

## " EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS ACUOSOS DE HOJAS DE TRES PLANTAS FRUTALES DE ICA "

Silvia Klinar Barbuza, Artemio Chang Canales y Jorge Chanllío Lavarello

### INTRODUCCIÓN

Los nuevos conceptos fisiológicos, farmacológicos y clínicos, han devenido en investigaciones que han demostrado el rol en diferentes patologías, de las especies reactivas del oxígeno (EROs) que se generan como producto de nuestro metabolismo. Como consecuencia, en los últimos años se actualizó el tema de los antioxidantes biológicos y se ha incrementado la investigación en búsqueda de nuevos antioxidantes, principalmente de origen natural. Considerando las perspectivas que, a la par de los nuevos descubrimientos de la acción de las EROs, se generarán requerimientos de nuevas fuentes de agentes o sustancias antioxidantes; en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga, desde hace siete años, se ha implementado un programa de investigación que tiene como objetivo principal el de evaluar el potencial de la actividad antioxidante de la flora peruana, en especial de aquellas especies que se utilizan en la medicina tradicional y/o popular. (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17)

En ese marco, el presente trabajo corresponde a la evaluación de extractos acuosos de las hojas de: *Mangifera indica* L. (**mango**) (18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29), *Citrus sinensis* (L.) Osb. (**naranja**) (30,31,32,33,34,35,36) y *Vitis vinifera* L. (**uva, vid**) (37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49). La evaluación se realizó por un procedimiento "in vitro" que se fundamenta en la determinación de la capacidad de inhibir a las enzimas Polifenol Oxidasas (PPO), cuando actúan sobre el catecol oxidándolo a o-benzoquinona, la cual absorbe a 420 nm.

***Mangifera indica* L. (mango), *Citrus sinensis* (L.) Osb. (naranja) y *Vitis vinifera* L. (uva, vid)** son plantas que forman parte de la flora iqueña, se consumen los frutos y se utilizan en la medicina tradicional.

En la evaluación de la actividad antioxidante se ha comprobado que los extractos acuosos de hojas de *Mangifera indica* L., *Citrus sinensis* (L.) Osb. y *Vitis vinifera* L., presentan capacidad de inhibición a las enzimas Polifenol Oxidasas. Al realizar una estimación cuantitativa, por comparación con la capacidad de inhibición enzimática de un

estándar de referencia (Vitamina C), se comprobó que el extracto acuoso de hojas de *Mangifera indica* L. (**mango**) presenta una actividad antioxidante 416% mayor que la vitamina C. El extracto acuoso de hojas de *Citrus sinensis* (L.) Osb. (**naranja**) 153% y el extracto acuoso de hojas de *Vitis vinifera* L. (**uva, vid**) 184%, comparados con la Vitamina C.

## EXPERIMENTAL

### Muestras.-

- Hojas de *Mangifera indica* L. (**mango**), *Citrus sinensis* (L.) Osb. (**naranja**) y *Vitis vinifera* L. (**uva, vid**).

### Preparación de extractos.-

200 g de material vegetal (hojas las tres especies en estudio) se extraen por reflujo con agua. Los extractos líquidos se concentran a sequedad, a presión y temperatura reducida. A partir de los extractos secos se prepararon diluciones a 25, 50, 75 y 100 ug/mL respectivamente.

### Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó mediante una técnica "In Vitro", que consiste en determinar la capacidad de los extractos para inhibir a las enzimas polifenoloxidasas (PPO).

**Fundamento de la Técnica.-** El catecol en presencia de las enzimas polifenoloxidasas se oxida a o-benzoquinona. Cuando la oxidación ocurre en presencia de un inhibidor de las enzimas PPO, disminuye la cantidad de o-benzoquinona.

### Descripción de la Técnica

El catecol se somete a la acción de las PPO, la o-benzoquinona formada se mide a 420 nm; esta lectura se considera el blanco. Se repite el ensayo agregando el extracto en evaluación, a diferentes concentraciones ( 25, 50, 75 y 100 ug/mL ).

Si se observa actividad antioxidante, el ensayo se repite con vitamina C (estándar de referencia), y se compara con la actividad antioxidante de la muestra.

## 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) Estándar : 1.4 mL de amortiguador  
0.3 mL de catecol  
0.3 mL de solución de vitamina C

A cada solución anterior, se le agrega 1mL de la solución de PPO, e inmediatamente se procede a leer la absorbancia a 420 nm en el Espectrofotómetro.

### Preparación del amortiguador

Se prepara una solución acuosa que contenga 20 mM de acetato de sodio y 20 mM de ácido acético, con un pH aproximado de 5.

### Preparación de la polifenoloxidas (PPO)

Se licua pulpa de manzana con cantidad suficiente de amortiguador, el homogenizado se centrifuga a 4000 rpm durante 20 minutos; se separa el sobrenadante y se conserva refrigerado.

### Preparación del sustrato (catecol)

Preparar una solución 0,05 M de catecol con cantidad suficiente de amortiguador y conservar en refrigeración.

### Preparación del estándar (vitamina C)

Preparar soluciones acuosas de vitamina C, a las concentraciones de 25, 50, 75 y 100 ug/mL (1,2,3,4,5,6,7,8)

## RESULTADOS

Medida de la actividad antioxidante de los extractos acuosos de hojas de las 03 especies en estudio y la Vitamina C, por la producción de o-benzoquinona

Nº	Muestra	PRODUCCIÓN DE QUINONA					Actividad Antioxidante
		0 blanco	25 ug/mL	50 ug/mL	75 ug/mL	100 ug/mL	
1	Hojas de <i>Mangifera indica</i> L. ( <i>mango</i> )	468	428	389	352	327	Positivo
2	Hojas de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb. ( <i>naranja</i> )	434	422	409	398	386	Positivo
3	Hojas de <i>Vitis vinifera</i> L. ( <i>uva, vid</i> ).	472	456	438	426	409	Positivo
4	Vitamina C	456	448	441	431	423	Positivo

\* Los resultados son promedios de 5 ensayos, en cada caso.

## INHIBICIÓN A LAS ENZIMAS POLIFENOLOXIDASAS

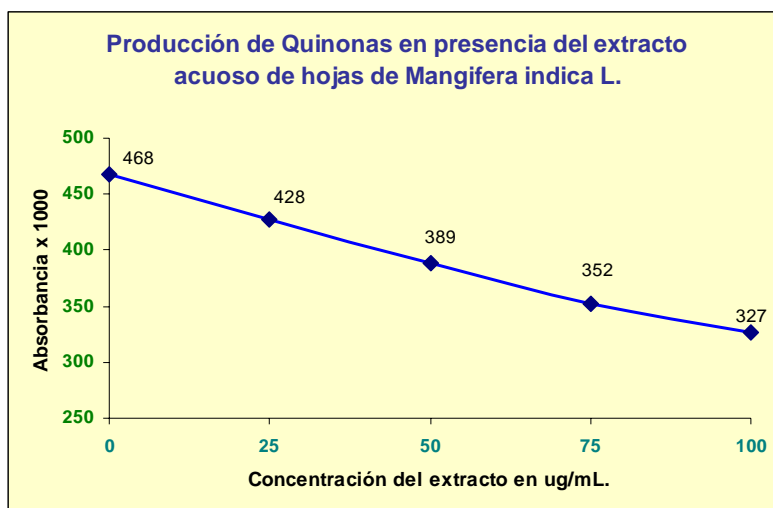
Nº	Muestra	% DE INHIBICIÓN A LAS PPO			
		25 ug/mL	50 ug/mL	75 ug/mL	100 ug/mL
1	Hojas de <i>Mangifera indica</i> L. ( <i>mango</i> )	8.55	16.88	24.79	30.13
2	Hojas de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb. ( <i>naranja</i> )	2.76	5.76	8.29	11.06
3	Hojas de <i>Vitis vinifera</i> L. ( <i>uva, vid</i> ).	3.39	7.20	9.75	13.35
4	Vitamina C	1.75	3.29	5.48	7.24

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

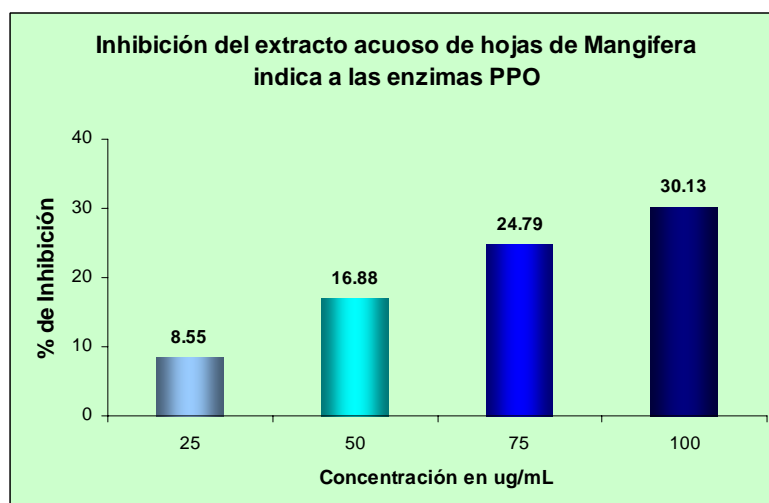
### EVALUACIÓN DE LOS EXTRACTOS

#### Extracto acuoso de hojas de *Mangifera indica* L. (*mango*)

En los cuadros siguientes se muestran los resultados de la oxidación del catecol por acción de las PPO, en presencia del extracto acuoso de hojas. El primer cuadro es una gráfica XY, en donde podemos observar que la disminución de o-benzoquinona es lineal, presentando un  $R^2 = 0.9933$

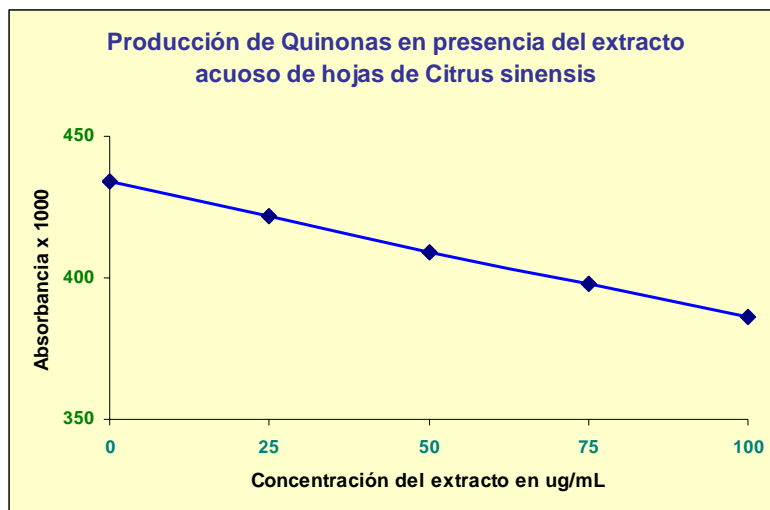


En el siguiente gráfico se muestra la capacidad de inhibición a las enzimas PPO, expresado en porcentaje y calculado a partir de los resultados mostrados en el gráfico anterior.

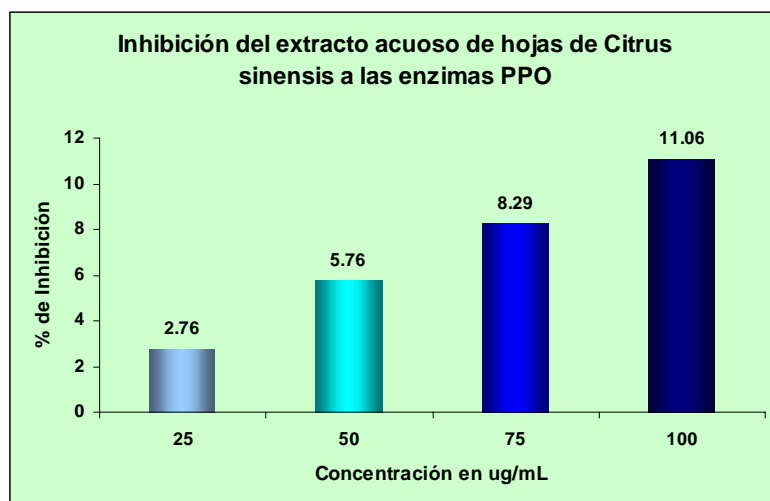


### Extracto acuoso de hojas de *Citrus sinensis* (L.) Osb. (*naranja*)

En los cuadros siguientes se muestran los resultados de la oxidación del catecol por acción de las PPO, en presencia del extracto acuoso de hojas. El primer cuadro es una gráfica XY, en donde podemos observar que la disminución de o-benzoquinona es lineal, presentando un  $R^2 = 0.9994$

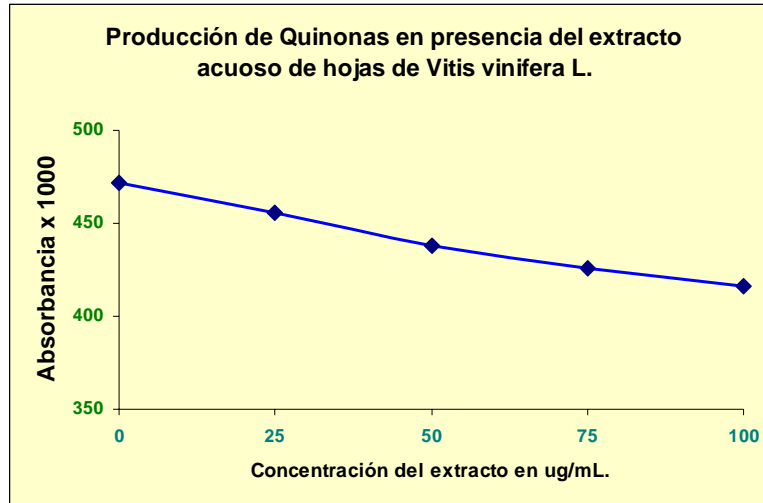


En el siguiente gráfico se muestra la capacidad de inhibición a las enzimas PPO, expresado en porcentaje y calculado a partir de los resultados mostrados en el gráfico anterior.

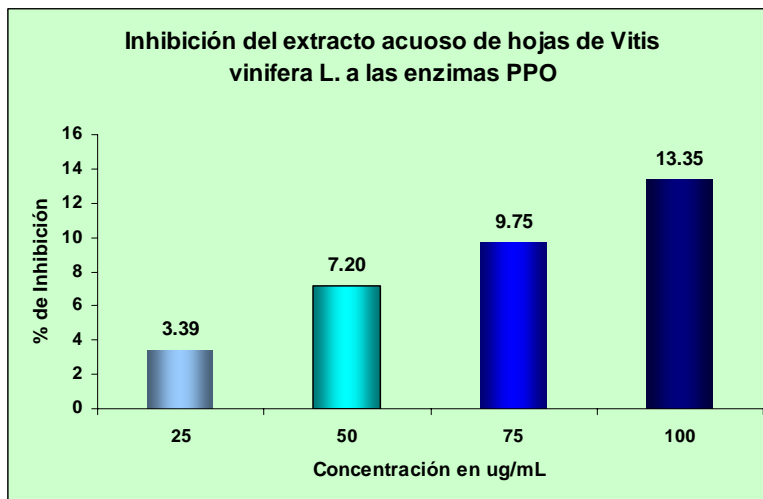


**Extracto acuoso de hojas de *Vitis vinifera* L. (*uva, vid*).**

En los cuadros siguientes se muestran los resultados de la oxidación del catecol por acción de las PPO, en presencia del extracto acuoso de hojas. El primer cuadro es una gráfica XY, en donde podemos observar que la disminución de o-benzoquinona es lineal, presentando un  $R^2 = 0.9971$

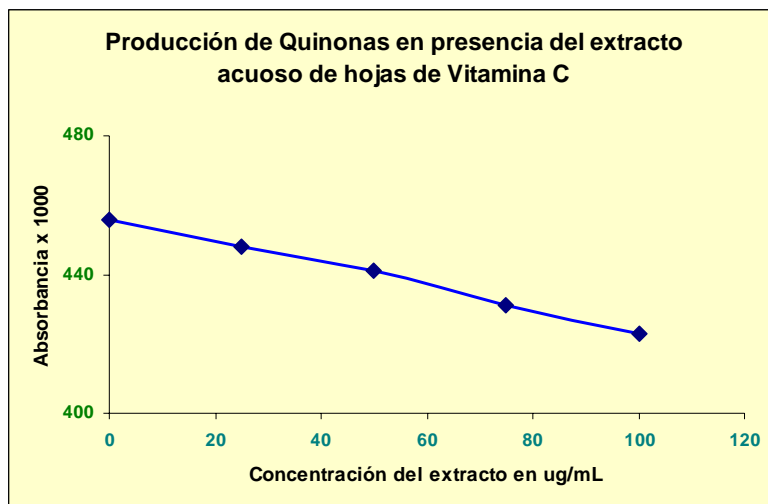


En el siguiente gráfico se muestra la capacidad de inhibición a las enzimas PPO, expresado en porcentaje y calculado a partir de los resultados mostrados en el gráfico anterior.

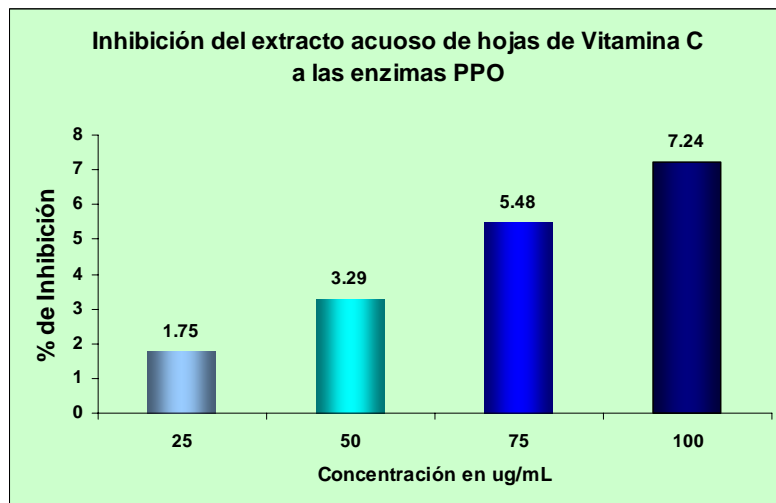


## Vitamina C

En los cuadros precedentes se muestran los resultados de la oxidación del catecol por acción de las PPO, en presencia de Vitamina C. El primer cuadro es una gráfica XY, en donde podemos observar que la disminución de o-benzoquinona es lineal, presentando un  $R^2 = 0.9972$



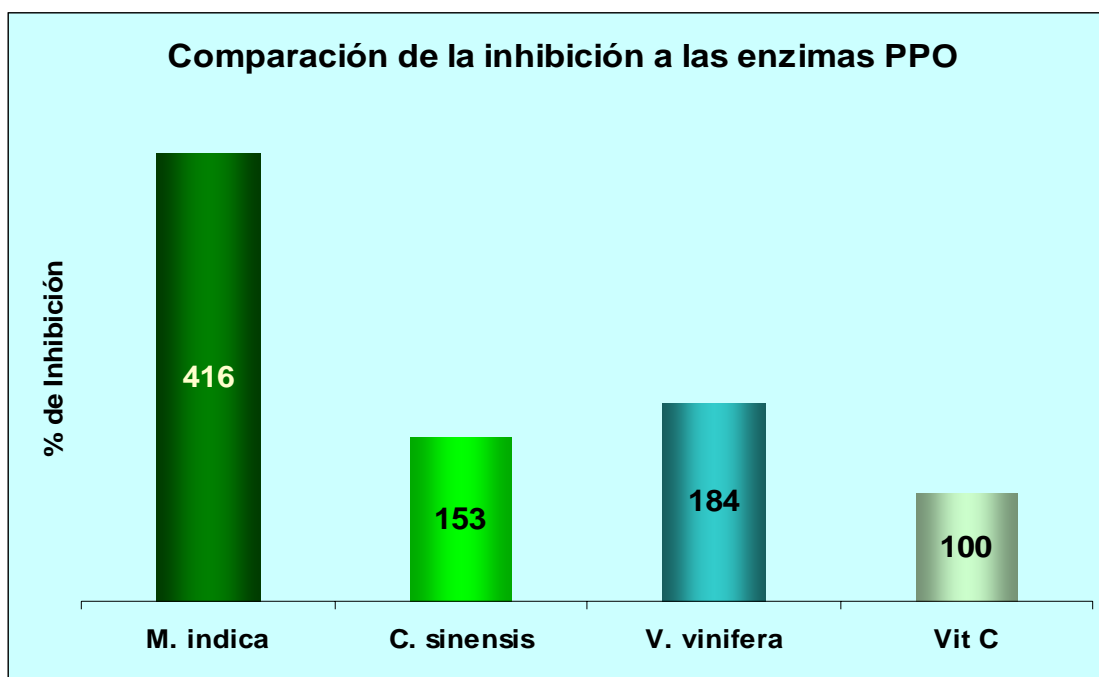
En el presente gráfico se muestra la capacidad de inhibición a las enzimas PPO, expresado en porcentaje y calculado a partir de los resultados mostrados en los gráficos anteriores.





## COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS CON LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA VITAMINA C

Se comparan los porcentajes de inhibición de los extractos con la Vitamina C a la concentración de 100 ug/mL, para determinar la actividad de dichos extractos frente al estándar.



## CONCLUSIONES

- Los extractos acuosos de hojas de Mangifera indica L. (**mango**), Citrus sinensis (L.) Osb. (**naranja**) y Vitis vinifera L. (**uva, vid**), muestran actividad antioxidante en el método de inhibición de las enzimas PPO.
  
- En la estimación cuantitativa de la actividad antioxidante detectada se observó que:
  - El extracto acuoso de hojas de Mangifera indica L. (**mango**), es el extracto de mayor actividad antioxidante de la especie estudiada. Presenta una actividad antioxidante de 416% comparada con la Vitamina C, es decir una potencia antioxidante 4 veces mayor.
  
  - El extracto acuoso de hojas de Citrus sinensis (L.) Osb. (**naranja**), presenta una actividad antioxidante de 153% comparada con la Vitamina C, es decir una potencia antioxidante 1.5 veces mayor.
  
  - El extracto acuoso de hojas de Vitis vinifera L. (**uva, vid**), presenta una actividad antioxidante de 184% comparada con la Vitamina C, es decir una potencia antioxidante aproximadamente 2 veces mayor.

## REFERENCIAS

1. Silvia Klinar B., Artemio Chang C. y Jorge Chanllio L (2006) Silvia Klinar B., Artemio Chang C. y Jorge Chanllio L. Evaluación de la actividad antioxidante de Lactuca sativa L. (**Lechuga**). FITOICA, Año 1- Número 1- Enero del 2006
2. Silvia Klinar B., Artemio Chang C. y Jorge Chanllio L (2006) Evaluación de la actividad antioxidante en extractos de hojas y flores de Althea rosea Cav. (**malvarrosa**). FITOICA, Año 1- Número 1- Enero del 2006
3. Silvia Klinar B., Artemio Chang C. y Jorge Chanllio L (2006) Evaluación de la Actividad Antioxidante en extractos de Foeniculum vulgare WILL. (**hinojo**). FITOICA, Año 1- Número 1- Enero del 2006

4. Silvia Klinar B., Artemio Chang C. y Jorge Chanllio L. (2006) Evaluación de la Actividad Antioxidante en extractos de *Urtica magellanica* Poir "**ortiga**". FITOICA, Año 1- Número 1- Enero del 2006
5. Silvia Klinar B., Artemio Chang C. y Jorge Chanllio L. (2006) Evaluación de la Actividad Antioxidante en flores de *Tropaeolum majus* L. **mastuerzo** y *Sarothamnus scoparius* Wimmer **retama negra**". FITOICA, Año 1- Número 1- Enero del 2006
6. Artemio Chang C., Silvia Klinar B. y Santos Jaimes S. (2006) Evaluación de la actividad antioxidante de *Polimnia sonchifolia* "**yacon**". FITOICA, Año 1- Número 1- Enero del 2006
7. Artemio Chang Canales, Silvia Klinar Barbuza, y Jorge Chanllio Lavarello (2006) Evaluación de la actividad antioxidante de cinco plantas medicinales de Ica. FITOICA, Año 1- Número 1- Enero del 2006
8. Chang C. Artemio y Klinar B. Silvia (UNICA). Olga Sonia León F. (CIEB Universidad De La Habana. Cuba) (2006) Actividad Antioxidante en Extractos de *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. "**Uña De Gato**". FITOICA, Año 1- Número 1- Enero del 2006
9. Miriam Acuache A., Artemio Chang C. y Silvia Klinar B. (2000) Reporte de la evaluación de la actividad antioxidante de plantas medicinales de Ica. Congreso Internacional Fito 2000.
10. Cueto CH. Christian (2000). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
11. Acuache A. Miriam et al (1999). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
12. Lara Paula (1998). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
13. Condeña R. Anlly y Ludeña C. Sonia (1999). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
14. Peña S. Carmen E. (1998). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
15. Alarcón H. Jessica et al (1998). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
16. Olaechea G. Aela et al (1998). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico.
17. Murga Z. Gladys (1998). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico UNICA.
18. Pardo-Andreu GL, Philip SJ, Riano A, Sanchez C, Viada C, Nunez-Selles AJ, Delgado R. Arch Mangifera indica L. (Vimang) protection against serum oxidative stress in elderly humans. Med Res. 2006 Jan; 37(1):158-64.
19. Pardo-Andreu GL, Delgado R, Nunez-Selles AJ, Vercesi AE. Mangifera indica L. extract (Vimang) inhibits 2-deoxyribose damage induced by Fe (III) plus ascorbate. Phytother Res. 2006 Feb; 20(2):120-4.
20. Prabhu S, Jainu M, Sabitha KE, Devi CS. Role of mangiferin on biochemical alterations and antioxidant status in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. J Ethnopharmacol. 2006 Aug 11; 107(1):126-33.

21. Rodeiro I, Cancino L, Gonzalez JE, Morffi J, Garrido G, Gonzalez RM, Nunez A, Delgado R. Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. *Food Chem Toxicol*. 2006 Oct; 44(10):1707-13.
22. Pardo-Andreu GL, Sanchez-Baldoquin C, Avila-Gonzalez R, Yamamoto ET, Revilla A, Uyemura SA, Naal Z, Delgado R, Curti C. Interaction of Vimang (*Mangifera indica* L. extract) with Fe(III) improves its antioxidant and cytoprotecting activity. *Pharmacol Res*. 2006 Nov;54(5):389-395.
23. Bafna PA, Balaraman R. Antioxidant activity of DHC-1, an herbal formulation, in experimentally-induced cardiac and renal damage. *Phytother Res*. 2005 Mar; 19(3):216-21.
24. Ramirez D, Tafazoli S, Delgado R, Harandi AA, O'Brien PJ. Preventing hepatocyte oxidative stress cytotoxicity with *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Drug Metabol Drug Interact*. 2005; 21(1):19-29.
25. Shivashankara KS, Isobe S, Al-Haq MI, Takenaka M, Shiina T. Fruit antioxidant activity, ascorbic acid, total phenol, quercetin, and carotene of Irwin mango fruits stored at low temperature after high electric field pretreatment. *J Agric Food Chem*. 2004 Mar 10; 52(5):1281-6.
26. Shafiee M, Carbonneau MA, d'Huart JB, Descomps B, Leger CL. Synergistic antioxidative properties of phenolics from natural origin toward low-density lipoproteins depend on the oxidation system. *J Med Food*. 2002 Summer;5(2):69-78.
27. Calliste CA, Trouillas P, Allais DP, Simon A, Duroux JL. Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *J Agric Food Chem*. 2001 Jul;49(7):3321-7.
28. Martinez G, Delgado R, Perez G, Garrido G, Nunez Selles AJ, Leon OS. Evaluation of the in vitro antioxidant activity of *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Phytother Res*. 2000 Sep; 14(6):424-7.
29. Sánchez GM, Re L, Giuliani A, Nunez-Selles AJ, Davison GP, León-Fernández OS. Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol Res*. 2000 Dec;42(6):565-73
30. Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Kokkalou E, Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. Analysis of antioxidant compounds in sweet orange peel by HPLC-diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*. 2005 Mar; 19(2):138-48.
31. Sánchez-Moreno C, Plaza L, Elez-Martinez P, De Ancos B, Martin-Belloso O, Cano MP. Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *J Agric Food Chem*. 2005 Jun 1; 53(11):4403-9.

32. Franke AA, Cooney RV, Henning SM, Custer LJ. Bioavailability and antioxidant effects of orange juice components in humans. *J Agric Food Chem.* 2005 Jun 29; 53(13):5170-8.
33. Fiore A, La Fauci L, Cervellati R, Guerra MC, Speroni E, Costa S, Galvano G, De Lorenzo A, Bacchelli V, Fogliano V, Galvano F. Antioxidant activity of pasteurized and sterilized commercial red orange juices. *Mol Nutr Food Res.* 2005 Dec; 49(12):1129-35.
34. Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Krzeminski R, Gralak M, Martin-Belloso O, Delgado-Licon E, Haruenkit R, Katrich E, Park YS, Jung ST, Trakhtenberg S. Fresh Israeli Jaffa blond (Shamouti) orange and Israeli Jaffa red Star Ruby (Sunrise) grapefruit juices affect plasma lipid metabolism and antioxidant capacity in rats fed added cholesterol. *J Agric Food Chem.* 2004 Jul 28; 52(15):4853-9.
35. Manthey JA. Fractionation of orange peel phenols in ultrafiltered molasses and mass balance studies of their antioxidant levels. *J Agric Food Chem.* 2004 Dec 15; 52(25):7586-92.
36. Proteggente AR, Saija A, De Pasquale A, Rice-Evans CA. The compositional characterisation and antioxidant activity of fresh juices from sicilian sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) varieties. *Free Radic Res.* 2003 Jun; 37(6):681-7.
37. Monagas M, Hernandez-Ledesma B, Gomez-Cordoves C, Bartolome B. Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: antioxidant and chemical characterization. *J Agric Food Chem.* 2006 Jan 25; 54(2):319-27.
38. Janisch KM, Olschlager C, Treutter D, Elstner EF. Simulated digestion of *Vitis vinifera* seed powder: polyphenolic content and antioxidant properties. *J Agric Food Chem.* 2006 Jun 28; 54(13):4839-48.
39. Orhan N, Aslan M, Orhan DD, Ergun F, Yesilada E. In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2006 May 20
40. Yilmaz Y, Toledo RT. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J Agric Food Chem.* 2004 Jan 28; 52(2):255-60.
41. Moio L, Ugliano M, Genovese A, Gambuti A, Pessina R, Piombino P. Effect of antioxidant protection of must on volatile compounds and aroma shelf life of Falanghina (*Vitis vinifera* L.) wine. *J Agric Food Chem.* 2004 Feb 25; 52(4):891-7.
42. Giorcelli A, Sparvoli F, Mattivi F, Tava A, Balestrazzi A, Vrhovsek U, Calligari P, Bollini R, Confalonieri M. Expression of the stilbene synthase (StSy) gene from grapevine in transgenic white poplar results in high accumulation of the antioxidant resveratrol glucosides. *Transgenic Res.* 2004 Jun; 13(3):203-14.

43. Kalkan Yildirim H, Delen Akcay Y, Guvenc U, Yildirim Sozmen E. Protection capacity against low-density lipoprotein oxidation and antioxidant potential of some organic and non-organic wines. *Int J Food Sci Nutr*. 2004 Aug; 55(5):351-62.
44. Privat C, Telo JP, Bernardes-Genisson V, Vieira A, Souchard JP, Nepveu F. Antioxidant properties of trans-epsilon-viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and nonaqueous media. *J Agric Food Chem*. 2002 Feb 27; 50(5):1213-7.
45. Chidambara Murthy KN, Singh RP, Jayaprakasha GK. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *J Agric Food Chem*. 2002 Oct 9; 50(21):5909-14.
46. Simonetti P, Ciappellano S, Gardana C, Bramati L, Pietta P. Procyanidins from *Vitis vinifera* seeds: in vivo effects on oxidative stress. *J Agric Food Chem*. 2002 Oct 9; 50(21):6217-21.
47. Torres JL, Varela B, Garcia MT, Carilla J, Matito C, Centelles JJ, Cascante M, Sort X, Bobet R. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *J Agric Food Chem*. 2002 Dec 18; 50(26):7548-55.
48. Castillo J, Benavente-García O, Lorente J, Alcaraz M, Redondo A, Ortuno A, Del Río JA. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J Agric Food Chem*. 2000 May; 48(5):1738-45.
49. Scartezzini P, Speroni E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J Ethnopharmacol*. 2000 Jul; 71(1-2):23-43.
50. Chang C. Artemio y Klinar B. Silvia. Fitofarmacopea Tradicional de Ica. En Prensa.
51. Calderón, P. (1987) Plantas Terapéuticas de Ica. Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico. UNICA
52. Font Quer P. (1978) Botánica pintoresca. Sopena. España.
53. Soukoup J. (1970) Vocabulario de los nombres vulgares de la Flora Peruana. Colegio Salesiano. Lima – Perú.