

Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de *Palicourea guianensis* (Rubiaceae)

Evaluation of antioxidant activity of *Palicourea guianensis* (Rubiaceae) extracts

Lic. Lina Marcela Giraldo Vásquez, Dr. C. Luz Stella Ramírez Aristizabal

Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira-Risaralda, Colombia.

RESUMEN

Introducción: la proliferación de radicales libres en el cuerpo humano induce daños oxidativos a las biomoléculas que provocan daños a nivel celular y generan diversas anomalías en el organismo, como arterosclerosis, envejecimiento y cáncer.

Actualmente, la búsqueda por moléculas con características antioxidantes es cada vez mayor, donde las plantas representan una de las principales fuentes de compuestos.

Objetivo: determinar la actividad antioxidante y el contenido de fenoles de los extractos de diferentes polaridades de la parte aérea de la especie *Palicourea guianensis* (Rubiaceae).

Métodos: para la evaluación de la actividad biológica, se calcularon los valores de concentración media inhibitoria (IC₅₀) de los extractos más activos mediante los métodos de captura de electrones DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y ABTS (ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico). Adicionalmente, se determinó la concentración de fenoles totales presentes en los extractos a través del método de Folin-Ciocalteu.

Resultados: los extractos en acetato de etilo (PgAEF) y en agua (PgAF) presentaron mayor actividad antioxidante con valores de IC₅₀ de 5 207 y 3 912 mg/L respectivamente. Asimismo, se observó una relación directamente proporcional entre la concentración de fenoles totales presentes en los extractos y la actividad antioxidante exhibida.

Conclusiones: las especies de la familia Rubiaceae, especialmente *P. guianensis*, son una fuente promisoriosa e importante de metabolitos secundarios con capacidad antioxidante, por lo cual se requieren de mayores estudios que permitan identificar dichas sustancias e integrarlas a programas de terapia antioxidante en el área de la salud.

Palabras clave: actividad antioxidante, *Palicourea guianensis*, DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu.

ABSTRACT

Introduction: the proliferation of free radicals in the human body induces oxidative damage to biomolecules that cause damage at the cellular level and can generate various abnormalities in the body, such as atherosclerosis, aging and cancer. Currently, the search for molecules with antioxidant properties is increasing, where the plants are a major source of compounds.

Objective: to determine the antioxidant activity and phenolic content of extracts of different polarities from the aerial part of *Palicourea guianensis* (Rubiaceae) species.

Methods: for evaluation of the biological activity, the values of the mean inhibitory concentration (IC₅₀) of the most active extracts were estimated by the methods of electron capture DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid). Additionally, the total phenol concentration present in the extracts was determined using the Folin-Ciocalteu reagent.

Results: the extracts in ethyl acetate (PgAEF) and in water (PgAF) showed higher antioxidant activity with IC₅₀ values of 5 207 and 3 912 mg/L respectively. Furthermore, there was direct relationship between the concentration of total phenols present in the extracts and the antioxidant activity.

Conclusions: *Rubiaceae* family species, especially *P. guianensis* are a promising and important source of secondary metabolites with antioxidant capacity, so further studies are required to identify these substances and integrate them to the antioxidant therapy programs of the health areas.

Key words: antioxidant activity, *Palicourea guianensis*, DPPH, ABTS, Folin-Ciocalteu.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se han logrado avances significativos para obtener sustancias químicas o biológicas que sean menos tóxicas para el ambiente, el hombre, y más selectivas respecto a los propósitos que se persiguen. Uno de esos propósitos es encontrar formas naturales de prevenir la proliferación de radicales libres en el cuerpo humano, pues se ha demostrado que dichos radicales libres pueden inducir daños oxidativos a las biomoléculas y estos daños pueden causar diversas anomalías en el organismo, como arterosclerosis, envejecimiento, cáncer e incluso llegar a provocar daño a nivel celular.¹ Esto ha despertado gran interés en la obtención de productos de origen natural que contribuyan al desarrollo de nuevos antioxidantes, que permitan combatir la proliferación de radicales libres en el organismo y que al mismo tiempo sean compatibles con el medio ambiente.

Por este motivo se desarrolló el presente estudio, centrado en la investigación de la planta *Palicourea guianensis*, una especie distribuida en países como México,

Colombia, Venezuela, Brazil, Bolivia y Las Antillas.² Esta pertenece a la familia Rubiaceae, del género *Palicourea*. Colombia es el país con mayor número de especies de este género con cerca de 130, presentes en todas las regiones y altitudes hasta las zonas de páramo; su mayor diversificación se localiza en la región andina entre los 1 000 y 2 000 m de altitud.³ Con este estudio se pretende contribuir con el conocimiento de las especies de este género, pues tanto la familia Rubiaceae, como el género *Palicourea*, presentan antecedentes en diferentes actividades biológicas, como antimicrobiana y antimicótica,^{4,5} razón por la cual se espera encontrar resultados positivos en la actividad antioxidante evaluada.

Constituye objetivo de este trabajo determinar la actividad antioxidante y el contenido de fenoles de los extractos de diferentes polaridades de la parte aérea de la especie *Palicourea guianensis* (Rubiaceae).

MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Las hojas de *P. guianensis* se colectaron en el jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira el 24 de abril de 2009 y una muestra de este material fue enviado al Herbario Nacional de Colombia, en donde fue identificada con el registro COL 519790.

El material recolectado se dejó secar a temperatura ambiente por 8 días. Posterior a esto, se secó en estufa a 50 °C durante 2 h;⁶ finalmente las hojas secas se molieron y almacenaron.

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se homogeneizaron 600 g del material almacenado, se dividió en 6 porciones de 100 g para facilitar la extracción. A cada porción se adicionó 6 L de metanol en porciones sucesivas de 1 L y se extrajo en el ultrasonido durante 20 min (Fisher Scientific, modelo FS60H). Finalmente se filtró a gravedad y se redujo el volumen mediante rotaevaporación hasta un total de 1,8 L. El extracto obtenido en metanol fue llevado a 2 L adicionando agua y fue fraccionado a través de extracciones líquido-líquido con diferentes solventes, obteniendo los extractos en: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y acuoso. Posteriormente se fraccionó el extracto acuoso con el empleo de una columna de DIAION HP-20, y se obtuvo un total de 17 fracciones.

DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

A cada una de las muestras se aplicó el siguiente procedimiento:^{7,8} 50 µL de muestra más 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N. Después de 1 min, se adicionó 750 µL Na₂CO₃ al 20 % (p/v) y se aforó a 5,0 mL con agua. Luego de 30 min de incubación a 25 °C, se midió absorbancia a 760 nm y se comparó con una curva de calibración usando soluciones patrón de ácido gálico (50-600 mg/L). El contenido de fenoles totales se determinó como los equivalentes de ácido gálico (GAE, miligramo de ácido gálico/gramo de extracto), y los valores se presentaron como la media de los datos del análisis realizado por triplicado.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La evaluación de la capacidad de captura del radical libre DPPH se realizó según el método planteado por *Brand-Williams* y otros.⁹ La determinación de los porcentajes de inhibición de las muestras evaluadas se realizó según la expresión matemática:⁷

$$\% \text{ inhibición radical DPPH} = \left[1 - \frac{A_m - A_{bm}}{A_r - A_{br}} \right] * 100$$

donde:

A_m : absorbancia de las muestras

A_{bm} : absorbancia del blanco de muestra

A_r : absorbancia de las soluciones de referencia

A_{br} : absorbancia del blanco de referencia.

La determinación de la actividad inhibidora del catión radical del ácido 2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS•+) se realizó siguiendo metodología desarrollada por *Re* y otros¹⁰ y descrita por *Kuskoski* y otros,¹¹ con algunas modificaciones, pues el ensayo de ABTS original estaba basado en la activación de la metmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir el catión radical en presencia o ausencia de antioxidantes. Este método ha sido criticado con la base de que antioxidantes con una acción rápida pueden contribuir a la reducción del radical ferrilo mioglobina, interfiriendo así con los resultados; un formato más apropiado para este ensayo es la técnica de decoloración del radical que es generado en su forma estable antes de entrar en contacto con el antioxidante a evaluar. La técnica mejorada para la generación de ABTS•+ comprende la producción directa del ABTS azul verdoso a través de la reacción entre el ABTS y persulfato potásico y posterior a esto, la reacción entre el radical formado y el antioxidante que se quiere evaluar.¹⁰

Posteriormente se calcularon los porcentajes de inhibición para cada muestra evaluada haciendo uso de la misma expresión matemática empleada para el análisis de la capacidad de captura del radical DPPH•.⁷

Los porcentajes de inhibición encontrados para cada una de las muestras se graficaron contra la concentración de extracto evaluado, y a partir de las ecuaciones obtenidas se determinó el valor de la concentración media inhibitoria (IC_{50}) de cada extracto para cada metodología empleada.

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

A partir de la curva patrón de ácido gálico, se determinó la concentración de fenoles totales presentes en las muestras (Fig. 1).

Los extractos en acetato de etilo (PgAEF) y en agua (PgAF) registraron una mayor concentración de fenoles totales (tabla 1).

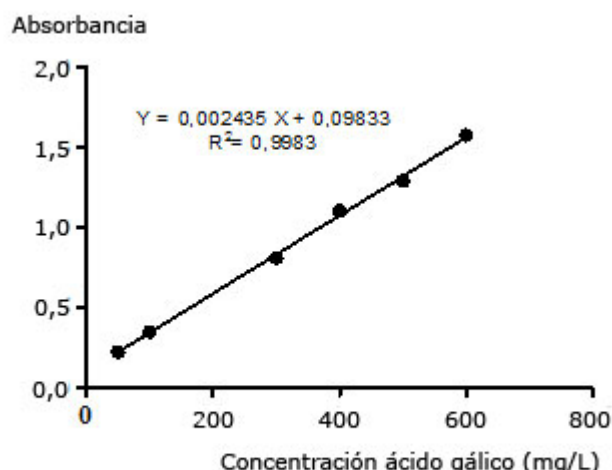


Fig. 1. Curva patrón de ácido gálico.

Tabla 1. Resultados obtenidos en la determinación de fenoles totales

Extracto evaluado (mg/L)	Absorbancia			Concentración fenoles totales (mg ácido gálico/g extracto seco)			
	Promedio	DE	% CV	Promedio	DE	% CV	
PgMETOH (metanólico)	2 000	0,147	0,002	1,078	10,47	0,68	6,47
	4 000	0,205	0,002	1,156			
Pghf (n-hexano)	2 000	0,088	0,001	1,271	0,27	0,00	0,00
	4 000	0,101	0,002	2,057			
PgDF (diclorometano)	2 000	0,175	0,002	0,905	16,33	0,82	5,04
	4 000	0,263	0,002	0,625			
PgAEF (acetato de etilo)	2 000	0,242	0,002	0,729	28,95	0,78	2,68
	4 000	0,375	0,003	0,811			
PgAF (acuoso)	2 000	0,314	0,005	1,459	43,99	0,41	0,94
	4 000	0,524	0,004	0,771			

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

CAPACIDAD DE CAPTURA DEL RADICAL LIBRE DPPH

Los extractos PgAEF y PgAF son los más activos pues necesitan de una menor cantidad de extracto para inhibir el 50 % del radical DPPH empleado en la evaluación (tabla 2).

Las fracciones más activas corresponden a PgAF-2 y PgAF-3 pues presentaron los menores valores de IC₅₀, mientras que las fracciones PgAF-16 y PgAF-17 corresponden a las menos activas debido a sus altos valores de IC₅₀ (tabla 3).

Tabla 2. Resultados obtenidos para cada ensayo realizado a los extractos evaluados

Extracto evaluado	IC ₅₀ Método DPPH (mg/L)	IC ₅₀ Método ABTS (mg/L)	Concentración de fenoles totales (mg ácido gálico/g extracto seco)
PgMETOH	11342	1421	10,47
PgHF	42116	8279	0,27
PgDF	16105	816	16,33
PgAEF	5207	367	28,95
PgAF	3912	-	43,99
Ácido ascórbico	196,5	104,8	-

Se informa la concentración de cada extracto necesaria para inhibir el 50 % del radical empleado en cada ensayo y se compara dicha concentración con la cantidad de fenoles presentes en cada muestra.

Tabla 3. Valores de IC₅₀ obtenidos para cada fracción del extracto PgAF evaluada por DPPH

Fracción	R ²	IC ₅₀ (mg/L)
1	0,9901	2 372
2	0,9953	2 063
3	0,9922	2 025
4	0,9970	2 126
5	0,9941	2 274
6	0,9988	2 108
7	0,9985	3 033
8	0,9997	4 195
9	0,9979	6 129
10	0,9938	5 712
11	0,9964	13 195
12	0,9938	8 847
13	0,9927	11 449
14	0,9914	11 335
15	0,9990	17 153
16	0,9989	21 395
17	0,9955	22 403

ACTIVIDAD INHIBIDORA DEL CATION RADICAL DEL ACIDO 2,2'AZINOBIS-(3-ETILBENZOTIAZOLINA)-6-SULFÓNICO (ABTS•+)

Los resultados obtenidos se trataron de igual manera. Los extractos presentan un comportamiento similar al encontrado al realizar la evaluación empleando el radical libre DPPH, de igual manera los extractos PgAEF y PgAF fueron los más activos en esta determinación (tabla 2).

En la figura 2 se puede observar la correlación existente entre la actividad evidenciada por los extractos y la concentración de fenoles totales presentes en estos, lo que permite atribuir la actividad encontrada a dichos compuestos.

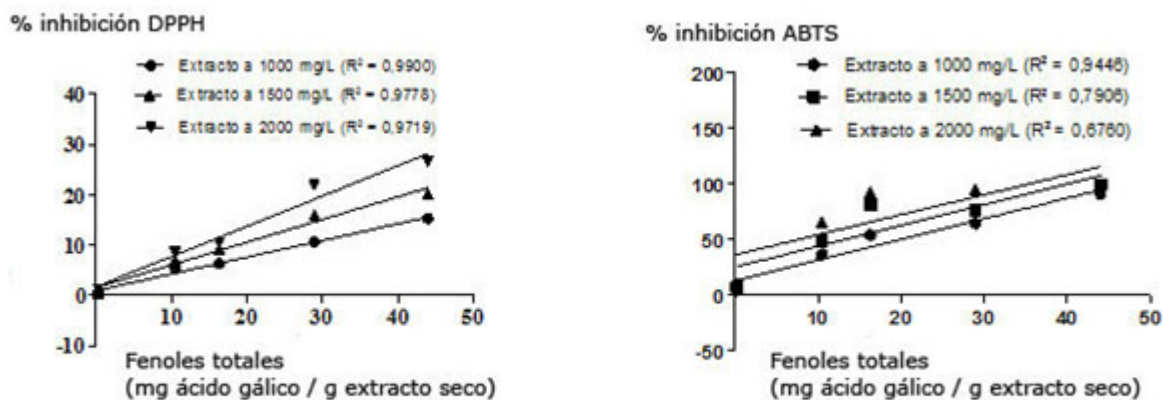


Fig. 2. % inhibición DPPH vs. concentración fenoles totales y % inhibición ABTS vs. concentración de fenoles totales.

El ANOVA realizado para la actividad antioxidante de las concentraciones evaluadas de los extractos de *P. guianensis* Rubiaceae, frente a los dos métodos empleados, muestra la existencia de diferencias significativas entre ambos, debidas posiblemente a la naturaleza de los reactivos y a la diferencia entre la estabilidad de cada uno de los radicales empleados.

DISCUSIÓN

Los extractos PgAEF y PgAF presentaron mayor poder antioxidante con valores de IC_{50} de 5207 mg/L y 3912 mg/L respectivamente (tabla 2). Así mismo, las fracciones del extracto PgAF de la PgAF-1 a la PgAF-7 lograron una mayor decoloración del radical DPPH (tabla 3), lo que se evidencia en los bajos valores de IC_{50} presentados por dichas fracciones, pues necesitan de una menor concentración de la muestra para inhibir el 50 % del radical libre DPPH; esto indica que estas fracciones son las responsables de la actividad antioxidante presentada por el extracto PgAF que al ser fraccionado concentró compuestos activos en las primeras fracciones.

En general, el efecto antiradical aumenta conforme aumenta la concentración de extracto evaluado. Adicionalmente, para alcanzar una inhibición del radical ABTS del 50 %, es necesaria una concentración de extracto más baja que las concentraciones necesarias para inhibir el 50 % del radical DPPH (tabla 2). Sin embargo, la técnica del ABTS no permite discriminar extractos que contienen buenos compuestos antioxidantes como la gran mayoría de técnicas. Esto se debe a la estabilidad del reactivo $ABTS^{\bullet+}$, una estructura completamente plana que reacciona fácilmente con reductores mediante un mecanismo SET (Single Electron Transfer) y(o) HAT (Hydrogen Atom Transfer),¹² lo cual hace que los ensayos con el ABTS sean poco confiables y de baja reproducibilidad, por lo que no es recomendable realizarlos sin otro método de captura de electrones, con el cual se pueda corroborar los resultados obtenidos.

La correlación directa entre la concentración de fenoles totales presentes en cada extracto y la actividad antioxidante evidenciada por cada uno de estos mediante los métodos de captura de electrones empleados (tabla 2), coincide con numerosos estudios mostrados en la literatura científica referentes a los compuestos fenólicos como antioxidantes que actúan con una variada gama de mecanismos.¹³

Adicionalmente, los antioxidantes fenólicos son moléculas que en pequeñas concentraciones protegen a las biomoléculas (fosfolípidos, ácidos nucleicos) del daño provocado por radicales libres^[14]. Lo cierto es que la naturaleza de los radicales libres los hace muy reactivos; sin embargo, los compuestos fenólicos son capaces, al colisionar con ellos, de cederles un electrón o un hidrógeno, estabilizándolos y evitando así el inicio o la propagación del daño oxidativo.^{15,16}

En conclusión, las especies de la familia Rubiaceae, especialmente *P. guianensis*, son una fuente promisorio e importante de metabolitos secundarios con capacidad antioxidante, por lo cual se requieren de mayores estudios que permitan identificar dichas sustancias e integrarlas a programas de terapia antioxidante en el área de la salud.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la Universidad Tecnológica de Pereira, a través del Grupo de Investigación Polifenoles-UTP, por el apoyo financiero para la desarrollo de la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998;62(6):1201-4.
2. Sánchez PE. *Flórla del Parque Nacional Cahuita*. San José (Costa Rica): Editorial Universidad Estatal a Distancia; 2000. p. 5-343.
3. Mendoza H, Ramírez BR, Jiménez LC. *Rubiaceae de Colombia, Guía ilustrada de géneros*. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt; 2004. p. 1-48.
4. Niño J, Narváez DM, Mosquera OM, Correa YM. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two rubiaceae plants from Colombian biodiversity. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2006. 37: 566-70.
5. Suffredini IB, Barradas ML, Varella AD, Younes RN. Antibacterial Activity of Brazilian Amazon Plant Extracts. *Braz J Infect Dis.* 2006;10:400-2.
6. Carvajal-Rojas L, Hata-Urbe Y, Sierra-Martínez N, Rueda-Niño D. Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana Krukoff*). *Rev Colombiana Forestal.* 2009;12:161-70.

7. Alvarez E, Jimenez OJ, Posada CM, Rojano BA, Gil JH, Garcia CM, Durango DL. Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (guttiferae). *Vitae*. 2008;15(1):165-72.
8. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol*. 1999;299:152-78.
9. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie*. 1995;28:25-30.
10. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med*. 1999;26(9):1231-7.
11. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, García-Parilla MC, Fett R. Actividad antioxidante de pigmentos antiocianicos. *Bras Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. 2004;24(4):691-3.
12. Mesa-Vanegas AM, Gavirial CA, Cardonal F, Sáez-Vega JA, Trujillo SB, Rojano BA. Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. Laboratorio de Ciencias de los Alimentos. Escuela de Química. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín 2009 [citado 14 Jul 2011]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol_15_2_10/pla03210.htm
13. Schwarz K, Huang SW, German J, Tiersch B, Hartmann J, Frankel EN. Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil in water and water in oil emulsions and bulk oils. *J Agri Food Chem*. 2000;48:4874-82.
14. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Res Commun*. 1990;9:1-32.
15. Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr*. 2003;133:3275S-84S.
16. Avello M, Valladares R, Ordóñez JL. Antioxidant capacity of *Aristolelia chilensis* (Molina) Stuntz. *Rev Cubana Plant Med*. 2008 [cited 14 Jul 2011];13(4). Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000400002&lng=es

Recibido: 8 de julio de 2013.

Aprobado: 22 de agosto de 2013.

Lina Marcela Giraldo Vásquez. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira-Risaralda, Colombia. Correo electrónico: limagiraldo@utp.edu.co