilo-metanol (3:1)

La curva de calibración se preparó realizando diluciones seriadas a la mitad a partir de 400 μL de la solución de TMOP 10 μM en acetonitrilo en una microplaca eppendorf de 1 mL. Se adicionaron 40 μL de isopropanol, 80 μL de HCl 1N en metanol, y 80 μL de solución de cromogénico 200 μM . Se completó el volumen a 1 mL con 600 μL de HCl 0,0003 N en metanol. Se puso la microplaca en la incubadora a 60 grados por tres horas, una vez pasado el tiempo de reacción se trasvasó cada pozo a una microplaca eppendorf de 200 μL . Se leyó la absorbancia en el microlector de placas usando un filtro de 600 nm (Figura 5).



Figura 5. a) Lector de microplacas **b)** Microplaca con curva de calibración realizada con estándares de 1,1,3,3 TMOP

Respecto a las muestras, se utilizaron arvejas comunes (*Pisum sativum*) crudas que se sometieron a un proceso de imbibición en agua tibia (aproximadamente 60 grados) al 0,2% de sacarosa durante 3 horas. A continuación se pusieron a germinar en platos con agua y papel filtro hasta que ocurriera la germinación. Una vez la raíz había alcanzado los 2-3 cm de longitud se sembró cada arveja en una cavidad de un germinador rellena de algodón. Se sembraron lotes de 12 plantas que son fueron con 5 mL de solución (según el tratamiento) el primer día y los días siguientes con 5 mL de agua.

Para procesar las plantas se cortaron desde el hipocótilo, se trituraron con un bisturí hasta homogeneidad (aproximadamente 2 mm de longitud), se maceraron, y se disolvieron en 1 mL de HCl 1N en metanol en un tubo eppendorf. Se sometieron a 15 minutos de sonicación en ultrasonido y a continuación el sobrenadante (aproximadamente 900 μL) se trasvasó a

otro eppendorf descartando el material sólido. Se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 minutos y del sobrenadante se tomaron 800 μL para llevar a cabo la reacción en la microplaca eppendorf de 1 mL de volumen. La reacción se llevó a cabo igual que en los estándares, se adicionaron 40 μL de isopropanol, 80 μL de HCl 1N en metanol, y 80 μL de solución de cromogénico 200 μM . Los valores de absorbancia obtenidos en el microlector de placas fueron transformados a μmoles de MDA por gramo de peso húmedo conociendo las masas de la planta y mediante la ecuación de la recta de la curva de calibración previamente realizada.

3.3 Análisis estadísticos en las cuantificaciones

Se expusieron los lotes de doce plantas a distintas concentraciones de cobre (1,0 mM y 2,0 mM) para determinar una concentración de cobre tal que la cantidad de MDA (promedio de las muestras) tras 8 días de exposición fuera significativamente diferente de la cuantificada en las plantas control, esto mediante un análisis de varianza de una cola realizado en Graphpad Prism versión 5, se asumió resultados estadísticamente diferentes si $P < 0,05$.

El valor de P evalúa la hipótesis nula respecto a que los datos de todos los grupos fueron tomados de poblaciones con medias idénticas. Por lo tanto, el valor de P responde a la siguiente pregunta: Si todas las poblaciones efectivamente tuvieran la misma media (los tratamientos son inefectivos), cual es la posibilidad de que un muestreo aleatorio resultaría en medias tan lejanas (ó más) que las observadas en el presente experimento?

Si el valor de P es grande ($P > 0,05$), los datos no proporcionan ninguna razón para concluir que las medias difieren. Aún si las medias de las poblaciones fueran iguales, no sería sorpresivo encontrar medias de las muestras tan lejanas entre sí solo por casualidad.

Si el valor de P es pequeño ($P < 0,05$), entonces es poco probable que las diferencias observadas son debidas a un muestreo aleatorio. Es posible rechazar la idea de que las poblaciones tienen medias idénticas. Esto no significa que cada media difiera de cada otra media, solo que al menos una difiere del resto. Para saber específicamente cual media

difiere de cual, es necesario realizar comparaciones entre medias, en este caso con un test de Tukey posterior al anova de un factor.

El test de Tukey se basa en el cálculo de las diferencias entre las J medias. Si la diferencia de una de las $J(J-1)/2$ comparaciones posibles supera un valor denominado *diferencia mínima significativa (DMS)*, entonces se considera que dichos promedios son significativamente diferentes. Si la distancia entre un par de medias sobrepasa su DMS, ambos promedios serán significativamente diferentes. [14]

Una vez fijada la concentración de cobre tal que la cantidad de MDA fuera significativamente diferente a la determinada en las plantas control, se determinó si en comparación con las plantas control, había variación respecto a la cantidad de malondialdehído cuantificado a diferentes tiempos de procesamiento de las plantas. Por lo tanto, se determinó el mejor día entre el octavo y el treceavo post siembra para cortar las plantas según se obtuviera una cantidad de MDA significativamente diferente del hallado en las plantas control ($P < 0,05$) mediante un diseño experimental como se muestra a continuación:

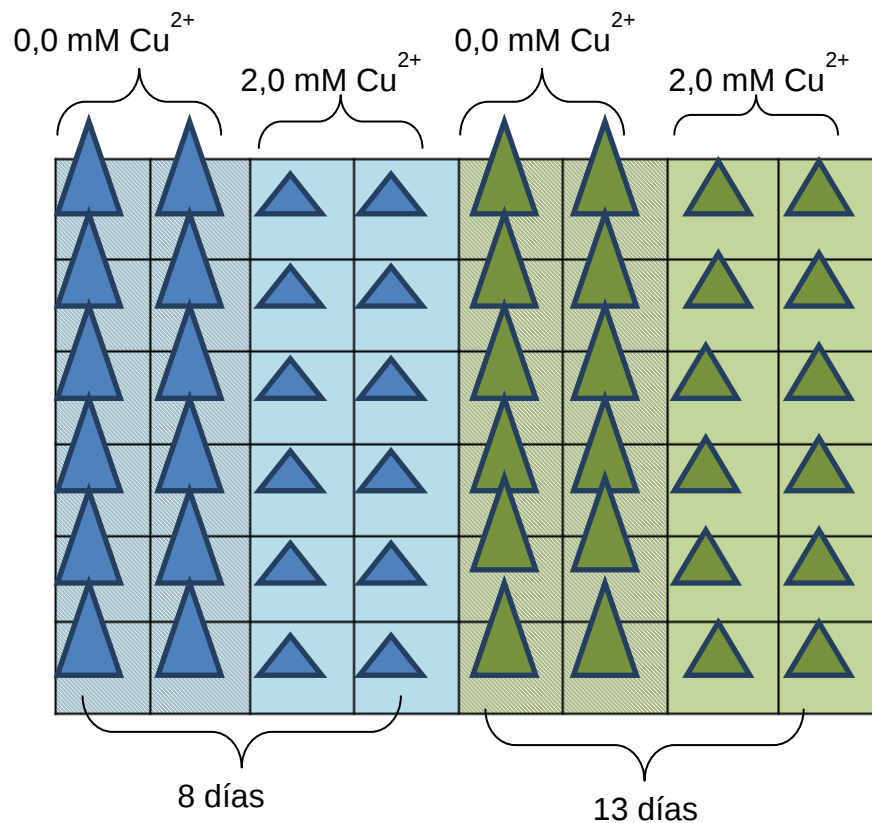


Figura 6. En azul, plantas procesadas el día octavo. En verde: plantas procesadas el día treceavo. En sombreado oblicuo: plantas control.

El anova de dos colas fracciona la variabilidad debida a: Interacciones entre fila y columna, variabilidad entre columnas y variabilidad entre filas. Por lo tanto, computa valores de P que evalúan tres hipótesis nulas: 1) Que el factor tiempo no tuvo un efecto en el resultado 2) Que el factor tratamiento no hace alguna diferencia 3) Que las diferencias entre tratamientos es idéntica en todos los tiempos.

El software Graphpad Prism puede hacer post tests dentro de una fila, comparando columnas. Las preguntas que responde en este caso son: ¿difieren las respuestas del día octavo con y sin tratamiento?, ¿difieren las respuestas del día treceavo con y sin tratamiento? Se responde a estas preguntas con un post test de Bonferroni y se fija el día de procesamiento de las muestras.

Para establecer que hubo un efecto inhibitor de peroxidación lipídica tras las exposición de plantas bajo estrés oxidativo a 300 $\mu\text{g/mL}$ de una fracción rica en flavonoides se llevó a

cabo un cultivo de 12 muestras a las que se les adicionó el primer día 5 mL de sulfato de cobre 2,0 mM y 4 mL de una fracción rica en flavonoides (suministrada por el Grupo de investigación en productos naturales y alimentos de la Universidad del Valle) y los días siguientes fueron regadas con 5 mL de agua hasta el día octavo. Con los resultados de Se realizó un análisis de varianza de una cola y se consideró que los resultados eran estadísticamente diferentes si $P < 0,05$. Del mismo modo se procedió para establecer que hubo un efecto inhibidor de peroxidación lipídica tras la exposición de plantas bajo estrés oxidativo a 4 mL de una solución 400 μ M del compuesto tipo piridopirimidina (suministrado por el Grupo de investigación en compuestos heterocíclicos de la Universidad del Valle)

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 VALIDACION DEL METODO DE *N*-METIL-2-FENIL-INDOL PARA CUANTIFICAR MALONDIALDEHIDO EN *Pisum sativum*

4.1.1 Determinación de la longitud de onda

Se tomó un estándar de 2,0 mM de 1,1,3,3 tetrametoxipropano y se escaneo entre 400 y 700nm en el espectrofotómetro (Shimadzu Varian Cary) para conocer la longitud de onda a la cual se produce la máxima absorción de la carbocianina producto de la reacción del mismo con *N*-metil-2-fenilindol. La longitud de onda para la máxima absorción obtenida fue de 586 nm como se muestra en la Figura 7.

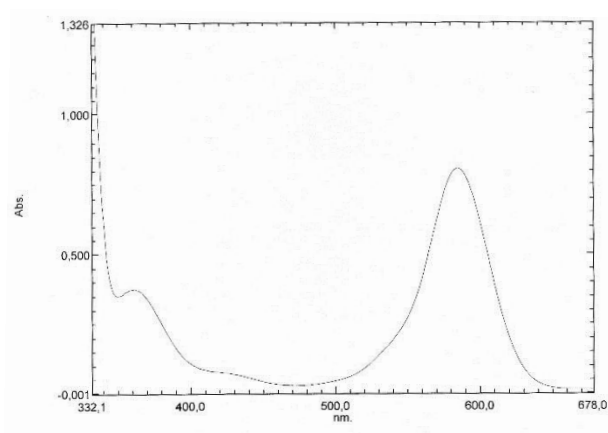


Figura 7.. Espectro de absorción de la carbocianina producto de la reacción de de 1,1,3,3 tetrametoxipropano y *N*-metil-2-fenilindol.

4.1.2 Rango lineal

La relación entre la señal analítica y la concentración de TMOP en un intervalo de 0,0078 – 2,0 μ M TMOP sugiere una relación lineal según la representación en la Figura 8. Al realizar el análisis por regresión no lineal con eliminación automática de outliers usando la curva de calibración por sextuplicado, se obtuvo un coeficiente de correlación $r^2=0,9960$ para el rango lineal de 0,0078 – 1,0 μ M TMOP.

Con la finalidad de verificar la validez del rango lineal estimado, se aplicó una prueba t de student al coeficiente de correlación r, para conocer si su valor indicaba una correlación significativa entre la señal y la concentración en el rango lineal estimado. Se plantearon las siguientes hipótesis:

Ho: “No existe correlación entre los valores de la señal analítica y la concentración de TMOP”

Ha: “Existe correlación entre los valores de la señal analítica y concentración de TMOP”.

La prueba t en parejas compara dos grupos. Si el apareamiento es efectivo, se espera que las primeras y posteriores medidas varíen juntas. Graphpad Prism cuantifica esto calculando el coeficiente de correlación de Pearson, r. De r, calcula un valor P que responde: Si los dos grupos no están correlacionados en absoluto, cuál es la probabilidad de que sujetos seleccionados aleatoriamente tengan un coeficiente de correlación tan largo (ó más largo) que el observado en el experimento? El valor de P tiene una cola, pues no hay interés en la posibilidad de observar una marcada correlación negativa.

Se calculó t usando el software GraphPad Prism versión 5 [15].

Tabla 1. Resultados de la prueba t en parejas

Compuesto	r	P (una cola)
TMOP	0,9972	<0,0001

Si el apareamiento fue efectivo, r será positivo y el valor de P será pequeño. Esto significa que los dos grupos están significativamente correlacionados, como se corroboró en este caso a un nivel de confianza de 95 % para el intervalo de 0,0078 a 1 μ M TMOP.

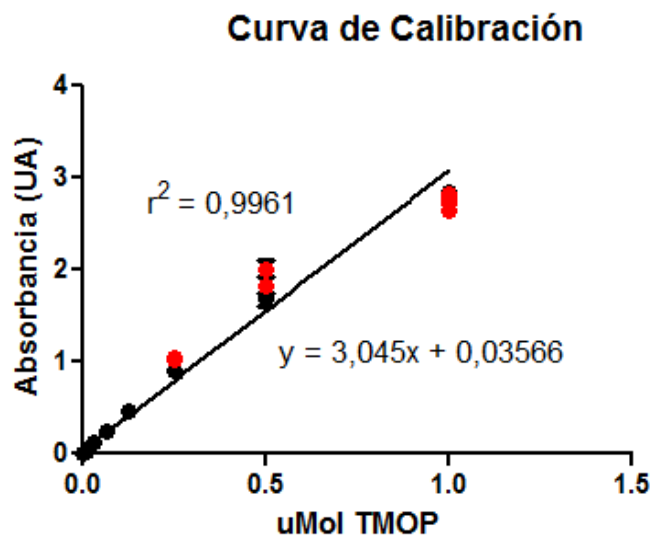


Figura 8. Curva de calibración en el rango de 0,0078 – 1,0 μ M TMOP. En rojo los valores outliers descartados automáticamente por el software.

La ecuación de la recta obtenida, mediante regresión no-lineal con ecuación de línea recta es $Y = 3,045(\pm 0,02877)X + 0,04339 (\pm 0,007793)$ con un coeficiente de determinación $r^2 = 0,9961$.

Al realizar una curva de Ringbom se determinó el rango óptimo (Figura 9).

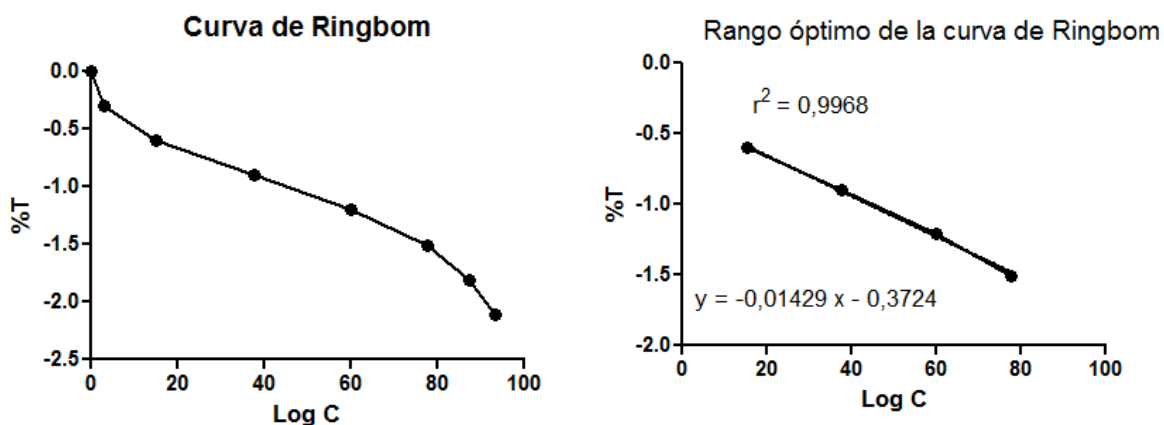


Figura 9. Curva de Ringbom para el 1,1,3,3 tetrametoxipropano: **a)** tendencia general **b)** rango óptimo.

4.1.3 Linealidad

Se representa curva promedio de 3 curvas realizadas en días diferentes en el intervalo de concentración de 0,0078 a 1 μM de TMOP en la Figura 10.

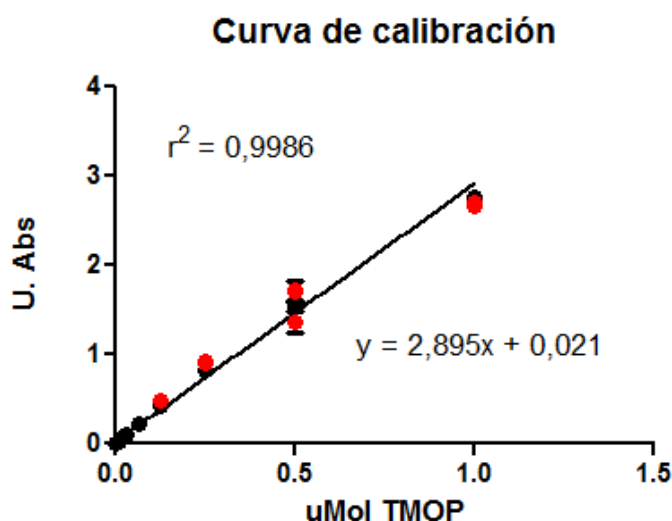


Figura 10. Promedio de tres curvas de calibración realizadas en tres días diferentes.

La ecuación de la recta obtenida, mediante regresión no-lineal con ecuación de línea recta es $Y = 2,895(\pm 0,03214)X + 0,02145 (\pm 0,005828)$ con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9986$.

Al aplicar el análisis de varianza (ANOVA) a los datos de la Figura 10 se plantearon las siguientes hipótesis:

Ho: “El cuadrado medio de la regresión (CM_{reg}) fue igual al cuadrado medio residual”

Ha: “El cuadrado medio de la regresión (CM_{reg}) no fue igual al cuadrado medio residual (CM_{res})”

Se obtuvo un F_{calc} de 1,5 que al compararse con el F_{crit} ($P=0,05$) de 5,99 dio lugar al rechazo de la hipótesis nula ya que $CM_{reg} > CM_{res}$ a un nivel de probabilidad del 5%, lo que significa que existe una correlación significativa entre x e y [16].

4.1.4 Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

Se determinó el valor del Límite de detección (LOD) del método con base en la siguiente ecuación:

$$\text{LOD} = 3 \times \text{Sbl} / b$$

LOD: Límite de Detección del Método

Sbl: Desviación estándar de las respuestas de los 10 blancos

b: Pendiente de la recta de calibración utilizada.

$$\text{LOD} = 3 \cdot 0,004 / 2,940 = 4,081\text{E-}3 \mu\text{Mol TMOP}$$

Se determinó el valor del Límite de cuantificación (LOQ) del método con base en la siguiente ecuación:

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{Sbl} / b$$

LOQ: Límite de Detección del Método

Sbl: Desviación estándar de las respuestas de los 10 blancos

b: Pendiente de la recta de calibración utilizada.

$$\text{LOQ} = 10 \times 0,004 / 2,940 = 0,0136 \mu\text{Mol TMOP}$$

4.1.5 Repetibilidad

En la tabla 2 se pueden observar los resultados obtenidos en el estudio de la desviación estándar de los resultados bajo condiciones de repetibilidad. Esto mide la dispersión de la distribución de resultados obtenidos por un mismo analista, en un mismo equipo, en un mismo laboratorio en un periodo corto de tiempo, que no excede un día.

Tabla 2. Resultados para el análisis de repetibilidad.

	Promedio	Desviación Estándar	RSD %	r
Std 8	2,949	0,091	3,1	0,252
Std 7	1,475	0,066	4,5	0,183
Std 6	0,773	0,035	4,5	0,096
Std 5	0,420	0,035	8,2	0,096
Std 4	0,210	0,013	6,4	0,037
Std 3	0,104	0,013	12,3	0,036
Std 2	0,058	0,005	9,5	0,015
Std 1	0,033	0,005	14,3	0,0129

Donde el coeficiente de variación promedio total (%) es de 7,842 y la desviación estándar relativa total es de 0,0329.

A partir de la desviación estándar de repetibilidad es útil calcular el límite de repetibilidad r' que permite al analista decidir si la diferencia entre análisis por duplicado de una muestra, determinada bajo condiciones de repetibilidad, es significativa [8].

El límite de repetibilidad está dado por la fórmula:

$$r = t \times \sqrt{2} \times \sigma_r \quad (1)$$

Donde t es el t de Student de dos colas para un determinado nivel de confianza (usualmente el valor es 1.96), y σ_r es la desviación estándar medida bajo condiciones de repetibilidad.

Empleando la fórmula (1) y las desviaciones estándar de la Tabla 2 se obtiene un límite de repetibilidad para cada concentración (r . Lim) como se muestra en la Tabla 2.

Los límites de repetibilidad para las concentraciones 0,0156 a 1,0 (estándares 2 al 7) indican que la diferencia entre análisis por duplicado de una muestra determinado bajo condiciones de repetibilidad no es significativa. Para la concentración 0,078 una diferencia entre análisis por duplicado determinada bajo condiciones de repetibilidad es significativa, por lo tanto la repetibilidad no incluye esta concentración mínima.

4.1.6 Reproducibilidad

Se evaluó la reproducibilidad con las curvas de calibración preparadas en días diferentes mostradas en la Figura 11 y Figura 12.

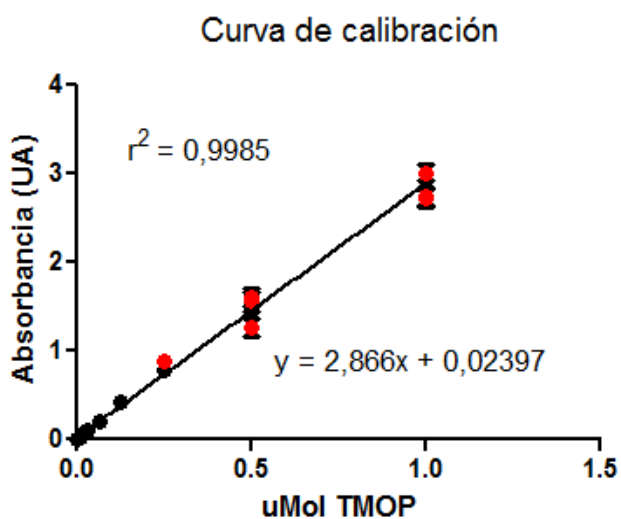


Figura 11. Curva de calibración utilizada para el análisis de la reproducibilidad del método preparada el 20 de Noviembre.

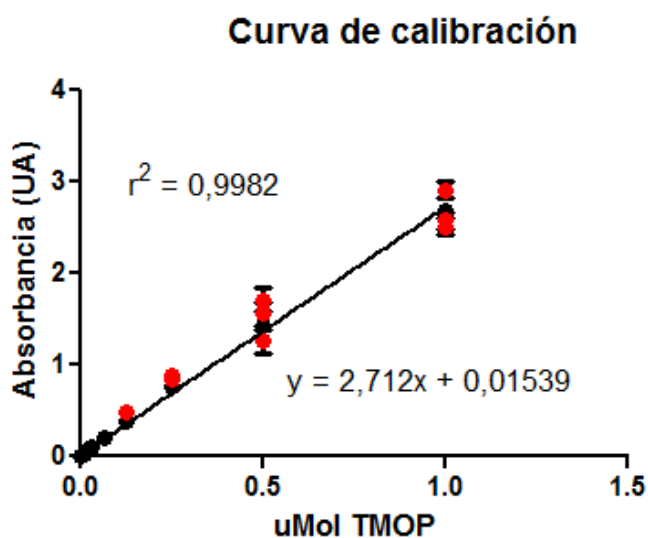


Figura 12. Curva de calibración utilizada para el análisis de la reproducibilidad del método preparada el 19 de Noviembre de 2014.

Se obtuvo en respuesta a la pregunta de si las pendientes son iguales un valor de $P = 0,05942$. Si las pendientes fueran idénticas, hay por tanto un 5,9 % de probabilidad de elegir aleatoriamente datos con pendientes así de distintas, por lo tanto se puede concluir que las diferencias entre las pendientes no son significativas. Como las pendientes no son significativamente diferentes, es posible calcular una pendiente para todos los datos, la pendiente del grupo es 2,731

En respuesta a la pregunta de si los interceptos son iguales se obtuvo un valor de $P = 0,1127$. Si los interceptos en general fueran idénticos, hay un 11% de elegir aleatoriamente datos con interceptos diferentes. Es posible concluir que las diferencias entre los interceptos no son significativas. Como los interceptos no son significativamente diferentes, es posible calcular un intercepto de Y para todos los datos. El intercepto del grupo de datos es 0,0334

4.1.7 Evaluación de interferencias por efecto de matriz

La Figura 13 muestra la comparación entre las curvas obtenidas por la adición de un patrón y la curva de calibración promedio de tres curvas de calibración realizadas en el rango lineal de $0,078 - 1 \mu\text{M}$.

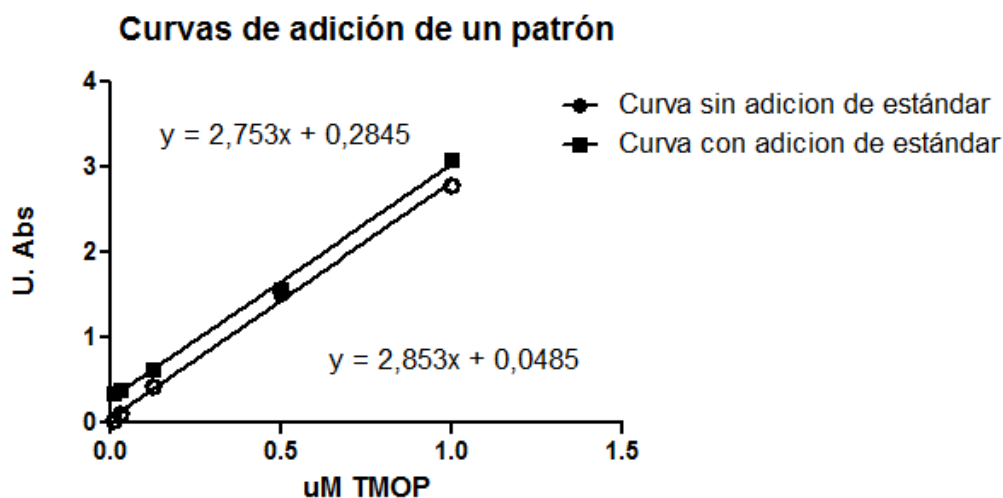


Figura 13. Comparación entre las curvas de adición de patrón y la curva de calibración promedio en el rango de $0,078 - 1 \mu\text{M}$.

Donde la concentración de la muestra utilizada corresponde a $0,1034 \mu\text{M}$ de MDA.

Como respuesta a si las pendientes son iguales se obtuvo un valor de $P=0,7695$. Si las pendientes fueran idénticas, hay, hay por tanto un 77 % de probabilidad de elegir aleatoriamente datos con pendientes así de distintas, por lo tanto se puede concluir que las diferencias entre las pendientes no son significativas. Como las pendientes no son significativamente diferentes, no hay interferencia por efectos de matriz. Los valores de las cuantificaciones son correctos.

4.1.8 Sensibilidad

El cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en el analito mide la sensibilidad. Cuanto mayor sea este cambio, más sensible será el método. Se logró obtener una curva de calibración más sensible dentro del rango lineal determinado mediante el incremento de temperatura de 45 a 60 grados y el incremento de tiempo de reacción de 1 a 3 horas.

En la Figura 14 se muestra la curva de calibración realizada bajo condiciones de temperatura y tiempo de reacción de 45 grados Celsius y 1 hora respectivamente.

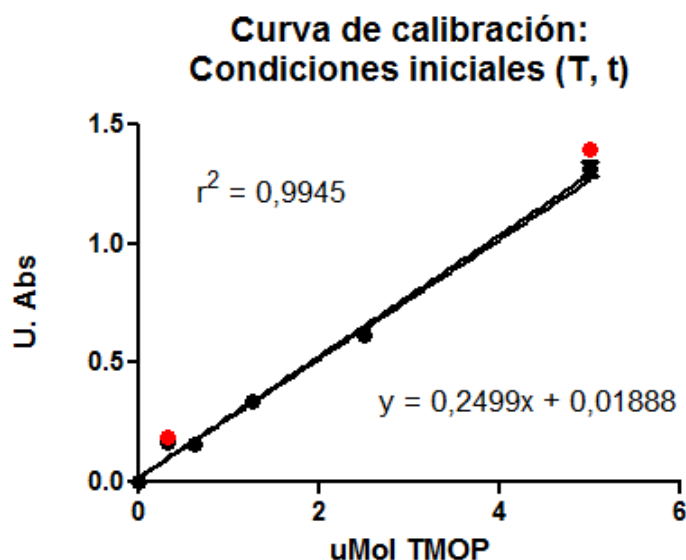


Figura 14. Curva de calibración realizada bajo condiciones iniciales de temperatura (T) y tiempo (t).

Teniendo en cuenta que la carbocianina mostraba estabilidad en el tiempo, se realizó un ensayo incrementando en primer lugar el tiempo de reacción y posteriormente la

temperatura de reacción que se incrementó hasta 60 grados dados que de los solventes empleados, el punto de ebullición más bajo correspondía al metanol con un valor de 64,7 grados °C, imponiendo esto un límite de temperatura a la cual se podía llevar a cabo la reacción.

En la Figura 15 se muestra la curva de calibración realizada bajo condiciones de temperatura y tiempo de reacción de 60 grados ° C y tres horas respectivamente.

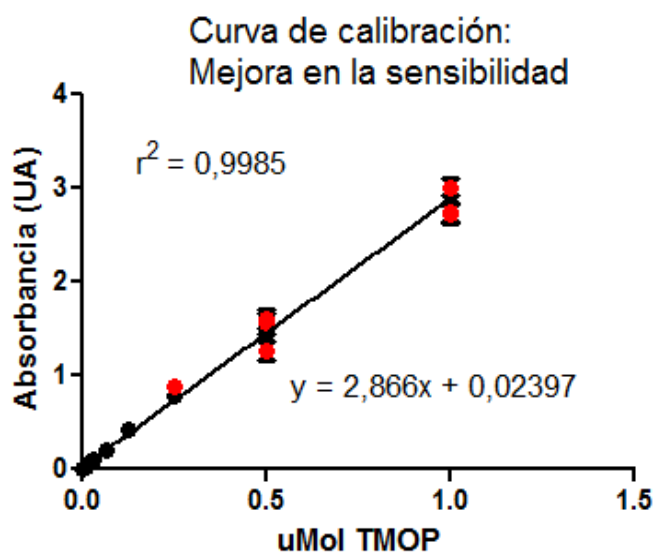


Figura 15. Curva de calibración realizada bajo condiciones de temperatura (T) y tiempo (t) de 60 grados ° C y tres horas respectivamente.

Como se observa al comparar las pendientes de la Figura 14 y Figura 15 se obtuvo una mejoría en la sensibilidad denotada por el incremento de la pendiente de 0,2499 a 3,045 unidades, aproximadamente se incremento en un factor de 12.

4.2 Cuantificación de malondialdehído en *Pisum sativum* expuesta a cobre por el método de *N*-metil-2-fenil-indol

Estudios preliminares en el cultivo de lotes de doce plantas de *Pisum sativum* expuestas a distintas concentraciones de sulfato de cobre mostraron que el estrés oxidativo al que se sometía la semilla germinada de *Pisum sativum* expuesta a cobre se manifestaba a nivel

morfológico, como lo es el grosor del tallo y la altura de la planta. Esto se ilustra en la Figura 16.

Inclusive, el efecto presentó una tendencia con alto grado de linealidad según el coeficiente de determinación (r^2) estimado en la altura registrada, según la cantidad de cobre adicionado como se muestra en la Figura 17.



Comportamiento de la altura frente a la exposición a Cu^{2+}

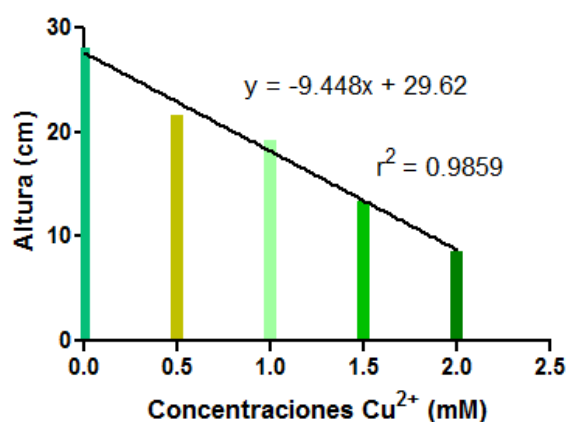
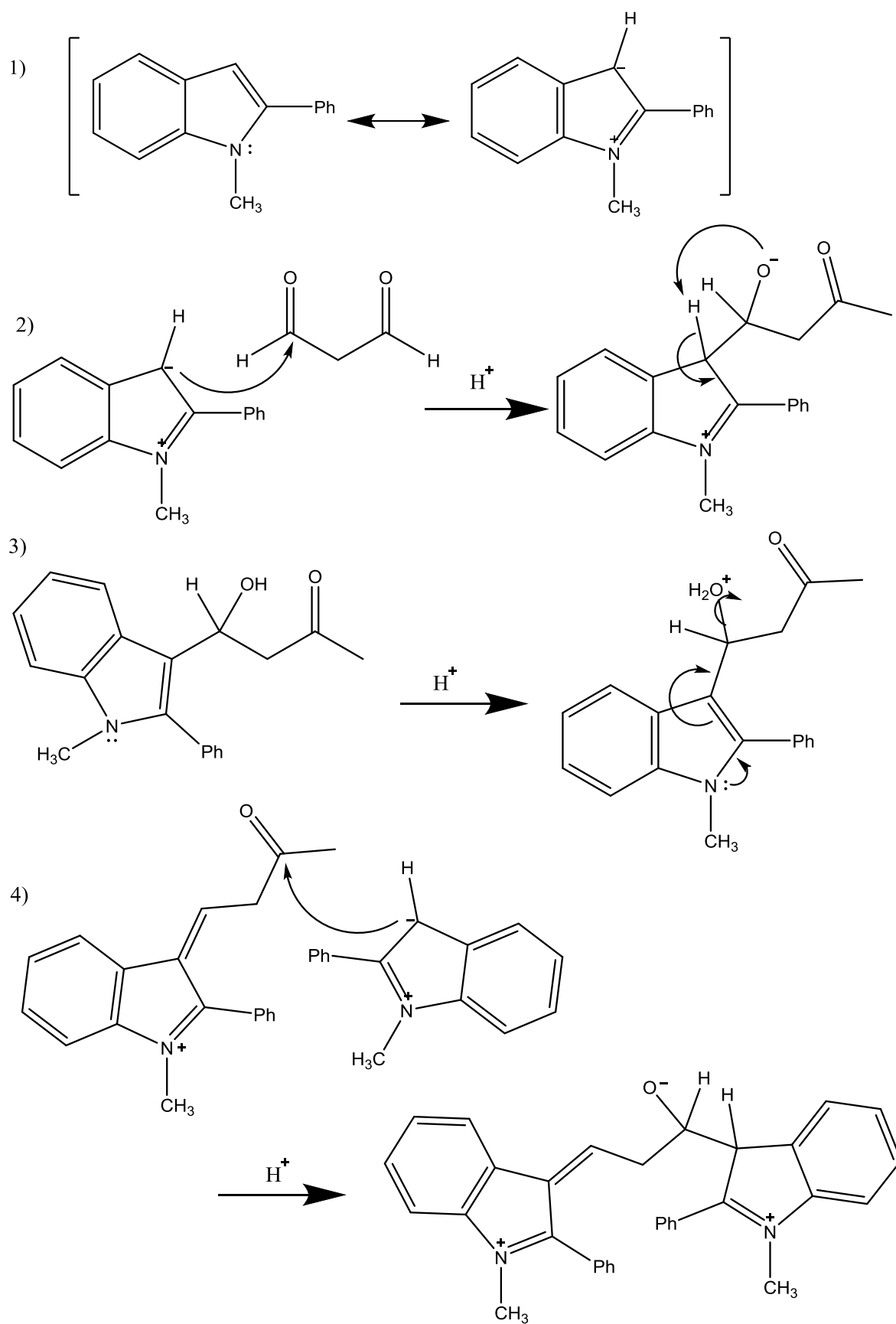


Figura 16. Efecto macroscópico del estrés oxidativo generado por cobre en el sustrato de crecimiento para *Pisum sativum*. **Figura 17.** Tendencia lineal de la altura de plantas de *Pisum sativum* según cantidad de cobre a la que fueron expuestas

A nivel químico, se buscó cuantificar el estrés oxidativo mediante la medida de malondialdehído producido por la planta expuesta a un metal de transición, el cobre.

La cuantificación se realiza midiendo la cantidad la carbocianina producto de la reacción del malondialdehído con *N*-metil-2-fenil-indol cuyo mecanismo de reacción se sugiere en la Figura 18.



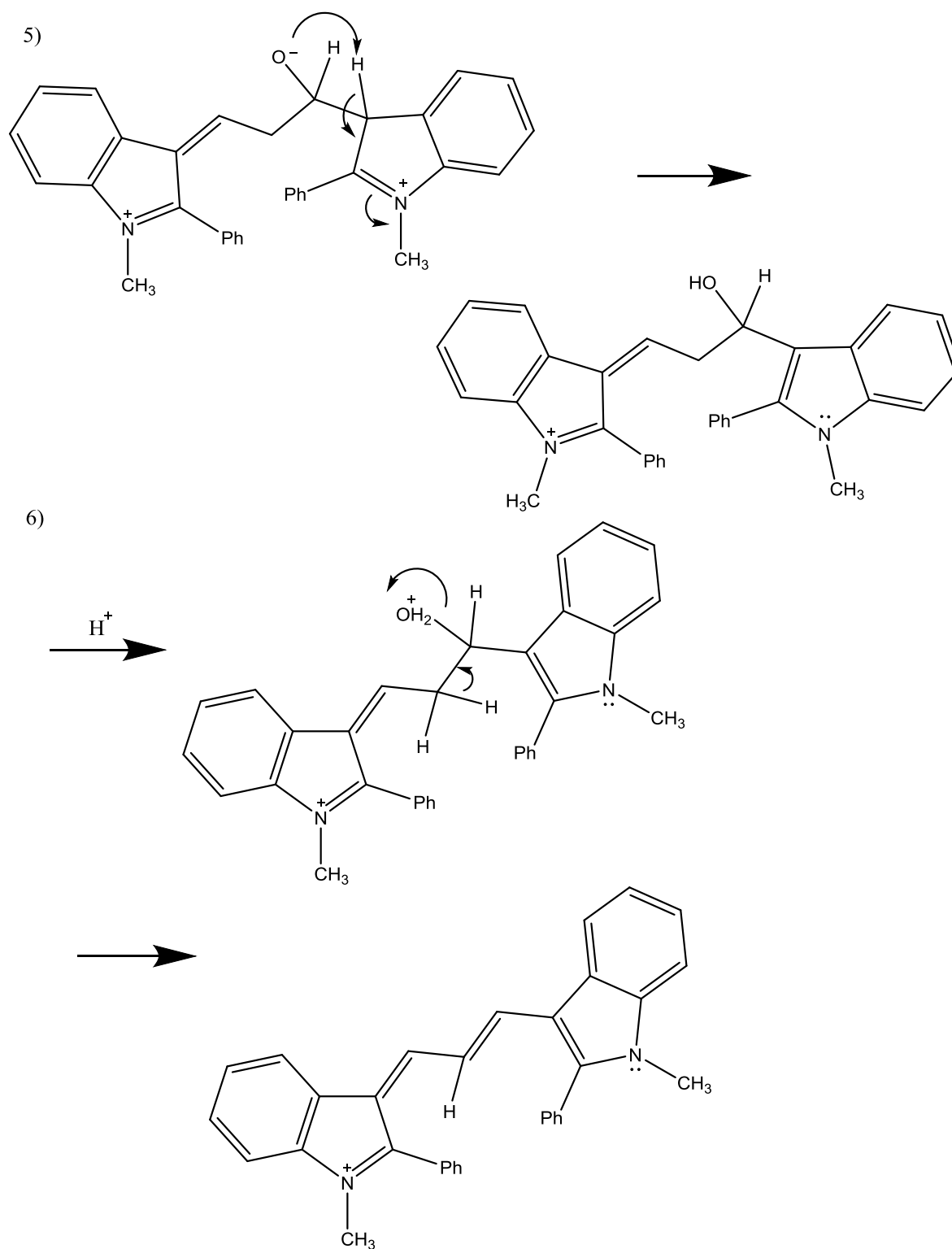


Figura 18. Mecanismo de reacción sugerido para la reacción entre malondialdehído y *N*-meil-2-fenil-indol [indole]

En la cuantificación, mediante un anova de un factor y un test de Tukey posterior, se obtuvo que, muestras (promedio de 12) sometidas a 2,0 mM de sulfato de cobre diferían significativamente de las plantas control ($P < 0,001$) en la cantidad de MDA por gramo de planta mientras que plantas expuestas a 1,0mM de sulfato de cobre no diferían significativamente de las plantas control. En la Figura 19 se muestra las μ moles de MDA según el tratamiento de cobre. Los resultados del anova se muestran en la tabla 3.

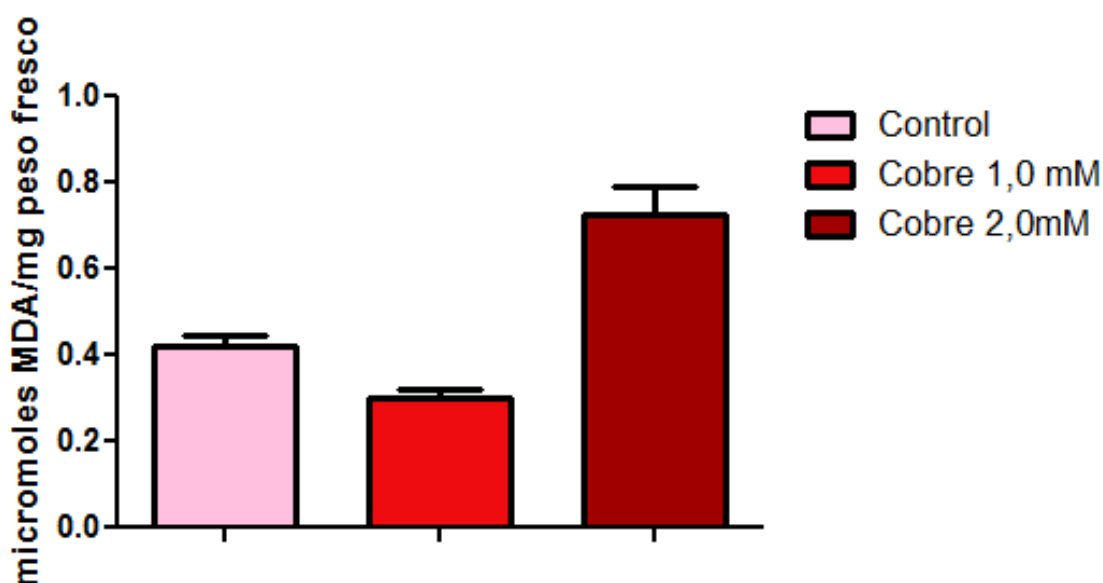


Figura 19. Comparativo para MDA (promedio y desviación estándar) según tratamiento: ausencia de cobre, cobre 1,0 mM, y cobre 2,0 mM en presencia de compuesto tipo piridopirimidina.

Tabla 3. Resumen del test de Tukey tras realizar un anova de un factor para concentración de cobre utilizada en el tratamiento.

Test de Turkey	Significativo?	
	P < 0,05?	Resumen
Control vs Cobre 1,0 mM	No	ns
Control vs Cobre 2,0mM	Si	P< 0.001
Cobre 1,0 mM vs Cobre 2,0mM	Si	P< 0.001

Los resultados del anova de dos factores del diseño experimental con los factores: tiempo al cual se procesaron las muestras y tratamiento al que se sometieron las muestras de *Pisum sativum*, se representan en la Figura 20.

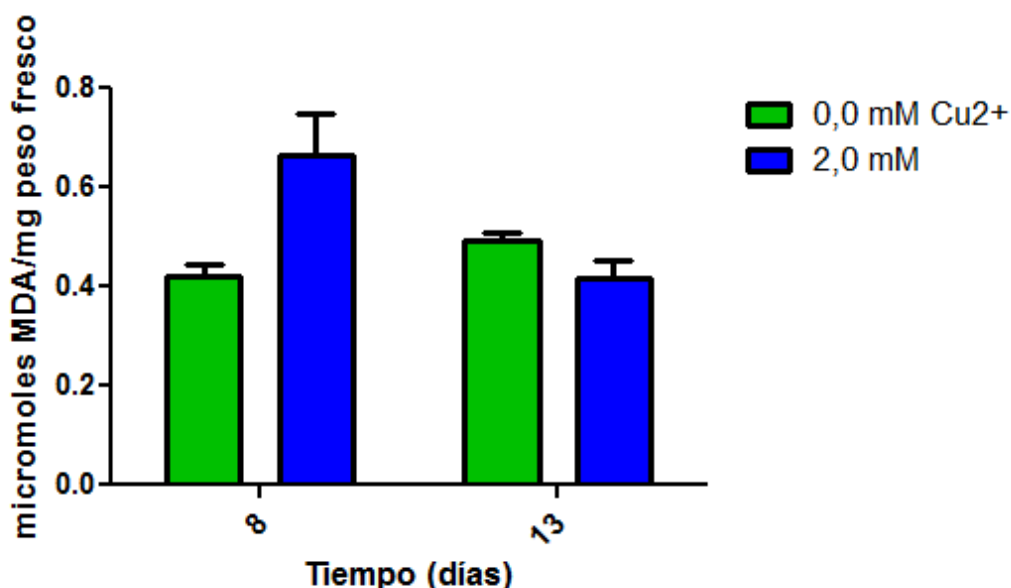


Figura 20. Resultados del diseño experimental de dos factores: Tiempo y tratamiento.

Mediante un anova de dos factores, se obtuvo los resultados mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Resumen del análisis de varianza de dos factores: tiempo y tratamiento.

Fuente de variación	Resumen del valor P	Es significativo?
Tratamiento	0,1025	No
Tiempo	0,0902	No
Interacción	P 0,001 a 0,01	Si

El primer valor de P es grande. Indica que no se rechaza la hipótesis nula y que por tanto, el tratamiento no tiene un efecto en los resultados. El segundo valor de P es pequeño pero no menor a 0,05, es decir que no puede descartarse la hipótesis nula con un 95 % de confiabilidad, en cambio, se dice que el tiempo no tiene un efecto en los resultados. El

tercer valor de P es muy pequeño. Indica que hay una interacción entre el tratamiento y el tiempo estadísticamente muy significativa, es decir, que el efecto del tratamiento no es consistente a todos los tiempos. Debido a que la interacción es estadísticamente significativa, se realizó un post test de Bonferroni, los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resumen del post test de Bonferroni.

Fuente de variación	Diferencia	Intervalos de confianza	Resumen del valor de P	Es significativo?
Día 8	0,2431	0,08272 a 0,4035	0,001 a 0,01	Muy significativo
Día 13	-0,07364	0,2469 a 0,09960	P > 0,05	No

El test de Bonferroni en cada valor del tiempo determina si la diferencia entre plantas control y plantas tratadas es estadísticamente significativa en cada valor del tiempo, y genera un intervalo de confianza de 95 % para la diferencia entre las medias en cada valor del tiempo [12]. Según la tabla 5, la respuesta significativamente diferente en el día octavo y no es significativamente diferente en el día treceavo, como resultado, el día octavo fue establecido como el día para el procesamiento de muestras en los análisis de capacidad inhibitoria de peroxidación lipídica.

Las siguientes cuantificaciones fueron realizadas todas en el día octavo. Los resultados de la capacidad inhibitoria de peroxidación lipídica fueron positivos para ambos tratamientos con potencialidad de inhibir la peroxidación lipídica.

Los resultados para la fracción rica en flavonoides se resumen en la Figura 21. Se muestra en esta figura una comparación entre el malondialdehído cuantificado en las plantas control, en las plantas expuestas a cobre 2,0 mM (5mL) y en las plantas expuestas a cobre 2,0 mM (5mL) y 300 µg/mL (4mL) de una fracción rica en flavonoides.

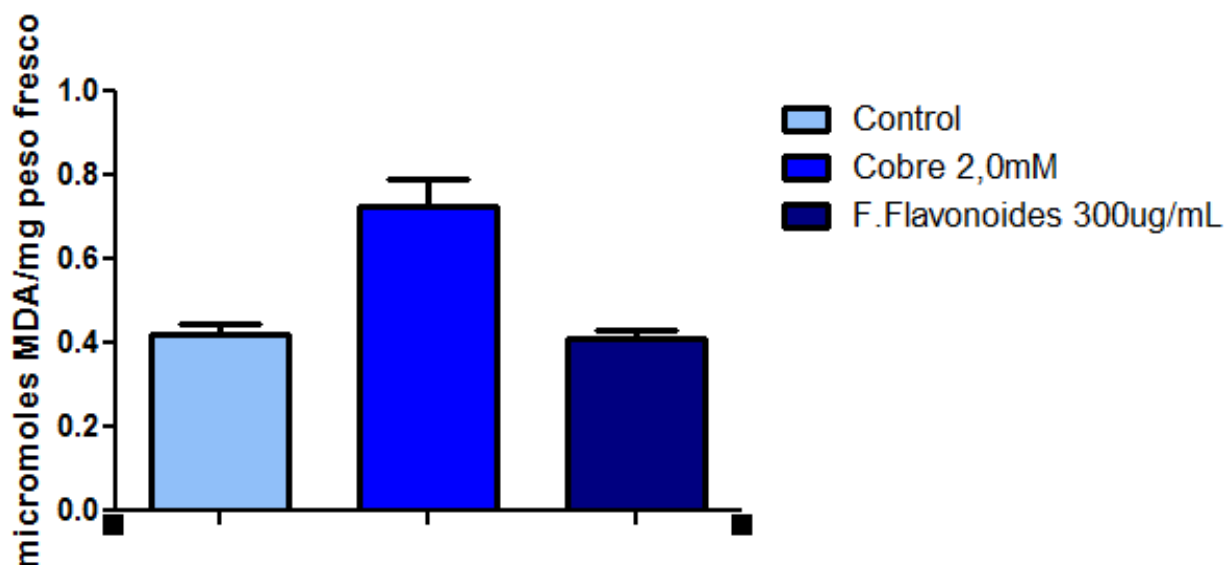


Figura 21. Comparativo para MDA (promedio y desviación estándar) según tratamiento: ausencia de cobre, cobre 2,0 mM, y cobre 2,0 mM en presencia de fracción rica en flavonoides.

Es de destacar en este experimento que la cantidad de MDA en plantas bajo estrés oxidativo inducido por cobre, retrocedió al nivel de las plantas control, es decir, al nivel de peroxidación lipídica natural de los procesos oxidativos en el metabolismo de la planta; tras efectuar un tratamiento de las mismas con una fracción rica en flavonoides.

Mediante un anova de un factor y un test de Tukey posterior a este, se obtuvo que, muestras (promedio de 12) sometidas a 2,0 mM de sulfato de cobre y 4 mL con 300 ug/mL no diferían significativamente de las plantas control ($P < 0,001$) en la cantidad de MDA por gramo de planta. Los resultados de anova se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Resumen del test de Tukey tras realizar un anova de un factor para evaluar la inhibición de peroxidación lipídica de una fracción rica en flavonoides.

Test de Turkey	Significativo? P < 0,05?	Resumen
Control vs Cobre 2,0mM	Si	P< 0.001
Control vs Flavonoide	No	ns
Cobre 2,0mM vs Flavonoide	Si	P< 0.001

Teniendo en cuenta lo citado anteriormente, es posible afirmar que los flavonoides tienen una acción inhibitoria reforzada, dado combinan la inhibición enzimática y la inhibición vía neutralización de radicales libres.

Por otro lado, los resultados para el compuesto tipo piridopirimidina, ácido 3-metil-2-metiltio-5-(4-metoxifenil)-4-oxo-3,4,5,8-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-7-carboxílico, se resumen en la Figura 22. Se muestra en esta figura una comparación entre el malondialdehído cuantificado en las plantas control, en las plantas expuestas a cobre 2,0 mM (5mL) y en las plantas expuestas a cobre 2,0 mM (5mL) y 400 μ M (4mL) de la solución en agua del compuesto tipo piridopirimidina mencionado.

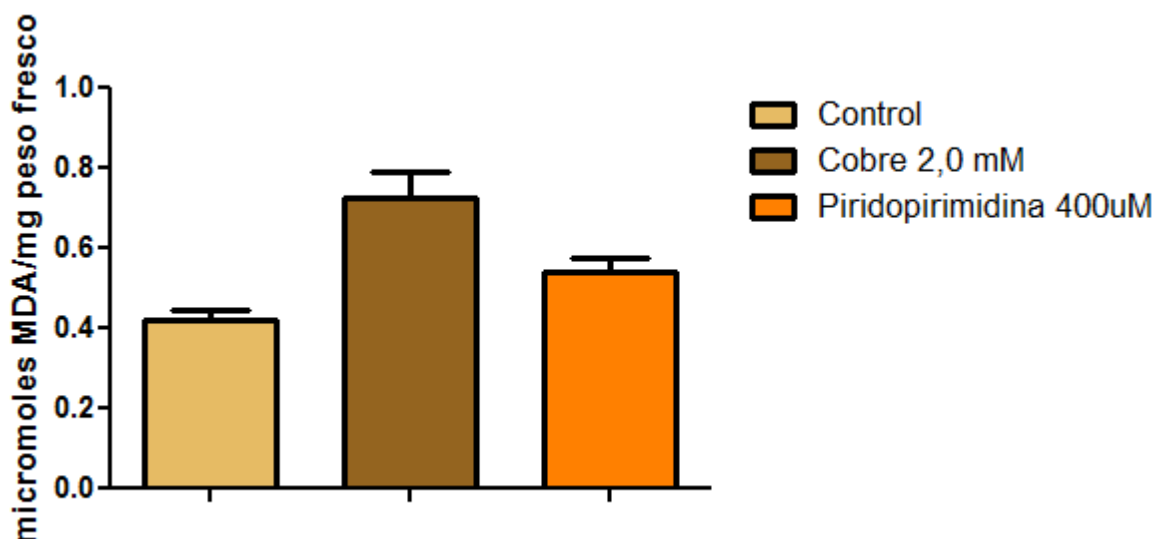


Figura 22. Comparativo para MDA según tratamiento: ausencia de cobre, cobre 2,0 mM, y cobre 2,0 mM en presencia de un compuesto tipo piridopirimidina

En este experimento la cantidad de MDA en plantas bajo estrés oxidativo inducido por cobre, retrocedió cerca al nivel de las plantas control, tras efectuar un tratamiento de las mismas con una compuesto tipo piridopirimidina en la concentración y cantidad empleada.

Mediante un anova de un factor y un test de Tukey posterior a este, se obtuvo que, muestras (promedio de 12) sometidas a 2,0 mM de sulfato de cobre y 4 mL con 400 uM no diferían significativamente de las plantas control ($P < 0,001$) en la cantidad de MDA por gramo de planta. Los resultados de anova se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Resumen del test de Tukey tras realizar un anova de un factor evaluar la inhibición de peroxidación lipídica de un compuesto tipo piridopirimidina.

Test de Turkey	Significativo? $P < 0,05$?	Resumen
Control vs Cobre 2,0 mM	Si	$P < 0.001$
Control vs Inhibidor 400uM	No	ns
Cobre 2,0 mM vs Inhibidor 400uM	Si	$P 0,01$ a $0,05$

Respecto al mecanismo mediante el cual la peroxidación lipídica es inhibida por los el ácido 3-metil-2-metiltio-5-(4-metoxifenil)-4-oxo-3,4,5,8-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-7-carboxílico, se sugiere la donación del protón del grupo ácido en la etapa de propagación de la reacción generando un radical en el compuesto tipo piridopirimida de mayor estabilidad que el radical de ácido graso poliinsaturado.

5. CONCLUSIONES

Se validó el método de N-metil-2-fenilindol con 1,1,3,3 tetrametoxipropano como método de cuantificación de malondilaldehído en *Pisum Sativum*.

El método de N-metil-2-fenil-indol para cuantificación de malondialdehído tiene un amplio rango lineal, 0,0078 – 1,0 μ M TMOP, con un 99,88 % de correlación.

El rango de evaluación de malondialdehído 0,0078 – 1,0 μ M TMOP tiene una ecuación, $Y = 1,724(\pm 0,01450) + 0,04339 (\pm 0,008780)$ y $r^2 = 0,9988$. Es decir que el 99,8 % de la variación de la respuesta es explicada por la recta de regresión.

Se obtuvo un valor pequeño del coeficiente de variación total (menor al 10%), por lo tanto el método tiene una reproducibilidad aceptable.

Dado que no se requiere el método de adiciones estándar para la cuantificación como se determinó con el paralelismo de la curva con adición de estándar y sin adición de estándar, no hay interferencias asociadas a la matriz lo que indica que las cuantificaciones son correctas. Se recomienda el uso de una curva de calibración con estándares externos.

Se determinó que el método es reproducible comparando mediante regresión lineal los parámetros pendiente e interceptos de dos curvas de calibración realizadas en días distintos obteniéndose una pendiente e intercepto grupal de 2,731 y 0,0334 respectivamente.

Se logró mejorar la sensibilidad en un factor de 12 atendiendo al cambio de inclinación de la pendiente dentro del rango lineal desde 0,2499 a 3,045.

Se determinó capacidad inhibitoria de peroxidación lipídica para una fracción rica en flavonoides y para un compuesto tipo piridopirimidina encontrándose que ambos revierten la cantidad de malondialdehído producida por *Pisum sativum* bajo condiciones de estrés oxidativo llegando a no tener diferencia significativa con plantas en ausencia a cobre.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Singh, S.; Tuteja N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology Biochemistry*, 48:909.
- [2] Whitacre, D. Reviews of Enviromental Contamination and Toxicology. Summerfield. Springer International Publishing. pp8
- [3] Roqueme, J.; Pinedo, J.; Marrugo, J.; Aparicio, A. (2014) Metales pesados en suelos agrícolas del Valle medio y bajo del río Sinú, departamento de Córdoba. Memorias del II Seminario de Ciencias Ambientales Sue-Caribe & VII Seminario Internacional de Gestión Ambiental, 108.
- [4] Erdelmeier, I.; Dominique, G.; Yadan, J.; Chaudiere, J. (1998) Reactions of N-Methyl-2phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hidroxyalkenals. Mechanistic Aspects of the Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.*, 11, 1184.
- [5] Jiri Sochor, Branislav Ruttkay-Nedecky, Petr Babula, Vojtech Adam, Jaromir Hubalek and Rene Kizek (2012). Automation of Methods for Determination of Lipid Peroxidation, Lipid Peroxidation, Dr. Angel Catala (Ed.), ISBN: 978-953-51-0716-3, InTech, DOI: 10.5772/45945. Available from: <http://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/automation-of-methods-for-determination-of-lipid-peroxidation>
- [6] Barylá et al. Evaluation of lipid peroxidation as a toxicity bioassay for plants exposed to copper
- [7] Rael, L. T.; Thomas, G. W.; Craun, M. L.; Curtis, C. G.; Bar-or, R.; Bar-or, D. Lipid Peroxidation and the Thiobarbituric Acid Assay : Standardization of the Assay When Using Saturated and Unsaturated Fatty Acids. *Biochem. Mol. Biol.*
- [8] Escobar, D.; Metabolitos secundarios mayoritarios con actividad antioxidante de *Psychotria macrophylla*. Jose Hipólito Isaza. Tesis de pregrado [impreso], Universidad del Valle, 2013, 45-46

- [9] Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview (2013), *The Scientific World Journal*, 6.
- [10] Sugihara, N.; Arakawa, T.; Ohnishi, M. Furuno, K. Anti and pro oxidative effects on flavonoides on metal induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with α -linoleic acid (1999) *Free radical Biology & Medicine*, 27(11/12): 1314.
- [11] Middleton, E.; Kandaswami, C.; Thoharides, T. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer (2000), *Pharmacological Reviews*, 52 (4) :712.
- [12] Jimenez, N.; Londoño, J.; Arango, G. Actividad Captadora de Radicales Libres y Citotoxicidad de Plantas Colombianas de la Familia Annonaceae. *Acta Farm. Bonaerense*. 2005, 24, 337.
- [13] The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. LGC (Teddington) Ltd, 1998, 16-28
- [14] Chapter 18 of J Zar, Biostatistical Analysis, 2nd edition, Prentice-Hall, 1984.
- [15] El test t student fue realizado usando GraphPad Prism version 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com
- [16] Rial, A.; Varela, J. Estadística práctica para la investigación en ciencias de la salud. Netbiblo: Oleiros, 2008, 119
- [17] Christopoulos, A.; Motulsky, H.J. Fitting models to biological data using linear and non linear regression: A practical guide to curve fitting. 2003, GraphPad software Inc., San diego, www.graphpad.com
- [18] Ammar, R.B.; Bhourri, W.; Sghaier, M.B. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) : A structure-activity relationship study (2009), *Food Chemistry*, 116:262.