

## ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y ACUOSOS DE LA CÁSCARA Y LA SEMILLA DE *Annona muricata* Y DE LAS HOJAS *Brownea ariza*.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF AQUEOUS AND ETHANOLIC EXTRACTS OF THE PEEL AND SEED OF *Annona muricata* AND THE LEAVES OF *Brownea ariza*.

Mónica V. Moncada Restrepo<sup>1,2</sup>, Alejandra M. Giraldo<sup>1,3</sup>, Patricia Landazuri<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad del Quindío. plandazu@uniquindio.edu.co.

<sup>2</sup> Programa de Química. Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías. Universidad del Quindío. Armenia-Quindío, Colombia. movimor31@yahoo.com

<sup>3</sup> Programa de Licenciatura en Biología y Educación ambiental. Facultad de Educación. Universidad del Quindío. Armenia-Quindío, Colombia. amgiraldo@uniquindio.edu.co.

Recibido: Noviembre 26 de 2012

Aceptado: Diciembre 19 de 2012

\*Correspondencia del autor. Grupo de Investigación en Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad del Quindío. Carrera 15 Calle 12N, Armenia, Colombia. Contacto: plandazu@uniquindio.edu.co

### RESUMEN

En los seres humanos, el estrés oxidativo se ha visto asociado a la aparición de varias enfermedades. La búsqueda de antioxidantes provenientes de fuentes naturales ha tomado fuerza en los últimos tiempos. En este estudio se evaluaron las propiedades antioxidantes de los extractos etanólicos y acuosos de las hojas de *Brownea ariza* (Palo de la Cruz) y las cáscaras y las semillas de *Annona muricata*, (guanábana) empleando los métodos in-vitro para la captación del radical DPPH<sup>•</sup>, la captación del radical hidroxilo, y la actividad antioxidante total. También se determinó el contenido fenólico total. Los extractos etanólicos y acuosos de las hojas de *B. ariza* presentaron el mayor contenido fenólico (542.3±15.0 y 365.5±18.2 mg AG/g extracto seco), la mayor actividad antioxidante (550.1±14.5 y 310.6±4.2 mg AA/g extracto seco) y el mejor comportamiento frente al radical DPPH<sup>•</sup> (93.8±1.4 y 91.6±0.5 % a una concentración de 0.05 mg/mL). Para *A. muricata* el extracto con mejores resultados en todos los ensayos fue el etanólico de las cáscaras. Se propone a los extractos etanólico y acuoso de las hojas de *B. ariza* y al extracto etanólico de las cáscaras de *A. muricata* como fuentes potenciales de compuestos fitoquímicos con capacidad antioxidante.

**Palabras clave:** *Annona muricata*, *Brownea ariza*, actividad antioxidante, radicales libres.

## ABSTRACT

In human beings, oxidative stress has been associated with several diseases develop. Finding antioxidants from natural sources has taken strength in the last time. The aim of this study was to evaluate the antioxidant properties of the aqueous and ethanolic extracts of the peel and seeds of *Annona muricata* and the leaves of *Brownea ariza*, using the in-vitro methods for the scavenging of DPPH<sup>•</sup> radical, the scavenging of hydroxyl radical, and the total antioxidant activity. Total phenolic content was also measured. Ethanolic and aqueous extracts of the leaves of *B. ariza* leaves showed the highest phenolic content (542.3±15.0 y 365.5±18.2 mg AG/g dry extract), the highest antioxidant activity (550.1±14.5 y 310.6±4.2 mg AA/g dry extract) and the best behavior against the DPPH<sup>•</sup> radical (93.8±1.4 y 91.6±0.5 % to a concentration of 0.05 mg/mL). For *A. muricata*, the extract that exhibited the highest results in the assays was the leaves ethanolic extract. It is proposed to the ethanolic and aqueous extracts of the *B. ariza* leaves and the ethanolic extract of the peel of *A. muricata* as potential sources of secondary metabolites with antioxidant activity.

**Key words:** *Annona muricata*, *Brownea ariza*, antioxidant activity, free radicals.

## INTRODUCCIÓN

Los radicales libres, especies capaces de existir de forma independiente con uno o más electrones no apareados, y ciertas especies no radicales, caracterizadas por ser agentes oxidantes y/o fácilmente convertidos en radicales son conocidas con el termino de especies reactivas (RS). Algunos ejemplos de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RNO y RNS respectivamente) son el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>), el radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>), el radical peróxido (ROO<sup>•</sup>), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el óxido nítrico (NO<sup>•</sup>), el dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>), y el peroxinitrilo (ONOO<sup>-</sup>)(1). En organismos vivos las especies reactivas se pueden generar por mecanismos endógenos como la fuga mitocondrial, la explosión respiratoria, reacciones enzimáticas, reacciones de auto-oxidación, y por mecanismos exógenos como el humo de cigarrillo, la polución, la luz UV, las radiaciones de ionización y los xenobióticos. Debido a que los radicales libres usualmente son moléculas que, por la alta reactividad que les confiere su electrón desapareado, pueden reaccionar de una forma indiscriminada dañando cualquier componente celular, el cuerpo humano cuenta con un amplio sistema de defensa antioxidante (2). Las principales defensas antioxidantes contra los radicales libres son la superóxido dismutasa (SOD), el glutatión (GSH), la GSH peroxidasa, la glutatión reductasa, la catalasa, y los nutrientes antioxidantes (3). Cuando existe un desequilibrio entre la producción de radicales libres y el sistema de defensa antioxidante, se genera una condición conocida como estrés oxidativo (EO). El EO se ha asociado con el daño a un amplio rango de moléculas que incluye los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Estos daños finalmente se

manifiestan en el desarrollo de varios desordenes de salud, tales como trastornos neurológicos, la aterosclerosis, condiciones inflamatorias, ciertos cánceres, y el proceso del envejecimiento (4).

En la industria alimenticia, cosmética y terapéutica, los antioxidantes sintéticos como el Butil hidroxil anisol (BHA) y el butil hidroxitoulueno (BHT) se han utilizado ampliamente. Sin embargo, algunas propiedades físicas indeseadas, como sus altas volatilidades y la inestabilidad a altas temperaturas así como la naturaleza carcinogénica de algunos de ellos, han desviado la atención de la industria hacia otra clase de antioxidantes. El uso de antioxidantes provenientes de fuentes naturales ha tomado mayor importancia en la actualidad debido a que son de bajo costo, tienen una alta compatibilidad con la ingesta dietaria y no presentan efectos perjudiciales dentro del cuerpo humano (4). Los antioxidantes naturales provenientes de la dieta que más se han estudiado son las vitaminas C, A, E y los carotenoides. Aparte de ellos, también se han estudiado otras sustancias que provienen de las plantas, dentro de los que se encuentran los polifenoles, los cuales representan una amplia variedad de moléculas que incluyen fenoles, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y lignanos (5). Desde la década de los 90s, existe cada vez más interés en los polifenoles, debido en gran parte al reconocimiento de sus propiedades antioxidantes, y su probable papel en la prevención de diversas enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (6).

*Annona muricata*, conocida también como guanábana, es un árbol tropical que se puede encontrar en las Indias

Occidentales, América del Norte y del Sur, las tierras bajas de África, islas del Pacífico y el Sudeste Asiático. *A. muricata* es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional alrededor del mundo (7). Todas las partes de la planta, incluyendo la corteza, las hojas, las raíces y las semillas del fruto, son utilizadas dentro la medicina tradicional. *A. muricata* se usa para el tratamiento de la epilepsia, la disentería, los problemas cardiacos, las infestaciones de lombrices, las constipaciones, las hemorragias, las infecciones antibacteriales, la disuria, la fiebre y la úlcera. Se ha demostrado la actividad anticancerígena de los extractos etanólicos de las hojas y el tallo<sup>8</sup>, las propiedades citotóxicas de algunos compuestos fitoquímicos de las hojas contra diversas líneas celulares, la actividad antiinflamatoria y antinociceptiva del extracto etanólico de las hojas (9), así como la actividad antioxidante in vitro del extracto etanólico de sus hojas y del jugo del fruto (10,11), y la actividad antioxidante in vivo del extracto acuoso de sus hojas (12).

*Brownea Ariza* B. es un árbol maderable que se distribuye principalmente desde Perú hasta Panamá. Es usado en la medicina tradicional contra heridas internas, heridas sangrantes, disentería y diarrea. Se ha demostrado la inhibición in vitro del veneno de *Brothor asper* por los extractos etanólicos de las hojas y la corteza (13), la actividad anticoagulante del extracto etanólico y las subfracciones de la corteza (14), así como la actividad anticancerígena y la citotóxica de 2 de sus flavonoides (15).

Hasta el momento no se han encontrado estudios que analicen la capacidad antioxidante de los extractos acuosos y etanólicos de las semillas y la cáscara de *A. muricata* y de las hojas de *B. Ariza*. En el presente estudio se determinó la actividad antioxidante de los extractos etanólicos y acuosos de las hojas de *Brownea ariza* y las cáscaras y las semillas de *Annona muricata*, utilizando varios métodos in vitro.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención del material vegetal.

El fruto de *Annona muricata* fue recolectado en la finca Milan, vereda Montegrando del municipio de Caicedonia, Departamento del Valle del Cauca - Colombia. Las hojas de *Brownea ariza* fueron compradas en el mercado local de la ciudad de Armenia, Colombia.

### Obtención de los extractos vegetales.

Las hojas de *B. ariza* y las semillas y las cáscaras de *A. muricata* se secaron en un horno a 40 °C durante un mes, luego se pulverizaron utilizando un molino mecánico. Para la obtención de los extractos etanólicos aproximadamente 100 g de cada material vegetal pulverizado se sometió a un proceso de lixiviación con etanol durante 8 días, el extracto crudo obtenido se concentró en un rotavapor a presión reducida a 40°C, posteriormente se mezcló con una solución de etanol:agua (1:7) por 5 días y se filtró con el fin de separar clorofilas, el extracto sin clorofilas se volvió a concentrar en las mismas condiciones y se secó en un horno a 40°C hasta la remoción completa del solvente. Para la obtención de los extractos acuosos, se mezclaron 10 g de cada material vegetal seco y pulverizado con 90 mL de agua, la mezcla se mantuvo en agitación constante durante 24 h a 40 °C, luego se filtró, y la solución obtenida se concentró en un rotavapor a presión reducida a 40 °C y se llevó a sequedad.

### Determinación del contenido de fenoles totales.

El contenido fenólico total fue determinado usando el método colorimétrico propuesto por Guha y col. 2009 (16). A 50 µL del extracto o el estándar de ácido gálico se le adicionó 2.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu al 10 % v/v y 2 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7.5 % p/v. Después de un periodo de incubación a 40°C durante 15 minutos se leyó la absorbancia de la mezcla a 765 nm usando como blanco una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7.5% en 2.55 ml de agua destilada). Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto seco (mg AG/ g extracto seco).

### Determinación de la capacidad antioxidante total por el método de Molibdato.

La capacidad antioxidante total de los extractos fue determinada mediante el método propuesto por Prieto y col. 1999 (17). A una alícuota de 100 µL de cada extracto o del estándar de ácido ascórbico se le adicionó 1 mL de una solución reactiva (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.6 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 28mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 4 mM). La mezcla resultante se incubó a 95 °C durante 90 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se leyó absorbancia a 695 nm. Se utilizó un blanco compuesto por 1 mL de la solución reactiva y 100 µL del mismo solvente usado para cada muestra. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido ascórbico por g de extracto seco (mg AA/g extracto seco).

### Actividad de captación del radical libre y estable DPPH<sup>•</sup>.

La actividad captadora del radical libre DPPH<sup>•</sup> fue evaluada de acuerdo al método de Brand-Williams y col. 1995 (18), con las modificaciones propuestas por Guha y col. 2009 (16) así: A 500 µl de una solución de DPPH<sup>•</sup> 0.2 mM en metanol, se le agregó un mililitro del extracto a las diferentes concentraciones preparado en metanol y agitado vigorosamente. La mezcla fue incubada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 40 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 517 nm usando el blanco apropiado para cada muestra. Se utilizó BHT (hidroxitolueno butilado) como control positivo. El porcentaje de captación del DPPH<sup>•</sup> se calculó a partir de la ecuación [1].

$$\% \text{ Captacion} = \frac{\text{Abs Control} - \text{Abs Muestra}}{\text{Abs Control}} \times 100 \quad [1]$$

Donde La absorbancia del control (Abs Control) hace referencia a la medición que contenía el DPPH<sup>•</sup> y metanol en vez de extracto y La absorbancia de la muestra (Abs Muestra) se refiere a la medición que contenía el DPPH<sup>•</sup> y el extracto o el BHT.

### Actividad de la captación del radical hidroxilo generado mediante el sistema del ascorbato/Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La capacidad de captación de radicales Hidroxilo por los extractos fue medida de acuerdo al método de Halliwell y col. 1987 (19). Se generó una mezcla de reacción que contenía, en un volumen final de 1 mL, los siguientes reactivos (concentraciones finales): FeCl<sub>3</sub> (100 µM), EDTA (104 µM), 2-deoxi-D-ribosa (2.8 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.42 mM), ácido ascórbico (100 µM), y los extractos vegetales. El ensayo se llevó a cabo adicionando 200 µL de FeCl<sub>3</sub> 1 mM y EDTA 1.04 mM previamente mezclados en una relación 1:1 (v/v), 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM), 500 µL de 2-deoxi-D-ribosa (5.6 mM) preparada en un buffer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH (40 mM, pH 7.4), 100 µL de los extractos vegetales (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, y 1.0 mg/mL) y 100 µL de ácido ascórbico (1 mM). Después de un periodo de incubación de 1 h a 37 °C, la degradación de la 2-deoxi-D-ribosa generada por los radicales hidroxilos formados se midió usando el método del ácido tiobarbitúrico. La solución resultante se diluyó en agua destilada en una proporción mezcla:agua destilada 1:4 (v/v), 1 mL de la dilución se mezcló con 1 mL de TBA (1% p/v preparado en NaOH 50 mM) y 1 mL de TCA (2.8 % p/v), la mezcla obtenida se calentó en un baño de agua a 95 °C por 15 min, se enfrió con un baño de hielo, y se le midió absorbancia a 532 nm utilizando el blanco

apropiado para cada muestra. Las soluciones de FeCl<sub>3</sub>, ácido ascórbico y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron preparadas justo antes de su uso. Se utilizó DMSO como control positivo. El porcentaje de captación del DPPH<sup>•</sup> se calculó a partir de la ecuación 1, donde la absorbancia del control (Abs Control) hace referencia a la medición que contenía todos los reactivos de la reacción a excepción del extracto o el DMSO y la absorbancia de la muestra (Abs Muestra) se refiere a la medición que contenía los reactivos de reacción más el extracto o el DMSO.

### Análisis estadístico.

Todos los ensayos fueron realizados en triplicado. Los resultados se expresaron como la Media ± la desviación estándar (DS). Los valores de EC50 se calcularon a partir de un análisis e regresión lineal.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A la fecha una gran variedad de métodos in-vitro para determinar la actividad antioxidante, han sido desarrollados y estudiados (20,21). Los estudios de capacidad antioxidante son ampliamente utilizados como parámetros para la búsqueda de componentes medicinales bioactivos. En el presente trabajo, la actividad antioxidante in vitro de los extractos acuosos y etanólicos de las hojas de *B. ariza* y de las cáscaras y las semillas de *A. muricata* fue determinada por la habilidad de captar el radical estable DPPH<sup>•</sup> y el radical OH<sup>•</sup>, por la actividad antioxidante total por el método del fosfomolibdeno, y por el contenido fenólico total de cada uno de ellos.

### Contenido fenólico total.

El contenido fenólico total de los extractos etanólicos y acuosos de las hojas *B. ariza* (EHBA y AHBA), las cáscaras de *A. muricata* (ECAM y ACAM) y las semillas de *A. muricata* (ESAM y ASAM) se presenta en la tabla 1. La cantidad de fenoles totales varía desde 15.26 ± 1.85 hasta 542.27 ± 14.99 mg AG/g extracto seco. Los extractos de *B. ariza* presentan los niveles más altos de fenoles totales, siendo mayor en el etanólico, por el contrario, los extractos acuosos de las cáscaras y las semillas de *A. muricata* presentan los niveles más bajos. En general, se puede apreciar que para cada parte estudiada los niveles más altos de fenoles totales se presentan en los extractos etanólicos.

Varios estudios soportan el papel benéfico de los polifenoles en la prevención de diversas enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (6,22).

**Tabla 1.** Contenido fenólico total y capacidad antioxidante total para los extractos acuosos y etanólicos de las hojas de *B. ariza* y de las cáscaras y las semillas de *A. muricata*\*1

Extracto	Contenido fenólico total mg AG/g extracto seco	Capacidad antioxidante total mg AA/g extracto seco
<b>EHBA</b>	542.3±15.0	550.1±14.5
<b>AHBA</b>	365.5±18.2	310.6±4.2
<b>ECAM</b>	80.6±7.9	165.0±5.0
<b>ACAM</b>	49.6±4.7	132.2±3.9
<b>ESAM</b>	50.9±11.3	141.2±7.0
<b>ASAM</b>	15.3±1.8	53.9±8.5

\*1 Los valores se expresan como la media aritmética ± la desviación estándar de los porcentajes de captación de cada extracto, obtenidos para cada uno de los tres ensayos. Donde EHBA es el extracto etanólico de las hojas *B. ariza*, AHBA es el extracto acuoso de las hojas *B. ariza*, ECAM es el extracto etanólico de las cáscaras de *A. muricata*, ACAM es el extracto acuoso de la cascara de *A. muricata*, ESAM es el extracto etanólico de las semillas de *A. Muricata* y ASAM es el extracto acuoso de las semillas de *A. Muricata*.

La actividad antioxidante de los polifenoles se debe, principalmente, a sus propiedades redox y su estructura química, que le confieren la capacidad para atacar radicales libres de forma directa, ya sea mediante una transferencia de un átomo de hidrogeno, o una transferencia de un electrón, así como la capacidad para quelar metales de transición (23,24). Por su gran cantidad de contenido fenólico total, *B. ariza* se postula como una candidata para estudios posteriores relacionados con la determinación, elucidación y medición de actividades biológicas tanto in vitro como in vivo de los polifenoles que posee, así como la biodisponibilidad y toxicidad de los mismos. Hasta el momento la actividad anticancerígena de dos de sus flavonoides ya ha sido demostrada (15).

#### Capacidad antioxidante total por el método del fosfomolibdeno.

El ensayo de la capacidad antioxidante total por el método del fosfomolibdeno, se basa en la reducción del Mo (IV) a Mo (V) causada por un agente reductor, con la subsecuente formación de un complejo verde de fosfato/Mo(V) a pH ácido que tiene un máximo de absorción a 695 nm (Ecuación 2). La reacción es utilizada para la determinación de vitamina E, así como para la determinación de la capacidad reductora de los compuestos antioxidantes que posee un extracto vegetal (17).



Las capacidades antioxidantes de los extractos medidas a través del método de fosfomolibdeno se presentan en la tabla 1. Los valores varían desde  $550.15 \pm 14.47$  hasta  $53.89 \pm 8.52$  mg AA/g extracto seco, indicando

que todos los extractos analizados poseen capacidad antioxidante. La capacidad antioxidante total de todos los extractos tuvo el siguiente orden decreciente: EHBA>AHBA>ECAM>ESAM>ACAM>ASAM. Los dos extractos de las hojas de *B. ariza* son los que presentan la mayor capacidad antioxidante, habiendo más capacidad en etanólico que en el acuoso. Por el contrario, los extractos que presentan menor capacidad antioxidante son los acuosos pertenecientes a los dos órganos estudiados de *A. muricata*. Estos resultados demuestran, que las hojas de *B. ariza* tienen un alto poder reductor, y que de las partes estudiadas de *A. muricata* el mayor poder reductor lo posee el extracto etanólico de sus cáscaras. Se sabe que dentro de la composición fitoquímica de las hojas de *B. ariza* existe la presencia de flavonoides (15), un grupo de polifenoles que se han caracterizado por su alta actividad antioxidante (5,25), por lo que los resultados de actividad antioxidante total para estos extractos pueden estar relacionadas con estos metabolitos.

En general, en cada órgano analizado, los extractos etanólicos presentaron mejor capacidad antioxidante que los acuosos. Se puede inferir entonces que el proceso empleado para la obtención de los extractos etanólicos es más eficiente que el empleado para la obtención de los extractos acuosos, en cuanto a la extracción de compuestos antioxidantes con poder reductor.

#### Actividad de captación del radical libre y estable 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo (DPPH')

El DPPH' es uno de los pocos radicales orgánicos del nitrógeno estable y comercialmente disponible. Este ra-

dical libre es de un color púrpura intenso que presenta su máximo de absorbancia a 517 nm. El ensayo se basa en la medición de la habilidad de los antioxidantes para reducir el DPPH<sup>•</sup>, a través de un decrecimiento en la absorbancia. La reacción puede ser generada por un antioxidante ya sea por una transferencia de un electrón, o por una transferencia de un átomo de hidrógeno (20,21).

En la tabla 2 se muestra la actividad de captación del radical DPPH<sup>•</sup> por el BHT y los diferentes extractos. Todos los extractos presentaron capacidad para reducir el DPPH<sup>•</sup> a una molécula no-radical. Los dos extractos de las hojas de *B. ariza* muestran la mayor efectividad en el proceso de captación. El extracto etanólico de las hojas de *B. ariza* fue el captador más efectivo, siendo incluso mejor que el antioxidante sintético BHT. En un rango de concentraciones entre 0.05 mg/mL y 1 mg/mL, este extracto captó el radical libre desde un 93.8 ± 1.4 hasta un 95.7 ± 0.6 %. El extracto acuoso de las hojas de *B. ariza* presentó un comportamiento muy similar al del BHT, captando el 91.6 ± 0.5% de los radicales DPPH<sup>•</sup> a una concentración de 0.05 mg/mL. De los órganos estudiados de *A. muricata* el extracto etanólico de las cáscaras presentó la mayor capacidad de captación del radical DPPH<sup>•</sup>, alcanzando una captación mayor al 91% a una concentración de 0.1 mg/mL, estos resultados son mayores a los encontrados en el extracto

etanólico de sus hojas por Baskar y col. 2007 (10) en el que a la misma concentración se alcanzaba una captación del 72.7%. El extracto acuoso de las semillas mostró los menores porcentajes de captación. Se requieren entonces estudios futuros que determinen cuál o cuáles son los antioxidantes responsables de esta actividad, así como estudios que aclaren si la vía de acción de estos antioxidantes para captar el radical DPPH<sup>•</sup> se produce a través de una transferencia de un electrón, o a través de una transferencia de un átomo de hidrógeno.

**Actividad de la captación del radical hidroxilo generados mediante el sistema del ascorbato/Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

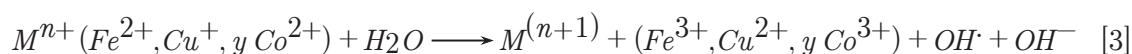
El radical hidroxilo es la especie radical más reactiva conocida en la química. Puede atacar y dañar casi todos componentes celulares tan pronto entra en contacto con ellos. Estas reacciones incluyen interacciones con las bases nitrogenadas del DNA pirimidina y purina y abstracciones de átomos de hidrogeno de moléculas biológicas como los tioles, con la subsecuente generación de radicales sulfuro. El daño biológico por el que más se ha caracterizado el radical hidroxilo, es su capacidad para estimular la reacción de radicales en cadena conocida como peroxidación lipídica (26). En un sistema vivo, los radicales hidroxilo se forman en su gran mayoría a través de la reacción de fenton (ecuación 3),

**Tabla 2.** Porcentaje de captación del radical DPPH<sup>•</sup> para los extractos acuosos y etanólicos de las hojas de *B. ariza* y de las cáscaras y las semillas de *A. Muricata*<sup>\*1</sup>

Muestra	concentraciones de ensayo (mg/mL)					EC 50 (mg/mL)
	0.05	0.1	0.2	0.5	1	
<b>EHBA</b>	93.8±1.4	94.2±0.9	94.9±0.6	95.4±0.7	95.7±0.6	-
<b>AHBA</b>	91.6±0.5	91.7±0.5	91.8±0.6	91.9±0.6	92.0±0.6	-
<b>ECAM</b>	66.9±4.3	91.7±0.8	94.4±0.7	94.6±0.8	94.8±0.8	-
<b>ACAM</b>	18.6±1.4	32.5±2.5	55.6±2.9	92.4±0.6	94.4±0.4	0.1758
<b>ESAM</b>	21.3±2.1	38.1±1.7	72.0±2.1	93.7±0.2	94.4±0.1	0.1349
<b>ASAM</b>	4.1±1.0	6.9±0.6	11.5±0.9	26.3±0.8	48.4±1.4	1.0260
<b>BHT</b>	90.9±1.1	91.2±1.1	91.4±1.1	91.7±0.9	92.0±0.9	-

<sup>\*1</sup> Los valores se expresan como la media aritmética ± la desviación estándar de los porcentajes de captación de cada extracto, obtenidos para cada uno de los tres ensayos. Donde EHBA es el extracto etanólico de las hojas *B. ariza*, AHBA es el extracto acuoso de las hojas *B. ariza*, ECAM es el extracto etanólico de las cáscaras de *A. muricata*, ACAM es el extracto acuoso de la cascara de *A. muricata*, ESAM es el extracto etanólico de las semillas de *A. muricata* y ASAM es el extracto acuoso de las semillas de *A. muricata*.

que consiste en un rompimiento del peróxido de hidrogeno mediante una catálisis con metales de transición, que generalmente son  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$ , y  $Co^{2+}$  (27).

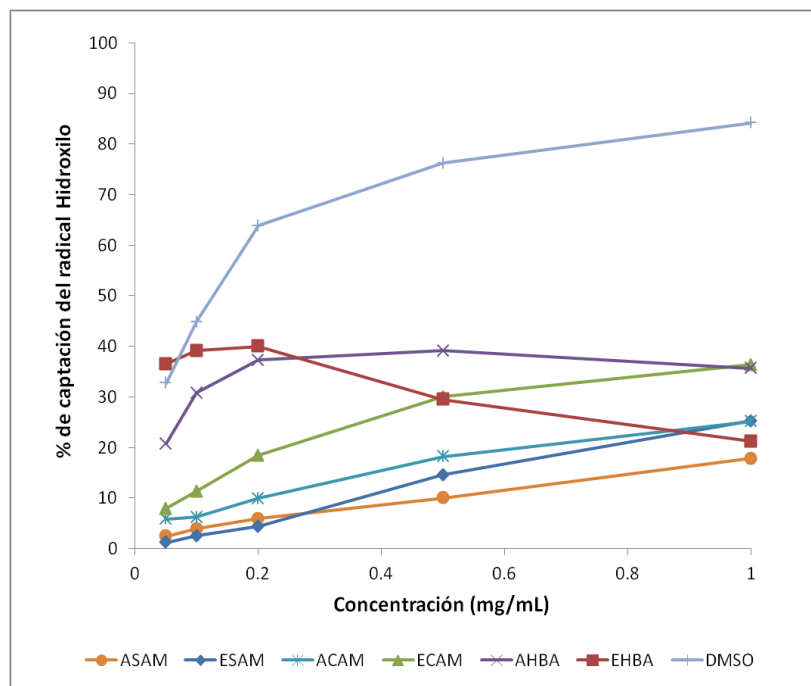


Donde  $M^{n+}$  es el ion de un metal de transición.

En el ensayo realizado se generó una reacción de fenton mediada por el ácido ascórbico, en la que el ascorbato reduce el  $Fe^{3+}$ -EDTA a  $Fe^{2+}$ -EDTA, para que este pueda catalizar la ruptura del peróxido. Los radicales hidroxilo generados por el sistema ascorbato/ $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$ , pueden ser detectados por su habilidad para degradar la pentosa 2-deoxi-D-ribosa en una mezcla de productos que bajo calentamiento con ácido tiobarbitúrico (TBA) a pH ácido, reaccionan formando un cromógeno rosado con un máximo de absorbancia a 532 nm. Cuando se adicionan captadores de radicales hidroxilo a la mezcla de reacción, estos compiten con la deoxirribosa por el radical hidroxilo, generando una disminución en la formación del cromógeno (19), lo que permite deducir el porcentaje de captación de los radicales hidroxilo por los diferentes extractos vegetales.

En la figura 1 se muestran los porcentajes de captación de los radicales hidroxilo producidos por cada extracto

a las 5 concentraciones trabajadas. El extracto etanólico de las hojas *B. ariza* en el rango de 0.05 a 0.2 mg/mL presenta un porcentaje de captación que va desde el  $36.5 \pm 4.4$  hasta el  $40.0 \pm 4.3$  %, pero a concentraciones mayores el porcentaje de captación empieza a disminuir. Una situación similar se presenta con el extracto acuoso de las hojas de *B. ariza*, el cual a una concentración de 0.5 mg/mL alcanza una captación del  $39.2 \pm 2.4$ %, pero a 1 mg/mL este porcentaje disminuye a un  $35.7 \pm 2.3$  %. Este comportamiento pro-oxidante a altas concentraciones se puede deber a las habilidad de algún o algunos compuestos presentes en el extracto para promover la reducción de  $Fe^{3+}$ -EDTA a  $Fe^{2+}$ -EDTA, y por ende generar más radicales hidroxilo, aumentando la cantidad de 2-deoxi-D-ribosa degradada (28). Los extractos de *A. muricata* presentaron porcentajes de captación del radical hidroxilo dosis dependiente. Aunque estos extractos fueron capaces de prevenir la degradación de la deoxirribosa captando los radicales



**Figura 1.** Porcentaje de captación del radical hidroxilo para los extractos acuosos y etanólicos de las hojas de *B. ariza* y de las cáscaras y las semillas de *A. muricata*. Donde EHBA es el extracto etanólico de las hojas *B. ariza*, AHBA es el extracto acuoso de las hojas *B. ariza*, ECAM es el extracto etanólico de las cáscaras de *A. muricata*, ACAM es el extracto acuoso de la cascara de *A. muricata*, ESAM es el extracto etanólico de las semillas de *A. muricata* y ASAM es el extracto acuoso de las semillas de *A. muricata*.

libres que se generaron mediante la reacción de fenton, a la máxima concentración estudiada (1mg/mL), los porcentajes de captación estuvieron por debajo del 50%, entre un rango de  $17.8 \pm 1.0$  y  $36.4 \pm 2$  %. La mayor captación la obtuvo el extracto etanólico de las cáscaras ( $30.1 \pm 3.0$  % a 0.5 mg/mL); sin embargo estos resultados son menores a los encontrados en el extracto etanólico de sus hojas por Baskar y col. 2007 (10), en los que a la misma concentración ya obtenía un porcentaje de captación del 85.9%. Estos resultados sugieren que los extractos estudiados de las cáscaras de *A. muricata* son captadores moderados de radicales hidroxilo, y que sus hojas, o bien tienen mayor concentración de metabolitos captadores de radicales hidroxilo, o tienen metabolitos diferentes a los de las cáscaras que son buenos captadores de radicales hidroxilo. No obstante no se descarta la búsqueda de los metabolitos responsables de esta captación en las cáscaras.

## CONCLUSIONES

Basados en los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que los extractos de las hojas de *B. ariza*, los cuales contenían la mayor cantidad de

polifenoles, exhibieron la más alta actividad antioxidante y actividad de captación del radical DPPH<sup>•</sup>, y que el extracto etanólico de las cáscaras *A. muricata* presentó los mejores resultados de actividad antioxidante de todos los extractos evaluados para esta planta. Lo que sugiere que los dos extractos de las hojas de *B. ariza* y el extracto etanólico de las cáscaras de *A. muricata* son una fuente importante de antioxidantes naturales que podrían disminuir el progreso de estrés oxidativo, y que en el caso de *B. ariza* son incluso mejores que el antioxidante sintético BHT. No obstante, son requeridos futuros estudios dirigidos a aislar, identificar y determinar la toxicidad y la biodisponibilidad de los compuestos antioxidantes presentes en dichos extractos, así como los estudios de la actividad antioxidante in vivo y los mecanismos antioxidantes por los que actúan.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a la Universidad del Quindío, por permitirnos utilizar las instalaciones y los reactivos necesarios para llevar a cabo el proyecto, así como a la Red ALMA MATER, por la beca pasantía de joven investigador otorgada.

## BIBLIOGRAFÍA

- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *Journal of Neurochemistry* 2006; 97: 1634–1658.
- Young I, Woodside, J. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54: 176–186
- Fang Y, Yang S, Wu G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition* 2002; 18(10): 872–879.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 2010; 4(8): 118–126.
- Pietta P. Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63: 1035-1042.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 727–747.
- Badrie N, Schauss A. Soursop (*Annona muricata* L.): Composition, Nutritional Value, Medicinal Uses, and Toxicology. *Bioactive. Foods in Promoting Health*. Oxford: Academic Press 2009; 621-643.
- Dembitsky V, Poovarodom S, Leontowicz H, Leontowicz M, Vearasilp S, Trakhtenberg S, Gorinstein S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. *Food Research International* 2011; 44: 1671–1701.
- de Sousa O, Vieira G, De Pinho J, Yamamoto C, Alves M. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract of *Annona muricata* L. Leaves in Animal Models. *Int J Mol Sci* 2010; 11: 2067-2078.
- Baskar R, Rajeswari V, Kumar T. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian Journal of Experimental Biology* 2007; 45(5): 480-485.
- Almeida M, de Sousa P, Arriaga A, do Prado G, Magalhães C, Maia G, Lemos T. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International* 2011; 44(7): 2155-2149.
- Adewole S, Ojewole J. Protective effects of *annona muricata* linn. (annonaceae) leaf aqueous Extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of Streptozotocin-treated diabetic rats. *Afr J Trad CAM* 2009; 6(1): 30 – 41.

13. Mack-Wen V, Rico L, Alarcón J, Pereañez J. Inhibición In Vitro del veneno de *Bothrops asper* con extractos etanólicos de *Brownea ariza* B. (Caesalpiniaceae). *Vitae* 2011; 18(1): 43-48.
14. Márquez-Vizcaíno R, de la Rosa C, Arrieta-García J, Villalba-Uparela J. Evaluación de la actividad coagulante de *Brownea ariza* Benth (Caesalpiniaceae). *Actual Biol* 2005; 27 (Supl. 1): 101-104.
15. Gil J, Gomez M, Trejos J. Citotoxicidad y actividad anticancerígena de dos flavonoides aislados y purificados de *Brownea ariza* Benth. *Vitae* 2009; 16(01): 93-101.
16. Guha G, Rajkumar V, Kumar RA, Mathew L. Therapeutic Potential of Polar and Non-Polar Extracts of *Cyanthillium cinereum* In Vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2009; 1-11.
17. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry* 1999; 269: 337-341.
18. Brand-William W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss u technol* 1995; 28 (1): 25-30.
19. Halliwell B, Gutteridge J, Aruoma O. The deoxyribose method: a simple "test tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry* 1987; 165: 215-219.
20. Huang D, Ou B, Prior R. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 1841-1856.
21. Prior R, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 4290-4302.
22. Scalbert A, Johnson I, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 215S-217S.
23. Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco J. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry* 2003; 83: 547-550.
24. Leopoldini M, Russo N, Toscano T. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* 2011; 125: 288-306.
25. Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008; 476: 107-112.
26. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91 (suppl 3C): 14S-22S.
27. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160: 1-40.
28. Aruoma O. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research* 2003; 523-524: 9-20.