

Actividad antioxidante, minerales y toxicidad aguda del extracto alcohólico de tallos bulsenia retama Griseb "Calato"

Antioxidant activity, minerals and acute toxicity of the alcoholic extract of stems bulsenia retama Griseb "Calato"

Felipe Artemio Surco Laos
felipe.surco@unica.edu.pe - Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Ica
Manuel Alfredo Valle Campos
manuel.valle@unica.edu.pe - Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Ica
Luz Maximilina Yarasca Arcos
luz.yarasca@unica.edu.pe - Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Ica
Eddie Loyola Gonzales
eddie.loyola@unica.edu.pe - Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Ica
Juan Felipe Panay Centeno
juan.panay@unica.edu.pe - Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Ica

Resumen

El presente trabajo está enmarcado en el estudio de rescatar y revalorar a las especies vegetales en peligro de extinción en la provincia de Ica y tuvo como objetivo determinar la actividad antioxidante, contenido de minerales y toxicidad aguda del extracto alcohólico tallos de *Bulsenia retama* Griseb Calato obtenido en el distrito de Yauca del Rosario del departamento de Ica. Se obtuvo el extracto por ultrasonido y luego se determinaron los metabolitos secundarios por reacciones de precipitación y coloración; la actividad antioxidante por los métodos DPPH y FRAP; el contenido de minerales por absorción atómica y así mismo la toxicidad aguda a una dosis fija. Como resultado se obtuvo la presencia de los metabolitos taninos, flavonoides y alcaloides; actividad antioxidante frente al radical DPPH con IC₅₀ equivalente a 0.74 mg de extracto, por el método FRAP 1.24 mg extracto equivalente a 1mM de trolox, la presencia de Fe 24.5; Ca 526.1; Mg 330.4; Zn 8.20 mg/Kg de extracto respectivamente; y no se observó signos clínicos ni anatomopatológico a toxicidad aguda a 2,000 mg/Kg.

Palabras claves: *Bulsenia retama, actividad antioxidante, minerales, toxicidad.*

Abstract

The present work is marked in the study of rescuing and re-valuing endangered plant species in the province of Ica and also aimed to determine the antioxidant activity, mineral content and determination of acute toxicity in the alcoholic extract stems of *Bulsenia Griseb calato* broom; obtained at the district of Yauca del Rosario in Ica department. The extract was obtained by ultrasound, then, the secondary metabolites were determined by precipitation and coloring reactions; the antioxidant activity was performed by the DPPH and FRAP methods; the content of minerals by atomic absorption, and also, the acute toxicity at a fixed dose. As a result, tannin, flavonoid and alkaloid metabolites were obtained; the antioxidant activity, against the DPPH radical with IC₅₀ equivalent to 0.74 mg of extract was obtained by the method FRAP 1.24 mg of extract equivalent to 1mM of trolox, the presence of Fe 24.5; Ca 526.1; Mg 330.4; Zn 8.20 mg / kg extract respectively were also obtained. Nor clinical neither pathological signs of acute toxicity at 2,000 mg / kg were observed.

Keywords: *Bulsenia retama, antioxidant activity, minerals, toxicity.*

Como citar: Surco-Laos, F.A., Valle-Campos, M.A., Yarasca-Arcos, L.M., Loyola-Gonzales, E. & Panay-Centeno, J.F. (2019). Actividad antioxidante, minerales y toxicidad aguda del extracto alcohólico de tallos bulsenia retama Griseb "Calato". ÑAWPARISUN – Revista de Investigación Científica, 2(1), 61-64.

Introducción

El cambio climático viene produciendo variaciones en la distribución y abundancia de las especies vegetales, prediciendo el riesgo de extinción de algunas plantas (Thomas et al., 2004), lo que significa una pérdida del potencial que representa el conocimiento de sus metabolitos de interés. Por ello existe la necesidad de realizar estudios fitoquímicos y evaluar las posibles propiedades, y principios activos que éstas poseen en beneficio del hombre, sobre todo de las especies que no han sido estudiadas o sólo lo han sido poco (Barron et al 2011).

El presente trabajo es parte de un estudio que pretende revalorar especies vegetales en riesgo de extinción. El Perú es un país con una amplia diversidad de plantas con propiedades terapéuticas, muchas de las cuales necesitan estudios científicos que respalden su uso tradicional. Entre ellas se encuentra la especie *Bulnesia retama Griseb* "calato", la cual crece en zonas árida de distrito de Yauca del Rosario, departamento de Ica. Su corteza es empleado como digestivo en infusión. Éste es un arbusto de hábito retamoide, cuya estructura responde a la de una planta netamente xerófito, debido a que las ramas poseen abundante parénquima en empalizada. Su aplicación de carácter industrial, es la obtención de la cera que cubre las ramas jóvenes, la cual es buena reemplazante de la cera "carnauba" (Palacio y Hunziker 1984). En Argentina, presenta estudios acerca del contenido de cera en relación al diámetro de sus ramas (Dalmasso y Llera 1996), diversidad de levaduras (Toro et al 2005) y detección de bacterias con actividad degradadora en suelos (Toro y Salomon 2007). El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad antioxidante *in vitro*, contenidos de compuestos minerales y la toxicidad aguda del extracto alcohólico de los tallos de esta especie.

Materiales y métodos

Material biológico.

Tallos de *Bulnesia retama Griseb* "Calato" obtenidos en la zona de Yauca-Ica.

Recolección y tratamiento de la muestra vegetal

El material vegetal fue recolectado en el río Molletambo, perteneciente al distrito de Yauca del Rosario, provincia y departamento de Ica, encontrándose a una latitud de -14.1817, longitud -75.3867 y a una altitud de 1.900 msnm, con una temperatura promedio de 28°C, en los meses de marzo y abril 2017.

El secado de la planta se llevó a cabo a temperatura ambiente y bajo sombra, luego fue sometida a un proceso de molienda para su posterior estudio.

Obtención del extracto etanólico

Los extractos etanólicos se obtuvieron a partir de los tallos secos de *Bulnesia retama* (Gillies ex Hook. & Arn.) Griseb "Calato", empleando el método de extracción en un baño ultrasónico.

Se empleó un equipo Ultrasonic Cleaner y balones de fondo plano. En 5 L de etanol fueron agregados 1,250 Kg. de muestra vegetal seca y fragmentada, la cual fue sometida a sonicación por periodos de 25 min. a alta intensidad y a una temperatura de 25°C. Esta operación fue realizada por etapas hasta agotamiento total de la muestra. Luego de la extracción, se filtró y concentró los extractos a presión reducida, haciendo uso de un evaporador rotatorio Büchi 125, a una temperatura de 45°C y a revoluciones que van de 60 - 120 rpm (Azuela y Vargas 2007).

Caracterización del extracto. Se realizó la determinación de sólidos totales, sólidos solubles, pH, cenizas del extracto seco por métodos oficiales descritos en la AOAC 2005 para plantas y derivados.

Screening fitoquímico, siguiendo uno de los métodos indicados por Olga Lock 1988 con la finalidad de identificar la presencia o ausencia de metabolitos secundarios, por reacciones de precipitación y/o coloración.

Determinación de Compuestos fenólicos. Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por Muñoz et al 2007 con modificaciones. Se preparó una curva de calibración de ácido gálico cuyo rango de concentración fue de 0.02 - 0.1mg/mL. Para esta determinación se prepararon diluciones sucesivas de los extractos etanólicos, a partir de los cuales se tomó una alícuota de 150 µL, a la cual se le añadió 3 ml de agua ultrapura y 500 µL de Folin-Ciocalteu, se dejó reposar por 5min, luego se agregó 600 µL de Na₂CO₃ al 7.5%. Se mezcló y se dejó incubar a 50 °C durante 10 min. Como blanco se empleó etanol de 96°. Las absorbancias respectivas fueron medidas a 760 nm en un espectrofotómetro. El contenido de compuestos fenólicos totales fue expresado en mg de ácido gálico/mL de extracto etanólico.

Determinación de Flavonoides: El contenido de flavonoides en los extractos etanólicos fueron determinados mediante el ensayo colorimétrico de AlCl₃, propuesto por Ivanova et al. 2010, con modificaciones. Para este ensayo se prepararon diluciones sucesivas de los extractos etanólicos, de las cuales se tomó una alícuota de 150 µL, se le agregó 1ml de agua destilada y 150 µL de NaNO₂ al 5%. Se dejó reposar por 5 min., luego se le añadió 250 µL de AlCl₃ al 5%, se dejó reposar por 6 min. y se agregó 1mL NaOH al 10%; se procedió a mezclar bien. Para la cuantificación se elaboró una curva de calibración de Rutina a concentraciones entre 0.1 y 0.4 mg/mL disueltos en una mezcla etanol: agua (1:1). Como blanco se utilizó la mezcla hidroalcohólica. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 510 nm. El contenido de flavonoides totales fue expresado como mg de rutina/mL de extracto etanólico.

Actividad antioxidante por DPPH. Se el método descrito Doroteo et al 2013, se prepararon diferentes

concentraciones del extracto etanólico diluido en metanol. Como control se preparó la solución de DPPH 0.1 mM, el cual se mantuvo cubierto de la luz y se llevó a un espectrofotómetro para hacer la lectura a 517 nm, donde resultó un valor de absorbancia entre 0.9 y 1.1. Como blanco se utilizó el disolvente empleado en las muestras, en este caso fue metanol.

Se tomó 100 µL de las diluciones del extracto en estudio, las cuales se agregaron a 2900 µL de la solución de DPPH 0.1 mM, luego la batería de viales con la reacción fueron colocadas bajo oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min, para posteriormente medir la absorbancia de cada uno de ellos a 517 nm. La concentración requerida para inhibir el 50% la absorbancia del radical libre DPPH (IC₅₀) fue calculada mediante la ecuación de la gráfica de concentración del extracto etanólico versus % de inhibición (Doroteo et al 2013).

Actividad antioxidante por FRAP. Se sigue el procedimiento descrito por Benzie y Strain (1999) con ligeras modificaciones. Para iniciar el análisis se prepara el reactivo de trabajo, que consiste en una mezcla de tampón acetato 300 mM (pH = 3.6), TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y tricloruro férrico (FeCl₃. 6H₂O) 20 mM en una proporción 10:1:1 (v:v:v). Una vez preparado, se añade 3 mL de este reactivo en una cubeta, y se mide la absorbancia a 593 nm. Posteriormente, se agrega 100 µL de una de las soluciones del extracto (0.25 – 1.0 mM) y se agita en un vórtex durante 30 segundos. Después de 6 minutos de incubación a temperatura ambiente, se realiza la lectura de absorbancia nuevamente a 593 nm, a la que se resta el valor de la absorbancia inicial. Las muestras se ensayaron por triplicado y se utiliza el trolox como patrón de referencia según García et. al 2004.

Determinación de minerales. Por espectrofotometría de absorción atómica con digestión seca según AOAC 2005.

Determinación de toxicidad aguda. El estudio de toxicidad aguda oral se realizó acorde a lo descrito en la Norma 423 de la OECD, que describe el método de la Clase Tóxica Aguda

Resultados y discusión

Tabla 1. Caracterización del extracto etanólico de tallo de *Bulnesia retama*

Parámetros	Extracto
Sólidos totales g/100g	91.29
Sólidos solubles °Brix	7.70
pH	3.32
Cenizas g/100g	2.69
Polifenoles totales mg EGA/g	0.50
Flavonoides como rutina mg/g	0.13

Se efectuó estas determinaciones para tener como referencia de parámetros que debe cumplir el extracto de los tallos de *Bulnesia retama* Griseb, mediante la técnica de ultrasonido se obtuvo ligeramente mayor concentración de polifenoles.

Totales y flavonoides según referencia Jáuregui y col (2015).

Tabla 2. Screening fitoquímico del extracto etanólico de tallo de *Bulnesia retama*

Metabolitos	Reacción	Extracto
Taninos	FeCl ₃	+++
Flavonoides	Shinoda	+++
Alcaloides	Drangedorff y Mayer	++
Saponinas	Espuma	++
Triterpenoides	Liebermann-Burchard	+

Se ver de acuerdo a los resultados del screening fitoquímico que predominan compuestos de naturaleza fenólicas como los taninos y alcaloides a los cuales se le atribuye propiedades antioxidantes.

Tabla 3. Actividad antioxidante del extracto etanólico de tallos de *Bulnesia retama*

Actividad antioxidante	Valor
Método DPPH IC ₅₀	0.74 mg
Método FRAP (1mM trolox)	1.24 mg

Se puede observar que por el método de captación del radical libre DPPH se obtiene un IC₅₀ de 0.74 mg, lo que nos indica que es la concentración de extracto etanólico de la especie requerida para inhibir el 50 % absorbancia del radical; mientras que por el método FRAP poseen un capacidad antioxidante equivalente al trolox (en milimoles) de 1.24 mg, se debe indicar que los métodos aplicados poseen diferentes mecanismos de acción; estos valores que no se pueden comparar puesto que no hemos encontrado estudios de actividad antioxidante para esta especie en toda la bibliografía revisada.

Tabla 4. Contenido de minerales en el extracto etanólico de *Bulnesia retama*

Minerales	Contenido	Unidades
Hierro	24.50	mg/kg
Calcio	526.10	mg/kg
Magnesio	330.40	mg/kg
Zinc	8.20	mg/kg
Potasio	3.70	g/100g
Fosforo	0.32	g/100g

El extracto presenta minerales en concentraciones considerables tales como el magnesio, hierro y zinc, consideramos que la actividad antioxidante sería potenciada en sistemas en vivos por la presencia de estos minerales donde muchos de ellos actúan como cofactores de sistemas enzimáticos que poseen actividad antioxidantes como la superóxido dismutasa (Cu/Zn), la catalasa (Fe) Venereo 2002.

Toxicidad aguda.

De manera general, tras la administración de una dosis única del extracto alcohólico seco de *Bulnesia retama* en una dosis límite de 2,000 mg/Kg de peso corporal, no se observaron signos clínicos. En los análisis anatomopatológicos de corazón, hígado, riñón pulmón y cerebro, no se evidenció ninguna anomalía entre el grupo control y en el grupo tratado, durante los 14 días del experimento.

Conclusiones

La presencia de los metabolitos secundarios: taninos, flavonoides y alcaloides en el extracto etanólico de tallos de *Bulnesia retama* Griseb "calato" se puede correlacionar con la actividad antioxidante que presenta frente al radical DPPH con IC₅₀ 0.74 y al FRAP 1.24mg ~ 1mM trolox. También muestra un apreciable contenido de Potasio 3,7g/100 y magnesio 330 mg/100g y no presenta toxicidad aguda a 2,000 mg/Kg.

Referencias bibliográficas

- AOAC International (2005). Official Methods of Analysis 18th Edition. Dr. William Horwitz Editor
- Azuela R, Vargas P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA) Rev. Tecnología en marcha. [Internet]. [citado 20 jun]; 20(4):30. Disponible en:
- Barrón R, García M, Soto M, Colinas T, Geoffrey K. (2011). Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. Rev. Fitotec. Mex. [Internet].
- Dalmasso A, Liera A. (1996). Contenido de cera en relación al diámetro de ramas de *Bulnesia retama* en Ampacama, Cauçete, San Juan. Multequina [Internet]. [citado 12 Mar 2014]; (5): Disponible en:
- Doroteo V, Díaz T, Terry C, Rojas R. (2013). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro de 6 plantas peruanas. Rev. Soc. Quim. Perú. 79 (01):15. Disponible en: <http://sqperu.org.pe/wp-content/uploads/2009/09/Revista-SQP-Vol-79-N1-2013.pdf>
- García A, de Pascual T, Santos C. (2004) Evaluation of the antioxidant properties of fruits. Food chemistry; 84: 13-18.
- Ivanova V, Stefova M, Chinnici F. (2010) Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. J. Serb. Chem. Soc. [Internet]. 75(1):47.
- Muñoz A, Ramos F, Alvarado C, Castañeda B. (2007). Evaluación de la capacidad Antioxidante y contenido de Compuestos Fenólicos en recursos vegetales promisorios. Rev. Soc. Quim. 73(3):142-143
- OECD. Guide N° 423. (2001). Disponible en: <http://www.oecd.org>.
- Palacios R, Hunziker J. (1984). Revisión Taxonómica del Género *Bulnesia* (Zygophyllaceae). Darwiniana [Internet]. [citado 05 Mar 2014]; 25 (1): 308-309. Disponible en: <http://www.jstor.org/discover/10.2307/23218080?uid=3738800&uid=2&uid=4&sid=21103969126707>
- Thomas CD, Cameron A, Green RE, Bakkenes M, Beaumont LJ, et al. (2004). Extinction risk from climate change. *Nature* 427: 145-148.
- Toro M, Oro N, Vega A, Maturano Y, Nally M. (2005). Diversidad de levaduras en *Bulnesia retama* y *Larrea divaricata* doseles y los suelos asociados. Rev. Argent. Microbiol. [Internet]. [citado 15 Mar 2014]; 37(4):1. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bulnesia+retama>
- Toro M, Salomón M. (2007). Detección de bacterias con actividad degradadora en suelos asociados a *Larrea divaricata* y *Bulnesia retama* [Internet]. [citado 15 Mar 2014]. Disponible en: http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords&id=28962&congresos=yes &detalles=yes&congr_id=1101158
- Venereo Gutiérrez J. (2002). oxidativo, radicales libres y antioxidante. Rev Cub Med Mil v.31 n.2 http://www.tecdigital.itcr.ac.cr/servicios/ojs/index.php/tec_marcha/article/view/449