615
L66

INFORME SOBRE LA MEDIDA DE CAPACIDAD PROTECTORA ANTIOXIDANTE DE ALGUNOS EXTRACTOS CRUDOS DE ESPECIES ENCONTRADAS EN RASTROJOS BAJOS DE LOS VALLES DE SAN NICOLAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLIN
DEPTO. DE BIBLIOTECAS
BIBLIOTECA "EFE" GOMEZ

TRABAJO PRESENTADO POR

LUIS FERNANDO LOPEZ FRANCO
PROFESOR ESCUELA DE FÍSICA
FACULTAD DE CIENCIAS

2006

UNAL - Medellin
64001000028886

I
615.321
L66

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLIN
DEPTO. DE BIBLIOTECA
BIBLIOTECA "EFE" C

INFORME SOBRE LA MEDIDA DE CAPACIDAD PROTECTORA ANTIOXIDANTE DE ALGUNOS EXTRACTOS CRUDOS DE ESPECIES DE RASTROJOS BAJOS

RESUMEN

La capacidad protectora antioxidante de extractos crudos de plantas provenientes de rastrojos, se cuantificó mediante un método biofísico que consiste en medir la absorbancia de los productos de la lipoperoxidación de membranas biológicas que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico, y relacionar los cambios en esta absorbancia con la inhibición de la oxidación.

Los resultados muestran gran capacidad protectora para algunos extractos tales como los de las hojas de mora de monte, salvia marga, diente de león, guascas y venturosa que inhiben casi totalmente la oxidación, y para los cuales se sugiere profundizar en sus actividades biológicas.

El método utilizado tiene la ventaja de mostrar como se desarrolla la oxidación bajo la actividad de los extractos en el tiempo.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLIN
DEPTO. DE BIBLIOTECAS
BIBLIOTECA "EFE" GOMEZ

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de hierbas de rastrojo es hoy día particularmente importante por la demanda creciente de productos derivados de ellos y la necesidad de encontrar alternativas válidas para la agricultura tradicional en áreas marginales.
Se han usado muchas hierbas de rastrojo desde tiempos antiguos para propósitos diferentes. Al presente ellos son principalmente usados para la producción de jarabes para alcoholes o bebidas suaves y aceites esenciales para perfumes y dulces. Ellos también son empleados como fuentes de principios activos para la producción de drogas y pesticidas, así como en la medicina alternativa y como aditivos aromáticos en la comida.
El creciente interés en la búsqueda de sustancias naturales como fuentes de protección contra el daño celular ocasionado por agentes peligrosos para el organismo, valida la búsqueda del presente trabajo cuyos resultados proporcionan más valor agregado a los productos que verdaderamente representan la riqueza de estas regiones.

El oxígeno que inhalamos para respirar está sometido a la posibilidad de que parte se convierta en agente Altamente Reactivo, ya que el oxígeno puede aceptar menos de cuatro electrones (Stadler1998), que es lo que requiere para ser una molécula estable, y puede formar metabolitos reactivos llamados radicales libres que no obstante ser producido en procesos naturales puede desencadenar reacciones no deseadas en algunos sitios específicos de producción de estas sustancias, formando superóxido que dismuta a peróxido de hidrógeno(Halliwell 1996) y extendiéndose como fuego que se propaga en un bosque. Este proceso se conoce como Explosión oxidativa.
Cuando los mecanismos de defensa de la célula no controlan la producción de ROS se produce el llamado estrés oxidativo, que en recientes investigaciones se a relacionado con daño, envejecimiento y muerte celular programada (Kowaltowski, Castilho,Versesi 2001),(Suleiman, Halestrap,Griffiths 2001)
Los daños producidos por esta especie reactiva del oxigeno, se asocian con enfermedades como: Arteriosclerosis, Cáncer, Artritis, Parkinson, Alzheimer, Retinopatía, etc.((Barja 2002), (Elliot 1999)

El organismo en ocasiones utiliza los agentes reactivos para atacar agentes más peligrosos de enfermedades, pero la sobreproducción de estos agentes debe ser controlada y para ello se usan los llamados ANTIOXIDANTES que ayudan de diferentes maneras a controlar "la propagación de estas especies reactivas del oxigeno". (Barclay et al 1997)

Los agentes peligrosos que en general se conocen como RADICALES LIBRES, no sólo se producen por los organismos vivos, pueden ser generados por ondas electromagnéticas y por metales de transición ; de ahí que los antioxidantes tengan aplicabilidad tanto en la medicina, la industria farmacéutica, de conservación de alimentos (Pszczola 1998) como en la industria petroquímica y de pinturas, etc.

De especial interés son los antioxidantes de origen natural (Kang et al 2002)que resultan seguros, económicos y de alta actividad, para reemplazar los sintéticos tales como el Hidroxianisol de butilato (BHA) y el Hidroxitolueno de butilato (BHT), muy utilizados por su eficiencia a bajas concentraciones, pero que son carcinogénicos. Las plantas representan una alternativa para la búsqueda de antioxidantes porque son fuentes ricas en compuestos químicos orgánicos bioactivos y son biodegradables hasta productos no tóxicos, resultando de gran utilidad en la conservación de alimentos e industria farmacéutica y más aún cuando los agentes protectores manifiestan otras propiedades en sus usos etnobotánicos.
En los organismos vivos los antioxidantes son moléculas que la célula utiliza para controlar los radicales libres; son capaces por ejemplo de ceder al radical libre un electrón, convirtiéndose ellas en radicales libres pero estables en esta forma , cesando la propagación de la oxidación.

En el presente trabajo se mide la capacidad protectora antioxidante de extractos crudos disueltos en agua, de algunas especies de rastrojo bajo en la Subregión de los Valles de San Nicolás que presentan usos en la medicina tradicional autóctona.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

LA LIPOPEROXIDACIÓN

Se conoce como lipoperoxidación a la introducción de un enlace peroxil (O-O) en una molécula de lípido. El proceso se inicia con una reacción de abstracción de átomo, donde el radical libre ($X^{\bullet}$) extrae un átomo de hidrógeno al lípido, ubicado en las membranas, convirtiendo a este último en un radical libre. Luego de la formación del liporadical se produce un reordenamiento de la molécula. El nuevo radical libre, de ácido graso, rápidamente reacciona con el oxígeno molecular y se convierte en un radical peroxil de ácido graso .(Smith 1992)

MEDIDA DE LOS PRODUCTOS DE LA LIPOPEROXIDACIÓN QUE REACCIONAN CON EL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO.

Este método utiliza el ácido tiobarbitúrico (TBA) para medir los aldehídos, productos estables de la lipoperoxidación. El TBA forma un complejo cuando reacciona con aldehídos como el malondialdehído (figura 1). El producto de la reacción del TBA tiene un pico de absorbancia a 533nm; a simple vista presenta un color rosado (Yagi 1998).

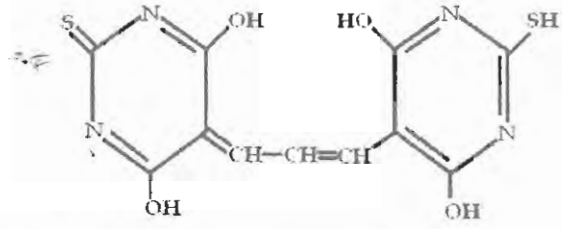


FIGURA 1. Estructura del producto obtenido de la reacción de malondialdehído con el TBA (Tomado de Yagi 1998).

El protocolo empleado en la medida de la actividad antioxidante, fue tomado de Lapenna *et al.* (2001) y se le hicieron pequeñas modificaciones;. La absorbancia reportada para las muestras en un determinado tiempo será la medida a 532nm menos el valor de la absorbancia de fondo (ecuación 1).

$$A = A_{533} - \left(A_{560} + [560 - 533] \times \frac{A_{500} - A_{560}}{560 - 500} \right) \qquad (1)$$

La figura 2 es una curva típica de absorbancia versus longitud de onda, donde se muestra la línea recta utilizada para eliminar la absorbancia de fondo a 533nm, y de donde se obtuvo la ecuación 1.

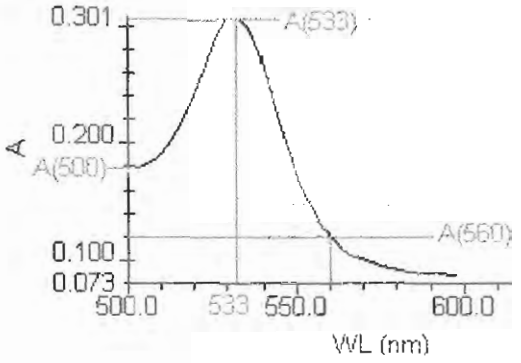


FIGURA 2. Esquema para medir el pico de absorbancia a 533nm

La actividad protectora, que expresa en porcentaje qué tanto protege un antioxidante, fue medida de acuerdo a la ecuación 2 (Daglia et al) :

$$\%AP = \frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \times 100 \qquad (2)$$

Este es un método sencillo usado clínicamente para investigar lipoeroxidación mediada por radicales y estrés oxidativo en muerte. Generalmente se utiliza la oxidación de plasma humano, pero a pesar de su sencillez y sensitividad presenta especificidad inadecuada, por lo que en el presente trabajo se usaron membranas de cerebro de ratas, y se utilizaron los agentes protectores antioxidantes (extractos) para medir cuanto incendio pueden apagar; el porcentaje de extinción será el valor de la capacidad protectora antioxidante. Brevemente:
La absorbancia máxima dela luz, para los productos de MDA y TBA se da en una longitud de onda de 532 nm. Es decir que entre más productos haya de MDA y TBA, la absorbancia será mayor y ésta disminuirá con la protección antioxidante que presenten los extractos analizados. Para disminuir el ruido por la absorbancia de fondo se resta la absorbancia promedio entre 500 y 550 nm. La absorbancia neta es inversa a la capacidad antioxidante.

MATERIALES UTILIZADOS

- Membranas biológicas (homogenizado de cerebro de ratas).
- Extractos de plantas recolectadas.
- Reactivos para inducir la oxidación y para suspenderla
- Equipo: pHímetro, balanza de precisión, baño de María, agitadores, nevera, calentador, destilador, centrífuga, espectrofotómetro, pipetas., etc.

MEMBRANAS BIOLÓGICAS:
Se separa el cerebro de rata y se homogeniza con buffer tris-Hcl, 125mM, pH 7.4 en proporción de un gramo de cerebro por 4 ml de buffer.

LOS EXTRACTOS:
Se secaron al medio ambiente por un mes las muestras recolectadas. Las muestras secas se fragmentaron con un molino casero y se mezclaron con agua destilada que se mantuvo a 90° en tubos de ensayo y en permanente agitación. Luego se sometió cada muestra a centrifugación de 2500 rpm por 30 minutos, y el sobrenadante se almacenó a 0° C para las mediciones. La concentración inicial utilizada fue de 0.2 gr. De muestra por 4 ml de agua.

OXIDACIÓN DE LAS MEMBRANAS:
A 2 ml de buffer tris Hcl (pH 7.4) 125mM, en permanente agitación se le adicionan 50 µl de solución de membranas y el extracto (La referencia es un control al que no se le adiciona extracto) buscando inicialmente la menor concentración con manifestación antioxidante . Cuando el porcentaje de inhibición de la oxidación de las muestras analizadas sobrepasó el 95% se disminuyó la concentración de los extractos comenzando con 250 µg de antioxidante/ml de buffer.
Se adiciona entonces .5mM de ascorbato tris (pH 7.4) y se inicia la lipoperoxidación con 10µM de $FeCl_3$. A partir de este momento se toman Alícuotas a los 0, 10, 20 y 30 minutos de iniciada la oxidación.

FIN DE LA OXIDACIÓN Y REACCIÓN DE LOS PRODUCTOS CON TBA:
Las alícuotas (500µl) se colocan en tubos de ensayo, permanentemente en hielo, que contienen 2ml de ácido fosfórico al 1% (pH 1.2), 1ml de sln. Acuosa de TBA al .3% y .5mM de BHT para prevenir oxidaciones fuera de tiempo y no deseadas.

MEDIDA DE LA ABSORBANCIA:
La reacción del TBA con los productos de la lipoperoxidación, colorea hacia el rosado intenso, y se manifiesta al calentar las muestras a 90 ° C en Baño de María durante 30minutos. A las muestras enfriadas y sometidas a sedimentación se les mide la absorbancia a 500, 532, y 550 nm.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN
DEPTO. DE BIBLIOTECA
BIBLIOTECA "EFE" GÓM

3. RESULTADOS

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla siguiente con la concentración final escogida para cada muestra. En esta tabla aparecen los valores complementarios de los propuestos por la fórmula utilizada (2), para representarlos en la forma convencional de % de oxidación en el eje vertical.

Una lectura horizontal de la tabla permite observar el comportamiento de la lipoperoxidación bajo el efecto de cada uno de los extractos y se presenta en gráficas individuales .

Una lectura vertical sobre todo en los 10 y 20 minutos permite comparar la capacidad protectora de las muestras, teniendo en cuenta sus concentraciones finales. Los datos del tiempo cero realmente corresponden a algunos segundos de oxidación antes de tomar la alícuota correspondiente. En la tabla aparecen los valores de oxidación al cabo de 30 minutos, solo para aquellas muestras que se consideran de interés por su alta efectividad.

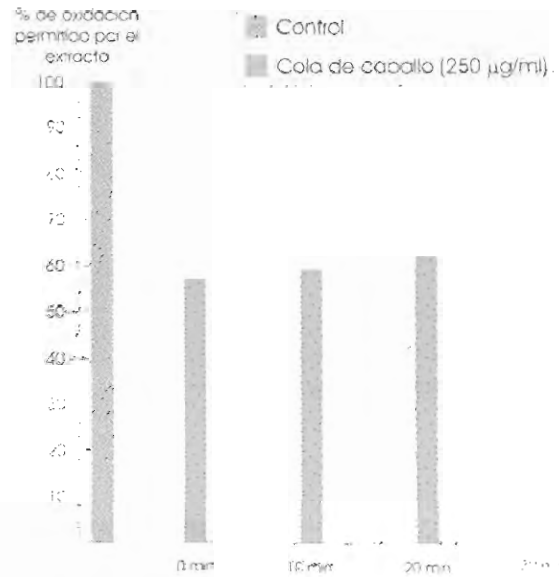
Muestra	Conc. (µg/ml)	%Oxid. 0 min	%Ox.. 10 min	%Ox.. 20 min	%Ox.. 30 min
Control		100	100	100	100
Venturosa	25	48	16	14	17
Mastranto	25	50	23	24	36
Mora de Monte	25	50	10	6	7
Verbena	25	48	17	13	57
Guascas	50	50	17	18	14
Cola de caballo	250	57	59	62	
Diente león	250	45	12	12	15
Salvia amarga	250	53	15	10	12
Cura hígado	250	71	95	97	
Tomatera	250	89	79	77	
Micay	250	88	77	86	
Colchón de pobre	250	92	58	43	
Yuyo quemao	250	90	88	86	
Cerraja	250	64	37	47	
Mentolín flores	250	59	93	100	
Marrubio Blanco flores	250	60	47	43	
Diente león Raiz	250	80	58	54	
Sarpoleta	250	89	97	89	
Acedera	250	89	100	100	
Cordoncillo blanco	250	90	17	26	44
Hoja santa	250	89	65	74	
Llantén flores	250	90	25	31	56
Verbena	250	60	22	27	40
Mentolín	250	60	60	50	

Tabla: Concentración de los extractos y porcentaje de protección contra la oxidación

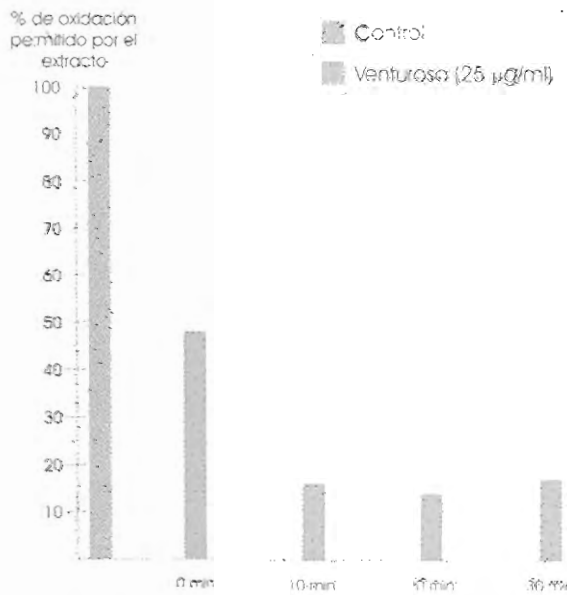
Los datos presentados en la concentración escogida, se deben a tres ensayos independientes para cada extracto, cuando la actividad protectora era alta, los demás se deben a dos ensayos independientes.

LAS MUESTRAS RECOLECTADAS, ALGUNOS DE SUS USOS TRADICIONALES Y GRAFICAS DE SUS ACTIVIDADES PROTECTORAS

1. Cola de Caballo: Según su uso tradicional "es remineralizante, se usa para limpiar la sangre, el hígado, cicatrizante, su decocción en gárgaras limpia la garganta, es indicada para lavar los ojos, tiene poderes antinfecciosos, es antituberculosa".

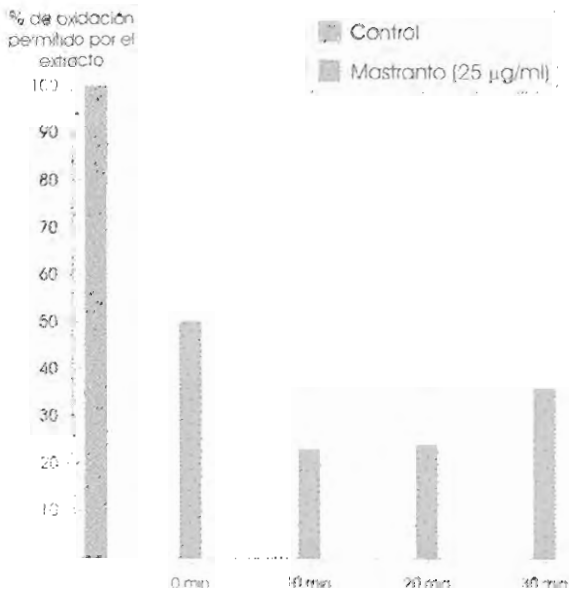


2. Venturosa: Usos: "la venturosa desinflama las articulaciones. En baños sirve para desinflamar tendones, para la artritis y la gota.



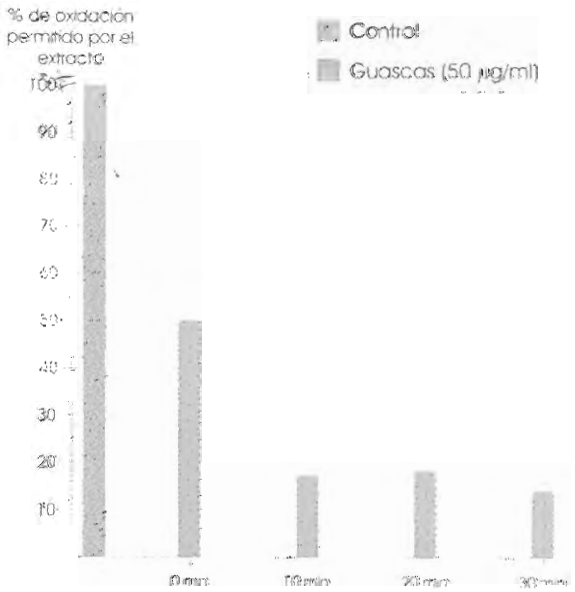
3. Mastranto:

Usos "Se usan las flores y los cogollos para tratar la presión alta".



4. Guascas:

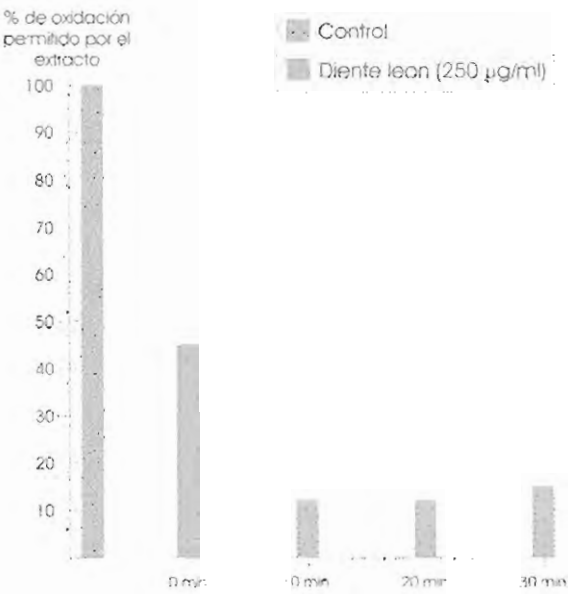
"Es diurética y se usa como condimento".



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN
DEPTO. DE BIBLIOTECAS
BIBLIOTECA "EFE" GOMEZ

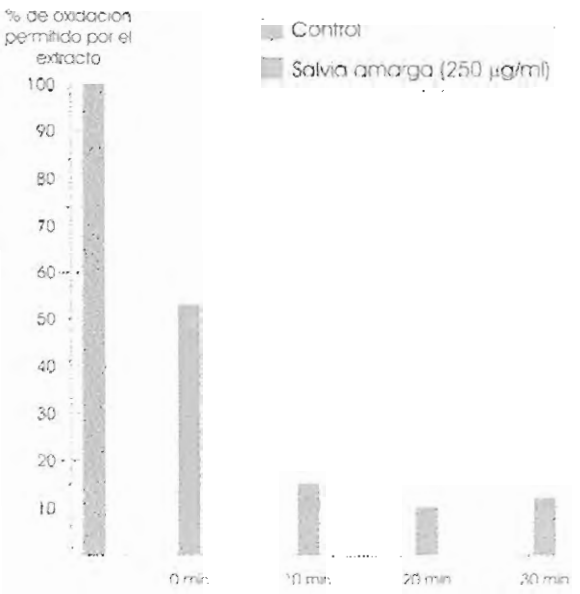
5. **Diente de León**

"Sus hojas en infusión son diuréticas, muy indicado en las convalecencias, limpia la sangre y el hígado".



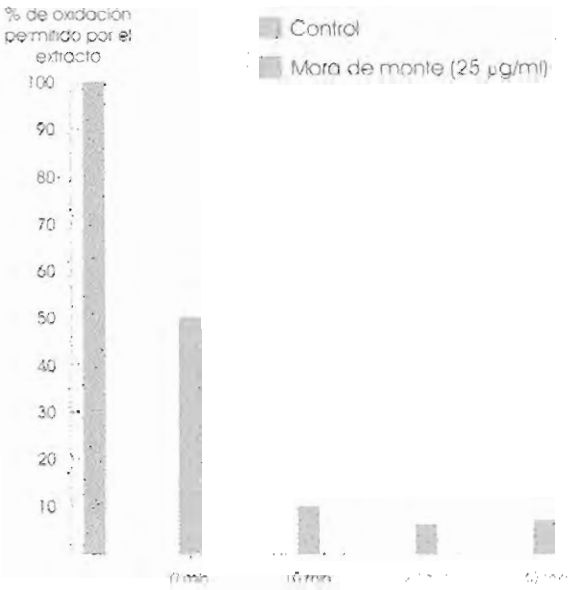
6. **Salvia amarga:**

Indicada para los tumores, es desinflamatoria, en emplastos es indicada para problemas de las coyunturas, golpes o inflamaciones. Es hemostática, detiene la sangre de las heridas, es refrescante, tónica y muy rica en minerales. Usada en baños. Aspirando sus vapores se curan los problemas respiratorios.



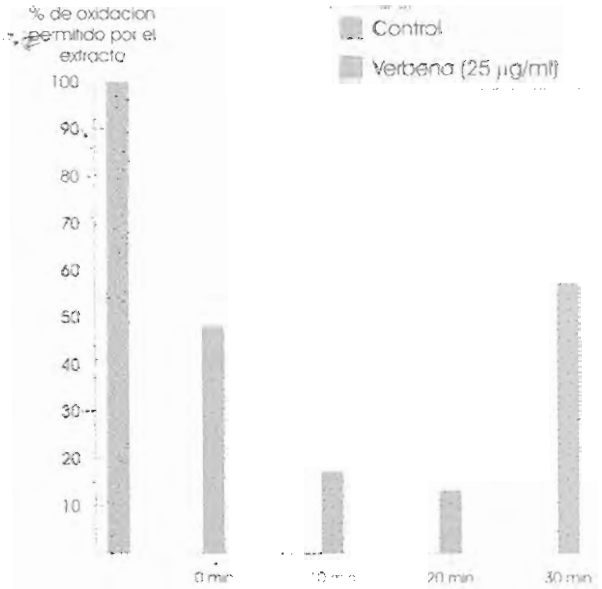
7. Mora de monte:

Sus hojas se usan para la diabetes, tomada en infusión. El emplasto caliente aplicado sobre la cabeza cura el dolor.



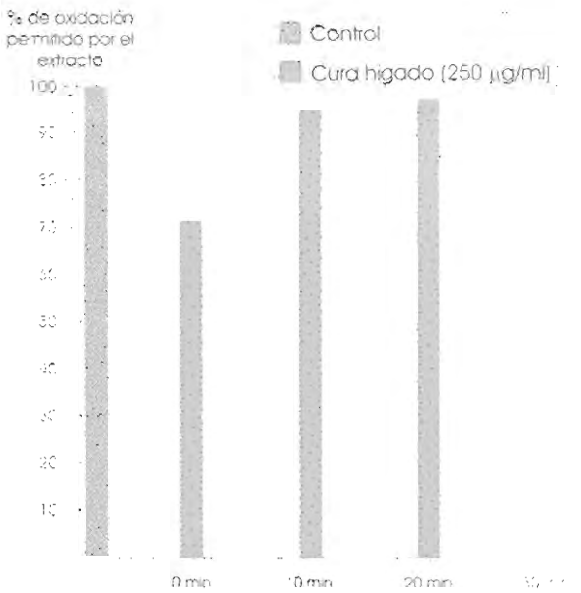
8. Verbena (Flores):

Sus flores tienen poderes somníferos y relajantes



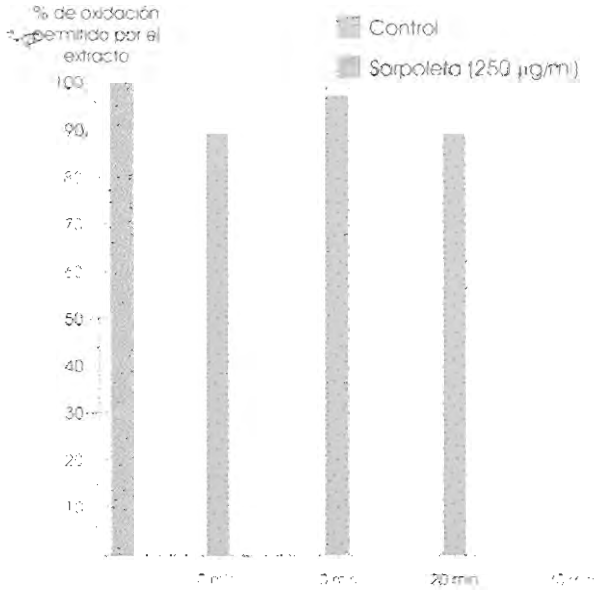
9. Cura Hígado:

Sus hojas en infusión sirven para tratar el hígado y la diabetes.



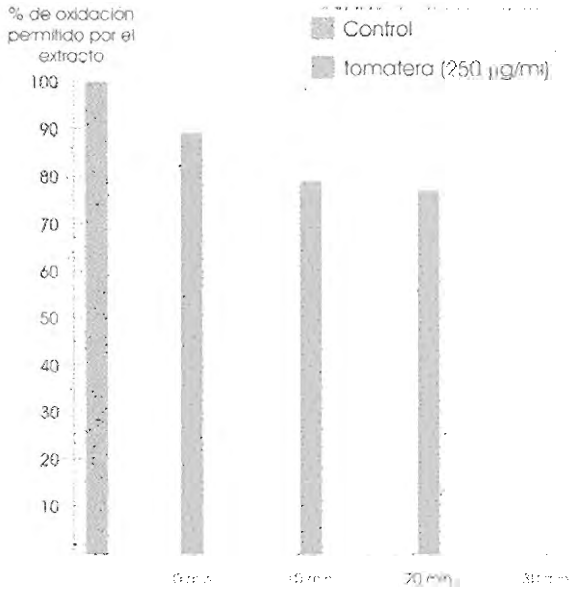
10. Sarpoleta:

Se toma para aumentar la leche materna y para la tos.



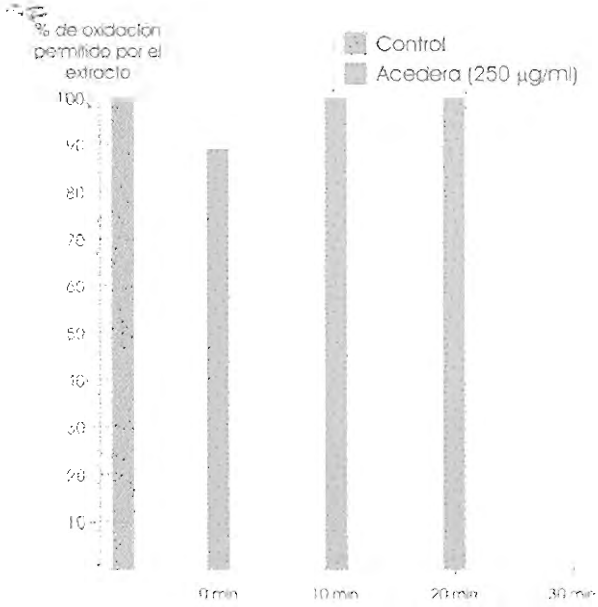
11. Tomatera:

Sus hojas en infusión son antiinflamatorias, en gárgaras sana las encías y aftas en la boca.



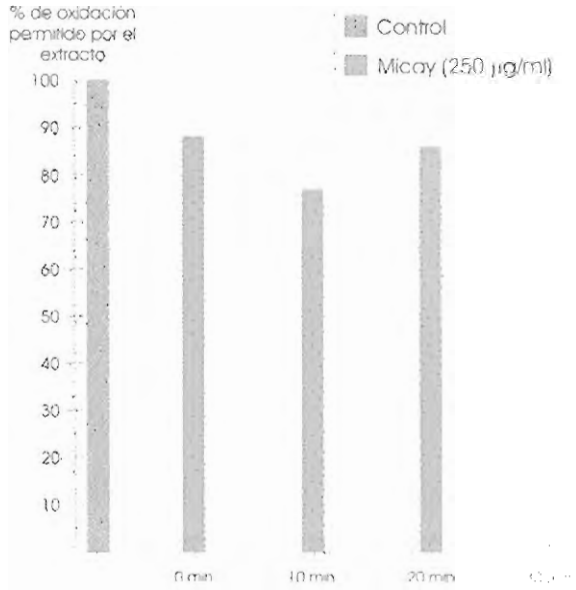
12. Asedera:

Su consumo desinflama el colon, se usa como antidiarreico. Se consume como bebida refrescante.



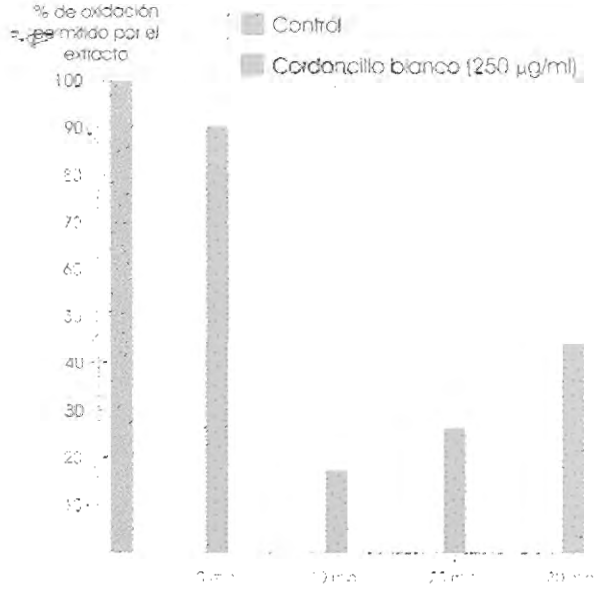
13. Micay:

Sirve para problemas del riñón tomado en decocción, se usa para estados gripales y febriles.



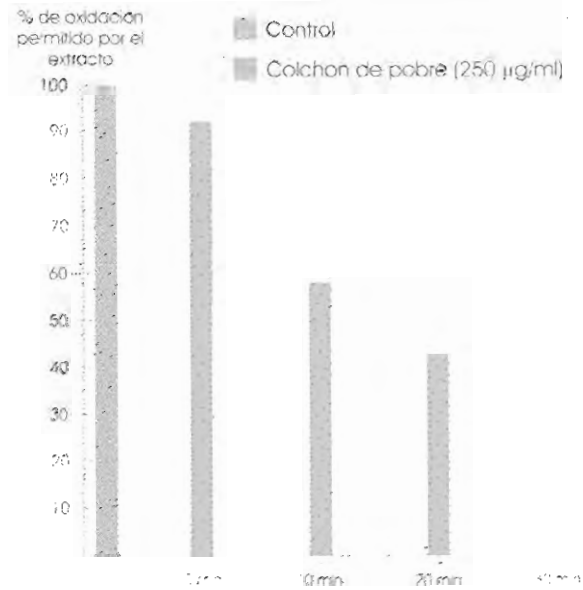
14. Condoncillo Blanco:

Antiinflamatorio. Se usa toda la planta para baños.

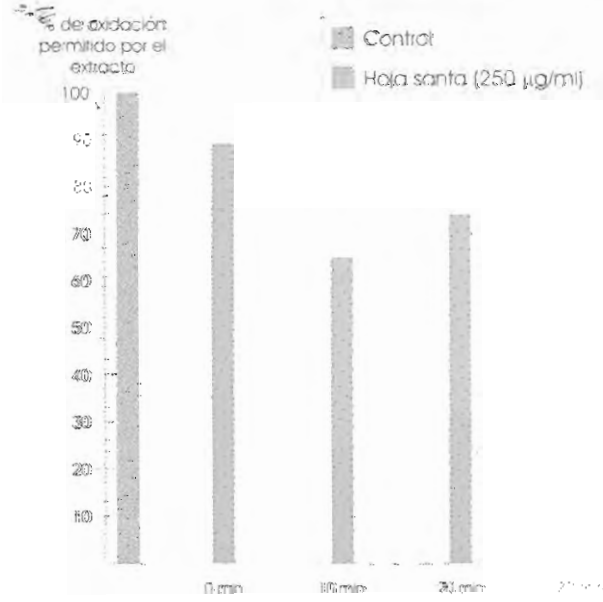


UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN
DEPTO. DE BIBLIOTECAS
BIBLIOTECA "EFE" GOMEZ

15. **Colchón de pobre:**
Se usa en baños para las neuralgías de la cabeza y migrañas puesto en compresas.

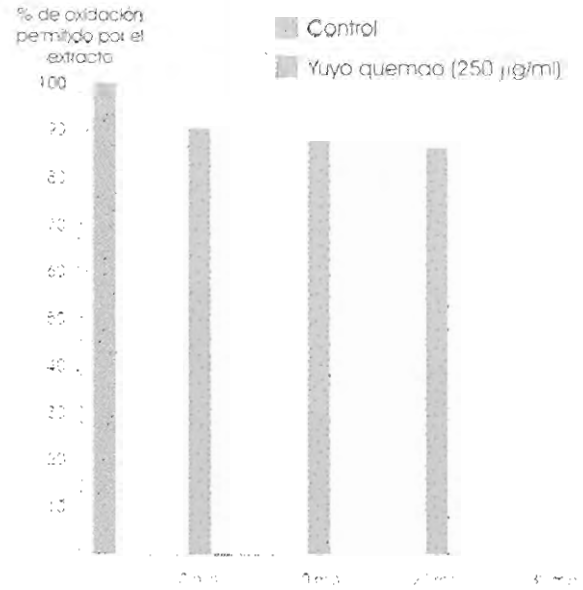


16. Hoja Santa :
Aplicada la hoja sobre la cabeza alivia jaquecas, sirve para suavizar la piel. Detiene hemorragias, sacaclavos y alivia las vías respiratorias en forma de jarabe.



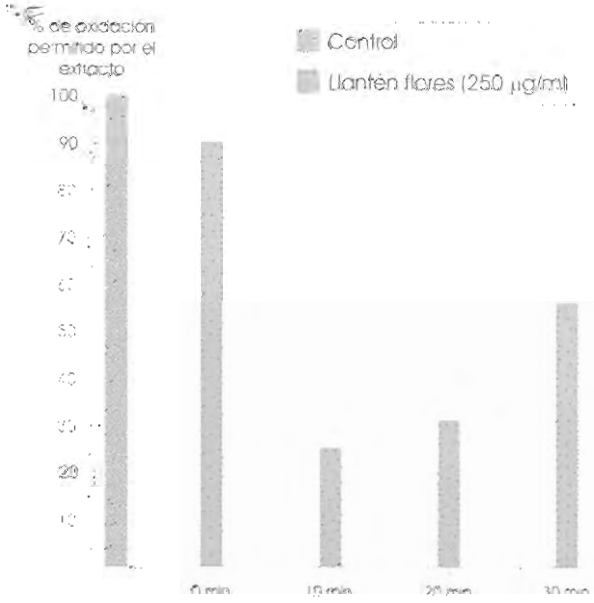
17. **Yuyo Quemao:**

Sus hojas tienen un efecto anestésico, se usa para tratar los dolores de muela, sus flores en tisana se usan para tratar la presión.



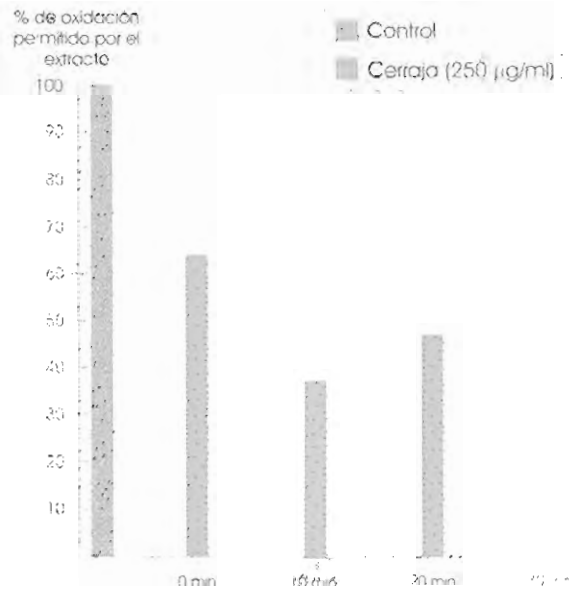
18. **Llantén**

Ulceras gástricas. Para todo tipo de heridas. En jarabe se usa para problemas pulmonares.



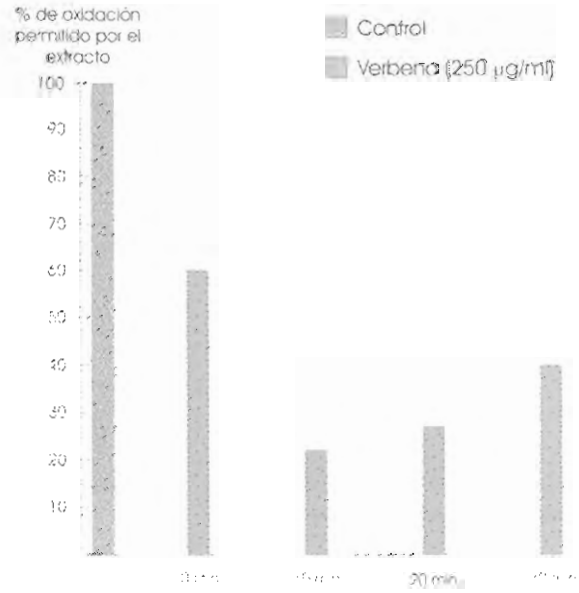
19. Cerraja:

Previene el bocio, indicado para la debilidad del corazón, problemas de estreñimiento y ulceras varicosas.



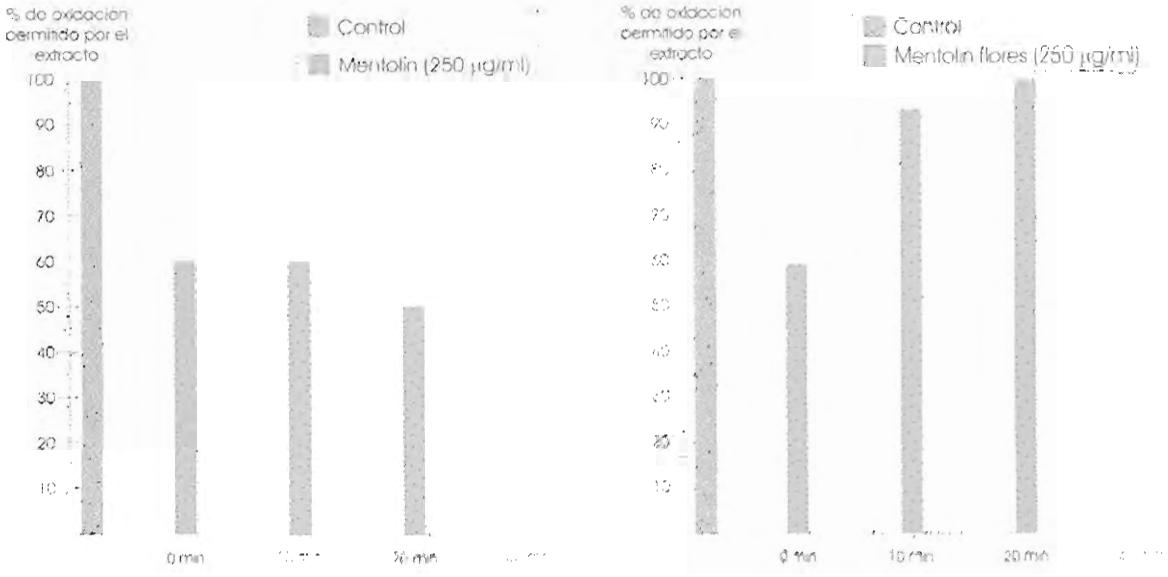
20. Verbena (Hojas):

En tisana sirve para problemas de páncreas e hígado, se usa en compresas para el dolor de cintura.



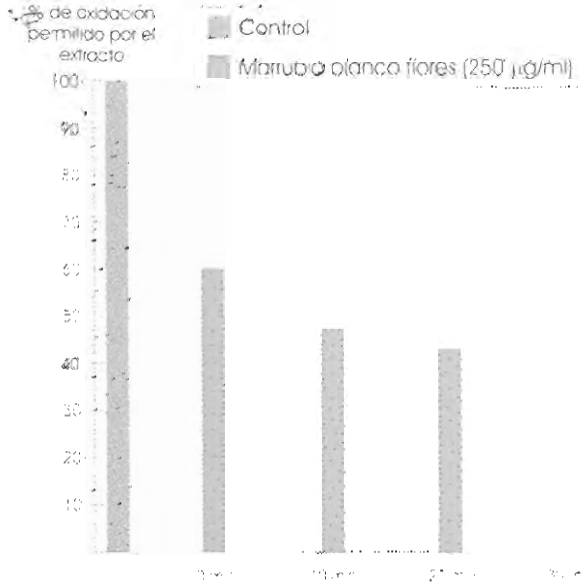
21. Mentolin o Estrellita:

Toda la planta en infusión tiene efectos antiinflamatorios, muy indicada para problemas de la próstata, alivia la retención de orina.

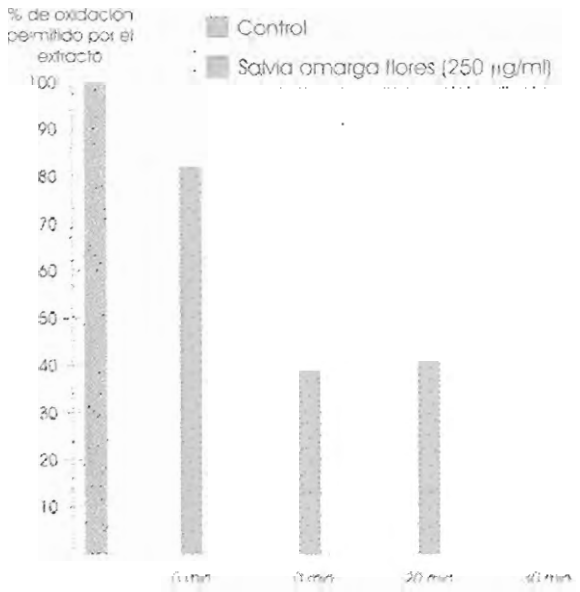


22. Marrubio Blanco:

Su infusión calma la tos fuerte, desinflama el colon, antiinflamatorio de los tejidos blandos, desinflama matriz y ovarios.

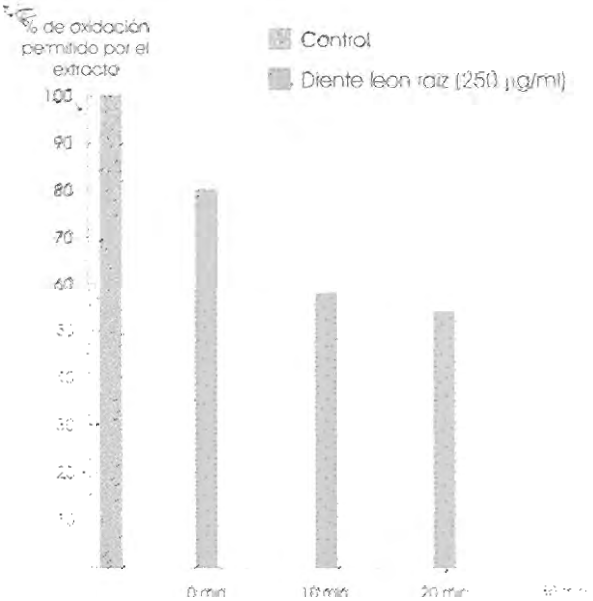


23. Salvia Amarga (flores):

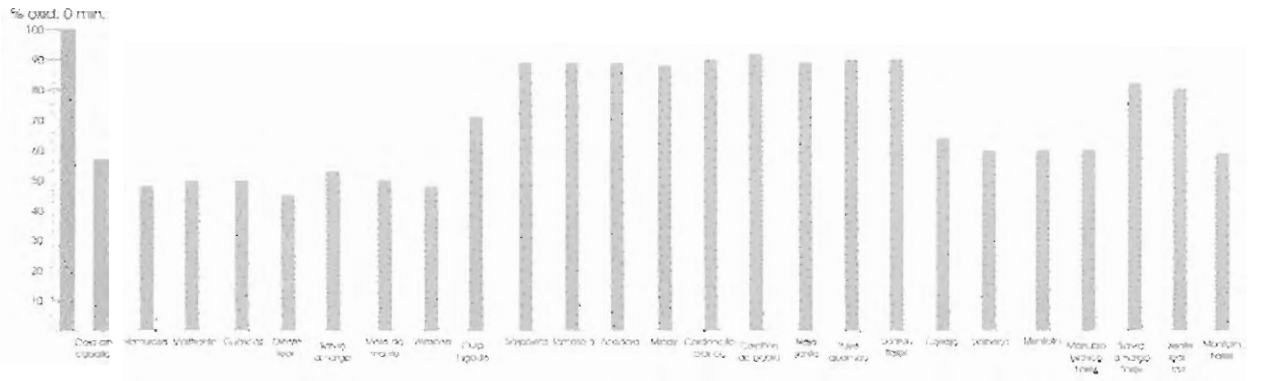


24. Diente de león (raíces):

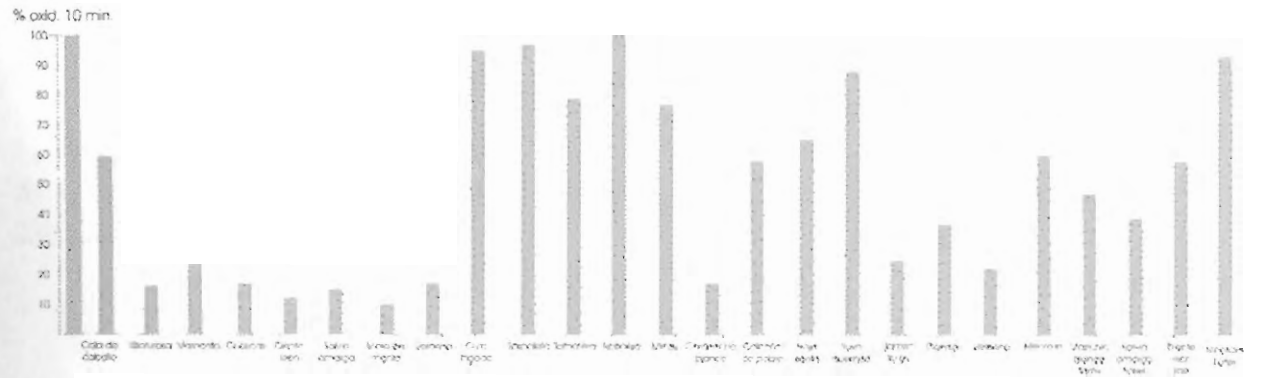
Pulverizadas se usan en tizanas para regular la presión arterial y la diabetes.



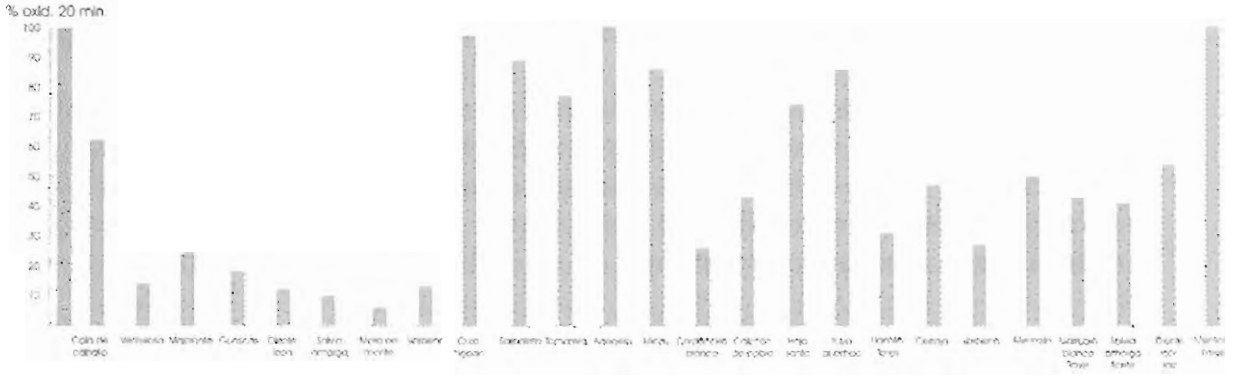
PORCENTAJESDE OXIDACIÓN INICIALES PERMITIDOS POR LOS EXTRACTOS



PORCENTAJES DE OXIDACIÓN PERMITIDOS POR LOS EXTRACTOS A LOS 10 MINUTOS



PORCENTAJES DE OXIDACIÓN PERMITIDOS POR LOS EXTRACTOS A LOS 20 MINUTOS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN
DEPTO. DE BIBLIOTECAS
BIBLIOTECA "EFE" GOMEZ

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

El método empleado para medir la capacidad antioxidante ha sido utilizado ya para la medición de la protección antioxidante de extractos de "Lauráceas" y se ha validado con la medición simultánea del consumo de oxigeno (López y Espinosa).

Aunque este método no puede aclarar en que forma especifica protege una muestra contra la propagación de radicales en membranas (lipoperoxidación), la medida es fiable porque se basa en la reacción de coloración de los productos de la lipoperoxidación, que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico que es inverso con el pico de absorbancia a 532 nm medido en un espectofotómetro de buena precisión.

Se encontraron entonces algunos extractos que presentaron muy buena capacidad antioxidante incluso para concentraciones finales de extracto de 25µg/ml, estas fueron: La venturosa (hojas), mastranto (hojas), la mora de monte (hojas) y la verbena (Flores).

Las hojas de guascas presentan también buena capacidad protectora hasta concentraciones de 50 µg/ml; igualmente, ocurre con las hojas de Salvia amarga para concentraciones finales de 250 µg/ml.

Las hojas de diente de león, presentaron muy buena actividad protectora así como extractos de "cordoncillo blanco", las flores de "llantén" y las hojas de la verbena.

Por lo general los buenos antioxidantes mencionados, permiten una oxidación cercana al 50% en el tiempo cero e inhiben aún más dramáticamente la oxidación con el tiempo a diferencia de las demás muestras. Esta persistencia en el tiempo indica que no se ha agotado el poder protector analizado.

Las muestras de Colchón de pobre, hojas de cerraja, flores de marrubio blanco y flores de Salvia amarga presentaron actividad media en la concentración final de 250 µg/ml.

RECOMENDACIONES

Para estas muestras podría disminuirse aun más la concentración, pero también valdría la pena profundizar más la investigación sobre estos extractos toxicidad, capacidad, ionofórica, mecanismo de protección, propiedades antitumorales y anticancerígenas etc.

De especial interés por inhibir casi completamente la oxidación de las membranas durante todo el tiempo y con muy baja concentración (25µg/ml), aparecen las hojas de MORA DE MONTE, y las hojas de VENTUROSA. Se recomienda analizar más profundamente las propiedades de este par de muestras.

La actividad protectora del resto de muestras fue muy baja e incluso el extracto de Mentolín parece haber promovido la oxidación en lugar de protegerla, lo que resulta interesante también para posteriores investigaciones.

La socialización de los resultados puede realizarse al acompañar la información que se ofrezca sobre estos productos de rastrojo, con la información obtenida en el presente trabajo.

Debe esclarecerse en los casos que amerite, porqué en el tiempo cero de oxidación el porcentaje de protección ya se registra tan alto.

5. BIBLIOGRAFIA

Barclay LRC, Antunes F, Egawa Y, McAllister KL, Mukai K, Nishi T y Vinqvist MR. 1997. The efficiency of antioxidants delivered by liposomal transfer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1328: 1-12.

Barja G. 2002. Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction. *Ageing Research Reviews* . 1: 397–411.

Elliot J.G. 1999. Application of antioxidants vitamins in foods and beverages. *Food Technology*. 53 (2): 46-48.

Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 16:33-50

Kowaltowski AJ, Castilho RF y Vercesi AE. 2001. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters*. 495: 12-15

Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Giambernardino MA, Cuccurullo F. 2001. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radical Biology & Medicine*. 31 (3): 331-335.

Moslen MT. Protection against free radical-mediated tissue injury. Parte de: Free Radical Mechanism of Tissue Injury. Editado por: Moslen MT y Smith CV. CRC Press. United States of America: 1992. Pág. 203-215.

Penn JS. Oxygen-induced retinopathy in the rat: a proposed role for peroxidation reactions in the pathogenesis. Parte de: Free Radical Mechanism of Tissue Injury. Editado por: Moslen MT y Smith CV. CRC Press. United States of America: 1992. Pág.177-188.

Pszczola D.E. 1998. Ingredients antioxidants take center stage. *Food Technology*. 52 (5):

Smith CV. Free Radical Mechanism of Tissue Injury. Parte de: Free Radical Mechanism of Tissue Injury. Editado por: Moslen MT y Smith CV. CRC Press. United States of America: 1992. Pág.2-22.

Stadler I. Oxygen Consumption Methods. Parte de: Methods in Molecular Biology, vol. 108: Free Radical and Antioxidant Protocols. Editado por Armstrong D. Humana Press. Totowa, New Jersey: 1998. Pág. 3-13.

Taylor AA y Shapell SB. Reactive oxygen species, neutrophil and endothelial adherence molecules, and lipid-derived inflammatory mediators in myocardial ischemia-reflow injury. Parte de: Free Radical Mechanism of Tissue Injury, Editado por: Moslen MT y Smith CV. CRC Press. United States of America: 1992. Pág.65-141.

Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. Parte de: Methods in Molecular Biology, vol. 108: Free Radical and Antioxidant Protocols. Editado por Armstrong D. Humana Press. Totowa, New Jersey: 1998. Pág. 101-106.