

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE DIVERSAS PARTES DEL ÁRBOL *Nicotiana Glauca*

Muñoz Juárez M. A., Dra. Gutiérrez D. M.
Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro

RESUMEN:

La actividad antioxidante de 4 partes del árbol *Nicotiana Glauca* fue evaluada en cuanto a su actividad antioxidante utilizando el método del DPPH. Se prepararon los extractos metanólicos mediante maceración exhaustiva durante una semana, de la misma manera se prepararon los extractos alcaloideos siguiendo las técnicas convencionales. Todos los extractos se concentraron bajo vacío hasta su completa sequedad y se guardaron en frascos ámbar, en refrigeración debidamente etiquetados y pesados hasta su siguiente uso. Los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante preliminar de raíz, tallo, flor y semilla permitieron observar que dicha actividad es dependiente de la concentración del extracto y que es la flor la que presentó la mejor actividad hasta ahora.

INTRODUCCIÓN:

Los Antioxidantes son compuestos los cuales pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhibiendo la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. Los antioxidantes se dividen en dos categorías principalmente que son: sintéticos y naturales. En general los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides así como el ácido ascórbico.¹ Los antioxidantes sintéticos como el BHA y BHT (Butil – hidroxianisol y Butil - hidroxitolueno) han sido utilizados como antioxidantes desde principios del siglo pasado. Sin embargo, se han impuesto medidas de precaución y se ha restringido su uso debido a su carcinogenicidad. Debido a esto, el interés por los antioxidantes naturales se ha incrementado considerablemente ya que la capacidad de actuar como antioxidante se ha demostrado en el laboratorio y mencionado en la literatura.

Muchos antioxidantes naturales, en especial los flavonoides, muestran un amplio rango de efectos biológicos incluyendo funciones antibacteriales, antivirales, antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas y vasodilatadores. Una terapia antioxidante provee una alternativa barata para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo ya que se ha demostrado el efecto antioxidante de productos naturales provenientes de las plantas. La actividad antioxidante y su relación con la propiedad curativa de una gran cantidad de plantas medicinales ha sido reportada en diversas investigaciones². Existe muchos métodos para medir la capacidad antioxidante de una especie o sustancia, un método muy usado se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 520 nm³. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical (R) se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia

¹ Y.S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao y B. D. Oomah “Actividad Antioxidante y Fenoles totales y frutas selectas, vegetales y productos de grano” Journal Agric Food Chem. 1998

² P.Pietta, P. Simonetti, P. Mauri “Antioxidant Activity of selected medicinal Plants”

³ P. Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakarin Journal of Science and Technology, Vol. 26 No. 2, 2004, 211-219.

La planta *Nicotiana glauca* conocida como tabaquillo se usa en medicina tradicional en el estado de Querétaro para tratar las inflamaciones, se usa la epidermis de las hojas la cual se quita de éstas y se pone en la zona inflamada. También se ha reportado su uso para el dolor de muela. Este trabajo forma parte de un proyecto en el cual se evaluará la actividad antiinflamatoria y se relacionará con la capacidad antioxidante de algunas plantas utilizadas para este fin. *Nicotiana glauca* forma parte de este estudio ya que es una planta muy utilizada en medicina tradicional y no existen reportes sobre su actividad antiinflamatoria ni sobre su actividad antioxidante. El objetivo del presente trabajo fue preparar los extractos metanólicos y alcaloideos de cada una de las partes de esta planta (Raíz, tronco, corteza, tallo, flor, hoja y semilla) Así como la evaluación antioxidante preliminar de algunos de estos extractos.

METODOLOGÍA:

Se realizó una investigación experimental en la cual se trabajó con el árbol *Nicotiana glauca*. La recolección de éste árbol se realizó con seis meses de anticipación aproximadamente en San Antonio de la Cal, Tolimán en el estado de Querétaro. Posteriormente el árbol se separó en sus partes como son: Raíz, Tronco, Corteza, Tallo, Hoja, Flor y Semilla y se dejaron secar en estufa a 40 °C cuidando únicamente que no se sometiera a condiciones de alta humedad y que cada una de las partes recolectadas se encontraran libre de contaminación por exposición a agentes químicos, físicos y/o biológicos.

Una vez secas cada una de las partes. Se procedió a moler hasta reducir el tamaño de las partículas a polvo con ayuda de un molino mecánico. A partir de aquí se pesaron y se dividieron en 2 las muestras (Raíz, Tronco, Corteza, Tallo, Hoja, Flor y Semilla) con el fin de realizar 2 tipos de extracción. Una metanólica y otra alcaloidea. La extracción metanólica se llevó a cabo de la siguiente manera: Se colocó el material vegetal en un frasco ámbar y se agregó metanol hasta cubrirlo completamente, después de 24 hrs. se filtró y los residuos sólidos se volvieron al frasco, se les agregó metanol y se maceraron durante otras 24 hrs., se filtró y se repitió el procedimiento 2 veces más. Los extractos metanólicos se juntaron y se evaporaron a sequedad en el rotavapor, finalmente se pesaron y se guardaron en viales ámbar debidamente etiquetados en el refrigerador.

El extracto alcaloideo se preparó de la siguiente manera: El material vegetal se desengrasó con hexano, en seguida se preparó en extracto metanólico al 70 %, se evaporó la mayor cantidad posible de metanol y el extracto acuoso resultante se acidificó a pH = 5 con ácido clorhídrico 1 N, posteriormente se extrae con cloroformo y se desecha la fase orgánica. La fase acuosa se basifica hasta pH = 11 con hidróxido de amonio, se extrajo con cloroformo y la fase acuosa se desechó. Se evaporó el cloroformo a sequedad y el extracto alcaloideo se pesó, y se guardó debidamente etiquetado en viales ámbar en el refrigerador.

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos de las plantas, objeto de este estudio, se tomaron 20 µL de cada extracto a 6 concentraciones diferentes y se le adicionó a cada uno 200 µL de la disolución de 150 µmol/L de DPPH. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo durante 30 minutos a temperatura ambiente, en microplacas de 96 pozos protegidas de la luz, después de lo cual, se mide la absorbancia a 520 nm en un espectrómetro Elisa Versa Max Tunable Microplate Reader (Molecular Devices Co.). Los experimentos se llevaron a cabo usando un bloque de diseño al azar. Dentro de cada bloque cada tratamiento se aplicó 3 veces.

La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la siguiente ecuación

$$\% \text{Inhibición} = \% I = \frac{A - A_1}{A} \cdot 100 \quad (1)$$

A = Absorbancia del blanco

A₁ = Absorbancia de la muestra

RESULTADOS:

En la tabla 1 se representa el rendimiento de cada extracto metanólico así como la cantidad de material vegetal y disolvente utilizados. En la tabla 2 se muestran el rendimiento de los extractos alcaloideos así como la cantidad de reactivos utilizados para su preparación. En la tabla 3 se muestran todos los reactivos y concentraciones utilizadas para el ensayo del DPPH. Finalmente la tabla 4 muestra los porcentajes de inhibición del radical DPPH por cada uno de los extractos.

• **Tabla 1: Extracción metanólica *Nicotiana glauca***

Muestra	Cantidad (g)	Volumen de Metanol (mL)					Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
		1ra extracción	2da extracción	3ra extracción	4ta extracción	5ta extracción		
Semilla	100	910	710	634	700	X	6,5938	6,6
Tronco	200	874	500	500	500	500	15,8855	7,94
Flor	25	500	400	200	390	X	5,4378	21,75
Tallo	45	300	370	380	360	X	5,3309	11,84
Raíz	43	585	400	300	x	X	1,7746	4,1269
Hoja	82	400	300	x	x	X		
Corteza	21,5	300	300	300				

Esta tabla muestra los volúmenes de metanol utilizados por cada extracción realizada a cada una de las muestras así como la cantidad de extracto obtenida por una cantidad determinada de muestra y su respectivo rendimiento.

• **Tabla 2: Extracción alcaloidea *Nicotiana glauca* (continúa tabla siguiente página)**

Muestra	Cantidad (g)	Vol MeOH 70% (mL)	Vol MeOH 70% (mL)	Masa alcaloidea (g)	Masa alcaloidea (g)	Masa alcaloidea (g)	Rendimiento (%)	Extracto seco (*)
		1ra extracción	2da extracción	Extracto AcOEt	Extracto CHCl ₃	Total		
Semilla	50	300	200	0,0336	0,1754	0,209	0,418	*
Tronco	100	500	500	0,7217	0,066	0,7877	0,7817	*
Flor	8	150	145	0,00991	0,04035	0,05026	0,62825	*
Tallo	50	500	440	0,146	0,01314	0,15914	0,31828	
Raíz	30	300	200	0,127	0,01161	0,1386	0,4621	*
Hoja	81,5	440	400	0,2277	0,759	0,9857	1,2094	
Corteza	13,6	200	200	0,1325	0,0878	0,2203	1,61985	

AcOEt → Acetato de Etilo CHCl₃ → Cloroformo MeOH → Metanol

• **Tabla 3: Concentraciones y reactivos utilizados para DPPH**

Agua	220 µL de agua destilada
Blanco	20 µL de MeOH + 200 µL de DPPH
Concentración 1	20 µL de solución de 2,4 mg de muestra /mL de MeOH + 200 µL de DPPH
Concentración 2	20 µL de solución de 1,8 mg de muestra / mL de MeOH + 200 µL de DPPH
Concentración 3	20 µL de solución de 1,2 mg de muestra /mL de MeOH + 200 µL de DPPH
Concentración 4	20 µL de solución de 0,6 mg de muestra /mL de MeOH + 200 µL de DPPH
Concentración 5	20 µL de solución de 0,3 mg de muestra /mL de MeOH + 200 µL de DPPH
Concentración 6	20 µL de solución de 0,15 mg de muestra /mL de MeOH + 200 µL de DPPH

- **Tabla 4:** Tabla de %de Inhibición de la palca 1 y 2

Concentración Mg/mL	% de Inhibición								
	semilla		Tallo	Raiz			Flor		
2.4	58.7942	42.5624	70	87.12602	43.1614	63.64461	82.16306	92.79238	
1.8	46.46419	33.71048	31.41431	30.0544	25.69052	39.3019	67.72047	91.11514	
1.2	32.18495	21.198	26.17304	50.5893	20.13311	27.83318	39.1015	76.74524	
0.6	10.6981	14.50915	14.97504	11.01541	12.41265	7.43427	30.48253	40.84316	
0.3	0.861287	12.11314	9.783694	1.314597	8.75208	0	16.70549	16.77244	
0.15	-5.031732	5.990017	4.625624	-3.173164	6.189684	-7.796917	30.94842	13.28196	

Es importante mencionar que las 2 placas se elaboraron al mismo tiempo. Sin embargo, las lecturas se realizaron con 40 minutos de diferencia aproximadamente; razón por la cual se considera que las lecturas fueron tan diferentes, pues existe la posibilidad que gran parte de nuestras muestras se hayan evaporado antes de haber realizado nuestra lectura de la 2da placa.

CONCLUSIONES:

Se logró observar que las concentraciones utilizadas durante las primeras lecturas no son las adecuadas, ya que en algunos casos el %de inhibición no llega al 50%. Sin embargo, estos resultados son la base de los siguientes experimentos ya que nos indican el aumento de la concentración en semilla, raíz y tallo. Es evidente que la concentración de flor es la adecuada y según estos datos preliminares, es en la flor donde se concentra la mayor actividad antioxidante.

Falta saber la actividad antioxidante de los extractos alcaloideos de todas la demás partes antes mencionadas de la planta así como el extracto metanólico de hoja, tronco y corteza.

La limitante que se presenta en el desarrollo del experimento es que es un árbol el cual ha sido poco estudiado a la fecha y no se sabe que tipo de compuestos están presentes en cada una de sus partes, así como tampoco se conoce si existe algún efecto de sinergismo al momento de mezclar 2 o más extractos, lo cual implica la necesidad una investigación más a fondo y detallada.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- Soto H. M. “Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*lippia graveolens hbk var. Berlandieri Schafer*)” Fitotecnia Mexicana, enero – marzo 2007 vol 30 no. 1 Chapingo, México pp 43 – 49
- Daymy Pineda A. y col “Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos” Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos y Intituto Nacional de Nutrición de Italia Rev Cubana Aliment Nutr 1999: 13.2: 104-11
- Y.S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao y B. D. Oomah “Actividad Antioxidante y Fenoles totales y frutas selectas, vegetales y productos de grano” Journal Agric Food Chem. 1998
- P.Pietta, P. Simonetti, P. Mauri “Antioxidant Activity of selected medicinal Plants”
- P. Molyneux, “The use of the stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakarin” Journal of Science and Technology, Vol. 26 No. 2, 2004, 211-219.