

“ESTANDARIZACION DEL METODO DE CAPTURA DE RADICALES LIBRES PARA LA EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS VEGETALES”

RESUMEN

La evaluación preliminar de la actividad antioxidante en extractos vegetales se realizó mediante el método de captura de radicales libres que utiliza el radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH).

Con el fin de determinar las condiciones físicas, químicas y termodinámicas del ensayo fotométrico, se utilizaron los extractos metanólicos de plantas provenientes del Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU) y Parque Natural Municipal La Nona (PNMN); extracto estandarizado de GingSeng (obtenido con el nombre comercial de GINGSANA) además de hidroquinona y ácido tánico.

Los resultados permitieron establecer las condiciones óptimas las cuales corresponden a: 517 nm (longitud de onda), 30 minutos (tiempo de reacción) y temperatura ambiente (temperatura de reacción); adicionalmente, se indica la baja estabilidad de las soluciones del radical libre usado, hecho que implica inmediata utilización de las mismas.

PALABRAS CLAVES: Bioprospección, Radicales libres, Porcentaje de captación de radicales libres, 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH*), Productos Naturales.

ABSTRACT

The preliminary antioxidant activity evaluation in plant extracts was made by the scavenging free radical assay with 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl DPPH radical compound.

To determinate the photometric assay conditions were used plant extracts come from to Parque Regional Natural Ucumarí and la Nona; standardized GingSeng extract (obtained commercially as GINGSANA) also hidroquinone and tanic acid.

The evaluation of those plant extracts and compounds, allowed stablishing the best conditions, correspond to: 517 nm (experimental wavelength), 30 minutes (reaction time with free radical) and enviromental temperature (reaction temperature); complementarily, it suggest that the free radical solutions are unsteady and must be used immediatly.

KEY WORDS: Bioprospection, Free radical, Free radical scavenging, 1,1-diphenyl-2-pycril-hydrazil (DPPH*), Natural Products.

1. 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 [1].

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 [1].

OSCAR M. MOSQUERA M.

Químico M. Sc.
Profesor Titular
Universidad Tecnológica de Pereira
omosquer@utp.edu.co

JAIME NIÑO O.

Lic. Bga.-Qca., M. Sc.
Profesor Titular
Universidad Tecnológica de Pereira
janino@utp.edu.co

YANED M. CORREA

Química
Profesora Catedrática
Universidad Tecnológica de Pereira
yamico@utp.edu.co

DIANA CAROLINA BUITRAGO BEJARANO

Estudiante
Programa de Tecnología Química
quechirilada@yahoo.es

En la actualidad son muchos los procesos relacionados con la producción de radicales libres como son: mutagénesis, transformación celular, cáncer, arteriosclerosis, infarto de miocardio, procesos de isquemia/reperfusión, diabetes, asfixia de neonato, enfermedades inflamatorias, trastornos del sistema nervioso central, envejecimiento, entre otros [4], [5]. Además, un creciente número de estudios soportan la teoría que el estrés oxidativo está envuelto en la progresión de VIH [9].

Los métodos de medición de la actividad antioxidante muestran extrema diversidad; muchos procedimientos usan una acelerada oxidación involucrando un iniciador para manipular una o más variables en el sistema de prueba; tales iniciadores incluyen adición de un metal de transición como catalizador, exposición a la luz para promover oxidación fotosensibilizada por oxígeno singlete [7], y fuentes de radicales libres [6].

La evaluación de actividad la antioxidante a través de fuentes generadoras de radicales libres en el sistema de prueba, asume que la oxidación es inhibida en un alto porcentaje por la captura de estos; por tanto se enfoca en monitorear la capacidad de aditivos y extractos para la captura de radicales o la inhibición de su formación. Este es el principio de los métodos más modernos de ensayo tales como los ensayos de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona)-6-sulfónico), DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y phycoerythrin [7].

El ensayo *in-vitro* con el radical libre en mención se considera representativo entre los métodos que emplean modelos radicales en la evaluación de la actividad antioxidante [9], debido a su citada estabilidad en virtud de la deslocalización del electrón desapareado.

La presente investigación pretende normalizar las condiciones físicas, químicas y termodinámicas necesarias para evaluar la actividad antioxidante en extractos vegetales, a través del método enfocado en la determinación del porcentaje de captación de radicales libres que usa como modelo radical el compuesto 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH*).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Reactivos: el conjunto de solventes y estándares empleados en el desarrollo experimental son de grado analítico. Metanol y etanol MALLINCKRODT; ácido tánico e hidroquinona MERCK. El radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo proviene de SIGMA.

2.1.2 Equipos: se utilizó un espectrofotómetro GENESYS 5 MILTON ROY y celdas de vidrio FISHER SCIENTIFIC. Además de pipeta de volumen variable

100-1000 μ L EPPENDORF research serie 2100, sometida periódicamente a procesos de calibración. El control de tiempo se efectuó con cronómetro FISHER SCIENTIFIC y el control de temperatura con baño termostático MEMMERT.

2.1.3 Extractos Vegetales: los extractos vegetales fueron obtenidos a partir de lixiviación con metanol de las plantas *Cinchona Pubecens* Valh (FJR 3161) (Rubiaceae) y *Miconia Lehmanni* Cong (FJR 3172) (Melastomataceae), recolectadas en el PRNU (Niño et al., 2002); y la planta *Calea angosturana* (FJR 3915) (*Asteraceae*) recolectada en el PNMN.

Las concentraciones evaluadas corresponden a: extracto estandarizado de Gingseng (100 ppm), extracto metanólico de *Calea Angosturana* (250 ppm), extracto metanólico de *Miconia Lehmanni* (100 ppm), extracto metanólico de *Cinchona Pubecens* (100 ppm), hidroquinona (100 ppm) y ácido tánico (500 ppm).

2.2 Evaluación de actividad antioxidante: la actividad antioxidante fue evaluada a partir del método planteado por Brand-Williams [10].

Se preparó una solución patrón de 2000 ppm del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH*) en metanol grado analítico, la cual se almacenó a 0° C, en recipiente ámbar recubierto con papel aluminio para mayor protección contra luz. Para efectos de esta evaluación se preparó una solución de trabajo de DPPH a 20 ppm, preparada diariamente a partir de la solución patrón, almacenada en recipiente ámbar recubierto con papel aluminio y conservada en baño de hielo.

Se realizó seguimiento a las reacciones entre soluciones a 250 ppm de los extractos citados anteriormente con la solución de trabajo del radical libre DPPH, a través de la técnica fotometría visible; para cada extracto se graficó el decrecimiento de la absorbancia en el medio de reacción contra tiempo, determinando los parámetros de reacción óptimos para el desarrollo del ensayo.

2.3 Análisis de los resultados: las gráficas y parámetros estadísticos de los datos experimentales fueron realizados a través de Microsoft office Excel.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Inicialmente se realizaron diversos barridos de exploración en el espectrofotómetro a 3 soluciones de DPPH a 20 ppm. Cada una de las tres soluciones fue sometida a 2 barridos de exploración en diferentes periodos de tiempo observando simultáneamente la estabilidad de las soluciones del radical libre al oxígeno y cantidad de luz en el ambiente.

Se evidencian grandes diferencias en las absorbancias mostradas en los espectros obtenidos para cada solución

(tabla 1), las cuales son atribuibles a variaciones de concentración y factores pertinentes al grado de reducción que las moléculas del radical libre presentan, también pueden estar relacionados con las condiciones ambientales (temperatura externa, cantidad de luz) y con el tiempo de almacenamiento al que se sometió cada solución.

Se advierte que cuanto mayor sea el tiempo de almacenamiento de la solución, se produce una disminución en la absorbancia de la solución (hecho relacionado con la reducción de las moléculas de radical libre); por tanto, se establece que la solución de trabajo de DPPH debe ser preparada en momentos previos a su utilización y no someterse a almacenamiento superior a 4 horas

Solución analizada	Tiempo de almacenamiento (horas)	Barrido de exploración 1		Barrido de exploración 2 (8 minutos después)	
		Λ (nm)	Abs	Λ (nm)	Abs
Solución 1	24	514	0.102	514	0.102
Solución 2	48	502	0.093	502	0.092
Solución 3	0	529	0.288	529	0.271

Tabla 1. Resultados evidenciados en los diferentes espectros visibles obtenidos a soluciones del radical libre DPPH

El amplio rango de longitudes de onda de máxima absorción (502-529 nm) observado, conlleva a establecer como longitud de onda para la realización de este ensayo un valor intermedio de este rango (517 nm), el cual es cercano a las longitudes de onda reportadas en otras investigaciones de este tipo [10].

La figura 2 corresponde al comportamiento cinético de las reacciones entre las sustancias anteriormente citadas y el radical libre DPPH, analizado a temperatura ambiente. En general se observa un decrecimiento exponencial de la absorbancia en los cuatro medios de reacción; situación no apreciable en la figura 3, correspondiente al comportamiento cinético de las reacciones mencionadas, evaluado a 37° C.

Cabe resaltar que no existe un patrón de comportamiento para las líneas obtenidas a partir de las mediciones a 37° C, hecho que da pie al planteamiento que las reacciones del radical libre DPPH con compuestos y extractos con capacidad antioxidante no son termalmente estables.

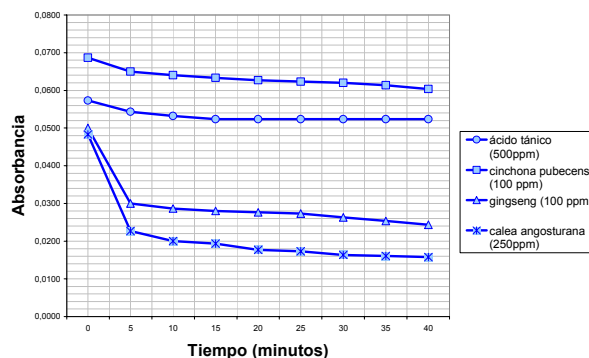


Figura 2 Comportamiento cinético de reacciones del radical libre DPPH con varias sustancias, analizado a temperatura ambiente

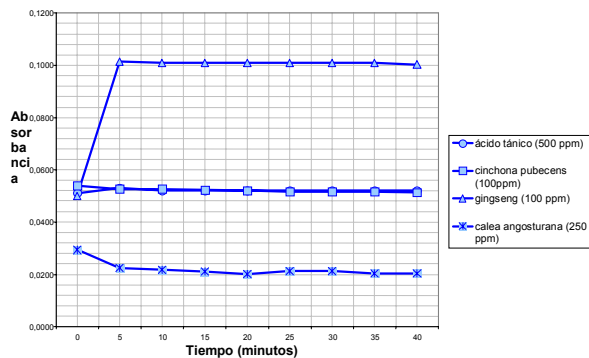


Figura 3 Comportamiento cinético de reacciones del radical libre DPPH con varias sustancias, analizado a 37° C

La razón por la cual la reacción del ácido tánico con el radical libre DPPH a temperatura ambiente presenta una tendencia claramente definida, en comparación con las figuras obtenidas para los tres extractos restantes obedece a la complejidad de las matrices analizadas y a las múltiples reacciones que en estas acontecen con el sustrato.

Dada la inestabilidad térmica advertida en las reacciones efectuadas, se considera apropiada la temperatura ambiente para la realización de evaluación de actividad antioxidante con el DPPH.

Para determinar el tiempo adecuado de reacción antes de la medición del porcentaje de capacidad de captación de radicales libres se debe tener en cuenta varios aspectos: el tiempo establecido debe ser conveniente para medirse con exactitud; debe procurarse que en este intervalo se mezclen completamente los compuestos reaccionantes; debe ser suficiente para que la mezcla metanol-agua, que acontece al incorporar la solución de trabajo del radical DPPH a las soluciones de los extractos y compuestos analizados, alcance el equilibrio térmico; y por último debe considerarse que el efecto total de atrapamiento de radicales libres de un compuesto o extracto es visible cuando la reacción entre estos y el radical libre empleado alcanza el equilibrio químico.

La línea obtenida para el decrecimiento de absorbancia en la reacción de hidroquinona con el radical libre DPPH (figura 4) alcanza el mínimo valor en su pendiente a 20 minutos de reacción, sin embargo, la línea correspondiente a reacción del radical libre con el extracto de la planta *Miconia Lehmannii* (figura 4), hace evidente la mínima variación en la pendiente después de 30 minutos de reacción, sin alcanzarse el valor mínimo esperado.

Las reacciones del radical libre DPPH con los diferentes extractos no alcanzan el equilibrio químico en un tiempo corto debido a las interacciones desarrolladas entre los diferentes compuestos con actividad antioxidante existentes en cada extracto (sinergismo y antagonismos farmacológicos y químicos).

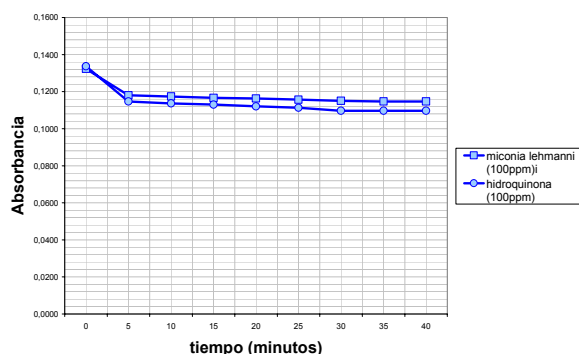


Figura 4 Comparación del comportamiento cinético entre la reacción del radical libre DPPH con compuestos puros (hidroquinona) y extractos vegetales (extracto metanólico de *Miconia Lehmannii*)

Dado que los extractos y los compuestos puros evaluados presentaron su equilibrio químico a diferente tiempo se decide como tiempo de ensayo 30 minutos, teniendo en cuenta que este tiempo satisface las demás condiciones de equilibrio térmico y exactitud planteadas para su selección.

4. CONCLUSIONES

La evaluación de actividad antioxidante a través del método que utiliza el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), constituye un procedimiento relativamente sencillo, en el cual es necesario tener presentes algunos cuidados con el manejo de la solución de trabajo, tales como tiempo de conservación, ausencia de humedad y cantidad de luz.

Dado que se desconoce la matriz (componentes) de los diferentes extractos, es erróneo generalizar condiciones universales para todos los ensayos de actividad antioxidante a partir de un solo ensayo, por tanto es importante la utilización de diferentes sustancias y extractos vegetales para brindar flexibilidad y adaptabilidad a las condiciones propuestas.

Las reacciones llevadas a cabo con el radical libre DPPH muestran no ser termalmente estables, por tanto se pueden realizar a temperatura ambiente, teniendo en cuenta que debe evitarse variaciones climáticas de magnitud considerable.

El tiempo de reacción establecido para el análisis de actividad antioxidante en extractos vegetales corresponde a 30 minutos; debe tenerse en cuenta que este, en el caso de la evaluación a compuestos puros, constituye un parámetro característico relacionado con la naturaleza química de cada compuesto.

Mediante la aplicación de esta metodología, se estandarizó el método de evaluación de actividad antioxidante en extractos vegetales para el Laboratorio de Biotecnología-Productos Naturales; a partir del cual actualmente se lleva a cabo la evaluación de los extractos metanólicos, de diclorometano y solvente 10-20 pertenecientes a 25 plantas procedentes de zonas de reserva de la región cafetera colombiana.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] GONZALES, M. Y MUÑIS, P. VALL, V. (2001). Actividad antioxidante de la cerveza, estudios in-vivo e in-vitro. Centro de información Cerveza y Salud. 57 p. http://www.nutricion.org/RevistaN+Dmarzo2002/VCongreso_publicaciones/ZCerveza/libroCERVEZA_8.pdf
- [2] RICE-EVANS C.A. Y MILLER N.J. (1996). Structure- antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free radical Biology Medicine* 20: 933-956.
- [3] HALLIWELL, B. Y GUTTERIDGE, J. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press. New york, 3rd edition.
- [6] LI, C., YUE, W. Y CHENG, C. (2003). Antibacterial and DPPH free radical scavenging activities of ethanol extract of propolis collected in taiwan. *Journal of Food and Drugs Analysis* 11(4): 277-282.
- [7] ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P., PATSALIDES, E., ET.AL. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The royal society of chemistry* 127:183-198
- [8] MOLYNEUX, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrilhidrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of science and technology* 26(2):211-219.
- [9] KOLEVA, I., VAN BEEK, T., LINSSEN, J., GROOT, A., Y EVSTATIEVA, L. (2002). Screening of plants extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemistry Analysis* 13: 8-17.
- [10] BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M. Y BERSET C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel. Wissenschaft. Und Technologie* 28. 25-30.