

Actividad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler por el método de captura del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH●)

Martínez, M.¹; Mancuello, C.¹; Ramond, F.¹; Bednarczuk de Oliveira, V.²

¹Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales – Departamento de Biología – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad Nacional de Asunción (UNA) - Paraguay

²Programa de Post-Graduación en Ciencias Farmacéuticas– Departamento de Farmacia – Universidad Federal de Paraná (UFPR) - Brasil

E mail del autor: miguelangelquimi@hotmail.com

Actividad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler por el método de captura del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH●). Este trabajo describe el análisis *in vitro* del potencial antioxidante que presenta el extracto etanólico de la especie *Phoradendron bathyoryctum* Eichler, evaluado a través del método de captura del radical orgánico 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH●). Esta especie es utilizada como medicinal por la población paraguaya. La identificación botánica, así como el análisis morfoanatómico de la especie vegetal en estudio, fueron determinados en un trabajo anterior a éste por el equipo de investigación del autor principal del presente trabajo. Los ensayos *in vitro* demostraron que el extracto de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler posee la capacidad de captar el radical libre DPPH● de forma análoga al ácido ascórbico, utilizado como patrón de referencia. Aunque el poder neutralizante del extracto frente al radical DPPH● haya sido 36 veces menor comparado con el compuesto de referencia, demostró su poder antioxidante, lo que otorga al vegetal un valor agregado en el momento de ser consumido como medicinal por la población paraguaya. La IC₅₀ del extracto fue de 169 ± 1,0 µg frente a la IC₅₀ del ácido ascórbico cuyo valor calculado fue de 4,69 ± 0,03 µg. La capacidad de 50 µg de extracto vegetal de neutralizar el radical libre DPPH● fue del 39,7 ± 1,99% y finalmente se determinó que cada gramo de extracto de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler contiene un equivalente a 75.400 ± 3764 µg de ácido ascórbico.

Palabras clave: Ácido ascórbico (AA), DPPH●, IC₅₀, radical orgánico

In vitro antioxidant activity of ethanolic extract of *Phoradendron bathyoryctum* Eichler by the method of capture of the free radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hidrazyl (DPPH●). This paper describes the *in vitro* analysis of the antioxidant potential of the ethanolic extract of the species *Phoradendron bathyoryctum* Eichler, through the method of capturing the organic radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hidrazyl (DPPH●). This species is used as a medicinal plant by the Paraguayan population. The botanical identification and the morphotoanatomical analysis of the plant were determined in a previous work by the research team of the main author of this work. The *in vitro* assays demonstrated the *Phoradendron bathyoryctum* Eichler extract's ability to capture the DPPH● free radical in a way analogous to ascorbic acid (AA), used as a standard for this study. Although the neutralizing power of the extract was 36 times lower than that of the standard used, its antioxidant power was still demonstrated, which adds value to it as a medicinal plant. The IC₅₀ of the extract was 169 ± 1.0 µg vs. the IC₅₀ of AA whose estimated value was 4.69 ± 0.03 µg. The capacity of 50 µg of plant extract to inhibit the free radical DPPH● was 39.7 ± 1.99%, and it was determined that each gram of extract of *Phoradendron bathyoryctum* Eichler contains an equivalent to 75,400 ± 3764 µg of ascorbic acid.

Keywords: Ascorbic acid (AA), DPPH●, IC₅₀, organic radical

INTRODUCCIÓN

Las especies oxigénicas reactivas (ROS), formadas metabólicamente como intermediarios parcialmente reducidos, son especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado (radical libre) en un nivel energético superior y por tanto dotadas de propiedades paramagnéticas que les confieren una alta e indiscriminada reactividad. Las ROS producen diversas acciones sobre el metabolismo de los principios inmediatos, que pueden ser el origen del daño celular. Actúan sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas celulares, produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL); sobre los glúcidos, alterando las funciones celulares tales como las asociadas con la actividad de las interleuquinas y la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores; sobre las proteínas produciendo inactivación y desnaturalización; sobre los ácidos nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis (Gonzales, 2001)

Gran interés se ha centrado en el papel de los radicales libres y estrés oxidativo (Ferreira y Matsubara, 1997) en la etiología de diversas enfermedades como las cardiovasculares, el cáncer, la aterosclerosis, la inflamación y envejecimiento (Yunes, 2001).

La actividad proporcionada por ciertos metabolitos secundarios se produce por la capacidad que tienen estos compuestos para neutralizar o eliminar los radicales libres, además de presentar propiedades redox, presentan estructuras con los anillos de conexión y grupos carboxilo capaces de inhibir la peroxidación de lípidos (Garg *et*

al., 2012).

Los antioxidantes son sustancias que disminuyen o retardan las reacciones de oxidación sobre diferentes sustratos y pueden ser naturales o sintéticos. El DPPH• (Fig. 1) es el radical libre orgánico utilizado para llevar a cabo el ensayo, cuya propiedad le permite cambiar de su color inicial violeta a otro final amarillo (Fig. 2) en la medida que va reaccionando con los compuestos que poseen caracteres antioxidantes, lo que se aprovecha para determinar dicha actividad espectrofotométricamente.

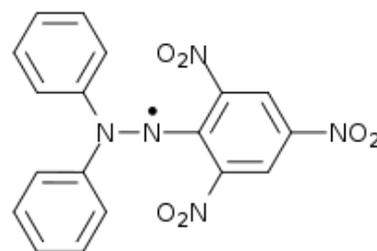


Fig. 1: Estructura química del radical orgánico libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH•)

El butilhidroxianisol (BHA), y el butil hidroxitolueno (BHT) son los antioxidantes sintéticos de mayor uso en la industria de alimentos y farmacéutica; sin embargo, se han encontrado efectos secundarios, como el aumento del colesterol, hepatomegalia e inducción de cáncer hepático, entre otras (Fuchs, 1998; Bush, 1998; Ito *et al.*, 1983); debido a esto, y a la creciente importancia de los antioxidantes en la industria farmacéutica y alimenticia es necesaria la búsqueda de moléculas alternativas de origen natural con gran actividad y que no tengan efectos citotóxicos, ni genotóxicos (Rojano, 2008a).

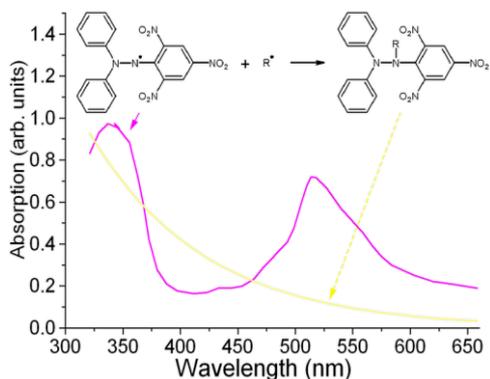


Fig. 2: Cambio de color del radical orgánico libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH●) cuando reacciona con compuestos con propiedades antioxidantes (Cowie 2008)

Los productos vegetales, son entonces una alternativa para usarlos como antioxidantes, ya que éstos poseen una variedad de compuestos como: antocianos, flavonoides, carotenoides, ácido ascórbico entre otros que pueden ser inocuos para la salud y que además, actúan a bajas concentraciones. Muchos antioxidantes son usados en la industria de alimentos por su capacidad conservadora; porque, retardan el proceso de rancidez, disminuyen la posibilidad de generación de compuestos tóxicos, evitan la decoloración de los pigmentos, no permiten los cambios en la textura, disminuyen la pérdida de valor nutricional causada por la degradación de los ácidos grasos esenciales y por la destrucción de las vitaminas A, E y D, ya que éstos y sus derivados encontrados en fuentes naturales se consideran como nutraceuticos (Parr y Bolwell 2000); (Benjamín Rojano. 2008)

La industria química en las áreas farmacéuticas y de alimentos, consideran que el crecimiento del mercado de los antioxidantes requiere de la educación

apropiada del consumidor y de investigaciones científicas pertinentes. Los estudios deben estar dirigidos a la búsqueda de compuestos puros o extractos activos como nuevas fuentes antioxidantes; y que a su vez, deben focalizarse hacia los beneficios que producen los antioxidantes en la salud de modo preventivo (Cornelli 2009).

La familia Viscaceae comprende 8 géneros con 450 especies. En la Argentina vive 1 género con 13 especies, 2 endémicas (Zuloaga y Morrone, 1999), alrededor de 60 a 70 géneros y cerca de 700 especies de distribución tropical y subtropical, especialmente en el hemisferio Sur (Cronquist, 1981).

La especie vegetal *Phoradendron bathyoryctum* Eichler (Viscaceae) consumida como medicinal por la población paraguaya es el objetivo de este nuevo estudio, el cual se enfocó a evaluar la actividad antioxidante del extracto etanólico obtenido a partir de sus hojas y ramas, con el propósito de conocer aún más sobre las propiedades de esta especie medicinal nativa del Paraguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales - Área Química Orgánica de los Productos Naturales del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción.

Material de estudio

Equipos

Espectrofotómetro UV-Vis modelo SHIMADZU serie 160 A. Vórtex HUMAN modelo Huma Twist GmbH.

Reactivos químicos

Metanol grado p.a. (Merck); Ácido ascórbico anhidro 99,0% (Merck) y el radical libre DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) (Sigma-Aldrich).

Materiales biológicos

La especie vegetal estudiada fue colectada en el distrito de Yukyty de la ciudad de Areguá del Departamento Central con coordenadas geográficas 25°19'39.26"S, 57°25'26.43"O, durante la estación de verano del año 2012.

El secado, envenenado y montaje del ejemplar fue realizado según metodología convencional para tratamiento de especímenes.

La identificación correcta del material vegetal se realizó con ayuda de un botánico (Bonifacia Benítez de Bertoni, UNA-Py.), paso indispensable antes del estudio fitoquímico, farmacológico y/o toxicológico, que garantiza la autenticidad de la especie utilizada en la investigación (Hostettmann, 2008).

Para la determinación taxonómica y la resolución de la problemática nomenclatural se utilizaron la Base de Datos del Missouri Botanical Garden, Tropicos (2014) y The Plant List (2013)

El material testigo de la especie vegetal en estudio quedó depositado como muestra (MMN°:08) permanente en el Herbario FACEN del Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción.

Caracterización morfológica de la especie vegetal

La morfo-anatomía vegetal constituye un campo de estudio de gran importancia para el reconocimiento preciso de las especies vegetales, desde el punto de vista del proceso de desarrollo de tejidos y órganos. La caracterización botánica es el primer paso para la verificación de la autenticidad del espécimen vegetal con el que se trabaja, en este sentido es muy importante disponer de patrones micrográficos como referencia (World Health Organization, 1998), en todo trabajo relacionado a productos naturales de origen vegetal. Con referencia a lo mencionado por la OMS, es relevante la caracterización morfológica de la especie *Phoradendron bathyoryctum* Eichler, para lo cual se siguió la metodología convencional de caracterización morfológica, con observación directa y al microscopio estereoscópico (Argüeso, 1986).

Caracterización anatómica foliar y caulinar

El material fue hidratado con agua destilada por 4 horas. Se realizaron cortes transversales a mano alzada de hojas, se diafanizaron con disolución de hipoclorito de sodio al 2,5% y posteriormente se aplicó tinción directa con disolución de safranina al 1%. Las láminas fueron montadas con la técnica gelatina-glicerina (Argüeso A. 1986) y depositadas en el herbario FACEN (CPN°:12). Las microfotografías fueron tomadas con cámara digital MOTICAM 352 incorporada al microscopio óptico y editadas con el software Motic Images Plus 2.0 (Motic China Group, 2006).

Preparación del material vegetal y extracción de los componentes solubles en etanol

El material vegetal en estudio fue secado a temperatura ambiente, con escasa aireación y bajo sombra, para evitar la acción del oxígeno, la luz, la temperatura y microorganismos; factores que podrían transformar los compuestos originales en artefactos (Hostettmann 2008). Las hojas secas fueron molidas con la ayuda de un molino de cuchillas convencional, con el propósito de aumentar la superficie de contacto, así como la eficiencia de extracción.

Se pesó 20 g. del micropolvo, usando como solvente de extracción etanol 96°. Este procedimiento se repitió tres veces con la misma muestra (extracción exhaustiva), se juntaron los filtrados, cada filtrado se realizó en un embudo de filtración con vidrio sinterizado de 0,45 µm. Los extractos fueron concentrados en un rotavapor a 40 °C y fueron almacenados a 4 °C durante el periodo de estudio.

Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del radical libre DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

Se empleó el método de Brand-Williams, Cuvelier, y Berset (1995) con algunas modificaciones: cambio de concentración de la solución de DPPH• y proporciones de los volúmenes de mezcla. El 1,1-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•), es un radical libre estable que presenta una coloración púrpura en medio metanólico, como consecuencia de la donación de un electrón o un protón por un compuesto con poder antioxidante la tonalidad desaparece convirtiéndose en color amarillo (Fig. 2). Este procedimiento se llevó a cabo utilizando 500 µL de una

concentración inicial de 1000 µg del extracto.(mL)⁻¹ y 2,5 mL de una solución metanólica de DPPH• (3,9 mg%). Como blanco se utilizó la misma cantidad de solución DPPH• y 500 µL del medio de disolución de la muestra (metanol). Luego de 30 minutos de reacción en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente, se procedió a la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 517 nm. Para la construcción de la curva de calibración, fueron preparadas cinco soluciones metanolicas de ácido ascórbico en un intervalo de concentración de 6,0 a 14,0 µg.(mL)⁻¹.

Para cada muestra estudiada se calculó el porcentaje de inhibición del radical por medio de la siguiente ecuación:

$$\%I = 100 - \left[\frac{(A_m - A_b) \times 100}{A_c} \right]$$

Donde:

%I = Porcentaje de inhibición del radical DPPH•

A_m = Absorbancia de la muestra

A_b = Absorbancia del blanco

A_c = Absorbancia del control

La determinación de la IC₅₀, es decir, la concentración de la muestra o estándar que provoca 50% de inhibición de la concentración inicial de DPPH• se obtuvo por regresión lineal de los puntos representados gráficamente.

Para los puntos representados en la curva de calibrado, se utilizaron los valores medios obtenidos de triplicados realizados para cada ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación taxonómica y caracterización anatómica de la especie *Phoradendron bathyoryctum* Eichler

Tanto la identificación taxonómica, así como el estudio morfoanatómico afirmaron que la especie en estudio se trata de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler (Fig. 3), y se la describió de la siguiente manera: plantas epífitas, sub-arbustos, con órganos que le permiten estar hundido en las ramas del hospedante, en este caso en las de la especie vegetal *Patagonula americana* L.

Tallos verdes fotosintetizadores. Hojas de color verde intenso, de 70-90 x 20-30 mm, con dos catáfilos en la base. Entrenudos comprimidos, 65 mm entre un nudo y otro. Hojas asimétricas elípticas arqueadas, con nervadura casi invisible, se visualizan recién en hojas secas, las más jóvenes carnosas y las más adultas son coriáceas, las del extremo de la rama tienen el ápice puntiagudo, algunas hojas de las ramas tienen un pequeño mucrón, el resto de las hojas su ápice es redondeado, con peciolo y base atenuada.



Fig. 3: Planta de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler

Inflorescencia en espiga. Frutos globosos pseudobaya color naranja. En cuanto a la caracterización anatómica caulinar la epidermis es uniestrata, compuesta por células cuadrangulares y presencia de estomas del tipo paracítico. El parénquima cortical está constituido por células redondeadas, con casquetes de fibras esclerenquimáticas y agrupaciones de braquiesclereidas, coincidiendo con lo mencionado por (Gómez 2011). El haz vascular es del tipo colateral abierto, está dispuesto alrededor de la medula formando un anillo discontinuo. En la parte central se halla la medula formada por tejido parenquimático.

En referencia a la caracterización anatómica foliar la epidermis es uniestratificada, con células de contorno rectos, estomas del tipo paracítico presentes en ambas caras de la hoja, la caracterizan como anfiestomática, coincidiendo con lo mencionado por (Gómez 2011). El Índice Estomático (IS , en $N = 26$) para la cara adaxial es 4,00 (8,08) 10,81; y para la cara abaxial es 5,66 (9,35) 13,04.

El mesófilo isobilateral, compuesto de células parenquimáticas cuadrangulares, con presencia de cristales de oxalato de calcio del tipo drusas. El haz vascular se encuentra rodeado por fibras perixilemática y perifloemática (Martínez 2013).

Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del radical libre DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

La curva de calibrado: Porcentaje de inhibición (PI) Vs. Concentración de Ácido ascórbico (AA) en μg (Fig. 4), obtenido a partir de las diversas disoluciones patrón de este compuesto, generaron los siguientes datos: ecuación de regresión lineal (ERL):

PI = 10,9[AA] – 1,07 y un valor de coeficiente de correlación lineal (r) igual a 0,997.

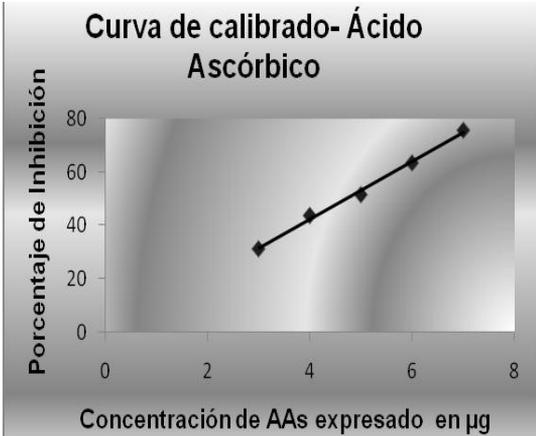


Fig. 4: Curva de Calibrado obtenido a partir de disoluciones patrón de ácido ascórbico (AA)

Los parámetros obtenidos de la curva de calibrado: Porcentaje de inhibición (PI) Vs. Concentración de extracto crudo (EC) en µg (Fig. 5) fueron: ecuación de regresión lineal (ERL): PI = 0,298[EC] – 0,595 y un valor de coeficiente de correlación lineal (r) igual a 0,995.

En valor de la IC₅₀ calculada para el ácido ascórbico utilizado como patrón fue de 4,69 ± 0,03 µg y la IC₅₀ calculada para el extracto crudo correspondiente a la especie vegetal en estudio generó un valor de 169 ± 1,0 µg.

Los valores de IC₅₀ obtenidos indican que el extracto crudo de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler es 36 veces menos antioxidante en referencia al ácido ascórbico (AA) utilizado como patrón en este experimento, debido al elvado poder reductor que lo llevó a ocupar un importante lugar dentro de los compuestos considerados como protector contra la oxidación, pero sin

despreciar que el extracto de la especie vegetal en estudio demostró buenas propiedades antioxidantes, es decir que tiene la capacidad análoga al ácido ascórbico de capturar el radical DPPH●, valor agregado del vegetal al momento de ser consumido por la población paraguaya.

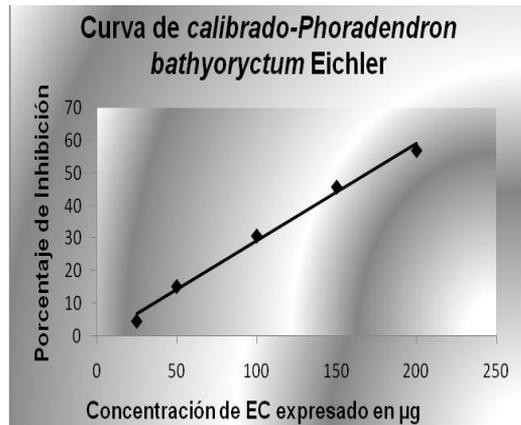


Fig. 5: Curva de Calibrado obtenido a partir de soluciones de extracto crudo (EC) de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler

Por otro lado se concluye que 50 µg de extracto crudo posee la capacidad de inhibir el 39,7 ± 1,99% del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH●) y finalmente que cada gramo de extracto de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler contiene un equivalente a 75.400 ± 3764 µg de ácido ascórbico (AA).

El ensayo de la actividad secuestradora del radical orgánico libre DPPH●, representa un test de predicción del poder antioxidante, pudiendo ser empleado para *screening* de productos naturales, tornandose importante como test preliminar para la determinación del potencial antioxidante de un extracto, fracción o sustancia pura (Paula. 2015).

BIBLIOGRAFÍA

- Argüeso A., D'A. 1986. *Manual de Técnicas en Histología Vegetal*. Buenos Aires: Hemisferio Sur.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, y C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28 (1): 25-30.
- Bush, R. 1998. *Adverse reactions to food and drug additives, in Allergy. Principles and Practice*. 5th ed. St. Louis: Mosby.
- Cornelli, Umberto. 2009. Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in Dermatology, Neutraceuticals: Part II*, 27 (2): 175-94. doi:10.1016/j.clindermatol.2008.01.010.
- Cowie, J. 2008. *Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials*. 3rd ed. Scotland, Ucrania: CRC Press.
- Cronquist, A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York, Columbia University Press.
- Ferreira, A. L. A., y L. S. Matsubara. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 43 (1): 61-68.
- Fuchs, Jürgen. 1998. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, l-ascorbic acid and beta-carotene in cutaneous photoprotection. *Free Radical Biology and Medicine* 25 (7): 848-73.
- Garg, Deepa, Ayesha Shaikh, Aditya Muley, y Thankamani Marar. 2012. In-vitro antioxidant activity and phytochemical analysis in extracts of Hibiscus rosa-sinensis stem and leaves. *Free Radicals and Antioxidants* 2 (3): 41-46.
- Gómez, M. 2011. Anatomía de especies mexicanas de los géneros Phoradendron y Psittacanthus, endémicos del Nuevo Mundo. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 1203-18.
- Hostettmann, K. 2008. *Manual de estrategias para el aislamiento de productos naturales bioactivos*. Bogotá-Colombia: Convenio Andrés Bello.
- Ito, Nobuyuki, Shoji Fukushima, Akihiro Haqlwara, Michiko Shibata, y Tadashi Ogiso. 1983. Carcinogenicity of Butylated Hydroxyanisole in F344 Rats. *Journal of the National Cancer Institute* 70 (2): 343-52.
- Martínez, M. 2013. Estudio espectrofotométrico de la actividad hemolítica del extracto crudo de Phoradendron bathyoryctum Eichler sobre eritrocitos humanos. *Revista Steviana* 5: 114-21.
- Parr, Adrian J, y G Paul Bolwell. 2000. Phenols in the Plant and in Man. The Potential for Possible Nutritional Enhancement of the Diet by Modifying the Phenols Content or Profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (7): 985-1012.
- Paula, Cristiane da Silva, Vanessa Cristina Dias Canteli, Beatriz Cristina Konopatzki Hirota, Ranieri Campos, Vinicius Bednarczuk de Oliveira, Milena Kalegari, Cristiane Bezerra da Silva, Geciani Miriam Silva, Obdulio Gomes Miguel, y Marilis Dallarmi Miguel. 2015. Potencial antioxidante in vitro das folhas da Bauhinia unguilata L. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 35 (2): 217-22.
- Rojano, B. 2008a. Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae* 1 (15): 173-81.

- Rojano, Benjamín, Jairo Saez, Guillermo Schinella, Jairo Quijano, Ederley Vélez, Andrea Gil, y Rafael Notario. 2008. Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol). *Journal of Molecular Structure* 877 (1–3): 1-6.
- The Plant List. 2013. Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org> (accessed 1st January).
- Tropicos. 2014. En: www.mobot.org/Name/100234908.
- Yunes R. 2001. Plantas Medicinales sobre la óptica de la química medicinal moderna. Chapecó (SC): Argos Editora Universitária 325 pp.
- Zuloaga, Ferdinando O. & Osvaldo Morrone (eds.). 1999. Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina. Vol 2.2, 623 - 1269 pp.