

Universidad Nacional San Luis Gonzaga

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Laboratorio de Productos Naturales

**“EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
EN FLORES DE *Tropaelum majus* L. mastuerzo y
Sarothamus scoparia retama.”**

**Silvia Klinar Barbuza
Artemio Chang Canales
Jorge Chanlilio Lavarello**

INTRODUCCION

El presente trabajo está enmarcado en el proyecto fitofarmacopea de Ica que se viene realizando en la Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNICA ^{1,2,3,4,5,6}.

Los Antioxidantes tienen importancia en el metabolismo humano ya que en este, se originan especies reactivas oxidantes tales como: OH^\cdot , H_2O_2 , etc, el problema crucial consiste en que los radicales libres no tienen receptores específicos, atacan todo lo que encuentran y son verdaderos misiles biológicos. Son responsables de desordenes vasculares que pueden originar diversos estados patológicos que incluyen enfermedades crónicas, cáncer, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, envejecimiento acelerado y enfermedades reumáticas.

La neutralización o inhibición de dichos agentes oxidantes ocurre por diversos mecanismos que es ejercido por los antioxidantes.

En el presente trabajo de tesis se ha evaluado la actividad antioxidante de nueve especies de la flora medicinal Iqueña, mediante un ensayo “In Vitro” basado en la capacidad de inhibir a las enzimas Polifenoloxidasas (PPO) obtenidas de manzanas.

Las especies fueron seleccionadas al azar y se emplearon las hojas, parte de la planta que generalmente se utiliza en la medicina tradicional, se prepararon tres extractos de cada especie con solventes diferentes.

Los ensayos son realizados con cinco concentraciones diferentes de cada uno de los extractos, los resultados se comparan con un patrón estándar de referencia (Vitamina C) para expresar la actividad antioxidante.

OXIDACIÓN EN SISTEMAS BIOLÓGICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Una consecuencia directa de la oxidación en los sistemas biológicos es que, al final del mismo, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación, algunas de las cuales pueden ceder uno o dos electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos llamadas especies reactivas de oxígeno (EROs).

Las fuentes endógenas de estas especies reactivas son las mitocondrias, los peróxisomas, fagocitosis, isquemia, reperfusión y otros. Entre las fuentes exógenas tenemos la contaminación ambiental, radiación ionizante, luz ultravioleta, ciertas drogas, reactivos y solventes industriales.

La generación de estos oxidantes en concentraciones mayores conllevan a enfermedades, puesto que una especie reactiva para poder convertirse en molécula estable busca electrones de otras moléculas tales como el ADN, lípidos de las membranas celulares, carbohidratos y de las proteínas de los tejidos corporales; esto genera una reacción en cadena comprometiendo nuevas moléculas y produciendo así más especies reactivas que pueden ser letales para la célula.

Las enzimas que participan en los procesos de oxidación son las Flavoproteínas, la Citocromo oxidasa, las Fenolasas (entre ellas las Polifenoloxidasas PPO). **Las Polifenoloxidasas son capaces de oxidar a los o-difenoles en o-benzoquinonas**

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Son los radicales libres y moléculas derivadas del oxígeno que tienen alta capacidad reactiva. Las especies reactivas de oxígeno (EROs) cumplen funciones fisiológicas importantes, pero si se generan en exceso pueden resultar muy perjudiciales para las células, esta situación se agrava en presencia de metales de transición como el hierro y el cobre.

Especies Radicálicas

Radical Anión Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

La fuente intracelular más importante es la mitocondria capaz de reducir parcialmente el oxígeno en dos lugares de la cadena respiratoria: el primero por acción de la enzima

NADH deshidrogenasa y el segundo es consecuencia de la autooxidación de la Quinona Coenzima Q o Ubiquinona.

Otras fuentes son los peróxisomas, leucocitos polimorfonucleares y células activadas aeróbicas (Neutrofilos, Monocitos, Macrófagos, Eosinófilos, Células cebadas, fibroblastos).

Radical Hidroxilo (OH[·])

Se forma esencialmente a partir del radical O₂^{·-} y del H₂O₂ mediante las reacciones de Haber – Weiss y Fenton, las que requieren trazas de metales de transición como catalizadores. Es uno de los oxidantes más potente que existe, posee acción directa sobre el ADN, lípidos y polisácaridos del líquido sinovial.

Radical Peróxilo (RO₂[·]) y Alcóxilo (RO[·])

Involucrados esencialmente en la peroxidación lipídica. La acumulación excesiva de las especies reactivas de oxígeno, pueden dar inicio a la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y de los fosfolípidos de membrana, comprometiendo la integridad estructural y funcional de la membrana celular, que puede conducir a la lisis total de la célula. Estos radicales se forman como intermedios durante las reacciones de la peroxidación lipídica, donde la formación de RO₂[·] es el paso más importante.

Oxido Nitrico (NO[·])

También conocido como factor relajante derivado del endotelio. El NO[·] se sintetiza en las terminaciones nerviosas a partir del aminoácido precursor L-Arginina mediante la acción de la enzima oxido nítrico sintetasa. Esta reacción tiene lugar en las células del endotelio vascular, algunas células cerebrales y por los fagocitos. Es un importante mediador de las respuestas vasculares inducidas por diferentes agentes farmacológicos como la Bradicinina y la Acetilcolina.

Radical Peróxinitrito (ONOO⁻)

Este nuevo compuesto a sido identificado como uno de los oxidantes liberados por las células de macrófagos como mecanismos de protección. Se sabe también que las células del endotelio vascular pueden formar pequeñas cantidades de superóxido que pueden reaccionar con el óxido nítrico y así generar el peróxinitrito. El peróxinitrito puede actuar directamente sobre la célula o descomponerse en otros productos tóxicos, en la actualidad se realizan estudios sobre las consecuencias que ocasionan esta reacción en las células.

Especies No Radicálicas

Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)

El O₂⁻ formado por acción de la superóxido dismutasa (SOD) origina H₂O₂. Este es poco reactivo a bajas concentraciones pero sin embargo si se exceden sus concentraciones pueden interactuar con los sistemas de generación de energía de las células e inactivarlos. Tiene participación importante en la formación de OH[·] catalizado por metales de transición.

Acido Hipocloroso (HOCL)

Se ha involucrado principalmente en el daño tisular directo y en los procesos de inflamación. Es un potente agente oxidante formado por los neutrófilos activados en los sitios de inflamación.

Singulete de Oxígeno (¹O₂)

Esta especie reactiva se genera en la piel por reacciones de fotosensibilización a fármacos, cosméticos, tóxicos de plantas o porfirias. Su participación es importante en la fototerapia de algunas enfermedades. Se dice que su formación sucede durante la dismutación no enzimática del O₂⁻; células fagocíticas activadas y durante los procesos de peroxidación lipídica.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La generación de especies oxidantes es un proceso inevitable. La protección natural contra estos oxidantes es limitada y puede ser sobrepasada en diferentes condiciones llevando a lesiones y eventualmente a la muerte celular.

La producción excesiva de EROs participa en la patogénesis de prácticamente todas las enfermedades y en el proceso de envejecimiento, debido a su capacidad para atacar, reversible o irreversiblemente, biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos libres, lípidos, lipoproteínas, carbohidratos y moléculas sintetizadas en el tejido conjuntivo. Sin embargo el organismo puede prevenir el daño producido por estos, a través de mecanismos de protección que incluye elevar los niveles intracelulares de defensas antioxidantes.

Los mecanismos de la actividad antioxidante se dan por acción directa sobre la especie oxidante ó por inhibición de las enzimas que intervienen en los procesos de

formación de las especies reactivas. Uno de los principales mecanismos de defensa antioxidante es ejercido por la barrera fisiológica que limita el paso del oxígeno , desde el aire inspirado hasta las células.

Otros mecanismos de defensa antioxidante se describen a continuación

ANTIOXIDANTES PRIMARIOS

Los Antioxidantes primarios actúan previniendo la formación de las especies reactivas de oxígeno reduciendo la velocidad de la cadena, convirtiéndolas en moléculas menos perjudiciales, que no son capaces de iniciar por sí mismos la formación de nuevos radicales, protegiendo de esta manera a las células del daño oxidativo. En este grupo destacan los antioxidantes endógenos como las enzimas SOD, glutatión peroxidasa, catalasas y proteínas de unión a metales como ferritina y céruloplasmina, se incluye también a la transferrina, cisteína, entre otros.

ANTIOXIDANTES SECUNDARIOS

Los Antioxidantes Secundarios son los llamados interruptores de cadena, ya que capturan los radicales libres y evitan las reacciones en cadena.

Entre estos principalmente tenemos a la vitamina C y E, B-carotenos.

ANTIOXIDANTES TERCARIOS

Los Antioxidantes terciarios son encargados de la reparación de las biomoléculas dañadas, en este caso se incluyen las enzimas reparadoras de ADN y la Metionina sulfóxido reductasa.

EXPERIMENTAL

MATERIALES Y METODOS

ESPECIE VEGETAL

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Descripción de la Técnica

Se determina la actividad antióxidante utilizando un método "In Vitro", midiendo la inhibición a las enzimas polifenoloxidasas (PPO) de la manzana.

Experimentalmente las polifenoloxidasas ejercen acción sobre el catecol oxidándolo a Orto-benzoquinona, este último absorbe en el Espectrofotometro UV-Vis. a 420 nm., por lo que resulta factible medir la cantidad de Orto-benzoquinona producida en la reacción.

El experimento se realiza agregando concentraciones diferentes de la muestra y se mide la cantidad de Orto-benzoquinona formada, si disminuye la producción de quinona, entonces la muestra tiene capacidad de inhibir a las polifenoloxidasas.

El experimento se repite utilizando vitamina C, en lugar de la muestra y se compara la actividad antióxidante de las muestras frente a la vitamina C.

Preparación de la muestra

Prepara soluciones acuosas de los extractos, a las concentraciones de 10, 30, 50, 80 y 100 ug/ml.

Si los extractos no son solubles en agua, disolverlos con gotas de dimetilsulfóxido y completar a volumen con el amortiguador.

Preparación del amortiguador

Prepara una solución acuosa que contenga 20 m.M. de acetato de sodio y 20 m.M. de ácido acético, con un ph aproximado de 5.

Preparación de la polifenoloxidasa (PPO)

La pulpa de manzana "Delicia" se licúa con el amortiguador, el homogenizado se centrifuga a 4000 r.p.m. aproximadamente durante 20 minutos; se separa el sobrenadante y se refrigera para conservar la PPO. Al momento de realizar la lectura, preparar una solución de PPO con el sobrenadante obtenido previamente filtrado y refrigerado.

Preparación del sustrato (catecol)

Preparar una solución 0,05 M de catecol diluida en el amortiguador y conservar en refrigeración hasta el momento de la lectura.

Preparación del standar (vitamina C)

Prepara soluciones acuosas de ácido ascórbico a partir de cristales Q.P. de vitamina C, a las concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 ug/ml.

Procedimiento

Preparar las siguientes soluciones:

- a) Blanco : 1.7 ml. de amortiguador
0.3 ml. de catecol
- b) Muestra : 1.4 ml. de amortiguador
0.3 ml. de catecol
0.3 ml de solución del extracto
- c) Estandar : 1.4 ml. de amortiguador
0.3 ml. de catecol
0.3 ml. de solución de vitamina C

A cada solución anterior, agregar 1ml. de la solución de PPO, e inmediatamente se procede a leer la absorbancia en el Espectrofotometro UV-Vis., cada 30 segundos durante 3 minutos.

RESULTADOS

PRODUCCION DE o-BENZOQUINONA

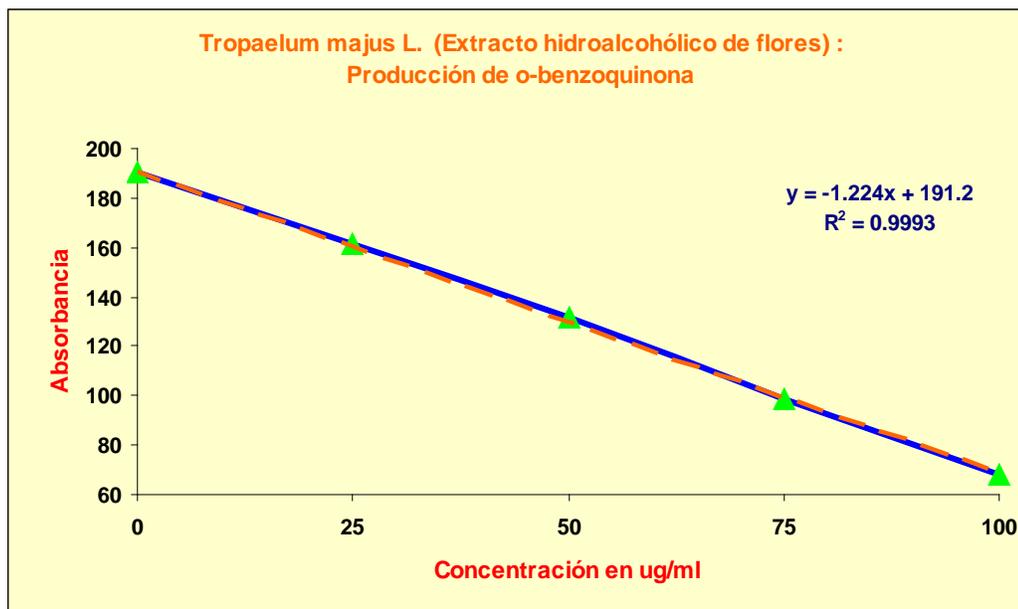
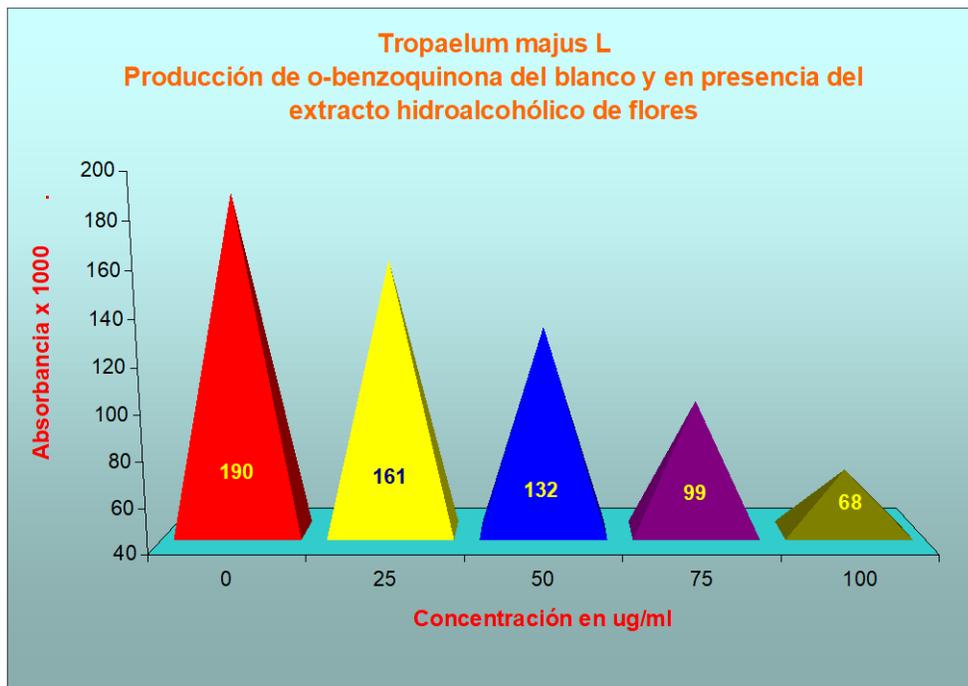
Nº	ESPECIE	PARTE DE LA PLANTA	INHIB. PROD. QUINONA				
			0 blanco	25 ug/ml	50 ug/ml	75 ug/ml	100 ug/ml
1	Tropaelum majus L. (mastuerzo)	Flores	177	154	133	99	68
2	Sarothamus scoparia (retama)	Flores	124	100	91	81	72
3	Vitamina C	-----	132	109	98	87	73

INHIBICION A LAS ENZIMAS POLIFENOLOXIDASAS

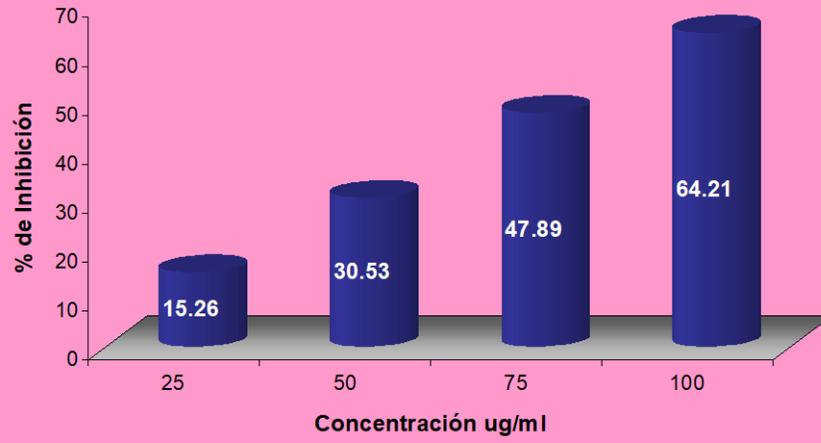
Nº	ESPECIE	PARTE DE LA PLANTA	INHIB. PROD. QUINONA			
			25 ug/ml	50 ug/ml	75 ug/ml	100 ug/ml
1	Tropaelum majus L. (mastuerzo)	Flores				
2	Sarothamus scoparia (retama)	Flores				
3	Vitamina C	-----				

6.- INTERPRETACION DE RESULTADOS

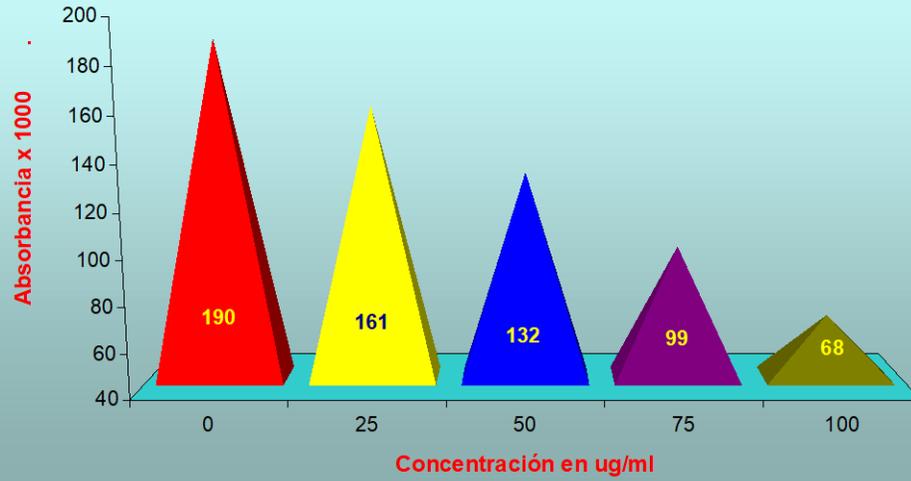
EVALUACION DE LOS EXTRACTOS

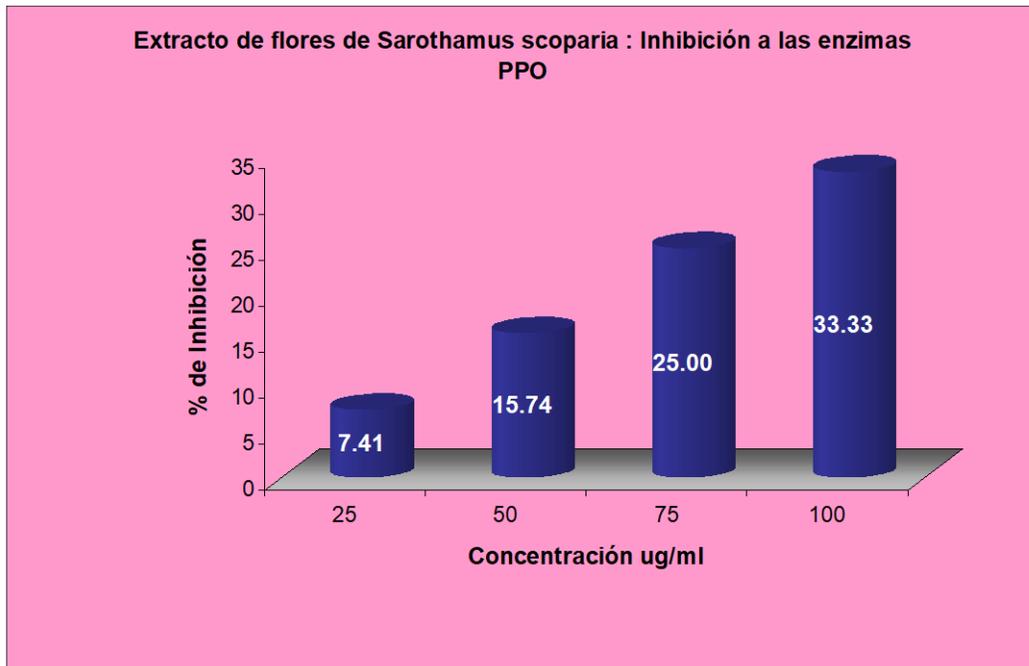
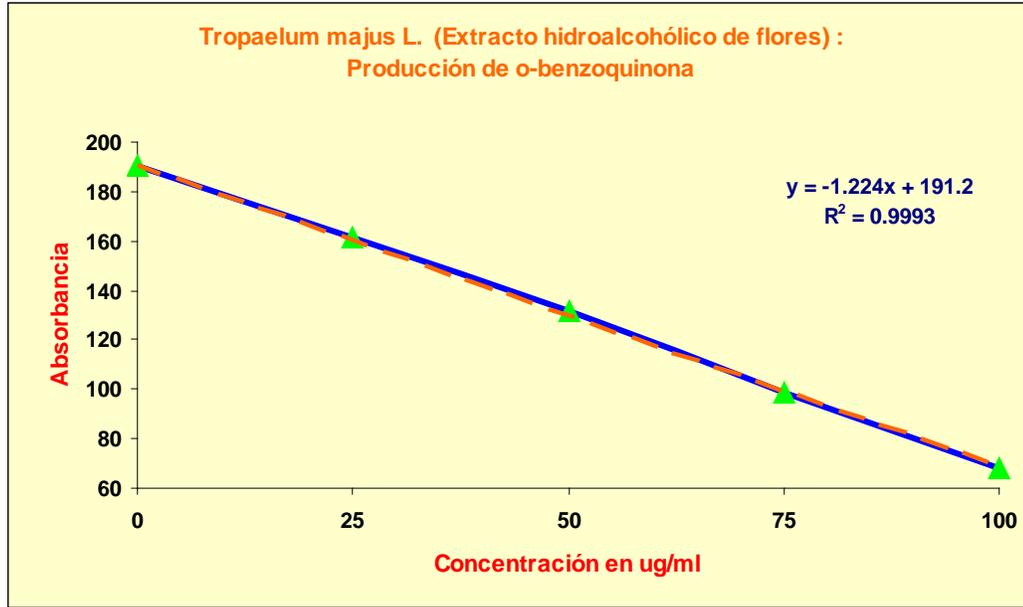


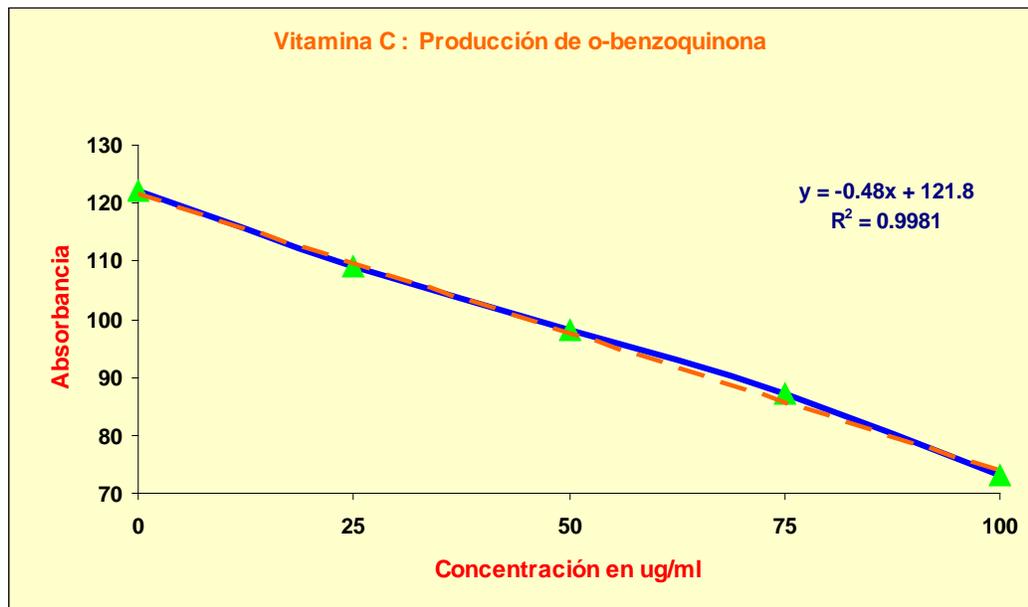
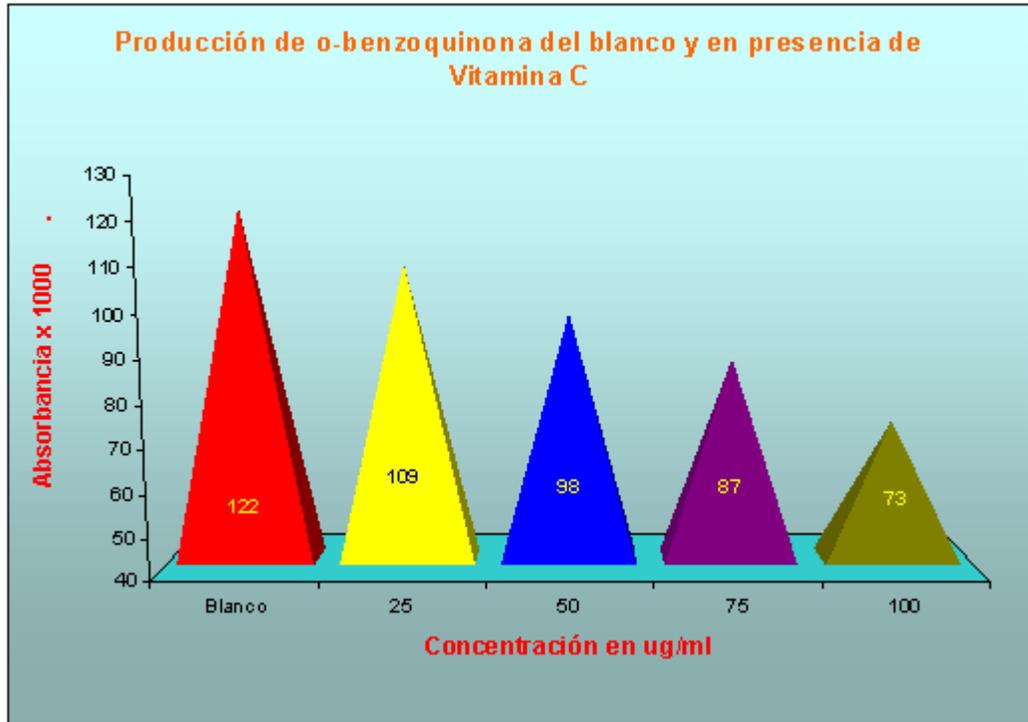
Extracto de flores de Tropaelum majus L : Inhibición a las enzimas PPO

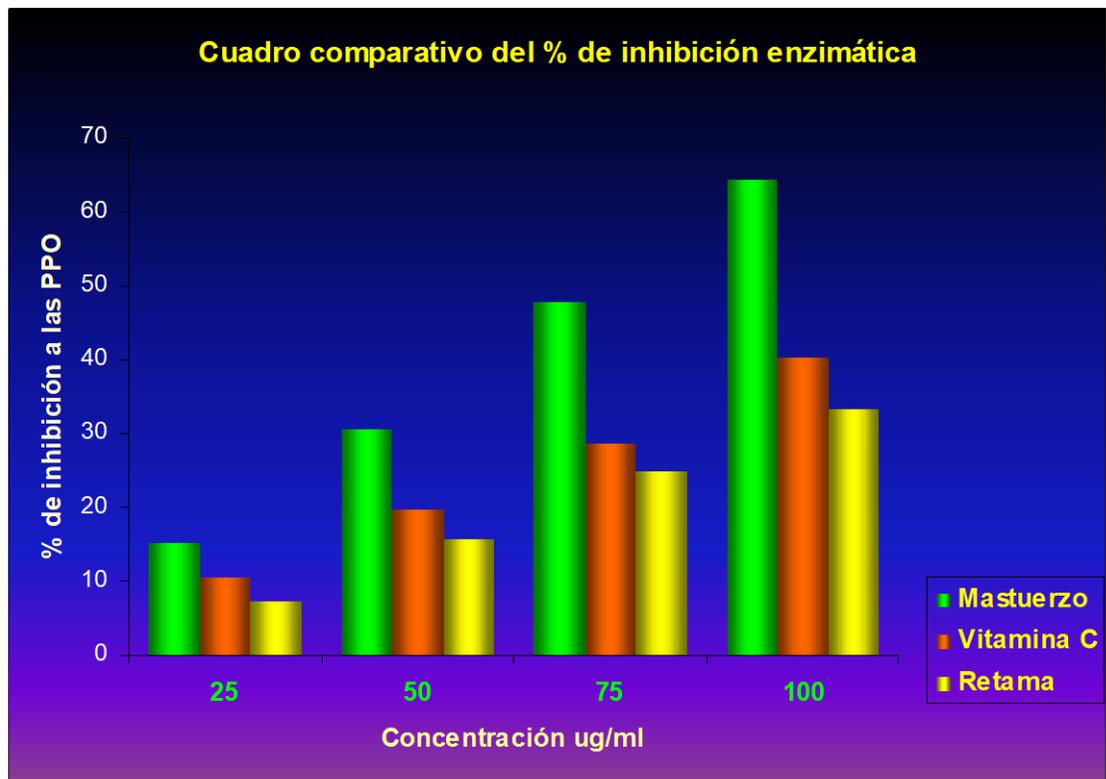
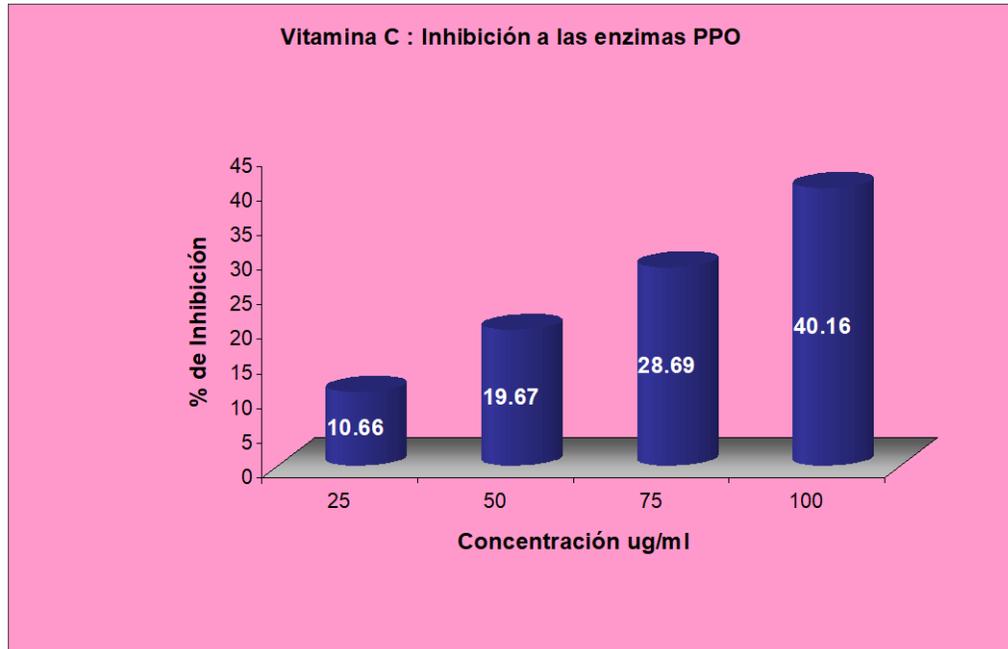


Tropaelum majus L
Producción de o-benzoquinona del blanco y en presencia del extracto hidroalcohólico de flores

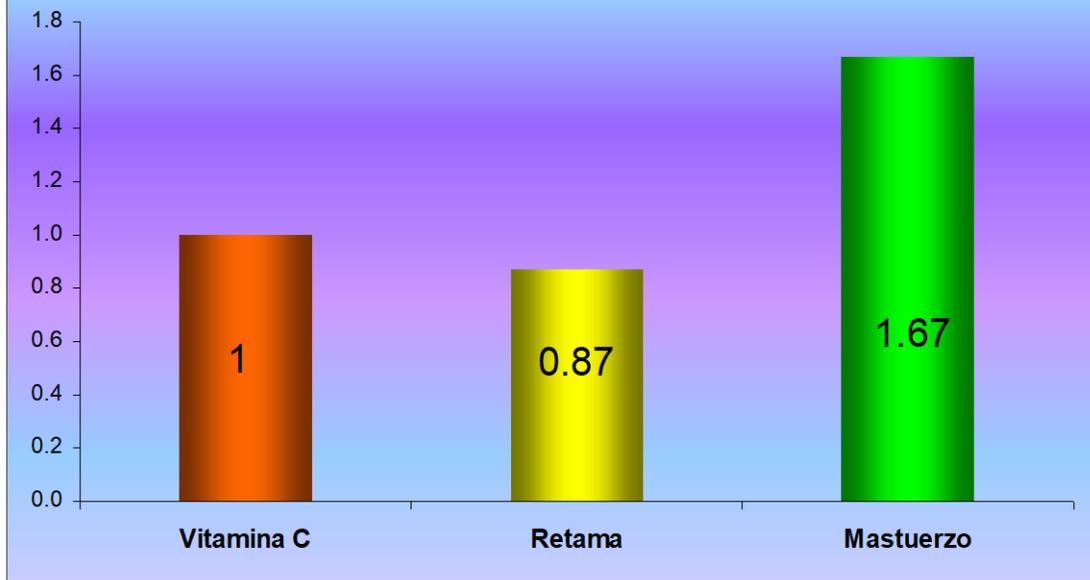








Estimación de la potencia antioxidante frente al estándar (Vitamina C)



Referencia - BIBLIOGRAFIA

1. MURGA Z. GLADYS (1998). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
2. ALDECOA FRANKLIN (1995). Revista Diagnóstico Vol. 34, 29-33.
3. BOVERIS ALBERTO A. ET AL (1997). Radicales libres y estados excitados.
4. GAMBOA ABOADO RAUL. Revista Médica, Vol. 2 – 14 – 15, 86 – 88.
5. OLAECHEA GONZALES AELA (1998). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico.
6. ALARCON HERNANDEZ JESSICA (1998). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
7. MIROQUESADA CANTURIAS OSCAR (1996) “Buena Salud” N° 8 y 18.
8. AYRES M. STEPHEN (1996) Tratado de Medicina Crítica y Terapia intensiva. Edit. Medica Panamericana (3ra Edición Argentina).
9. LOCK DE UGAR OLGA, CHAVEZ R. RICARDO, PLAZA P. ALBERTO (1996) “Antioxidantes de Origen Vegetal”. Revista Química 71 – 101.
10. BOHINSKI C. ROBERT. Bioquímica. 5ta. Edición Española.
11. MENDEZ F. JOSE, RAMOS RODRIGUEZ HECTOR (1997). “Sobre los Beneficios de los Radicales Libres”, Rev. Med, IMSS. Volumen 35 – México.
12. PEÑA SIGUAS CARMEN E. (1998). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
13. CHEFTEL. Oxidación de Lípidos