

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMÍCAS Y FARMACIA



**EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE  
EXTRACTOS DE POLARIDAD CRECIENTE DE RIZOMA DE  
ZARZAPARRILLA (*Smilax domingensis* Willd)**

Julio Roberto Juárez Pernillo

Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales

Guatemala, Noviembre de 2017

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMÍCAS Y FARMACIA



Trabajo de tesis presentado por

Julio Roberto Juárez Pernillo

Para optar al grado de Maestro en Artes

Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales

Guatemala, Noviembre de 2017

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	DECANO
M.A. Elsa Julieta Salazar de Ariza	SECRETARIA
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	VOCAL I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	VOCAL II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	VOCAL III
BR. Andreina Delia Irene López Hernández	VOCAL IV
BR. Carol Andrea Betancourt Herrera	VOCAL V

CONSEJO ACADÉMICO

ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Rubén Dariel Velásquez Miranda, Ph.D.

María Ernestina Ardón Quezada, MSc.

Jorge Mario Gómez Castillo, MA.

Clara Aurora García González, MA.

José Estuardo López Coronado, MA.

## ÍNDICE

Contenido	Página
1. RESUMEN EJECUTIVO.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES.....	5
3.1 Historia del término antioxidante.....	5
3.2 Radicales libres.....	6
3.3 Estrategias para el Descubrimiento de Fármacos a Partir de Plantas Superiores.....	8
3.3.1 Identificación del Espécimen Vegetal.....	9
3.3.2 Preparación del material vegetal para la extracción.....	10
3.3.3 Extracción del material vegetal.....	11
3.3.4 Formación de Artefactos.....	14
3.3.5 Tratamiento de los Extractos.....	16
3.3.6 Bioensayos.....	17
3.3.7 Selección Química con CCF.....	19
3.3.8 Técnicas de Separación Preparativas.....	20
3.3.9 Fraccionamiento por Cromatografía.....	21
3.3.10 Métodos de Cuantificación Espectrofotométricos de Especies Antioxidantes.....	23
3.4 Estrés oxidativo.....	29
3.4.1 Oxidación.....	29
3.4.2 Enfermedades, procesos degenerativos y el estrés oxidativo..	30
3.5 Antioxidante Naturales.....	35
4. JUSTIFICACIÓN.....	39
5. OBJETIVOS.....	40
5.1 Objetivo General.....	40
5.2 Objetivos Específicos.....	40
6. HIPÓTESIS.....	41
7. METODOLOGÍA.....	42
7.1 Diseño de investigación.....	42
7.2 Universo de trabajo.....	42
7.3 Muestra.....	42
7.4 Medios.....	42
7.5 Métodos.....	43
8. RESULTADOS.....	45
9. DISCUSIÓN.....	49
10. CONCLUSIONES.....	51
11. RECOMENDACIONES.....	52
12. REFERENCIAS.....	53

## 1. RESUMEN EJECUTIVO

En el presente trabajo se resumen las principales metodologías y estrategias analíticas que pueden encontrarse en la literatura especializada sobre tamizaje fitoquímico y fraccionamiento bioguiado, aplicables a la evaluación de la presencia de antioxidantes en rizoma de *Smilax domingensis* Willd. Se exponen los resultados de rendimiento de la extracción por maceración de rizoma de *S. domingensis*, utilizando disolventes en una secuencia de polaridad ascendente (hexano, cloroformo, acetato de etilo, isopropanol y metanol). Se muestran los resultados de cromatografía en capa fina sobre la que fueron aplicados los extractos obtenidos, comparados contra estándares de los flavonoides rutina, quercetina, ácido cafeico y ácido clorogénico, y revelados con reactivo radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), y luz ultravioleta de 254 nm.

## 2. INTRODUCCION

Las especies químicas con oxígeno reactivo (EOR), son producidas en el transcurso normal del metabolismo y cumplen importantes funciones fisiológicas. Sin embargo, debido a su alta reactividad, la acumulación de EOR en el ambiente celular puede afectar la estructura celular y la integridad funcional de moléculas críticas como el ADN, proteínas y lípidos, produciéndose el denominado estrés oxidativo. El estrés oxidativo puede afectar diversos tejidos en el organismo humano, pero afecta particularmente a aquellos con alto consumo de oxígeno, como el corazón, cerebro, hígado y riñones.

En la actualidad existe un aumento sin precedentes de casos de enfermedades asociadas al estrés oxidativo. El estrés oxidativo es causado por el desequilibrio entre la producción de especies químicas con oxígeno reactivo (EOR), y la capacidad del organismo de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Los desbalances en el equilibrio normal de oxidorreducción celular pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan los componentes celulares, que incluyen proteínas, lípidos y ADN. El estrés oxidativo severo puede llegar a causar la muerte celular y aún una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis; si es muy intensa, puede provocar la necrosis. Los malos hábitos alimentarios aunados al sedentarismo, el estrés cotidiano y la contaminación ambiental crean condiciones que propician el incremento del estrés oxidativo a nivel celular. El desarrollo de diversas enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, el cáncer y la diabetes mellitus, entre otras, así como el proceso natural de envejecimiento, han sido asociadas con el estrés oxidativo.

Aunque las células poseen intrincados mecanismos para contrarrestar el estrés oxidativo, el consumo de antioxidantes como nutraceuticos en suplementos dietéticos puede ejercer efectos farmacológicos positivos sobre padecimientos humanos específicos, a modo de contrarrestar los efectos negativos de las EOR.

Se ha encontrado que la actividad antioxidante en diversos productos de origen vegetal, puede coadyuvar en la mitigación de los efectos tóxicos dañinos ocasionados por el estrés oxidativo severo.

En el género *Smilax* hay especies de uso medicinal que crecen en Guatemala y en diferentes regiones de Mesoamérica, conocidas principalmente como zarzaparrilla y/o cuculmeca. Al rizoma y raíz de estas plantas se le atribuyen diversas propiedades medicinales. Las más relevantes; las tónicas y estimulantes, antiinflamatorias, antibacterianas y antifúngicas, las cuales se han conocido desde antes del arribo de los europeos a América.

Los extractos estudiados de rizoma de zarzaparrilla poseen potencial uso por su actividad antioxidante y abarcan la elaboración de productos farmacéuticos, fitoterápicos y nutracéuticos para el tratamiento preventivo de condiciones degenerativas de la salud humana, en conservación de alimentos, como aditivo natural, y en fitocosmética para productos tópicos retardantes del envejecimiento de la piel.

En el presente estudio se evaluó la actividad antioxidante, en extractos obtenidos por extracción fraccionada secuencial con disolventes orgánicos de polaridad ascendente, a manera de caracterizar qué disolvente brinda las condiciones adecuadas de extracción, según características de polaridad de los metabolitos responsables de la actividad antioxidante presentes en el rizoma de *S. domingensis*; este estudio es un paso indispensable en la caracterización de los compuestos químicos responsables de la misma.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Historia del término “antioxidante”

El término “antioxidante” fue utilizado originalmente para referirse específicamente a un producto químico que previniera el consumo de oxígeno. A finales del siglo XIX y a principios de siglo XX, extensos estudios fueron dedicados a las aplicaciones de antioxidantes en importantes procesos industriales, tales como la prevención de la corrosión del metal, la vulcanización del caucho y la polimerización de combustibles en la formación de sarro, en motores de combustión interna (Schafer, 2001).

Las primeras investigaciones sobre el rol de los antioxidantes en Biología se centraron en su uso en la prevención de la oxidación de grasas insaturadas, que es la causa de la rancidez. La actividad antioxidante podía ser medida simplemente al colocar la grasa en un contenedor cerrado con oxígeno y calcular la tasa de consumo. Sin embargo, fue la identificación de las vitaminas A, C y E como antioxidantes, la que revolucionó el campo y condujo a dilucidar la importancia de los antioxidantes en la bioquímica de los organismos vivos (Lelli, Becks, Dabrowska & Hinshaw, 1998).

Los posibles mecanismos de acción de los antioxidantes fueron investigados por primera vez cuando se reconoció que una sustancia con actividad antioxidante es probable que se oxide a sí misma fácilmente. La investigación de la forma en que la vitamina E previene el proceso de peroxidación lipídica condujo a la identificación de antioxidantes como agentes reductores que previenen reacciones oxidativas, a menudo por medio de depuración de EOR, antes de que puedan dañar las células (Sies, 1985).



### 3.2 Radicales libres

Los radicales libres (RL), son todas aquellas especies químicas capaces de existir con electrones desapareados en su orbital electrónico más externo (Chang, 1992; Carvalho, 2004). Entre ellos, se encuentra el triclorometilo,  $\text{CCl}_3^\bullet$ , el cual consiste en un radical centrado en un carbono que se forma durante el metabolismo del disolvente tetracloruro de carbono en el hígado, contribuyendo a los efectos tóxicos del mismo (Chang, 1992).

Las EOR que se producen en las célula incluyen el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el ácido hipocloroso y RL, tales como el oxidrilo ( $\bullet\text{OH}$ ), y el superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), radical centrado en el oxígeno con reactividad limitada. El radical del oxidrilo es particularmente inestable y reacciona rápidamente y de forma no específica con la mayoría de las moléculas biológicas. También puede mencionarse el peroxilo y alcoxilo ( $\text{RO}_2$  y  $\text{RO}$ ), que son radicales centrados en el oxígeno y formados durante la degradación de los peróxidos orgánicos. Otro RL importante es el óxido de nitrógeno ( $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_x$ ). El  $\text{NO}$  se forma *in vivo* a partir del aminoácido L-arginina y el dióxido de nitrógeno se produce cuando el óxido nítrico reacciona con el oxígeno; se encuentra en el aire contaminado y el humo de la materia orgánica en combustión (Sies, 1985).

**Tabla 1**  
**Agentes oxidantes**

Oxidante	Descripción
$\text{O}_2^-$ , Anión superóxido	Estado de reducción de un electrón de $\text{O}_2$ , formado en muchas reacciones de autooxidación por la cadena de transporte de electrones. Es poco reactivo, pero puede liberar $\text{Fe}^{2+}$ de proteínas ferrosulfuradas y de ferritina. Sufre dismutación para formar $\text{H}_2\text{O}_2$ espontáneamente o por catálisis enzimática y es un precursor para la formación de $\bullet\text{OH}$ catalizado por metales.
$\text{H}_2\text{O}_2$ peróxido de hidrógeno	Estado de reducción de dos electrones, formado por la dismutación de $\bullet\text{O}_2^-$ o por reducción directa de $\text{O}_2$ . Soluble en lípidos y, por ende, capaz de difundir a través de las membranas.

•OH, hidroxilo	Estado de reducción de tres electrones. Extremadamente reactivo, ataca la mayoría de los componentes celulares. Formado por reacciones de radicales con componentes celulares como lípidos y nucleobases.
RO <sup>•</sup> , alcoxi- y ROO <sup>•</sup> , peroxi-	Radicales orgánicos centrados en oxígeno. Formas lipídicas participan en reacciones de peroxidación lipídica. Producido en presencia de oxígeno por adición de radicales a dobles enlaces o eliminación de hidrógeno.
HClO, ácido hipocloroso	Formado a partir de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por la mieloperoxidasa. Soluble en lípidos y altamente reactivo. Rápidamente oxida constituyentes de proteínas, incluyendo tioles, aminas y metionina.
OONO <sup>•</sup> , per- oxinitrito	Formado en una rápida reacción entre O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> y NO. Liposoluble y similar en reactividad al ácido hipocloroso. Protonación forma ácido peroxinitroso, que puede someterse a escisión homolítica para formar radicales de hidroxilo y de dióxido de nitrógeno.

---

Fuente: Sies (1985).

Estos oxidantes pueden dañar las células al iniciar reacciones químicas en cadena tales como la peroxidación de lípidos, proteínas o la oxidación del ADN. Los daños al ADN pueden causar mutaciones irreversibles, y posiblemente provocar cáncer si no son revertidos por los mecanismos de reparación del mismo, mientras que los daños a las proteínas causan la inhibición enzimática, la desnaturalización y la degradación de proteínas (Sies, 1985, Carvalho).

El uso de oxígeno como parte del proceso para generar energía metabólica produce EOR. En este proceso, el anión de superóxido se produce como subproducto de varios pasos en la cadena de transporte de electrones. Particularmente importante es la reducción de la coenzima Q en el complejo 3, ya que un radical libre altamente reactivo se forma como intermediario (Q<sup>•-</sup>). Este intermediario inestable puede conducir a una pérdida de electrones cuando estos saltan directamente al oxígeno molecular y forman el anión superóxido en vez de

desplazarse con la serie de reacciones bien controladas de la cadena de transporte de electrones (Docampo, 1995; Rice-Evans, 1995).

Para que una molécula sea estable, todos sus electrones deben hallarse compensados por protones. La molécula que tiene uno o varios electrones no apareados es inestable y tiende a buscar moléculas estables para formar combinaciones con ellas y completar sus electrones. Esto produce oxidación y puede dar lugar a una reacción en cadena dañina en el organismo. Por esto los RL deben ser inactivados; en caso contrario, su reactividad química puede dañar varios tipos de macromoléculas celulares, incluyendo proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, lo cual resulta en daño celular (Fürst, 1998).

### **3.3 Estrategias para el descubrimiento de fármacos a partir de plantas superiores**

- Para poder hallar fármacos novedosos en plantas es necesario llevar a cabo un procedimiento de cribado para la detección de sus actividades biológicas. Este procedimiento conduce desde la planta intacta hasta sus constituyentes puros, implica sucesivos trabajos que pueden durar desde semanas hasta años, e incluye los siguientes pasos (Hostettmann, Gupta, Martson & Ferreira, 2008):
- Identificación botánica de la planta.
- Recolección y secado del material vegetal, con las precauciones que evitan la formación de artefactos.
- Preparación de extractos con diferentes disolventes y posterior análisis de dichos extractos por métodos cromatográficos.
- Fraccionamiento de los extractos por diferentes técnicas cromatográficas preparatorias.
- Control de pureza de los productos aislados.
- Elucidación de estructuras de los constituyentes por combinación de diversas técnicas espectroscópicas (UV-Vis, IR, RMN de  $^{13}\text{C}$  y protónica,

espectrometría MS, difracción de rayos X, y otras), y técnicas químicas (hidrólisis, formación de derivados, reacciones de degradación, entre otras).

- Síntesis o semisíntesis del producto natural.
- Modificación de la estructura con miras a establecer las relaciones entre la estructura y la actividad.
- Pruebas farmacológicas y toxicológicas.

### 3.3.1 Identificación del espécimen vegetal

La identificación correcta del material vegetal, con ayuda de un experto en botánica, es un paso indispensable antes del estudio fitoquímico y farmacológico. La clasificación de las plantas cambia constantemente. Tan pronto surge nueva evidencia, pueden realizarse cambios en la clasificación taxonómica de las especies, por lo que las identificaciones están sujetas a cambio. Tener disponible especímenes voucher ayuda a cruzar estos cambios con la investigación previa. Es importante identificar qué investigación se ha hecho o se realiza sobre la flora de la región en la que se trabaja. Una revisión minuciosa de la literatura y la consulta al personal del herbario de referencia proporcionarán una buena base para comenzar el proceso de identificación. La identificación del material vegetal desconocido puede lograrse con el uso de claves dicotómicas, descripciones publicadas de la planta; ilustraciones y fotografías; y comparación con especímenes del herbario adecuadamente identificados. Es indispensable contar con un microscopio para la observación de muchas características diagnósticas (Hostettmann y otros, 2008).

Un espécimen voucher del herbario es una muestra prensada de la planta que se deposita para referencia futura. Esta respalda el trabajo de investigación y se puede examinar para verificar la identidad de la planta específica usada en un estudio. La muestra voucher se debe depositar en un herbario reconocido dedicado a mantenimiento a largo plazo. Los especímenes deben prensarse en un dispositivo específico para plantas, consistente en un marco de madera que proporciona rigidez, ventiladores de cartón corrugado que permiten el flujo de aire, papel secante y papel periódico doblado, todo asegurado con correas o tornillos. El

objetivo es la extracción de la humedad en el tiempo más corto posible, a manera de preservar la integridad morfológica de la planta, a modo de producir material que pueda montarse rápidamente en papel de herbario para almacenamiento a largo plazo. Debe efectuarse el prensado inmediatamente después de la recolección y organizar cuidadosamente las muestras para una mejor preservación de las características diagnósticas. Las hojas, flores y frutos deben colocarse a modo de evitar su traslape. El número de recolección debe estar escrito claramente en el exterior del papel periódico que contiene cada espécimen vegetal. Los mejores resultados se obtienen al usar un secador eléctrico que proporcione calor uniforme y constante de 35 a 45 °C. Un secado rápido favorece la conservación del color de la planta, pero temperaturas demasiado altas o periodos de secado prolongado pueden producir especímenes negruzcos, descoloridos y frágiles (Hostettmann y otros, 2008).

Los datos de identificación deben ser precisos, y contar con los siguientes elementos:

- Nombre científico,
- Nombre de la persona que identificó la planta.
- Localización detallada.
- Hábitat.
- Hábito de la planta.
- Frecuencia de la planta: rara, ocasional, frecuente o común.
- Descripción de características tales como: color, fragancia de las flores o frutos, orientación y aroma de las hojas y otras que pudieran perderse durante el secado.
- Nombre del recolector.
- Identificación numérica.
- Fecha de recolección.

### 3.3.2 Preparación del material vegetal para la extracción

Antes de la extracción se debe secar y pulverizar el material vegetal, con cuidado de que durante el proceso de molido el material no se caliente demasiado.

Debe evitarse secar el material vegetal con luz solar directa, pues algunos compuestos podrían degradarse. También es importante eliminar todos los líquenes u otros parásitos cuando se trabaja con cortezas. En el caso de las raíces, un lavado preliminar con agua removerá todas las trazas de tierra. De ser posible, es recomendable pasarlas por nitrógeno líquido antes de introducir las al molino. El nitrógeno líquido disminuye la temperatura durante esta operación y evita la descomposición de los compuestos termolábiles (Hostettmann y otros, 2008).

### 3.3.3 Extracción de material vegetal

Una cuidadosa elección del disolvente o disolventes de extracción constituye el medio más obvio de preparar la muestra correctamente. La extracción inicial con disolventes de baja polaridad proporciona los componentes más lipofílicos, mientras que los disolventes alcohólicos ofrecen un espectro más grande de material polar y apolar. Si se usa un disolvente más polar para el primer paso de extracción, la subsiguiente partición de los disolventes permite una mejor división en las diferentes fracciones de polaridad (Hostettmann y otros, 2008).

Al indagar acerca de las técnicas utilizadas más frecuentemente para lograr la extracción inicial de las sustancias de interés en el material vegetal puede mencionarse las siguientes:

#### 3.3.3.1 Extracción fraccionada

La extracción fraccionada es la separación de porciones bioactivas provenientes de tejidos vegetales o animales, de todos aquellos componentes inactivos o inertes, mediante el uso de disolventes selectivos, y de polaridad creciente. También, la extracción fraccionada es la separación semipurificada de sustancias a través de sus polaridades, para buscar en las fracciones obtenidas los constituyentes buscados (Medinilla, 1996).

#### 3.3.3.2 Partición líquido-líquido

La extracción puede definirse como un proceso de separación en el cual un soluto se reparte o distribuye entre dos fases diferentes. Lo más frecuente es

realizar extracción entre dos fases líquidas, aunque también pueden realizarse extracciones sólido-líquido, lo que consiste en separar una o varias sustancias disueltas en un disolvente mediante su transferencia a otro disolvente insoluble o parcialmente insoluble, en el primero. La transferencia de materia se consigue mediante el contacto directo entre las dos fases líquidas. Una de las fases es dispersada en la otra para aumentar la superficie interfacial y aumentar el caudal de materia transferida. En una operación de extracción líquido-líquido se denomina “alimentación” a la disolución cuyos componentes se pretende separar, “disolvente de extracción” al líquido que se va a utilizar para separar el componente deseado, refinado a la alimentación ya tratada y “extracto” a la disolución con el soluto recuperado (Calle, 2011).

La extracción líquido-líquido se utiliza con frecuencia para separar especies moleculares simples, compuestos de coordinación y compuestos orgánicos, de las disoluciones acuosas en las que se encuentran inicialmente. El procedimiento consiste en agitar las disoluciones acuosas con un disolvente orgánico inmiscible con el agua y separar ambas fases. Se establece entonces un equilibrio o reparto de los solutos entre las dos fases, gobernado por la solubilidad relativa de los solutos en las fases acuosa y orgánico (Calle, 2011).

**Tabla 2**

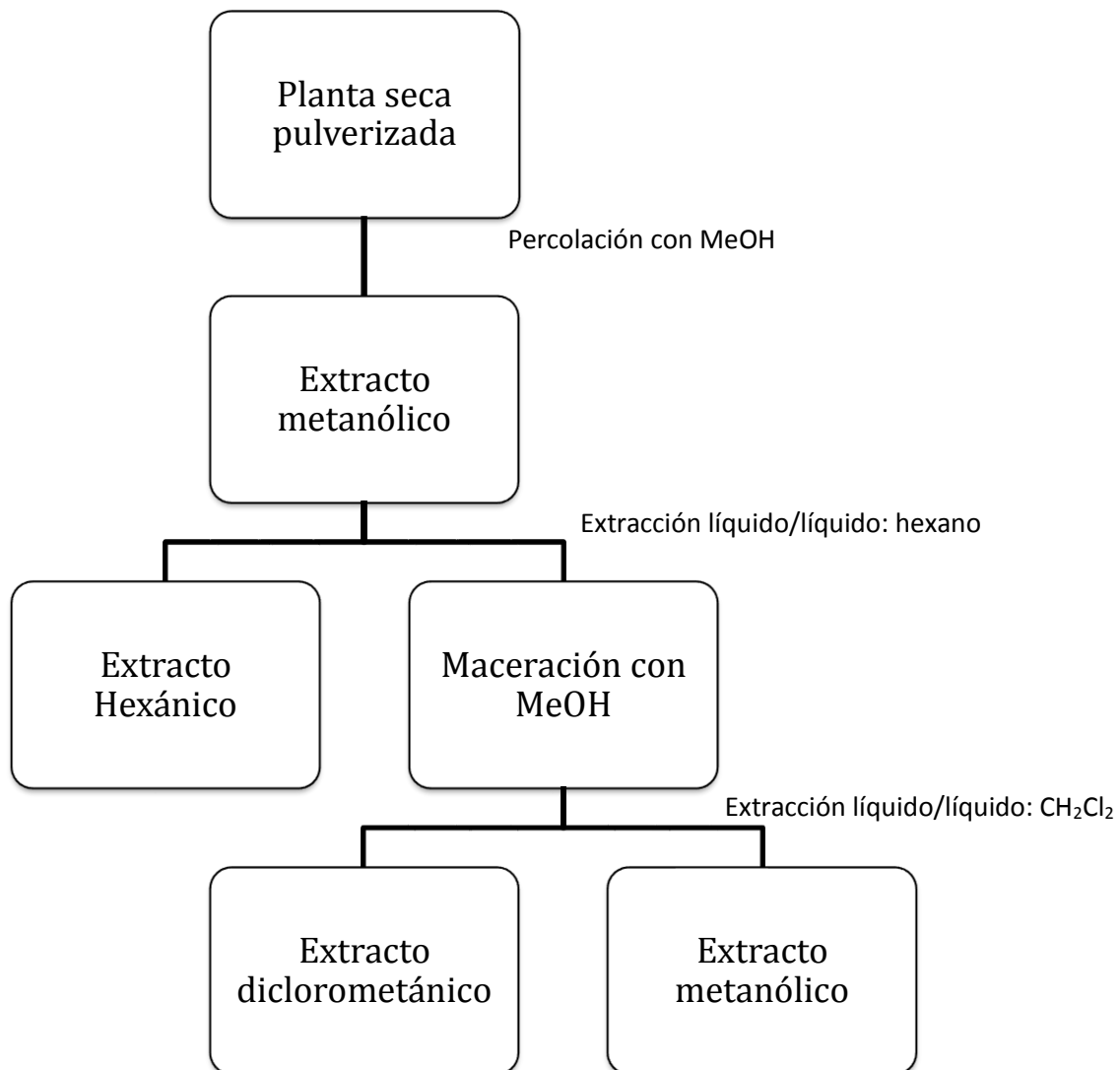
**Disolventes de polaridad creciente utilizados en la extracción fraccionada**

Disolvente	Fórmula	Constante dieléctrica (20°C)	Temperatura ebullición	Presión de vacío en rotavapor (bar)	Temperatura del baño de María
Hexano	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	0.18	68 °C	335	
Diclorometano	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.91	39.5 – 40.5 °C	850 (amb)	
Acetato de etilo	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	0.6 (25°C)	77 °C	240	40 °C
N-butanol	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> OH	0.18	118 °C	340	
Metanol	H <sub>3</sub> C– OH	3.26 (25°C)	65 °C	337	

Fuente: Calle (2011).

La Figura 1 muestra un procedimiento típico para la obtención de extractos de plantas con agitación mecánica. La muestra vegetal desecada y pulverizada se extrae primero con diclorometano y se obtiene un extracto rico en compuestos lipofílicos. El material vegetal se seca de nuevo con el fin de eliminar las trazas del disolvente y se extrae nuevamente con metanol. Por último, otro lote de material desecado se extrae con agua para obtener un extracto acuoso. Por este procedimiento es posible cubrir una amplia gama de polaridad de los compuestos presentes en el extracto vegetal. Alternativamente, puede obtenerse un extracto por tratamiento directo del material vegetal con alcohol. La extracción puede utilizar maceración, percolación, o agitación mecánica. Los métodos más recientes utilizan la extracción presurizada de sólido a líquido o de sólido a gas licuado a alta presión (fluido supercrítico). Los métodos directos de partición con disolvente remueven gran parte de materia extraña y, en especial, al asociarlos a un bioensayo, se obtienen rápidamente las fracciones ricas en los compuestos de interés (Hostettmann y otros, 2008).





Fuente: Hostettmann y otros, (2008).

**Figura 1. Ejemplo de procedimiento para obtener extractos vegetales por partición con disolventes.**

### 3.3.4 Formación de artefactos

Durante los diferentes pasos de material vegetal al principio activo es necesario tomar precauciones importantes para evitar la transformación de los compuestos originales en artefactos. La formación de estos compuestos es común en las

extracciones de compuestos naturales y concentraciones de contaminantes durante este proceso (Cannell, 1998).

Al realizarse el secado del material vegetal, los artefactos pueden originarse por la exposición al oxígeno atmosférico, luz, temperatura, presencia de sales inorgánicas, trazas de ácidos catalizadores y microorganismos. Debe evitarse exponer el material vegetal a exceso de temperatura durante la molienda, en especial si se realiza con molinos mecánicos.

**Tabla 3**  
**Formación de artefactos durante la extracción y el aislamiento**

PASO	ORIGEN DEL ARTEFACTO
Secado del material vegetal	O <sub>2</sub> , luz, temperatura, microorganismos.
Molienda	Temperatura
Almacenamiento	O <sub>2</sub> , luz, temperatura.
Extracción	Método, disolventes, tiempo, temperatura, actividad enzimática en medio acuoso.
Remoción del disolvente	O <sub>2</sub> , tiempo, temperatura
Aislamiento	Catálisis en fase estacionaria, adsorción, disolventes, tiempo, pH.

Fuente: Hostettmann y otros, (2008).

Por lo general, es recomendable utilizar técnicas rápidas y de temperatura menor a 40 °C para la extracción, la remoción del disolvente y el aislamiento, y así reducir el riesgo de formación de artefactos. Es preferible utilizar material vegetal de reciente recolección. La utilización de algunos disolventes orgánicos, tales como acetona, metanol, etilenglicol y dimetilformamida puede derivar en la formación de aductos. Algunas extracciones podrían necesitar su realización bajo atmósfera inerte para evitar la oxidación de los metabolitos (Cannell, 1998).

### 3.3.5 Tratamiento de los extractos

#### 3.3.5.1 Filtración

Es el método más simple para la preparación de las muestras previo a la separación con técnicas cromatográficas diversas (de partición, en contracorriente, con baja, media y alta presión). La filtración puede realizarse mediante la disolución de la muestra y pasándola a través de papel de filtro o un embudo simple o de vidrio poroso, con el fin de retirar el material particulado e insoluble. Se puede conseguir mayor grado de pureza al filtrar la disolución a través de una columna corta de sílica gel u otro material de empaquetamiento adecuado. Con este procedimiento se consigue retirar los contaminantes capaces ser adsorbidos, y que podrían provocar perturbaciones durante la separación en columna cromatográfica. La cromatografía inicial sobre geles de exclusión por tamaño, como el Sephadex LH-20, se utiliza frecuentemente como un paso de limpieza para la posterior purificación (Cannell, 1998; Hostettmann y otros, 2008).

#### 3.3.5.2 Precipitación

Este método se usa frecuentemente, tanto en etapas iniciales como intermedias y finales al requerir de un procedimiento que se valga de la extracción con disolventes, pues posibilita la separación de familias completas de compuestos en base a su reactividad, así como la separación y purificación final de compuestos individuales (Cannell, 1998; Colegate, 2008). Por ejemplo, se usa como método de purificación preliminar en la separación de saponinas. En este caso, puede verse una disolución metanólica del extracto conteniendo saponinas en un volumen mayor de dietiléter. Las saponinas precipitadas se recolectan por filtración o centrifugación. La precipitación se puede repetir varias veces para obtener mejores resultados (Hostettmann y otros, 2008).

#### 3.3.5.3 Remoción de la clorofila

Un método conveniente de eliminación de la clorofila, siempre que no existan problemas de solubilidad, consiste en incluir un paso de limpieza sobre una

columna pequeña de octadecilsilano antes de realizar cromatografía líquida de alto desempeño (Hostettmann y otros, 2008). También se recomienda el uso de cromatografía de exclusión por tamaño para la remoción de la clorofila, pues ésta tiende a ser mayor en tamaño y más lipofílica que muchos compuestos de interés. Este método tiene la ventaja de poder usarse en columnas abiertas a escala preparativa, cuando se hace necesaria la remoción en extractos altamente pigmentados (Cannell, 1998).

#### 3.3.5.4 Remoción de taninos

Se hace necesaria la eliminación de taninos de los extractos o fracciones antes de someterlos a pruebas biológicas. Entre los métodos descritos en la literatura resaltan la precipitación con una disolución de gelatina y NaCl, el tratamiento con pirlivnilpirrolidona soluble, cafeína o por cromatografía en columna de poliamida. De estas posibilidades el último método es el más efectivo, pero tiene la desventaja de ser poco selectivo y podría remover otros compuestos polifenólicos además de los taninos (Hostettmann y otros, 2008).

#### 3.3.6 Bioensayos

Para la realización del cribado de las actividades biológicas en los extractos vegetales es de vital importancia contar con los bioensayos apropiados. Estos bioensayos pueden involucrar diferentes formas:

- Organismos inferiores (p. ej.: microorganismos, insectos, crustáceos, moluscos).
- Sistemas subcelulares aislados (p. ej.: enzimas, receptores, organelos).
- Cultivos celulares (de origen humano o animal).
- Órganos aislados de vertebrados.
- Animales enteros.

Cada uno de estos experimentos posee distinta complejidad, así como distinto objetivo. Los experimentos realizados sobre animales tienen la ventaja de

incorporar la consideración de factores tales como metabolismo y biodisponibilidad. Sin embargo, debido a las restricciones sobre el uso de animales, dichos experimentos son cada vez más difíciles de justificar. Se ha vuelto común recurrir a otros sistemas más simples, por lo que hoy en día las pruebas sobre órganos aislados, cultivos celulares o componentes subcelulares son la norma. Con el fin de obtener resultados rápidos con el mínimo de inversión en términos de gastos y materiales, se precisan los bioensayos simples, llamados también bioensayos de mesa o “bench-top”. Un cierto número de bioensayos simples involucran el uso de cromatografía en capa fina (CCF), puesto que esta es una forma poco costosa, reproducible y simple de tamizar rápidamente extractos vegetales, así como fracciones (Colegate, 2008; Hostettmann y otros, 2008).

La CCF tiene varias características atractivas, como el procesamiento de muestras en paralelo y accesibilidad de las muestras para la evaluación postcromatográfica, así como lograr la limpieza de las muestras. La combinación de las técnicas de CCF y un bioensayo *in situ* se denomina “bioautografía”, y permiten la localización y posterior aislamiento de los constituyentes activos específicos en fracciones provenientes de una matriz compleja. Los métodos comunes de bioensayo para separaciones en capa fina se basan en la inhibición del crecimiento o de la actividad de un organismo de prueba como, por ejemplo, esporas de moho, células de levadura, bacterias, organelos celulares o enzimas. Los métodos bioautográficos más ampliamente difundidos y descritos son: difusión en agar, detección bioautográfica directa CCF y la técnica en capa de agar.

En la técnica de difusión en agar se transfiere el agente antimicrobiano de la cromatografía a una placa de agar inoculada a través de difusión. La bioautografía directa se puede realizar con precaución sobre los microorganismos que crecen directamente en la placa de CCF. Se han descrito métodos tanto para hongos como para bacterias. La técnica de capa en agar es un híbrido de los otros dos métodos y se puede aplicar a un amplio espectro de microorganismos. Brinda zonas de inhibición bien definidas y no es sensible a la contaminación. Los compuestos activos se transfieren por difusión de la fase estacionaria a una capa de agar que contiene el microorganismo. Después de la incubación, la placa se rocía con una

sal de tetrazolio, la cual se convierte en tinte de formazán para el microorganismo. Las zonas de inhibición se observan como manchas claras contra un fondo púrpura. Este método funciona exitosamente con una amplia gama de microorganismos, incluidos *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*. (Hostettmann y otros, 2008)

### 3.3.7 Selección química con CCF

Paralelamente a la realización de bioensayos puede examinarse los constituyentes de un extracto vegetal con análisis en CCF. Por este medio se encuentran las principales clases de constituyentes químicos, se hacen comparaciones de diferentes muestras del material vegetal y se detectan adulteraciones. En la evaluación de los productos a base de plantas, usados en el desarrollo de suplementos y fármacos modernos, es preciso determinar la autenticidad por una combinación de pruebas físicas y químicas. Aunque a menudo se considera anticuada o menos sofisticada que otras técnicas instrumentales modernas, la CCF se utiliza eficazmente en todo el mundo para la evaluación de la calidad e identidad de las sustancias extraídas de las plantas.

Después de realizada la migración de las muestras en un disolvente idóneo, se puede obtener cierta información preliminar sobre los constituyentes, a partir de los valores de  $R_f$  y comigración con sustancias de referencia. Los constituyentes separados se pueden detectar por varios métodos. Uno de estos es la observación directa bajo luz diurna si las manchas están coloreadas. Alternativamente, la placa puede observarse bajo luz UV (254 ó 366 nm), si están presentes los cromóforos idóneos. La otra posibilidad consiste en rociar la placa con un reactivo de revelador que reaccione con los de compuestos presentes, según sus características químicas. Se han desarrollado diversos reactivos de detección para los diferentes tipos de sustancias; algunos, se resumen en la Tabla 4:

**Tabla 4**  
**Ejemplo de reactivos reveladores para las**  
**diferentes clases de productos naturales**

REACTIVO REVELADOR	COMPUESTOS DETECTADOS
Reactivo de Godin	Terpenoides, polifenoles, secoiridoides.
Reactivo de Dragendorff	Alcaloides.
Reactivo de Keddé	Cardenólidos.
Reactivo de Bornträger	Antraquinonas.
Reactivo de productos naturales y polietilenglicol (NP/PEG)	Flavonoides.

Fuente: Hostettmann y otros, (2008).

### 3.3.8 Técnicas de separación preparativa

Una vez que se ha seleccionado un compuesto objetivo se separa la sustancia activa pura de entre cientos de otros componentes de la matriz del extracto vegetal. Esto se consigue por medio del fraccionamiento cromatográfico. Las fracciones obtenidas de esta primera separación, que todavía contienen mezclas de numerosas sustancias, se someten a pruebas biológicas con el fin de determinar la actividad. Posteriormente, las fracciones activas se someten a diversos procedimientos cromatográficos hasta obtener el compuesto puro. Este es a menudo un procedimiento largo que podría llevar a la pérdida de la actividad biológica después de numerosos pasos de separación cromatográfica, por modificación del principio activo en los soportes cromatográficos, por ejemplo. Es difícil predecir la dificultad de aislar productos naturales de fuentes vegetales o animales. En ocasiones, el compuesto que posee la actividad de interés está presente en cantidades relativamente grandes y es fácil separarlo por métodos cromatográficos simples y directos. En otros casos, los componentes buscados se encuentran sólo en cantidades pequeñas en una mezcla compleja; si se considera que las plantas pueden tener miles de constituyentes, se puede apreciar la dificultad de separar un componente en particular (Cseke, Kirakosyan, Kaufman, Warber, Duke & Briemann, 2006).

La naturaleza del problema de separación varía considerablemente, dependiendo de si se necesitan cantidades exiguas (del orden de miligramos), para propósitos de determinación de la estructura, o grandes cantidades (gramos o kilogramos), para realizar las pruebas biológicas completas, el trabajo semisintético o la producción de fármacos. Por esta razón, es de vital importancia contar con una buena selección de técnicas y enfoques diferentes. Se necesita de técnicas cromatográficas que sean rápidas y no acarreen descomposición, pérdida de material o formación de artefactos. Como resultado de estas necesidades se han introducido métodos nuevos, además de los clásicos ya existentes. Las etapas iniciales de un procedimiento de separación incluyen métodos con una gran capacidad de carga y fases estacionarias de bajo costo, como lo han sido tradicionalmente las cromatografías de columna en soportes de gel de sílice, alúmina, poliamida o resina (XAD), aunque los métodos líquido-líquido se usan cada vez más. Los pasos subsiguientes, por lo general, involucran cantidades más pequeñas de la muestra. Así mismo, pueden emplearse técnicas de mayor resolución, como la HPLC.

Sin embargo, lo más importante es la selección de la estrategia de separación, como es la combinación de diferentes técnicas cromatográficas. Una acertada elección de los métodos lleva a la obtención óptima del producto natural en el tiempo más corto posible.

### 3.3.9 Fraccionamiento por cromatografía

#### 3.3.9.1 Fraccionamiento por CCF

La CCF es un procedimiento que se utiliza para separar moléculas relativamente pequeñas. En la biología celular se utiliza frecuentemente para separar azúcares simples, lípidos, aminoácidos, nucleótidos, metabolitos y ocasionalmente, para separar cadenas cortas de polipéptidos y ácidos nucleicos. Al igual que otras cromatografías, consiste de una fase estacionaria y una fase móvil. El principio es el mismo: la sustancia de interés se adherirá a la fase estacionaria o se moverá con la fase móvil una distancia inversamente proporcional a la afinidad por la fase estacionaria (Cseke, y otros, 2006).



La fase estacionaria puede ser variada: de papel, celulosa o gel de silicato (vidrio molido muy fino) unido a una superficie sólida (placa de vidrio, aluminio, plástico o papel). Esa superficie sólida puede ser rígida o flexible. El tipo de fase estacionaria que se utilice en un experimento dependerá del tipo de moléculas que se quieran separar. Algunas placas vienen con indicadores fluorescentes. La fase estacionaria consiste en un disolvente que puede orgánico, agua o mezcla de ambos.

El procedimiento consiste en colocar diminutas alícuotas de las muestras ensayadas, alineadas de forma equidistante a lo largo de una línea recta trazada a un centímetro del borde de uno de los extremos de la placa. Se deja secar, se coloca la placa en un envase (tanque de desarrollo) que contiene una pequeña cantidad del disolvente, se tapa y se deja correr por un rato. El disolvente subirá por capilaridad e irá arrastrando las moléculas, las cuales se moverán según la afinidad que muestren por la fase estacionaria. Si la mezcla de muestras que se analiza presenta color, se verá migrar los distintos colores a distintas velocidades. Si son incoloras hay que someter la placa a tratamiento con una sustancia reveladora y así determinar la presencia de sustancias sobre el silicato. El tipo de desarrollador dependerá del tipo de moléculas que se analizan (Calle, 2011).

#### 3.3.9.2 Fraccionamiento por cromatografía en columna

La cromatografía es un método de separación y análisis basado en el uso de una fase estacionaria y una móvil. Los componentes de una muestra se hacen pasar por una fase estacionaria mediante el flujo de una fase móvil de manera que las sustancias se distribuyen entre las dos fases; aquellos solutos cuya relación de distribución sea favorable a la fase estacionaria quedan retenidos por ésta, mientras que los solutos que se encuentran preferentemente en la fase móvil serán los primeros en arrastrar. De esta forma los solutos serán separados en orden creciente a sus coeficientes de distribución respecto a la fase estacionaria. El conjunto de técnicas que se valen de una fase móvil que se desplaza a lo largo del sistema y una fase estacionaria que permanece fija recibe el nombre de cromatografía (Calle, 2011; Cseke, y otros, 2006).

En la cromatografía en columna se usan columnas huecas de longitud y diámetro variable en cuyo interior hallamos la fase estacionaria. La fase móvil se hace pasar por ellas ya sea por gravedad o aplicación de presión. La fase estacionaria se coloca como relleno un el tubo (Calle, 2011).

### 3.3.10 Métodos de Cuantificación Espectrofotométricos de Especies Antioxidantes

#### 3.3.10.1 Determinación de Fenoles Totales

La cuantificación e identificación de los componentes fenólicos en la dieta ha despertado un gran interés por su importancia nutricional, lo que ha hecho que cada día sean más los datos que pueden encontrarse en la bibliografía científica sobre el perfil fenólico de los alimentos. Además, la gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, han traído consigo la necesidad de desarrollar gran número de técnicas analíticas para su identificación y cuantificación (Martínez-Valverde, Periago, & Ros, 2000).

Dentro de las técnicas analíticas para la cuantificación y/o identificación de compuestos fenólicos se encuentran las técnicas cromatográficas como son la cromatografía de capa fina, la cromatografía de gases y la de líquidos de alta resolución (HPLC); también, se encuentran las técnicas espectrofotométricas (Martínez, 2007).

##### 3.3.10.1.1 Técnicas espectrofotométricas

Entre este tipo de técnicas, los métodos usados comúnmente para determinar polifenoles en alimentos destacan el ensayo de la vainillina para la determinación de compuestos flavan-3-ol, dihidrochalconas y proantocianidinas que tienen una unión simple en la posición 2,3 y poseen grupos hidroxilos en la posición meta del anillo B (Martínez-Valverde, Periago & Ros, 2000) y el ensayo de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de polifenoles totales. Esta técnica, llegó a ser la más utilizada para determinar de manera cuantitativa a los polifenoles y consiste, básicamente, en generar cierto color a través de la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu a una determinada muestra en un medio alcalino (Martínez, 2007).

Se han realizado numerosos estudios para desarrollar técnicas rápidas de cuantificación de compuestos fenólicos mediante ensayos ultravioletas. Cada grupo de compuestos fenólicos se caracteriza por tener una o varias absorbancias máximas a distintas longitudes de onda dentro del espectro ultravioleta. Así, los fenoles simples tienen una absorbancia máxima entre 220 y 280 nm, mientras que los compuestos fenólicos relacionados presentan una amplia variación en la longitud de onda a la cual presentan absorbancia máxima. Una de las técnicas más empleadas dentro de este grupo es la determinación del ácido clorogénico, el cual se cuantifica después de su extracción con etanol y posterior lectura de la absorbancia máxima a una longitud de onda de 325-328 nm (Martínez-Valverde y otros, 2000).

#### 3.3.10.1.2 Técnicas cromatográficas

Las técnicas cromatográficas han permitido la separación, aislamiento, purificación e identificación de compuestos fenólicos, así como el estudio de la interacción entre los polifenoles y otros componentes de los alimentos. Hoy en día, las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) son las más empleadas para la separación y cuantificación de compuestos fenólicos. Existen distintos soportes y fases móviles que permiten el análisis de antocianinas, procianidinas, flavonas y ácidos fenólicos. Mediante el empleo de HPLC, se puede determinar un gran número de polifenoles de interés nutricional, como fenoles simples, ácidos fenólicos y sus derivados, y los distintos flavonoides; sin embargo, esta técnica requiere la utilización de métodos de extracción adecuados a cada uno de los compuestos a analizar. Esto conduce a un tratamiento muy elaborado de las muestras (Martínez-Valverde y otros, 2000).

#### 3.3.10.1.3 Técnica de Folin-Ciocalteu (FC)

La determinación de fenoles totales no está directamente relacionada con la medición de actividad antioxidante, pero puede ser útil para tales estudios, en especial si se combinan con métodos para medir actividad antioxidante.

Entre los métodos para la medición de fenoles totales se encuentra el FC, uno de los métodos más antiguos para determinar el contenido de fenoles totales. Esta prueba consiste en mezclar tungstato y molibdato en un medio altamente básico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 5-10 %, acuoso). Los polifenoles son fácilmente oxidables en medio básico y reaccionan con el molibdato formando óxido de molibdeno  $\text{MoO}$ ; este compuesto, puede ser identificado y cuantificado por espectroscopía de UV/vis debido a que absorbe a una longitud de 750 nm. El contenido de fenoles totales generalmente, se expresa en equivalentes de ácido gálico. La prueba de FC es similar a la de ABTS ya que ambos métodos ayudan a la determinación de polifenoles y monofenoles.

La ventaja del método de FC sobre ABTS es que el primero está relacionado con la aparición de una absorbancia que es consecuencia de la aparición de color debido a la reacción, no a una disminución de la absorbancia como ocurre con la prueba de ABTS. Otra de las ventajas es que la prueba de FC no requiere de una estandarización de las condiciones del análisis. Aunque, el método de FC no está relacionado con la medición de actividad antioxidante, parece ser uno de los mejores métodos para estimar esta actividad antioxidante en alimentos, con la excepción de que la muestra no contenga una cantidad de proteínas significativa (Martínez, 2007).

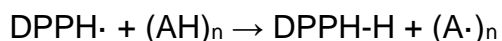
#### 3.3.10.2 Ensayo de actividad captadora de electrones con 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo radicalar (DPPH)

Este ensayo es usado para medir la capacidad antioxidante potencial que presentan ciertas sustancias para lograr una inhibición de RL que puede ocasionar serios daños a la salud de las personas.

La reducción del radical DPPH se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm. El radical es estable, tiene un electrón desapareado, es de color azul-violeta y se decolora progresivamente hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la absorbancia es

medida con el empleo de soluciones patrón de ácido ascórbico o trolox. En consecuencia, la desaparición del DPPH proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995; Castañeda, Ramos & Ibáñez. 2008).

El modelo que explica la actividad de un compuesto como antirradical se ejemplifica con la siguiente ecuación:



donde AH es un antioxidante que actúa como antirradical que dona átomos de hidrógeno y da como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, como es el caso de los fenoles. El nuevo radical formado ( $\text{A}\cdot$ ), puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A). La reacción entre el DPPH y un compuesto depende de la conformación estructural del mismo, por lo que las comparaciones cuantitativas no siempre son apropiadas (Martínez 2007).

### 3.3.10.3 Ensayo de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC)

El ensayo TEAC es uno de los más ampliamente utilizados para medir la capacidad antioxidante. Este ensayo evalúa la capacidad total de captación de radicales libres de los polifenoles ensayados, con base en la capacidad del compuesto para secuestrar el radical estable ABTS, siglas del compuesto ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). El ABTS radical se forma por la adición de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  a ABTS. Este método se basa en la medición espectrofotométrica de la reacción del ABTS estable azul-verdoso radicalar con los antioxidantes ensayados. En la reacción con polifenoles antioxidantes, el color azul-verdoso desaparece. Esta decoloración se determina espectrofotométricamente a 734 nm después de transcurridos 30 minutos de la adición de las muestras ensayadas de polifenoles. La reducción en la absorbancia está relacionada con la de Trolox, un material sintético análogo de la vitamina E, respecto al cual se calcula

el valor TEAC. El TEAC se calcula como moles de equivalentes Trolox por gramo de extracto o compuesto polifenólico (Harnafi & Souliman, 2008).

El modelo que explica la acción antioxidante por degradación o secuestro del  $ABTS^{\bullet+}$  se ejemplifica con la siguiente ecuación:

$ABTS^{\bullet+} + \text{antioxidante} \rightarrow \text{desaparición de } ABTS^{\bullet+} \text{ y disminución de la absorbancia}$

La forma reducida ( $ABTS^{\bullet-}$ ) presenta un pico característico a 340 nm, mientras que la forma oxidada ( $ABTS^{\bullet+}$ ) presenta un máximo a 415 nm y picos adicionales a 640, 734 y 815 nm. Los coeficientes de extinción a 415 y 734 nm del catión radical  $ABTS^{\bullet+}$  son  $3.6 \times 10^4$  y  $1.5 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ .

#### 3.3.10.4. Determinación de flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura química basada en un esqueleto C6-C3-C6, anillo bencénico unido a una cadena propánica y esta, a su vez, a otro anillo bencénico.

El compuesto 2-aminoetil-difenil borato reacciona en metanol con el grupo hidroxilo de los flavonoides en la posición 2' del anillo B para formar el 2'-difenilborato del flavonoide correspondiente; estos compuestos, presentan una coloración amarilla. La presencia de ese compuesto, se determina a partir de espectrofotometría a una longitud de onda de 404 nm. La rutina pertenece al grupo de los flavonoles y se usa rutinariamente como estándar en esta técnica (Martínez, 2001).

#### 3.3.10.5 Otros ensayos

##### 3.3.10.5.1 Peroxidación Lipídica

Todas las células están rodeadas por una membrana que las separa del medio extracelular. La membrana celular contiene proteínas que juegan papeles vitales en la interacción de la célula con otras células, hormonas y agentes reguladores del líquido extracelular. La estructura básica de todas las membranas biológicas es la

bicapa lipídica, que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva (Goodman, 1998). Éstas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados y, por lo tanto, vulnerables al ataque de RL que trae como consecuencia la peroxidación lipídica. Esta es generalmente inducida por un radical hidroxilo que sustrae un hidrógeno a la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carbonado, lo que genera una cadena de reacciones oxidativas. Los antioxidantes pueden formar complejos estables e impiden la acción catabólica de los radicales libres en la membrana celular (Avello & Suwalsky 2006; Halliwell, 1990).

Los mecanismos homeostáticos con que el organismo enfrenta el daño oxidativo que habitualmente causan estas especies son numerosos y diversos, reflejan la multiplicidad de formas de radicales libres y especies reactivas, los numerosos compartimientos donde actúan en el organismo y las propiedades físicas de éstos.

Entre la variedad de métodos analíticos desarrollados para determinar la peroxidación lipídica, se encuentra el del malondialdehído endógeno (MDA); el más comúnmente utilizado se basa en la reacción del mismo con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). El MDA, en condiciones de bajo pH y alta temperatura, reacciona con el TBA dando lugar a un aducto MDA-TBA cromógeno o pigmento rojo que es detectable por espectrofotometría o por fluorimetría (Estepa, Rodenas & Martin, 2001)

#### 3.3.10.5.2 Análisis del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP)

El análisis de FRAP fue introducido por Benzie y Strain en 1996 para medir la actividad antioxidante total y se basa en la capacidad de los polifenoles para reducir  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  (Pulido-Bravo, 2000). El análisis se basa en el poder reductor de un antioxidante que reduce el ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) al ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ); con formación de un complejo azul. Una absorción alta a una longitud de onda de 700 nm indica un poder de reducción alto del fitoquímico, con actividad antioxidante alta (Martínez 2007; Roginsky & Lissi, 2005).

El índice inicial absoluto de la reducción de la ferrilmetilmioglobina determinado por espectroscopía en la región visible fue sugerido para caracterizar la actividad antioxidante de flavonoides individuales (Silva, Santos, Caroco, Rocha, Justino & Mira, 2002).

### **3.4 Estrés oxidativo**

#### **3.4.1 Oxidación**

Se considera oxidación a todo proceso en el que ocurre pérdida de electrones, captación de oxígeno o deshidrogenación y reducción del par conjugado del cual se captan electrones o se pierden oxígenos. Todo proceso de oxidación va siempre acompañado de otro de reducción. Se denominan reacciones de óxido-reducción o reacciones redox entre pares conjugados (Chang, 1992).

El oxígeno es imprescindible para la vida, pero puede ser también fuente de enfermedades a través de una producción incontrolada de RL de oxígeno que dañan las macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y alteran los procesos celulares como funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, entre otros. (Roche & Romero-Alvira, 1997).

Un exceso de RL rompe el equilibrio y produce el llamado estrés oxidativo. Se producen durante las reacciones metabólicas, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía, especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia y también por exposición a determinados agentes externos como las radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, contaminación ambiental, humo del tabaco, y otros (Elajalde, 2001; Roche & Romero-Alvira, 1997).

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de EOR y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Este entorno reductor es preservado por las



enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Desbalances en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y RL que dañan a todos los componentes de la célula; incluyen las proteínas, los lípidos y el ADN (Schafer, 2001; Sies, 1985).

En términos químicos, el estrés oxidativo es un gran aumento en el potencial de reducción celular, adquiere un valor cada vez menos negativo, o gran disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión. Los efectos del estrés oxidativo dependen de la magnitud de estos cambios, si la célula es capaz de superar las pequeñas perturbaciones y de recuperar su estado original. Sin embargo, el estrés oxidativo severo puede causar la muerte celular y aún una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis (Lennon, 1991; Sies, 1985).

Un aspecto particularmente destructivo del estrés oxidativo es la producción de EOR, que incluyen los RL y los peróxidos. Algunas de las menos reactivas de estas especies, como el superóxido, pueden ser convertidas por una reacción redox con metales de transición u otros compuestos de ciclo redox en quinonas, especie radical más agresiva, que puede causar extenso daño celular (Valko, Morris & Cronin, 2005).

#### 3.4.2 Enfermedades, procesos degenerativos y estrés oxidativo

Hay una serie de procesos patológicos atribuibles razonablemente al ataque de RL, o que, por lo menos, estarían implicados en algunas de sus fases o secuencias bioquímicas (Elejalde, 2001).

Son muchos los procesos patológicos implicados, así como múltiples los descubrimientos llevados a cabo por diferentes grupos de investigación; por ello, sólo es posible recoger breves comentarios de algunos de estos procesos patológicos más significativos:

#### 3.4.2.1 Envejecimiento

Es difícil diferenciar entre lo que son procesos propios del envejecimiento o procesos patológicos que se desarrollan preferentemente durante el envejecimiento. El envejecimiento y la muerte pueden ser el resultado de la activación de genes específicos en un momento determinado del ciclo celular (apoptosis). La teoría del envejecimiento con origen en los RL del oxígeno, supone que este resulta de la acumulación de lesiones orgánicas debidas a RL (Elejalde, 2001).

#### 3.4.2.2 Aterosclerosis

La formación de la placa arteriosclerótica se inicia con la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos que se transforman así en células espumosas. Estas células son captadas por el endotelio mediante moléculas de adhesión y se acumulan en el espacio subendotelial, donde inducen la migración de células musculares, su proliferación e hipertrofia. En determinadas condiciones oxidativas las lipoproteínas se fragmentan y se alteran determinados residuos de aminoácidos de la apoproteína de la LDL (Fernández, 1999). Estas LDL oxidadas o productos liberados de ellas, van a tener mayor poder aterogénico ya que son captadas más ávidamente por los macrófagos, son citotóxicas para el endotelio y estimulan la producción de factores vasoactivos, de adhesión, trombóticos y de proliferación de células musculares lisas de la vasculatura, iniciando o extendiendo la lesión aterosclerótica (Galcerán, 2000).

#### 3.4.2.3 Cáncer

El desarrollo tumoral es un proceso altamente complejo caracterizado por la presencia de necrosis celular del tejido sano, crecimiento incontrolado de las células cancerosas, neovascularización del área afectada para asegurar el aporte de oxígeno y nutrientes al tumor, entre otros muchos fenómenos. Se ha sugerido la implicación de los RL en el desarrollo tumoral. El humo del tabaco es el causante del cáncer de pulmón, además de la nicotina y del alquitrán, en el que se encuentran RL en abundancia, que atacan los tejidos y destruyen los antioxidantes

celulares presentes en ellos; así mismo, están presentes óxidos radicalarios de nitrógeno que forman nitrosaminas carcinógenas con las proteínas (Ballester, 1997). Los RL estimulan el crecimiento de las células musculares lisas, lo que sugiere un papel del estrés oxidativo en la neovascularización tumoral o angiogénesis (Elejalde, 2001).

#### 3.4.2.4 Catarata senil

El cristalino está sujeto al constante bombardeo de radiaciones diversas causantes de procesos químicos irreversibles, que con el tiempo, por acumulación, producen una progresiva opacidad del cristalino; es decir, la catarata (Taylor, 1993). Los RL generados en el cristalino producen entrecruzamiento, desnaturalización, degradación de sus proteínas y otros efectos, formándose gránulos microscópicos de composición compleja por aglomeración desordenada de moléculas, que crecen en tamaño y cantidad, produciendo inicialmente el efecto Tindall y finalmente, la total opacificación del cristalino (Elejalde, 2001).

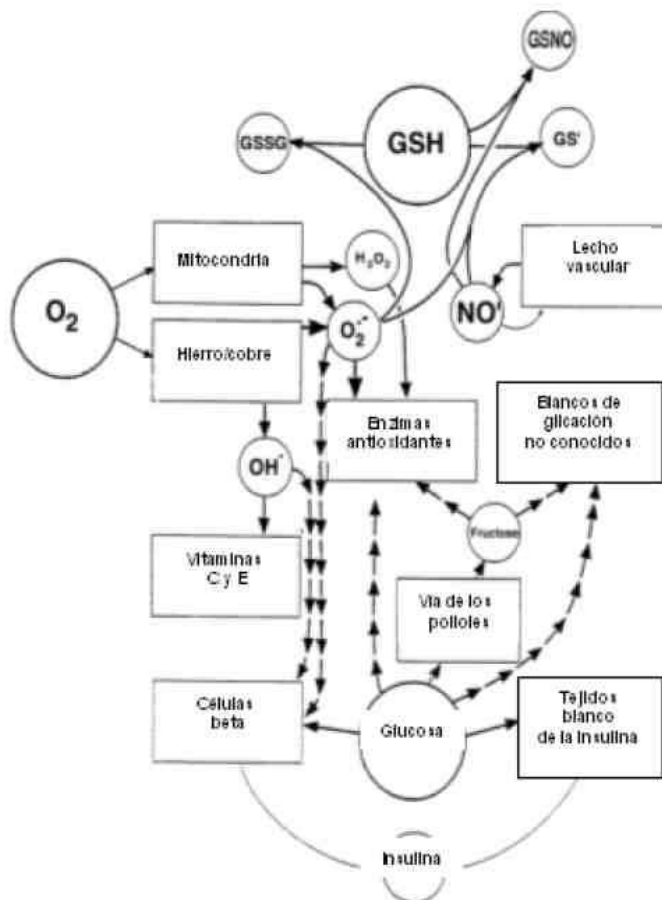
#### 3.4.2.5 Insuficiencia renal aguda (IRA) y crónica (IRC)

El daño tubular por isquemia/reperfusión, al menos en parte, se ocasiona por el aumento del estrés oxidativo de la IRA. Los RL del oxígeno producen la activación de la enzima xantina-oxidasa y de los neutrófilos, mecanismos importantes del daño renal por isquemia/reperfusión (Elejalde, 2001; Saldaña, 2004).

#### 3.4.2.6 Diabetes mellitus

El daño causado por las EOR se encuentra incrementado significativamente en pacientes con diabetes tipo 1, pero aun más en casos de diabetes tipo 2. La evidencia de la asociación entre las EOR y diabetes es principalmente de dos tipos: de los estudios que muestran que el daño causado por los EOR está incrementado en forma significativa y de los estudios que han encontrado anomalías en las defensas antioxidantes de los pacientes diabéticos. A pesar de la evidencia disponible sobre el aumento del estrés oxidativo en la diabetes, no se conoce con

certeza en que grado la hiperglucemia debilita las defensas antioxidantes o contribuye a la generación de EOR (West, 2000). Se ha postulado que los altos niveles de glucosa característicos en el paciente diabético inducirían la glicosilación no enzimática de proteínas. Esta glicosilación no enzimática altera la estructura y la función de las proteínas. Es sabido que la autooxidación de azúcares genera especies de RL que son oxidados por el oxígeno (RLO). A concentraciones altas de glucosa, típicas de estados diabéticos, la producción de RLO se incrementa en presencia de metales de transición, como el hierro o el cobre. Pero el aumento de estrés oxidativo descrito en los diabéticos, no está únicamente relacionado con la aceleración en la producción de RL, sino también con la disminución de antioxidantes. La vía del poliol es un posible mecanismo por el que la hiperglucemia puede alterar la función y la estructura de las células afectadas por las complicaciones diabéticas (Romero-Alvira, 1997; West, 2000). En la Figura 2 se esboza el mecanismo bioquímico propuesto de acción de los EOR en pacientes diabéticos.



Fuente: West, (2000).

**Figura 2: Mecanismo propuesto para la acción del estrés oxidativo sobre la vía de los polioles en pacientes con diabetes mellitus.**

#### 3.4.2.7 Hipertensión arterial (HTA)

La HTA puede ser considerada como un conjunto de resultados sistémicos de las lesiones vasculares, parenquimatosas y otras, producidas por los RL. Probablemente los antioxidantes y los RLO sean una nueva expectativa de tratamiento, la cual implica acciones terapéuticas que actúen beneficiosamente sobre las manifestaciones presentes en la anatomía patológica, como fibrosis e hipertrofia, y en la bioquímica de la HTA: inhibición de la bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ , inestabilización de membranas, lesiones sobre ADN, y otras; moderando y/o evitando las complicaciones clínicas. En la HTA se ha encontrado aumento de la peroxidación de lípidos, tanto en plasma como en las membranas celulares, así

como aumento en la cantidad total de lípidos y una disminución de la capacidad antioxidante. La HTA predispone la aceleración de la aterosclerosis, al menos en parte, a causa de la sinergia entre elevación de presión sanguínea y otros estímulos aterogénicos que inducen estrés oxidativo en los vasos arteriales (Galcerán, 2000).

#### 3.4.2.8 Otras enfermedades y procesos degenerativos relacionados al estrés oxidativo

Puede mencionarse además la cirrosis, insuficiencia hepática y la hepatopatía alcohólica. Se ha considerado tradicionalmente que la presión portal en las enfermedades hepáticas esta determinada solamente por la alteración de la arquitectura hepática y por el flujo sanguíneo esplácnico (Elejalde, 2001). Sin embargo, actualmente se considera que el estrés oxidativo inducido por el exceso de alcohol, drogas, así como malos hábitos alimenticios influyen de manera determinante en la ocurrencia de estos procesos degenerativos.

### 3.5 Antioxidantes Naturales

La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres. Estos mecanismos son adecuados a la muy corta vida media de los radicales libres y comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas, con capacidad antioxidante (Avello & Suwalsky 2006).

Los antioxidantes exógenos provienen de la dieta, y dentro de este grupo se incluyen la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides. La vitamina C constituye el antioxidante hidrosoluble más abundante en la sangre, mientras que la vitamina E es el antioxidante liposoluble mayoritario. El selenio, el más tóxico de los minerales incluidos en la dieta, actúa junto con la vitamina E como antioxidante. La vitamina E se encuentra presente en aceites vegetales, aceites de semilla, germen de trigo, maní, carnes, pollo, pescados y algunas verduras y frutas, en tanto que la vitamina C se puede encontrar en frutas y verduras. Los carotenoides son compuestos coloreados tales como los  $\beta$ -carotenos presentes en verduras y frutas amarillas y

anaranjadas, y en verduras verdes oscuras, los alfacarotenos en la zanahoria, los licopenos en el tomate, las luteínas y xantinas en verduras de hojas verdes como el brócoli y las  $\beta$ -criptoxantinas en frutas cítricas (Avello & Suwalsky 2006).

El uso de antioxidantes sintéticos como el hidroxianisol butilado (BHA), y el hidroxitolueno butilado (BHT), para mantener la calidad y estabilidad de las características originales de diversos productos alimenticios listos para el consumo se ha convertido en práctica común (Brewer, 2011). Sin embargo, se sospecha que el BHA y BHT podrían ser responsables de daños en el hígado y carcinogénesis (Grice, 1986; Wichi, 1988). La preocupación del consumidor respecto a su seguridad ha motivado a las diversas industrias a buscar alternativas naturales. Entre las más importantes familias de antioxidante naturales se cuentan los antioxidantes fenólicos, que pueden inhibir la formación de radicales libres e interrumpir la propagación de la auto-oxidación; las vitaminas liposolubles, como la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol); y las vitaminas hidrosolubles como la vitamina C (ácido L-ascórbico) (Brewer, 2011).

En la industria alimentaria, los extractos de plantas se utilizan generalmente por sus características de sabor. A menudo, tienen una fuerte actividad de donación de protones, lo que los hace muy efectivos como antioxidantes. Esta actividad antioxidante se debe a menudo a la presencia de los ácidos fenólicos; por ejemplo: ácidos gálico, ácido protocatechuico, ácido cafeico y ácido rosmarínico; diterpenos fenólicos, por ejemplo: carnosol, ácido carnósico, rosmanol y rosmadial; flavonoides, como la quercetina, catequinas, naringenina, y el kaempferol; y los aceites volátiles, como el eugenol, carvacrol, timol y mentol (Brewer, 2011).

Algunos pigmentos vegetales, como las antocianinas y antocianidinas, pueden quelar metales y donar protones a los radicales de oxígeno; así retardan la oxidación a través de ambos mecanismos. El té y los extractos de semillas y cáscara de uva contienen catequinas, epicatequinas, ácidos fenólicos, proantocianidinas y resveratrol, contribuyendo todos ellos a su actividad antioxidante (Brewer, 2011).

En un estudio reciente se evaluaron diversas plantas de uso tradicional en América Latina para determinar sus perfiles fenólicos, actividad antioxidante y potencial inhibitorio *in vitro* contra enzimas clave, relevantes en hiperglicemia e hipertensión (Galvez, Kwon, Apostolidis & Shetty, 2010). Este estudio mostró el alto contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en plantas medicinales y especias como la chancapiedra (*Phyllanthus niruri*), la zarzaparrilla (*Smilax officinalis*), la yerba mate (*Ilex paraguayensis*), y el huacatay (*Tagetes minuta*), quienes presentaron las mayores actividades anti-hiperglucémicas *in vitro* por inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa sin efecto sobre la  $\alpha$ -amilasa. El mismo estudio mostró que el molle (*Schinus molle*), la maca (*Lepidium meyenii*), la caigua (*Cyclanthera pedata*) y el jengibre (*Zingiber officinale*), inhibieron significativamente la enzima convertidora de angiotensina I (ACE), que es relevante en el mecanismo de la hipertensión. Todos los miembros evaluados del género *Capsicum*, mostraron actividad tanto contra la hiperglicemia como potencial anti-hipertensivo. Los principales compuestos fenólicos en el matico (*Piper angustifolium*), la guasca (*Galinsoga parviflora*) y el huacatay fueron el ácido clorogénico y diversos derivados del ácido hidroxicinámico. Todas especies de plantas medicinales, hierbas y especias de América Latina tienen potencial en la prevención de la hiperglicemia y la hipertensión asociada a la diabetes tipo 2 (Galvez, y otros, 2010).

En un estudio comparativo, la actividad antioxidante de extractos de brotes de clavo (*Eugenia caryophyllata* Thunb), y lavanda (*Lavandula stoechas* L.), fue estudiada por medio de las pruebas de potencial reductor, recolección de radicales libres, recolección de radicales anión superóxido y actividad metal-quelante. Ambos extractos mostraron actividad comparable a antioxidantes estándar como BHA, BHT y  $\alpha$ -tocoferol para todas las pruebas realizadas. Ambas plantas poseen uso potencial como suplemento nutricional o en aplicaciones farmacéuticas (Gülçin, Sat, Beydemir, Elmastas & Küfrevioğlu, 2004).



En otro estudio latinoamericano reciente, se estudió la actividad antioxidante de cuarenta y seis extractos metanólicos de plantas colombianas de las familias Astereaceae, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Rubiaceae y Solanaceae, recolectadas de forma natural en el parque natural de Ucumarí, Risaralda, Colombia. Se utilizó para su evaluación el método de DPPH para recolección de RL. Según los resultados del estudio, los extractos de *Phyllanthus sp* (Euphorbiaceae), seguidos de dos especies de Melastomataceae, *Tibouchi nagrossa* y *Miconia lehmannii* Cogn., así como *Lycianthes radiata* Sendt., mostraron gran actividad antioxidante, siendo este el primer reporte para las plantas analizadas (Mosquera, Corraera, Niño, 2009).

Investigadores malayos estudiaron recientemente las propiedades antioxidantes del aceite virgen de coco producido a través de refrigeración y fermentación, comparándolas con las del aceite refinado, blanqueado y desodorizado de coco. El aceite virgen de coco mostró una mayor capacidad antioxidante que el aceite de coco refinado, blanqueado y desodorizado. El aceite de coco virgen producido a través del método de fermentación, tuvo el mayor efecto recolector sobre el DPPH y la mayor actividad antioxidante basado en el método de blanqueo de  $\beta$ -caroteno linoleato (peroxidación lipídica). Sin embargo, el aceite virgen de coco obtenido a través del método de enfriamiento tuvo el mayor poder reductor. Los principales ácidos fenólicos detectados fueron el ácido ferúlico y el ácido p-cumárico. Se encontraron correlaciones muy altas entre el contenido de fenoles totales y la actividad recolectora de RL ( $r = 0.91$ ), y entre el contenido de fenoles totales y poder reductor ( $r = 0.96$ ). También hubo alta correlación entre los ácidos fenólicos totales y la decoloración  $\beta$ -caroteno. El estudio indica que la contribución a la capacidad antioxidante en el aceite de coco puede ser debida a los compuestos fenólicos (Marina, Man, Nazimah & Amin, 2009).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La investigación sobre las propiedades antioxidantes de las plantas medicinales pretende aumentar el interés en diversas especies vegetales nativas y propiciar su eventual aprovechamiento comercial e industrial en escala mayor que la realizada actualmente. Las ventajas existentes en su aprovechamiento local y en el desarrollo de las técnicas agronómicas apropiadas para su cultivo, dada su adaptación natural a las condiciones locales, hacen de la zarzaparrilla una de las plantas nativas más prometedoras para este fin. La aplicación de una serie de procedimientos de tamizaje fitoquímico a plantas nativas de Guatemala, como la zarzaparrilla, pueden demostrar su potencial en la elaboración de productos medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades, ocasionadas por el estrés oxidativo en el organismo.

La actividad antioxidante tiene especial relevancia en la medicina moderna, y existe alto potencial para su aprovechamiento en terapias contra el envejecimiento, el cáncer, enfermedades cardíacas y otros procesos degenerativos en el organismo humano.

Los procesos involucrados en la separación y evaluación fitoquímica del extracto de rizoma de zarzaparrilla tienen una especial importancia pues son el paso previo para el eventual aislamiento y caracterización e identificación química de los compuestos responsables de la actividad antioxidante, descrita en trabajos previos.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Establecer la presencia de actividad antioxidante en extractos de polaridad creciente de rizoma de *Smilax domingensis* Willd.

### 5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Obtener los extractos por maceración secuencial con hexano, cloroformo, acetato de etilo, isopropanol y metanol de rizoma de *S. domingensis*.

5.2.2 Realizar ensayos de cromatografía en capa fina para establecer la presencia de compuestos con actividad antioxidante en los extractos obtenidos de rizoma de *S. domingensis*.

## 6. HIPÓTESIS

### 6.1 Hipótesis nula

No existe actividad antioxidante en extractos obtenidos de rizoma de *S. domingensis*.

### 6.2 Hipótesis alterna

Existe actividad antioxidante en, al menos, un extracto obtenido de rizoma de *S. domingensis*.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Diseño de investigación

Se realizará un estudio no probabilístico utilizando estadística descriptiva para el análisis de los valores obtenidos de porcentaje de rendimiento de los extractos.

### 7.2 Universo de trabajo

Rizoma de *S. domingensis* (zarzaparrilla), proveniente de cultivos en Guatemala.

### 7.3 Muestra

Extractos con disolventes de polaridad ascendente de rizoma de *S. domingensis*, recolectado en Samayac, Suchitepéquez.

### 7.4 Medios

#### 7.4.1 Recursos humanos

Investigador: Julio Roberto Juárez Pernillo

Profesor de Seminario: Dr. José Vicente Martínez Arévalo

#### 7.4.2 Recursos materiales

##### 7.4.2.1 Instalaciones

- Centro de documentación Biblioteca CEDOBF. Facultad de CCQQ y Farmacia.
- Biblioteca de Laboratorio FARMAYA, S.A.
- Laboratorio FARMAYA, S.A.
- Laboratorio LIPRONAT, Facultad CCQQ y Farmacia.

##### 7.4.2.2 Material y equipo

- Cristalería y material de laboratorio en general.
- Balanza analítica.
- Sílica gel.
- Cromatoplasmas de sílica gel.

- Rotavapor.
- Cámara de desarrollo para CCF.
- Bomba de aire.
- Campana de extracción.
- Estufa.
- Disolventes orgánicos: hexano, cloroformo, acetato de etilo, isopropanol y metanol.
- Reactivos reveladores para cromatografía en capa fina: vainillina, ácido sulfúrico, DPPH.
- Computadora y programa Excel

## **7.5 Métodos**

### 7.5.1 Obtención de la muestra

Se recolectó el rizoma de zarzaparrilla en su lugar de crecimiento bajo manejo (Samayac, Suchitepéquez). Se lavó, escurrió y secó el rizoma. Se calculó el porcentaje de rendimiento freco-seco del material vegetal. Se molió el rizoma con una granulometría gruesa.

### 7.5.2 Extracción fraccionada

Se utilizó un percolador limpio y seco. Se colocó una tapa de algodón en la parte inferior del percolador, luego se colocó sobre el algodón un pedazo de papel filtro en forma de cono y a continuación 500 gramos de rizoma molido y seco de zarzaparrilla.

Se agregó suficiente cantidad de disolvente para macerar el material vegetal, cubriéndolo íntegramente. Luego de colocar la tapadera, se dejó macerar durante 24 horas.

Pasado este tiempo, se abrió la llave del percolador y se recolectó el extracto directamente en el balón de concentración del rotavapor. Se reconcentró el extracto en el rotavapor a presión reducida a 35°C. Se recuperó el disolvente, usándose

reiteradamente para macerar el material vegetal, repitiéndose tres veces la maceración, combinando cada vez los extractos obtenidos.

Al final de la maceración, se destapó el percolador 24 horas para que se evaporara el disolvente residual y se procedió a macerar con el segundo disolvente menos polar y se repitió el proceso anterior. En el presente experimento se obtuvieron cinco extractos utilizando hexano, cloroformo, acetato de etilo, isopropanol y metanol.

### 7.5.3 Ensayo de evaluación cualitativa de actividad antioxidante

#### 7.5.3.1 Cromatografía en capa fina

Se realizó una aplicación de cada extracto obtenido sobre una cromatoplaqueta de sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Como estándar de comparación se utilizó solución de flavonoides (quercetina, rutina, ácido clorogénico, ácido cafeico), al 0.05% en metanol (aproximadamente 10 µL). Se utilizó como fase móvil acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27), n-butanol-ácido acético-agua (40:10:50); acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-etilmetilcetona-agua (50:7:3:30:10). Para el revelado de antioxidantes, se roció DPPH sobre la cromatoplaqueta desarrollada para observar la presencia de zonas blancas sobre fondo púrpura indicativas de actividad antioxidante. Para el revelado de flavonoides, se realizó la detección sin tratamiento químico, por fluorescencia, a 254 nm, observándose zonas azules y amarillas de actividad positiva.

## 8. RESULTADOS

A continuación se presenta el detalle de los resultados obtenidos al aplicar experimentalmente la estrategia metodológica propuesta. En base a estudios anteriores, en los que se demostró la presencia de antioxidantes en extracto hidroalcohólico total de rizoma de zarzaparrilla (Cáceres, Cruz, Martínez, Gaitán, Santizo & Gattuso, 2012), se planteó un procedimiento en el que se obtuvieron fracciones individuales por maceración secuencial de disolventes de polaridad ascendente (extracción fraccionada), directamente sobre el rizoma seco de zarzaparrilla, en lugar del procedimiento alterno, consistente en la obtención de un extracto hidroalcohólico total del rizoma, que se fracciona posteriormente por medio de sucesivas particiones líquido-líquido, con disolventes de polaridad creciente.

Se recolectaron 56.9 kg de material vegetal fresco, que luego de secarse rindieron 22.3 kg de material vegetal seco, siendo equivalente a un rendimiento de 39.2%. El rendimiento fresco-seco del material vegetal utilizado se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5**  
**Rendimiento porcentual del extracto sobre**  
**peso del material vegetal fresco y seco**

Condición del rizoma	Peso (kg)
Fresco	56.9
Seco	22.3

Fuente: Resultados de la investigación.



Se obtuvieron los pesos de cada uno de los extractos obtenidos a partir de 500 gramos de rizoma seco y molido, resumiéndose en la Tabla 6, donde también se detallan los rendimientos porcentuales por cada disolvente empleado.

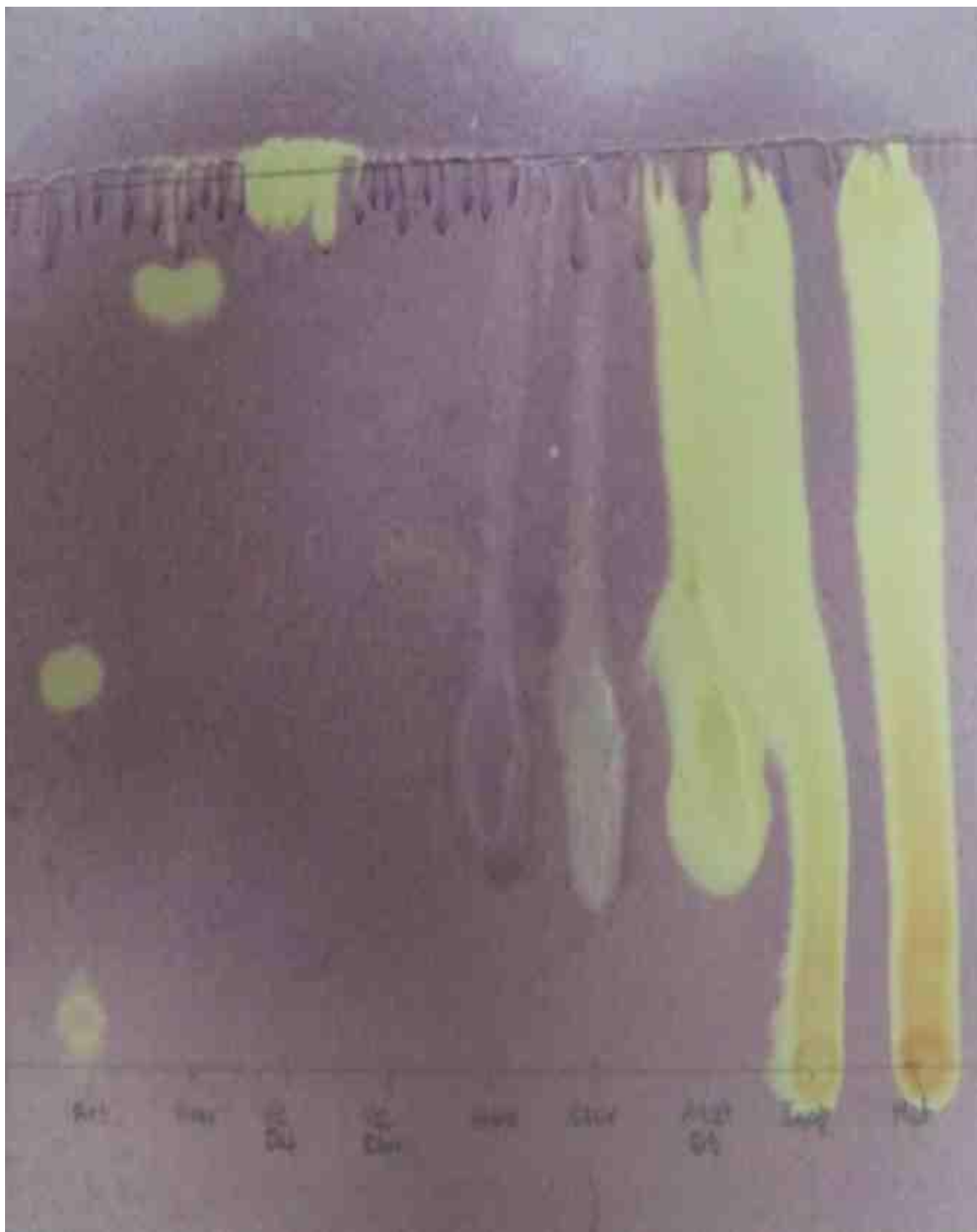
**Tabla 6**

**Rendimiento porcentual de los extractos de rizoma de zarzaparrilla obtenidos a partir de 500.0 g de material vegetal**

Disolvente	Peso del extracto seco (g)	Rendimiento del extracto (% p/p del rizoma seco y molido)
Hexano	1.3257	0.265
Cloroformo	1.4999	0.300
Acetato de Etilo	2.1797	0.436
Isopropanol	10.6948	2.139
Metanol	42.6789	8.536

Fuente: Resultados de la investigación.

Los extractos obtenidos fueron sometidos a dos pruebas sobre cromatoplasmas de CCF, según el procedimiento detallado en la sección 7.4.3. Se utilizaron disoluciones de los flavonoides rutina, quercitina, ácido cafeico y ácido clorogénico como estándares de comparación. La primera de las cromatoplasmas se reveló con disolución de DPPH y la segunda con luz UV a 254 nm, las cuales se muestran a continuación.



**Figura 3: Cromatoplaça con DPPH. De izquierda a derecha los puntos aplicados son: rutina, quercetina, ácido cafeico, ácido clorogénico, extracto hexánico, extracto clorofórmico, extracto etilacético, extracto isopropílico, extracto metanólico. Los antioxidantes producen coloración amarilla.**

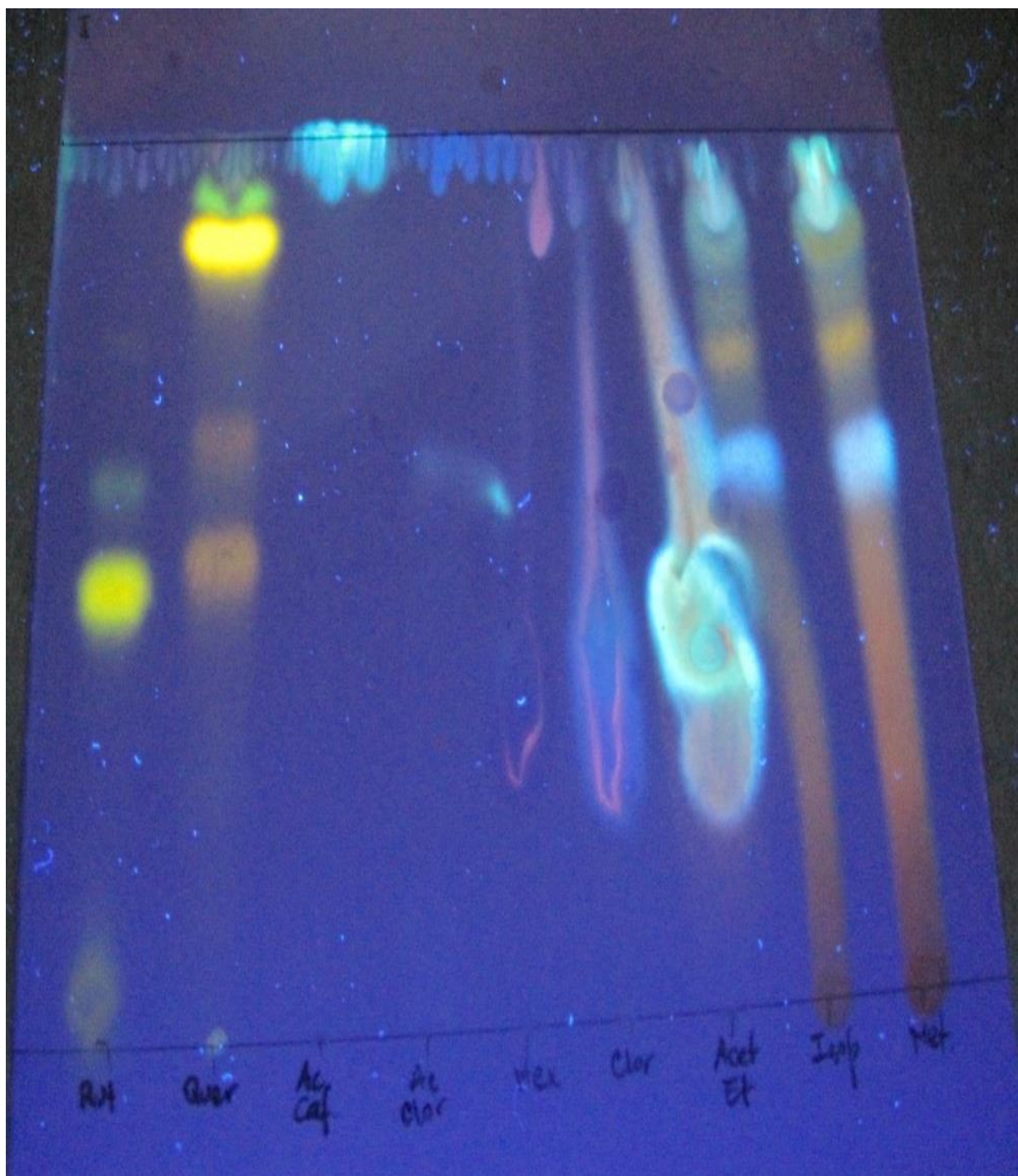


Figura 4: Cromatografía en capa fina revelada con luz UV a 254 nm. De izquierda a derecha los puntos aplicados son: rutina, quercetina, ácido cafeico, ácido clorogénico, extracto hexánico, extracto clorofórmico, extracto etilacético, extracto isopropílico, extracto metanólico.

## 9. DISCUSIÓN

Se encontró que la relación de peso fresco-seco del rizoma de zarzaparrilla colectado fue de 39.2%. Los rendimientos porcentuales obtenidos para cada una de las extracciones realizadas muestran valores que aumentan progresivamente a medida que aumenta la polaridad en la secuencia de disolventes, desde 0.26% para el extracto hexánico, hasta el 8.53% para el extracto metanólico. Este resultado muestra que una proporción mayoritaria del peso de los componentes extraíbles posee características polares en el rizoma de *S. domingensis*. Las CCF realizadas a los extractos obtenidos muestran considerable presencia de sustancias antioxidantes en las fracciones etilacética, isopropílica y metanólica, presentando las dos últimas patrones cromatográficos similares, y difieren del patrón del extracto etilacético en cuanto a que este último presenta una mayor proporción de antioxidantes con menor afinidad a la fase móvil, que tiende a retrasarse respecto al frente del disolvente. Los extractos hexánico y clorofórmico muestran escasa presencia de compuestos con actividad antioxidante. Esto es consistente con el hecho de que los grupos funcionales presentes en flavonoides y otros compuestos con características antioxidantes presentan una polaridad intermedia y alta, por lo que se espera abundancia mayor en los disolventes con dichas características (Filho, da Silva & Boveris, 2001). Estas pruebas muestran que la presencia de los compuestos responsables de la actividad antioxidante se encuentran en las fracciones más polares extraídas. Puede entonces descartarse el uso de disolventes apolares o de baja polaridad para realizar el extracto, a favor de disolventes polares.

Los patrones cromatográficos revelados por medio de luz UV demuestran la presencia de antioxidantes por presencia de manchas amarillas, azules o verdes. Los estándares de flavonoides utilizados como comparación presentan manchas iguales en los extractos son el de quercetina y ácido cafeico. El estándar de ácido clorogénico presenta una similitud en las manchas presentes en los extractos isopropílico y metanólico cerca del frente del solvente, con presencia de manchas

azules. El estándar de rutina no presenta similitudes con los patrones cromatográficos de los extractos ensayados.

## 10. CONCLUSIONES

1. Los rendimientos porcentuales de los extractos obtenidos en relación a cada disolvente indican una abundancia mayoritaria para los extractos isopropanólico y metanólico; el extracto metanólico es el que brinda mejor extracción.
2. Se encontró mayor presencia de compuestos con características antioxidantes en las fracciones etilacética, isopropanólica y metanólica de los extractos de rizoma de *S. Domingensis*, por lo que se acepta el planteamiento de la hipótesis alterna.
3. Existen similitudes en los patrones cromatográficos de los extractos con los de los estándares de flavonoides de: quercetina, ácido cafeico y ácido clorogénico.
4. De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, las principales técnicas para evaluar la actividad antioxidante son: ensayo de reducción del radical DPPH, ensayo de capacidad antioxidante equivalente a Trolox usando ABTS (TEAC), ensayo de peroxidación lipídica y ensayo del análisis del poder reductor férrico/oxidante (FRAP).
5. Son técnicas auxiliares para dichos análisis la determinación de fenoles totales por la técnica de Folin-Ciocalteu y la determinación de flavonoides totales.

## 11. RECOMENDACIONES

1. Realizar los procedimientos de evaluación cuantitativa de la capacidad antioxidante sobre las fracciones etilacética, isopropanólica y metanólica del extracto.
2. Realizar un fraccionamiento en columna cromatográfica de cada extracto, y la evaluación de la capacidad antioxidante de las fracciones obtenidas para afinar la metodología de extracción y lograr el aislamiento de los compuestos responsables de la actividad antioxidante.
3. Realizar los procedimientos de identificación de los compuestos responsables de la actividad antioxidante o, en caso de encontrar compuestos desconocidos, su elucidación estructural.

## 12. REFERENCIAS

- Avello, M. y Suwalsky M. (2006). Radicales libres, Antioxidantes naturales y Mecanismos de Protección. Universidad de Concepción, *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 2(494), 161-172.
- Ballester, M. (1997). Antioxidantes, radicales libres y salud: Un enfoque químico-orgánico-físico. *Medicina Clínica*, 107(13), 509-515.
- Benzie I.F.F. & Strain J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Journal of Analytical Biochemistry*, 239(292), 70-76.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28(1), 22-30.
- Cáceres, A. (1996). *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala: Editorial Universitaria.
- Cáceres, A. (2009). *Actividad antioxidante de diez especies nativas como posibles preservantes de alimentos y fuente para el desarrollo de nutracéuticos*. Proyecto FODECYT 28-2007. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT) Facultad de CCQQ y Farmacia. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.



- Cáceres, A; Cruz, S.; Martínez, V. & Gattuso, M. (2009). Validación de la actividad biocida e inmunomoduladora del extracto hidroalcohólico del rizoma de *Smilax domingensis* Willd. Cultivado en Guatemala. *Revista de Fitoterapia*, 9(1), 45-48.
- Cáceres, A; Cruz, S.; Martínez, V.; Gaitán, I.; Santizo, A.; Gattuso, S.; Gattuso, M. (2012). Ethnobotanical, pharmacognostical, pharmacological and phytochemical studies on *Smilax domingensis* in Guatemala. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(2), 239-248.
- Calle, S. (2011). *Métodos analíticos para la determinación y caracterización de la cafeína*. Universitat Politècnica de Catalunya.
- Cannell, R. (1998). *Natural products isolation, methods in biotechnology*. New Jersey: Humana Press.
- Carvalho, J., (2004). *Fitoterápicos anti-inflamatórios, aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. Brasil: Tecmedd Editora.
- Castañeda C, Ramos E. & Ibáñez V. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico*, 8(1), 56-70.
- Colegate, S., (2008). *Bioactive natural products, detection, isolation and structural determination* (Second edition). Florida: CRC Press.
- Cseke, L.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P.; Warber, S.; Duke, J. & Briemann, H. (2006). *Natural Products from plants* (Second edition). Florida: CRC Press.
- Chang Raymond. (1992). *Química. Reacciones químicas* (Cuarta edición). México: McGraw-Hill Interamericana.

- Docampo, R. (1995). *Antioxidant mechanisms*. In Biochemistry and Molecular Biology of Parasites. London: Academic Press.
- Elejalde Guerra, J. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. Servicio de Medicina Interna del Hospital de Navarra. Pamplona, 23, 1-10.
- Estepa, V., Ródenas, S. & Martín, M. (2001). *Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano*. Madrid: Universidad Complutense.
- Fernández, J. (1999). Aterosclerosis, colesterol y pared arterial. Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana. Centro de Investigaciones y Referencia de Aterosclerosis de la Habana. Cuba. *Revista Cubana de Investigación Biomedica*, 18(3), 1-7.
- Filho, D., da Silva, E. & Boveris, A. (2001). *Flavonóides antioxidantes de plantas medicinales e alimentos: importancia e perspectivas terapêuticas*. En: Plantas medicinales sob a ótica da química medicinal moderna. Brasil: Chapecó.
- Galcerán, J. & Martínez A. (2000). Fenómenos oxidativos en la fisiopatología vascular. *Hipertensión*, 17(1), 39-47.
- Goodman, S. (1998). *Medical cell biology*, vol. II. New York: Ed. Lippincott-Raven Publishers.
- Halliwell, B. (1990). *How to characterize a biological antioxidant*. In: *Free Radical Research Communication* 9(1), 1-32.

- Harnafi, H., Amrani & Souliman. (2008). Spectrophotometric Methods for Determination of Plant Polyphenols Content and their Antioxidant Activity Assessment: an Overview. *Pharmacognosy Reviews*, 2(3), 20-22.
- Hostettmann, K., Gupta, M., Marson, A. & Ferreira, E. (2008). *Manual de estrategias para el aislamiento de productos naturales bioactivos*. Colombia: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología. Cyted; Convenio Andrés Bello.
- Ke, C. (2004). Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 28(5), 771–799.
- Lelli J, Becks L, Dabrowska M, & Hinshaw D. (1998). *ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured*. Consultado el 17 de octubre 2011. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9801070?dopt>
- Lennon, S., Cotter, T. (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif*, 24(2), 203-214.
- Martínez, J. (2007). *Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de Helicarpus terebinthinaceous*. México: Universidad Tecnológica de la Mixteca.
- Martínez-Valverde I., Periago M.J. & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(1), 5-18.
- Medinilla, B. (1996). *Manual de Laboratorio de Farmacognosia*. Guatemala: USAC.
- Mosquera, O., Herrera, Y., & Niño, J. (2009). Antioxidant activity of plants extracts from Colombian flora. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(2), 382-387.

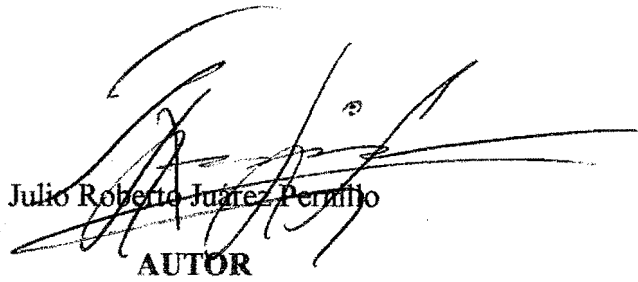
- Pulido R., Bravo L. & Saura-Calixto F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48(8), 3396-3402.
- Rice-Evans C & Gopinathan, V. (1995). Oxygen toxicity, free radicals and antioxidants in human disease: biochemical implications in atherosclerosis and the problems of premature neonates. *Essays in biochemistry*, 29: 39-63.
- Roche, E. & Romero-Alvira D. (1997). *Introducción a la bioquímica y citotoxicidad del desequilibrio oxidativo*. Madrid: ENE Ediciones.
- Roginsky V., & Lissi E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2), 235-254.
- Romero-Alvira, D. (1997). *Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales de la biología molecular en cardiología*. Madrid: ENE Ediciones.
- Romero-Alvira D. (1991). Papel de la prooxidación y la antioxidación en la etiología de la hipertensión arterial. *Medicina Clinica*, 57: 542-551.
- Saldaña, Alberto, (2004). El estrés oxidativo en la Insuficiencia Renal Crónica. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas Victoria de Girón. Cuba. *Revista Cubana de Investigación Biomedica*, 23(2), 118-120.
- Schafer F. and Buettner G. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(11), 1191-1212.

Sies, H. (1985). *Oxidative stress: introductory remarks*. In *Oxidative Stress*, H. Sies, (Ed.). London: Academic Press Inc.

Silva M., Santos M., Caroco C., Rocha R., Justino C. & Mira L. (2002). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids. Re-examination. *Free Radical Research*, 36(11), 1219-1227.

Taylor A. (1993). Cataract: relationships between nutrition and oxidation. *Journal of the American College of Nutrition*, 12(2), 138-146.

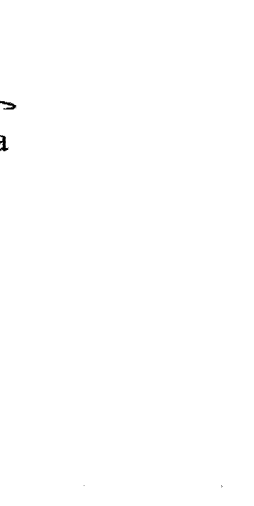
Valko, M., Morris, H. & Cronin M. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161-1208.



Julio Roberto Juárez Perillo  
**AUTOR**



MSc. María Ernestina Ardón Quezada  
**DIRECTORA**



Dr. Rubén Daríel Velásquez Miranda  
**DECANO**