

Estimación de la actividad antioxidante de extractos vegetales

Lilia Marlene Vázquez Juárez¹, Dr. Gabriel Herrera Pérez², Dr. Kazimierz Wrobel Sazada³, Dra. Xóchilt Sofía Ramírez Gómez⁴, Dra. Alejandra Sarahí Ramírez Segovia⁵

Resumen: En este trabajo se determinaron los diferentes tipos de metabolitos secundarios presentes en extractos metanólicos de muestras vegetales de chaya, níspero, mezquite y guayaba, así como el contenido de flavonoides totales, % actividad antioxidante y un análisis cromatográfico mediante HPLC-DAD. El ensayo del radical ABTS fue utilizado para determinar el porcentaje de actividad antioxidante de las muestras. Los resultados revelan que cada uno de los extractos vegetales contiene al menos dos tipos de metabolitos secundarios de interés: flavonoides y flavonas, mismos que les confieren propiedades antioxidantes a las muestras vegetales. La prueba de actividad antioxidante indica que la guayaba presenta el mayor porcentaje de actividad con respecto al té verde. Con respecto al análisis cromatográfico, este reveló que la guayaba posee picos de interés con valores superiores a los encontrados en el té verde, lo cual podría relacionarse con las propiedades antioxidantes e hiperglucémicas de la guayaba.

Palabras clave: Plantas, flavonoides, hiperglucemia, antioxidantes.

Introducción

Nuestros ancestros utilizaban diversos ingredientes de origen natural para el cuidado de la salud, principalmente por la alta eficiencia que pueden presentar diversas plantas. La mayoría de las propiedades medicinales de las plantas (antiinflamatorias, anticancerígenas, antioxidantes, por mencionar algunas) se debe a unos compuestos denominados fitoquímicos. Los fitoquímicos son metabolitos secundarios que tienen propiedades defensivas o preventivas de enfermedades; entre estos se encuentran los alcaloides, antocianinas, carotenoides, flavonoides, entre otros (Lemus, Vega, Zura, & Ah, 2012). Los flavonoides son compuestos químicos, y se ha descubierto que poseen una actividad antioxidante, es decir, neutralizan los radicales libres generados por el cuerpo o factores externos como puede ser la exposición a la luz solar, principalmente los rayos ultravioletas, debido a que pueden atravesar la capa de ozono y las capas profundas de la piel, así como también por factores atmosféricos (O₃, CO, CO₂, SO₂) (Andrade, Delgado, Herrera, Arévalo, & Caso, 2018).

La producción no equilibrada de radicales libres en el organismo puede conducir al daño en moléculas como ADN y ARN, de igual manera, contribuye a la generación de complejos inestables que pueden producir daños perjudiciales en el organismo (Middleton, 2000). Asimismo, se ha descubierto que las plantas medicinales que contienen antioxidantes, como es el caso del té verde, pueden tratar complicaciones crónicas como es el caso de diabetes mellitus (Salas, 2015). Esta enfermedad destruye gradualmente las defensas antioxidantes, haciendo que otras células se vean comprometidas, por ejemplo, la glucosa y sus productos de glicación son potentes reductores que generan radicales libres (González, Cabañas, Arana, Hernández, & Ortiz, 2011). En diversos estudios se ha investigado la relación que existe entre el consumo de té verde y su actividad antioxidante, a su vez, ayudan a reducir el estado hiperglucémico en la diabetes (Middleton, 2000).

En la presente investigación se planea realizar la extracción de metabolitos secundarios a partir de muestras vegetales de chaya, níspero, mezquite y guayaba, con el objetivo de identificar los tipos de metabolitos secundarios presentes por medio de técnicas analíticas y determinar tanto el porcentaje de humedad presente en las plantas, así como el contenido de flavonoides presentes y la actividad antioxidante de las mismas. Para ello, se utilizará un estándar de té verde, mismo que permitirán identificar los extractos. La finalidad de utilizar extractos de dichas especies es implementar el uso de plantas que no tienen uso comercial ni agroindustrial.

¹ Lilia Marlene Vázquez Juárez es Alumna de Ingeniería en Materiales en el Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Irapuato, Gto. marlenevj04@gmail.com

² El Dr. Gabriel Herrera Pérez es Profesor Investigador de la especialidad de Materiales Avanzados en el Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Irapuato, Gto. gabierl.hp@irapuato.tecnm.mx

³ El Dr. Kazimierz Wrobel Sazada es Profesor Investigador en División de Ciencias Naturales y Exactas en la Universidad de Guanajuato, Gto.

⁴ La Dra. Xóchilt Sofía Ramírez Gómez es Profesor Investigador de Universidad de Guanajuato

⁵ La Dra. Alejandra Sarahí es Profesor Investigador de la especialidad de Materiales Avanzados en el Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Irapuato, Guanajuato alejandra.rs@irapuato.tecnm.mx (autor corresponsal)

Desarrollo

Prueba de porcentaje de humedad

Las muestras vegetales de chaya, níspero, mezquite y guayaba fueron recolectadas en un período comprendido entre octubre-noviembre del año 2019 en la ciudad de Guanajuato. Posteriormente fueron lavadas, secadas, pesadas, etiquetadas y almacenadas, al cabo de un período de tiempo, las muestras fueron nuevamente pesadas y mediante la Ecuación 1 se calculó el porcentaje de humedad para cada una de estas. Finalmente, las muestras fueron molidas y almacenadas.

$$\% \text{ humedad} = 1 - \left(\frac{\text{masa final}}{\text{masa inicial}} \right) \quad \text{ecuación 1}$$

Preparación de muestras

La preparación de los extractos vegetales se llevó a cabo de la siguiente manera: Se pesó 0.5 g de material vegetal seco, se diluyó en 5 mL de etanol 96%, dejándose en la oscuridad durante 48 h. Posteriormente, se tomó 1 mL de la muestra anterior y se evaporó a temperatura ambiente por 48 h. Finalmente, el sólido evaporado se pesó y se resuspendió en etanol 30% hasta conseguir una concentración final de 100 mg/mL. Los extractos obtenidos se etiquetaron y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su uso. Se prepararon estándares de quercetina y ácido gálico a concentraciones de 1000 ppm, cuyas curvas de calibración fueron de 0 a 200 ppm. El solvente utilizado fue metanol 75% V/V.

Identificación de tipos de metabolitos secundarios

Para la identificación de los tipos de metabolitos secundarios presentes en los extractos se utilizaron principalmente tres reactivos: ácido sulfúrico [5 M], hidróxido de amonio (28%) e hidróxido de sodio [5 M]. Se tomó 1 mL de cada extracto y se adicionaron 2 gotas de cada reactivo, de modo que se generó una coloración característica acorde al tipo de metabolito presente, tal como se muestra en la Tabla 1, 2 y 3.

Color	Tipo de metabolito secundario
Amarillo	Flavonas y flavonoides
Anaranjado	Flavonas
Rojo	Chalconas

Tabla 1. Tipo de metabolito utilizando H₂SO₄.

Color	Tipo de metabolito secundario
Amarillo	Flavonas, flavonoides, xantonas
Rojo	Chalconas
Anaranjado	Dihidroflavonas
Azul	Antocianinas

Tabla 2. Tipo de metabolito utilizando NH₄OH.

Color	Tipo de metabolito
Amarillo	Flavonas y flavonoides
Rojo	Flavonas e isoflavonas
Anaranjado	Flavonoles
Azul	Antocianinas

Tabla 3. Tipo de metabolito utilizando NaOH.

Contenido de flavonoides totales utilizando cloruro de aluminio

Se utilizó una solución de quercetina y ácido gálico como estándar interno y externo, respectivamente, para construir curvas de calibración (200 ppm). El contenido de flavonoides totales en cada especie fue determinado usando el método de cloruro de aluminio, los reactivos utilizados fueron NaNO₂ (5% p/v), AlCl₃ (10% p/v), NaOH 1M y agua destilada. Para la preparación de las muestras (vegetales y quercetina) se mezclaron 50 µL del extracto vegetal, 2.5 mL de agua y 150 µL de NaNO₂ (5% p/v), dejándose reposar por 6 min, una vez transcurrido el tiempo, se adicionó 300 µL de AlCl₃ (10% p/v), por 5 minutos más, finalmente se adicionó 1 mL de NaOH [1 M]; cada muestra se leyó por duplicado a 510 nm en un espectrofotómetro UV-Vis HACH DR600. El uso de quercetina

como estándar interno fue debido a que es uno de los polifenoles presentes en el té verde, es así como se permitirá cuantificar el contenido de flavonoides que hay presentes en los extractos a analizar. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de quercetina y ácido gálico por gramo de muestra seca (mg/g).

% Actividad antioxidante utilizando ABTS

La generación del radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), se realizó mediante la mezcla de volúmenes iguales de una solución de 7.0 mM de ABTS y 2.45 mM de persulfato potásico, después se prosiguió a su almacenamiento en la oscuridad durante un período de 12-16 h para completar la reacción. Posteriormente, la solución resultante se diluyó con metanol 75% hasta conseguir una absorbancia de 0.70 ± 0.35 UA a 735 nm. Las muestras se prepararon mezclando 120 µL de agua desionizada, 10 µL de buffer de fosfatos (100 mM, pH=7), 50 µL de solución ABTS y 10 µL de muestra (tanto vegetal como estándares), después de 10 minutos la absorbancia fue medida a 470 y 735 nm. Por otro lado, se construyeron dos curvas de calibración con quercetina y ácido gálico como estándar interno y externo, las cuales fueron leídas a 370 y 289 nm, respectivamente. La concentración de los extractos vegetales utilizados para esta prueba fue de 100 mg/mL.

Cromatografía de líquidos para extractos vegetales

HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector, por sus siglas en inglés): Se tomaron 20 µL de cada extracto se centrifugan a 10 000 g se diluyeron 20 veces con acetonitrilo 30% y 20 µL de ácido fórmico 0.1%. En un cromatógrafo Agilent 1200 con detector DAD (diode-array detector, por sus siglas) se inyectan 10 µL de cada muestra en una columna, donde se encontraron los siguientes resultados: Symmetry c18 (3.5µm x 4.6; 7.5 cm); Flujo de 1.2 ml/min; Temperatura: 40°C y un gradiente: 10 a 40% de acetonitrilo de 0 a 10 min; 10-12 min disminuyendo 60-10% de agua y reestableciendo el equilibrio de columna a condiciones. Las muestras fueron leídas a diversas longitudes de onda (254, 280, 310 y 350 nm) para analizar la absorbancia en cada una de éstas.

Pruebas y Resultados

Los tipos de metabolitos secundarios presentes en los extractos vegetales fueron flavonas y flavonoides, tal como se muestra en la Tabla 4. En el caso de los flavonoides, se encontró una estrecha relación entre dicho metabolito y su actividad antioxidante, debido principalmente a la presencia de grupos fenólicos, mismos que mediante reacciones complejas neutralizan los radicales libres generados por diversos factores. En relación con la prueba de porcentaje de humedad, esta indicó que la muestra con mayor humedad fue la chaya con un 84%, seguido de níspero, guayaba y mezquite, con valores de 45%, 42% y 22%, respectivamente. En la Tabla 5 se indican las masas iniciales y finales de cada una de las muestras, además del porcentaje de humedad de éstas.

Prueba	H ₂ SO ₄	NH ₄ OH	NaOH
Flavonas	+	+	+
Flavonoides	+	+	+
Chalconas	-	-	-
Dihidroflavonas	-	-	-
Antocianinas	-	-	-
Antocianidinas	-	-	-

Tabla 4. Resultados de las pruebas del tipo de metabolito secundario presente en los extractos, + (positivo) y - (negativo) a la especie.

Muestra	Masa inicial (g)	Masa final (g)	% de humedad
Níspero	7.27	3.98	45.23
Chaya	5.10	0.77	84.92
Mezquite	4.46	3.48	21.97
Guayaba	6.81	2.90	42.59

Tabla 5. Porcentaje de humedad de cada muestra vegetal.

En cuanto a la aplicación de métodos espectrofotométricos, se consiguió determinar el contenido de flavonoides totales en las muestras metanólicas así como conocer su porcentaje de actividad antioxidante. Con respecto al porcentaje de actividad antioxidante se determinó que el extracto vegetal de guayaba presenta un valor mayor en comparación al té verde, siendo de 95.35 % y 93.93 %, mientras que mezquite, níspero y chaya les preceden con valores del 93.78% y 93.57%, respectivamente. En la Tabla 6 se muestran los resultados de dicho ensayo.

Muestra	% Actividad antioxidante
Guayaba	95.3591
Níspero	93.7884
Mezquite	93.7884
Chaya	93.5742
Té verde	93.9312

Tabla 6. Porcentaje de actividad antioxidante de muestras vegetales de interés.

En relación a los resultados obtenidos por cromatografía de líquidos, se encontró que la guayaba cuenta con picos cromatográficos de interés entre los que se escogieron principalmente dos: un pico con un tiempo de retención de 2.031 y 830.5 mUA y el otro con un tiempo de retención de 7.387 y 69.6 mUA. En la Figura 1 se muestra el cromatograma de la guayaba y en la Figura 2 se muestra el cromatograma del té verde.

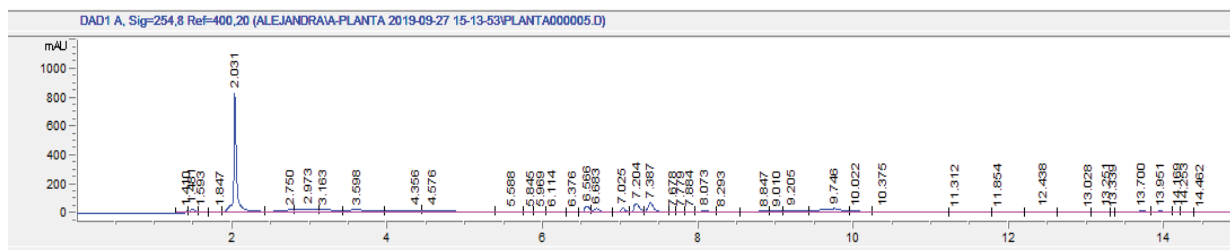


Figura 1. Cromatograma de guayaba a 254 nm.

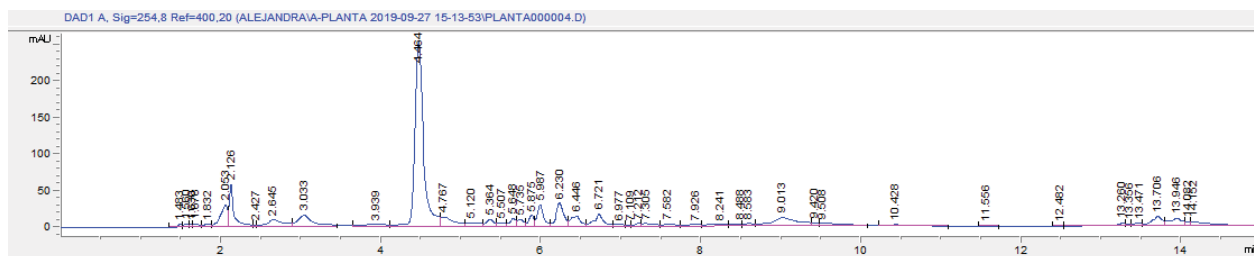


Figura 2. Cromatograma de té verde de 254 nm.

Conclusiones

Las especies propuestas presentan dos clases de metabolitos secundarios de interés: flavonoides y flavonas, mismas que les confieren propiedades antioxidantes. En el caso particular de los flavonoides, se ha encontrado que este metabolito puede representar una alternativa terapéutica para la regulación de la hiperglucemia, siendo posible que sea utilizado como agente antihiperoglucemiante, además, en el caso particular de la guayaba se encontró que posee una buena actividad antioxidante en comparación con el té verde. Los cromatogramas indican que, de igual manera, la guayaba también presenta picos cromatográficos con valores de mUA superiores a los encontrados en el té verde.

Limitaciones

Las principales limitaciones que tuvimos al realizar nuestra investigación se basan en no haber podido continuar con ella, esto debido a la contingencia sanitaria que se ha presentado, por otro lado, otra de las limitaciones fue no contar con el equipo necesario en nuestras instalaciones, ya que es necesario el uso de un cromatógrafo de gases acoplado a masas para poder determinar cuáles son los componentes de las muestras alcohólicas evaluadas. Al continuar la investigación se podrían definir diferentes ensayos para la identificación de metabolitos secundarios, así como calcular el % actividad antioxidante con otro tipo de antioxidante estandarizado.

Recomendaciones

Aquellos investigadores interesados en continuar con nuestra investigación podrán centrarse en estudiar los efectos de los extractos de guayaba con respecto a la glucosa, así como realizar el análisis en MS para caracterizar las especies presentes en los extractos de guayaba.

Agradecimientos

Los autores agradecen al tecnológico Nacional de México y a la Convocatoria 2019: Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica en los Programas Educativos de los Institutos Tecnológicos Federales, y Descentralizados por el financiamiento para la realización del presente, bajo el proyecto 5938.19-P

Referencias

- Andrade, G., Delgado, A., Herrera, E., Arévalo, M., & Caso, L. (2018). Variación de compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos en "Vanilla planifolia" Jacks. ex Andrews de la Huasteca Hidalguense, México. *Agrociencia*, 55-66.
- González, A., Cabañas, A., Arana, V., Hernández, E., & Ortiz, R. (2011). Citroflavonoides como posible alternativa en el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 17-27.
- Lemus, R., Vega, A., Zura, L., & Ah, K. (2012). Stevia rebaudiana Bertoni, source of high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Elsevier*, 1121-1132.
- Middleton, E. (2000). The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological*, 673-751.
- Salas, R. (2015). Evaluación de la actividad antidiabética y antioxidante in vitro de extractos polares de justicia spicigera y elucidación estructural de los compuestos fenólicos mayoritarios. *Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapán de León, Oaxaca*.