

Actividad antioxidante, contenido fenólico total y citotoxicidad de extractos polares obtenidos de plantas antidiabéticas colombianas

Antioxidant activity, total phenolic content and cytotoxicity of polar extracts from Colombian antidiabetic plants

MSc. Rivas Mena Kevin Eduardo,^I MSc. Muñoz Diana Lorena,^{II} MSc. Pino Benítez Cruz Nayive,^I MSc. Balcázar Morales Norman^{II}

^I Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Tecnológica del Chocó. Quibdó, Colombia.

^{II} Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

RESUMEN

Introducción: El uso tradicional de especies vegetales como medicina natural antidiabética es una práctica común en el pacífico colombiano, *A. altilis*, *B. picta*, *S. malaccensis*, *P. microphylla* y *P. quadrangularis*; son cinco especies que gozan de un amplio reconocimiento como antidiabéticos naturales a nivel regional, sin la existencia de evidencias experimentales que validen dicha apreciación.

Objetivo: evaluar el contenido total en compuestos fenólicos, potencial antioxidante y actividad citotóxica de extractos polares preparados de cinco especies vegetales usadas como antidiabéticos naturales en la medicina tradicional colombiana.

Métodos: los extractos de hojas (hojas y tallos para *P. microphylla*) se obtuvieron por maceración en etanol al 96 % o H₂O destilada, según el caso. La actividad antioxidante fue evaluada por los ensayos espectrofotométricos DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidracil y ABTS 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), mientras que el contenido total en moléculas fenólicas se determinó por el método de *folin-ciocalteu*. Además, la actividad citotóxica fue comprobada en las líneas celulares HEP-G2 (hepatocarcinoma humano) y C₂C₁₂ (Miocarcinoma de ratón).

Resultados: los extractos etanólicos obtenidos de *A. altilis*, *S. malaccensis* y *B. picta*, evidenciaron el mejor comportamiento antioxidante en ambos métodos, con propiedades comparables a las vitaminas E y C. Así mismo, en cuanto a las propiedades tóxicas de los extractos *A. altilis* reporto el mayor porcentaje de mortalidad en células C₂C₁₂, con un valor LC₅₀ de 24,9 ± 0,67 µg/mL, comparable a la citotoxicidad ejercida por la Anfotericina B. Mientras, en células Hep-G2 el mayor efecto tóxico fue evidenciado para *P. quadrangularis* con un LC₅₀ de 36,4 ± 5,79 µg/mL.

Conclusiones: el potencial antioxidante evidenciado por los extractos etanólicos y acuosos de *A. altilis*, *S. malaccensis*, *B. picta*, *P. quadrangularis* y *P. microphylla* correlacionó en 62,39 % con su contenido total en moléculas fenólicas. Todos los extractos presentaron actividad citotóxica cincuenta a concentraciones superiores de sus rangos de actividad antioxidante.

Palabras clave: medicina tradicional, plantas antidiabéticas, antioxidante, compuestos fenólicos, citotóxico, Hep-G2, C₂C₁₂.

ABSTRACT

Introduction: the traditional use of plants as antidiabetic herbal medicine is common practice in the Colombian Pacific, *A. altilis*, *B. picta*, *S. malaccensis*, *P. microphylla* y *P. quadrangularis* are five species that are widely recognized as natural antidiabetic regionally, without the existence experimental evidence to validate that assessment.

Objective: evaluate the total content of phenolic compounds, potential antioxidant and cytotoxic activity of polar extracts prepared from five plant species used as natural antidiabetic Colombian traditional medicine.

Methods: extracts of leaves (leaves and stems for *P. microphylla*) were obtained by maceration in 96 % ethanol or distilled H₂O as appropriate. The antioxidant activity was evaluated by spectrophotometric assays DPPH 2, 2-diphenyl-1-picrilhidracil and ABTS 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), while the total content of phenolic molecules is determined by the Folin-Ciocalteu method. Furthermore, the cytotoxic activity was tested in the Hep-G2 cell line (human hepatocarcinoma) and C2C12 (mouse Miocarcinoma).

Results: the ethanol extracts of *A. altilis*, *S. malaccensis* and *B. picta*, showed the best antioxidant behavior in both methods, with properties comparable to vitamins E and C. Likewise, as to the toxic properties of the extracts *A. altilis* reported the highest percentage of mortality in C₂C₁₂ cells with an LC₅₀ value of 24,9 ± 0,67 mg/mL, comparable to the cytotoxicity exerted by amphotericin B, while in HEP-G2 cells the major toxic effect was governed by *P. quadrangularis* with LC₅₀ of 36,4 ± 5,79 mg/mL.

Conclusions: the potential antioxidant evidenced by the ethanol and aqueous extracts of *A. altilis*, *S. malaccensis*, *B. picta*, *P. quadrangularis* and *P. microphylla* in 62.39% correlated with the total content of phenolic molecules. All extracts showed fifty cytotoxic activities at concentrations greater than their antioxidant activity range.

Key words: traditional medicine, antidiabetic plants, antioxidant, phenolic compounds, cytotoxic, Hep-G2, C2C12.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento sobre la preparación de remedios tradicionales a base de plantas es una práctica amplia, conservada en algunos pueblos de la América Latina. En Colombia la medicina tradicional ha evolucionado en función del conocimiento asociado a la exuberante diversidad florística de la región, alcanza su máxima expresión al convertirse en la principal alternativa para el tratamiento y control de algunas enfermedades. Se estima que un aproximado de 1,656 especies vegetales son reconocidas y empleadas por la medicina tradicional colombiana,¹ como una importante fuente natural de moléculas bioactivas con propiedades terapéuticas frente a algunas enfermedades.

Una gran proporción de las decocciones e infusiones preparadas a partir de hojas de estas especies, se emplean en el tratamiento de la diabetes tipo II, no solo en Colombia, sino también en otros países de las Américas y el mundo²⁻³ *Artocarpus altilis*, *Bauhinia picta*, *Syzygium malaccensis*, *Pilea microphylla* y *Passiflora quadrangularis*, son cinco plantas medicinales que gozan de una amplia aceptación y reconocimiento como remedios antidiabéticos naturales,^{4,5} sin la existencia de evidencias experimentales que validen dicha apreciación.

En una visión general a la composición química de los extractos polares obtenidos de las hojas de estas especies, se han caracterizado como fuente natural de compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides y esteroides,^{6,7} identificados como fitoquímicos con actividad antioxidante.⁸⁻¹⁰ Clínicamente los antioxidantes son definidos como un conjunto de moléculas capaces de inhibir el estrés oxidativo a nivel celular, fenómeno asociado al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer, aterosclerosis, artritis reumatoidea, parkinson, envejecimiento prematuro celular y diabetes mellitus tipo II, entre otras.⁹

La creciente importancia terapéutica de los antioxidantes y los efectos secundarios reportados para los antioxidantes sintéticos, han motivado la búsqueda de fuentes alternativas de moléculas con gran actividad y sin efectos tóxicos. Las plantas que a nivel tradicional se usan como medicina natural antidiabética son un importante punto de partida en la búsqueda de potenciales moléculas con actividad antioxidante.

Con base a lo anterior en el presente trabajo se evalúa el contenido total en compuestos fenólicos, la capacidad neutralizadora de los radicales libres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) y ABTS 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y la actividad citotóxica en células Hep-G2 y C₂C₁₂ de extractos polares preparados de 5 especies vegetales usadas como antidiabéticos naturales en la medicina tradicional colombiana.

MÉTODOS

Material vegetal y Obtención de los extractos

El material vegetal fue recolectado en el mes de Marzo de 2012 de poblaciones silvestres, presentes en la ciudad de Quibdó-Chocó-Colombia a 53 m.s.n.m. Se recolectaron hojas de las especies reportadas como medicinales de *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg (Moraceae), *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L.M. Perry (Myrtaceae), *Pileamicrophylla* (L.) Liebm (Urticaceae), *Passiflora*

quadrangularis (L.) (Passifloraceae) y *Bauhinia picta* H.B.K. DC (Caesalpinaceae) (tabla 1). Muestras de estas especies fueron depositadas en el herbario de la Universidad Nacional de Colombia (HCOL) y el herbario Joaquín Antonio Uribe (JAUM).

Tabla 1. Especies vegetales sometidas a evaluación. Muestras vegetales, números Boucher y especialista que confirmó/determinó

Especie	N.V.	Muestra vegetal	# Boucher	Confirmando/determinó
<i>Artocarpus altilis</i>	Árbol del pan	Hojas	JAUM 7563	Álvaro Cogollo
<i>Bauhinia picta.</i>	Casco de vaca	Hojas	COL000091811	Herbario colombiano
<i>Syzygium malaccensis</i>	Marañón	Hojas	COL 520029	Adolfo Jara
<i>Passiflora quadrangularis</i>	Badea	Hojas	COL 519996	Adolfo Jara
<i>Pilea microphylla</i>	Celedonia león	Toda la planta	JAUM53724	Álvaro Cogollo

JAUM: Herbario Joaquín Antonio Uribe.
HCOL: Herbario colombiano, Universidad Nacional de Colombia.

El material vegetal fue recolectado en óptimo estado vegetativo y fitosanitario. Las hojas de las especies fueron secadas primero a temperatura ambiente y luego en un horno con aire circulante a 40 °C. La molienda se llevó a cabo en un molino manual, hasta obtener 100 g, los cuales fueron puestos en maceración con etanol al 96 % (500 mL) o agua destilada (500 mL), por 10 días. El sobrenadante fue retirado por decantación y filtrado al vacío, se realizó concentraciones sucesivas por rotaevaporación en un equipo BUCHI-Vacuum controller R-128. El extracto obtenido fue almacenado a 4 °C hasta su análisis.

Determinación de la actividad antioxidante/ Capacidad neutralizadora del radical libre DPPH

Este ensayo se llevó a cabo tal como fue descrito antes por Brand-Williams,¹¹ con algunas modificaciones realizadas por Bounatirou y colaboradores¹² Se mezcló, 1 mL de una solución etanólica de DPPH (*2,2-difenil-1-picrilhidracil*) a 30 µg/mL con 0,5 mL de los extractos diluidos en etanol al 96 % hasta obtener concentraciones de (1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 µg/mL). Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y en la total oscuridad, se realizaron las lecturas de absorbancia a 517 nm, se utilizó un espectrofotómetro Uviline 9400 (SCHOTT Instruments®). Como controles de referencia las Vitaminas E y C, fueron evaluadas bajo las mismas condiciones. Los porcentajes de inhibición y DPPH remanente para cada concentración se estimaron, se aplicaron las siguientes ecuaciones: (Ecuación 1)

$$\text{DPPH}_{\text{rem}} = [(\text{ABS}_{\text{muestra}} + 0.004)/0.0126]$$

$$\% \text{ INH} = [1 - (\text{DPPH}_{\text{Rem}} / \text{CI}_{\text{DPPH}})] \times 100$$

Dónde: ABS es la absorbancia a 517 nm, DPPH_{Rem} es el remanente después de 30 min de reacción y CI_{DPPH} (concentración inicial 30 µg/mL).

La efectividad antioxidante de los extractos y los patrones de referencia vitaminas E y C se determinó mediante el cálculo de los "valores CI₅₀" obtenidos por regresión lineal simple (doble recíproca); donde la abscisa es la concentración de la muestra (µg/mL) y la ordenada es el porcentaje de inhibición (% INH), la efectividad fue expresada como la concentración requerida por las muestras para disminuir la absorbancia del DPPH a 50 %.

Ensayo ABTS

La medición de la actividad antioxidante por el método ABTS se llevó a cabo, se siguió la metodología desarrollada por *Roberta RE y colaboradores*¹³ con algunas modificaciones. El radical ABTS^{•+} se formó tras la reacción de ABTS (7mM) con persulfato de potasio (2,45Mm, concentración final) incubados a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 16h. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se diluyo con etanol al 99 % hasta obtener un valor de absorbancia de 0,700± 0,200 a 734nm (longitud de onda máxima de absorción). Un volumen de 50 µL de los extracto preparados a 100 µg/mL fue puesto en reacción con 250 µL de la solución preparada del radical ABTS^{•+} en platos de 96 pozo durante cuatro minutos, la absorbancia fue continuamente medida, pasado este tiempo en un lector de platos VARIOSKAN FLASH® de Thermoscientific a la longitud de onda antes mencionada. Una solución etanólica del antioxidante sintético *Trolox* preparada en concentraciones de 0-0,8mM (concentración final) fue usada como referencia, los resultados son expresados en µmol TEAC (actividad antioxidante equivalente a trolox), estimados por las siguientes ecuaciones: (Ecuación 2)

$$\% inh = [1 - (A_{ABTS^{•+}} - A_{Muestra} / A_{ABTS^{•+}})] * 100$$

Dónde: A_{ABTS^{•+}} es la absorbancia de la solución del radical catiónico a 734nm, A_{Muestra} es la absorbancia de la mezcla de reacción con el extracto. (Ecuación 3 y 4)

$$X = y \pm b/a = C_1$$

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2; C_2 = C_1 \cdot V_1 / V_2.$$

Dónde: C₁ es la concentración de la muestra equivalente a mM Trolox obtenida por interpolación, V₁ es el volumen inicial, V₂ es el volumen de reacción y C₂ es la concentración en µmoles TEAC.

Determinación del Contenido Fenólico Total (CFT)

Se tomó 1 mL de los extractos concentrados a 0,04 mg/L, se aforó a 10 mL con agua destilada y 0,5 mL de esta solución fueron puestos en reacción con 0,75 mL del reactivo *Folin-Ciocalteu*. Pasado cinco minutos se adicionó a la mezcla 0,5 mL de una solución de Na₂CO₃ al 7,5 %, se dejó incubar por 2 h en la total oscuridad y

a temperatura ambiente, para luego realizar lecturas de absorbancia a 760 nm, en un espectrofotómetro Uviline 9400 (SCHOTT Instruments®), se intercaló las absorbancias en una curva de calibración de ácido gálico ($y = 0,0148x - 0,0032$, $R^2 = 0,9993$). El contenido en compuestos fenólicos del extracto, se expresó en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de material seco (mg EAG/g⁻¹ MS).¹⁴

Cultivo de células Hep-G₂ y C₂C₁₂

El protocolo empleado para el cultivo de células Hep-G₂ y C₂C₁₂, contempla el uso del medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado al 10 % con suero fetal bovino (SBF), 1 % de una solución penicilina/estreptomicina y L-glutamina a 2Mm; el medio de proliferación en células C₂C₁₂ fue suplementado con glucosa a 1M, para facilitar el rápido crecimiento de los mioblastos y su posterior diferenciación a miotubos. La incubación de las células se realizó a 37 °C, con 5 % de CO₂ y 95 % de O₂, por un periodo de 3 días, con cambios de medio de proliferación cada día. Las células se sembraron a una densidad de 250,000 células/mL con un volumen de 100 µL/pozo en platos de 96 pozos.

Evaluación de la citotoxicidad

Las propiedades citotóxicas de los extractos fueron determinadas por la viabilidad de células Hep-G₂ (hepatocarcinoma humano) (ATCC) y C₂C₁₂ (mioblastos de músculo de ratón) (ATCC), expuestas a los extractos por un período de tiempo. El método usado fue el ensayo MTT (*3-(4,5 -dimetiltiazol-2-il) -2,5-di feniltetrazolio bromuro*) reportado por Mosmann (1983),¹⁵ para lo cual 250,000 células por pozo se sembraron en platos de cultivo de 96 pozos en medio DMEM al 10 % con SFB, e incubadas a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de O₂. Después de 24 h, el medio de cada pozo fue sustituido por 200 µL de medio con diferentes concentraciones de los extractos (6,25 a 200 µg/mL), así como de *Anfotericina B* usada como control positivo de citotoxicidad. Adicionalmente células sin extracto o Anfotericina fueron utilizadas como control de no efecto y se incubaron durante 72 h. Luego del período de incubación el medio se sustituyó por medio con MTT (5 mg/mL en PBS). Pasadas 3 h de incubación a 37 °C, se adicionaron a cada pozo 150 µL de Dimetil sulfóxido (DMSO) por 30 minutos para solubilizar los cristales de formazan y concluir determinar los valores de absorbancia a 570 nm por espectrofotometría. Los porcentajes de inhibición fueron calculados por la siguiente ecuación: (Ecuación 5)

$$\% \text{INH} = G_0 - G_1 / G_0 * 100$$

Dónde: G₀ es la absorbancia inicial del control y G₁ es la absorbancia de las muestras.

A través de un análisis de regresión lineal se determinó para los extractos sus valores de concentración letal "LC₅₀". Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron evaluados, se empleó el paquete estadístico Stat graphics centurión XVI, los valores LC₅₀ fueron estimados a través del programa

Probit 2. Todos los datos son la media de tres repeticiones \pm DS, la significancia estadística considerada fue $p < 0,05$.

RESULTADOS

Actividad antioxidante. Capacidad neutralizadora de radicales libres y contenido fenólico total

El radical libre DPPH (*2,2-difenil-1-picrilhidracil*) es un compuesto estable de color (violeta) con un máximo de absorción entre 515-517 nm, cuya absorbancia disminuye al ser reducido por un posible antioxidante (AH). Este ensayo refleja la capacidad de los antioxidantes de donar protones en un medio fisiológico polarizado con pH de 7,4, y permite identificar los antioxidantes neutralizadores de radicales libres.¹⁶

En los resultados de la evaluación se encontró que los extractos obtenidos por maceración en etanol al 96 %, poseen mayor potencial neutralizador del radical libre DPPH, con diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en comparación a sus homólogos obtenidos con agua destilada. Los extractos más activo fueron los preparados de las hojas de *A. altilis*, *S. malaccensis* y *B. picta* con valores CI_{50} de 3,24, 5,8 y 8,9 $\mu\text{g/mL}$, en orden, las vitaminas antioxidantes E y C presentaron valores de CI_{50} de 4,5 y 5,43 $\mu\text{g/mL}$, al respecto. Los patrones de referencias poseen diferencias significativas ($p > 0,05$) en cuanto a su efectividad sobre tres de los cinco extractos evaluados, los cuales son *P. quadrangularis*, *P. microphylla* y *B. picta* (Fig.).

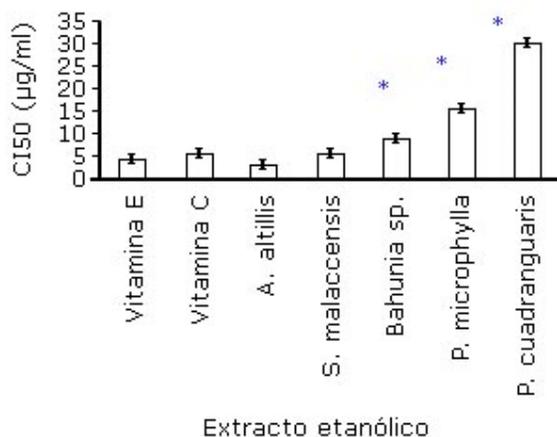


Fig. Capacidad neutralizadora del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) representada en valores CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de los extractos etanólicos preparados de las hojas de algunas plantas usadas como antidiabéticas en la medicina tradicional colombiana. * Dif. Sig. ($p > 0,05$).

De igual forma, el extracto etanólico obtenido de las hojas de *A. altilis* también posee la mayor capacidad de neutralización del radical catiónico $ABTS^{*+}$, actividad equivalente a $7504,47 \pm 0,02$ $\mu\text{mol Trolox/100g}$ de extracto, seguido por *B. picta* y *S. malaccensis* con $5025 \pm 0,04$ y $4050 \pm 0,01$ $\mu\text{mol Trolox/100g}$ de extracto, respectivamente (tabla 2).

Tabla 2. Contenido fenólico total y capacidad neutralizadora de los radicales libres DPPH y ABTS por los extractos polares obtenidos de plantas antidiabéticas colombianas

Muestra	DPPH CI ₅₀		CFT mgEAG/gmvs		ABTS TEAC µmol/100g extracto
	Extracto etanólico	Extracto acuoso	Extracto etanólico	Extracto acuoso	
<i>Artocarpus altilis</i>	3,24 ± 2,00	128,2 ± 7,00	71,0	1,2	7504,2 ± 0,02
<i>Syzygium malaccensis</i>	5,78 ± 1,20	117,3 ± 4,00	40,3	1,41	4050 ± 0,01
<i>Bahunia picta</i>	8,90 ± 4,33	54,48 ± 3,00	20,0	2,30	5025 ± 0,04
<i>Passiflora quadrangularis</i>	30,7 ± 1,00	76,5 ± 5,00	4,21	1,85	2156,25 ± 0,01
<i>Pilea microphylla</i>	16,0 ± 4,27	175,2 ± 6,00	8,0	1,0	265,5 ± 0,01
Vitamina E	4,50 ± 1,00				
Vitamina C	5,43 ± 1,00				

CFT: contenido fenólico total en miligramos equivalente de ácido gálico.
TEAC: actividad antioxidante equivalente a trolox.

El factor de correlación de las curvas de calibración fue R²= 0,999; DPPH, 0,9985; ABTS y 0,999; AG. Los valores expresados son la media de n = 3 ± DS de dos experimentos independientes.

Ambos ensayos destacan la propiedad antioxidante de los extractos como excelentes donadores de átomos de hidrógeno o electrones. El contenido total de moléculas fenólicas estimado para los extractos, demostró la proporcionalidad del contenido en fenoles con el efecto antioxidante de los extractos, estimándose un 62,39 % de correlación. Se demostró en ambos ensayos, que *A. altilis* presenta un mejor comportamiento como neutralizador de radicales libres y, también posee un mayor contenido en compuestos fenólicos, seguido por *S. malaccensis* y *B. picta*. En respuesta a la hipótesis del contenido total en moléculas fenólicas, los extractos con los menores efectos antioxidantes en ambos ensayos *P. microphylla* y *P. quadrangularis*, exhibe el menor contenido en este tipo de metabolitos secundarios.

Actividad citotóxica

Los resultados de la toxicidad de los extractos de *A. altilis*, *S. malaccensis*, *B. picta* y *P. microphylla* en células de hepatocarcinoma humano (Hep-G2) muestran el bajo efecto de mortalidad a 72 h, todos presentaron valores LC₅₀ superiores a 200 µg/mL en esta línea celular. Por otro lado *P. quadrangularis* reportó un valor LC₅₀ de 36,4 µg/mL, frente a 25,7 µg/mL de la Anfotericina B, (tabla 3).

Sin embargo, en células C₂C₁₂ los extractos de *A. altilis*, *P. quadrangularis*, *B. picta* y *P. microphylla*, exhibieron propiedades tóxicas, estimándose valores LC₅₀ de 24,9 ± 0,67, 83,4 ± 11,10, 65,5 ± 10,76 y 49,25 ± 5,41 µg/mL, al respecto, frente a 30,0 ± 1,41 µg/mL de la Anfotericina B. El extracto etanólico obtenido de las hojas de *A. altilis* fue sin diferencias estadísticamente significativas, más tóxico que la Anfotericina B. Pero ambos, si son significativos (P > 0,05) más tóxicos que los otros cuatro extractos probados. De igual forma, el extracto obtenido de las hojas de *S. malaccensis* evidenció su bajo efecto tóxico en ambas líneas celulares, aspecto que podría contribuir de forma importante a su elevada capacidad antioxidante. En evaluaciones preliminares desarrolladas en nuestro laboratorio sobre la composición

química de estos extractos, hemos encontrado constituyentes químicos similares para todos, caracterizados por la presencia de compuestos fenólicos, esteroides, triterpenoides y saponinas.

Tabla 3. Valores LC₅₀ de los extractos evaluados por el ensayo MTT en células Hep-G2 (Hepatocarcinoma humano) y C₂C₁₂ (Miocitos de ratón)

Extracto	Línea celular LC ₅₀ µg/mL	
	C ₂ C ₁₂	Hep-G2
<i>Artocarpus altilis</i>	24,9 ± 0,67	> 200 ± 0,00
<i>Syzygium malaccensis</i>	> 200 ± 0,00	> 200 ± 0,00
<i>Bauhinia picta</i>	83,4 ± 11,10	> 200 ± 0,00
<i>Passiflora quadrangularis</i>	65,5 ± 10,76	36,4 ± 5,79
<i>Pilea microphylla</i>	49,25 ± 5,41	> 200 ± 0,00
Anfotericina B	30,0 ± 1,41	25,7 ± 1,97

DISCUSIÓN

El uso tradicional de especies vegetales como medicina antidiabética es una práctica común en el pacífico colombiano, preparaciones tradicionales como la infusión de hojas de las especies *Artocarpus altilis*, *Bauhinia picta*, *Syzygium malaccensis*, *Pilea microphylla* y *Passiflora quadrangularis*, gozan de una amplia aceptación y reconocimiento como remedios antidiabéticos naturales.^{4,5} Se estima que cerca de 1,656 especies vegetales son reconocidas y empleadas por la medicina tradicional colombiana,¹ como una importante fuente natural de moléculas bioactivas. A pesar de esto, solo 206 especies (12,5 %) presentan más de tres referencias documentadas en las que se evidencia su uso terapéutico tradicional, mientras que 1,442 especies (87,5 %) no presentan este número de registros.¹ Esto demuestra la necesidad de emprender investigaciones hacia la caracterización, valoración y aprovechamiento del conocimiento tradicional asociado a las plantas medicinales.

Los compuestos fenólicos se han descrito como los antioxidantes naturales de mayor potencial, su contenido en materiales biológicos como se observó en los ensayos, es proporcional a la capacidad neutralizadora de especies reactivas de oxígeno. El potencial antioxidante de los fenoles depende del número y la posición de los grupos hidroxilos, la capacidad de donación de hidrógenos o electrones, su conjugación y solubilidad.^{17,18} Algunos son solubles en solventes orgánicos, otros son glucósidos o ácidos carboxílicos, y por lo tanto solubles en agua, y otros son polímeros muy grandes e insolubles.

El extracto etanólico obtenido de *A. altilis* ha sido caracterizado por su alto contenido en prenil y geranil flavonoides,^{19,20} responsables de la variedad de propiedades biológicas que ha exhibido este producto natural.^{21,22} Así mismo, las hojas de *S. malaccense* han sido catalogadas como una rica fuente de compuestos fenólicos, en lo especial flavonoides, con un elevado potencial antioxidante evidenciado por los 25,74 µg/mL como valor CI₅₀ para su extracto metanólico.²³ Pino en el 2009²⁴ reporta a los extractos etanólicos obtenidos de las hojas de *S. malaccense* y *P. quadrangularis* que crecen en el departamento del Chocó como una fuente natural de compuestos fenólicos, donde destacan los flavonoides. También, los frutos y hojas de las especies del género *Passiflora*, *P. tarminiana* y *P.*

mollissima, han sido caracterizados por contener compuestos fenólicos con importante actividad antioxidante.²⁵ Al igual que *P. microphylla*²⁶ y las especies del género *Bauhinia*.²⁷

La eficacia antioxidante de los flavonoides está condicionada en gran parte por su grado de hidroxilación, una actividad antioxidante óptima se relaciona con la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B. Los cuales confieren una elevada estabilidad al radical formado,²⁸ mientras que los grupos hidroxilos en las posiciones 3 del anillo C y en la posición 5 del anillo A, junto con el grupo carbonilo en la posición 4 son donadores de electrones y neutralizadores eficientes de los radicales libres.²⁹

La alta sensibilidad de las células C₂C₁₂ a todos los extractos y en especial a *A. altilis* pudiese estar sustentada en su contenido total en moléculas fenólicas, ya que compuestos puros como geraniol flavonoides, chalconas y otros, constituyentes fenólicos de esta especie, han sido reportados como citotóxicos y anticancerígenos, en células de adenocarcinoma de pulmón humano (SPC-A-1), células humanas de carcinoma de colon (SW-480), células de carcinoma hepatocelular humano (SMC-7721) y algunas células de cáncer de colon humano (HT-29),^{19,30} en esta última con una baja sensibilidad. Otras especies del género como *A. nigrifolius*, también posee propiedades citotóxicas frente a las líneas celulares LU (cáncer de pulmón), KB (carcinoma epidermoide), MCF-7 (carcinoma de mama) y moderada toxicidad en Hep-G2,³¹ aspecto que se relaciona con nuestro reporte para esta línea celular de hepatocarcinoma.

P. quadrangularis también ha sido caracterizada por su contenido en moléculas tóxicas,^{31,32} sin embargo, pocos reportes se encontraron para *Bauhinia picta*, *P. microphylla* y *S. malaccensis*, en las bases de datos consultadas, constituyéndose este en el primer reporte de citotoxicidad en las líneas celulares Hep-G2 y C₂C₁₂.

El estudio logró comprobar la importante participación de los compuestos fenólicos en el potencial antioxidante de las especies evaluadas, donde el contenido total es dependiente del solvente usado para la extracción, así mismo la actividad neutralizadora de los radicales libres DPPH y ABTS, está ligada en un 62,39 % al contenido total en compuestos fenólicos. Los extractos etanólicos se caracterizaron por ser más activos y presentar un mayor contenido en fenoles, en comparación a los extractos acuosos, esto nos proporciona una idea de la posible polaridad de los compuestos de interés, los cuales como constituyentes de estos productos naturales, pudieran tener algún grado de participación en los efectos tóxicos frente a las líneas celulares Hep-G2 y C₂C₁₂.

Se consideran los resultados de estas evaluaciones importantes, debido al excelente potencial antioxidante evidenciado por *A. altilis*, *S. malaccensis* y *B. picta* y a los efectos tóxicos evidentes en los extractos obtenidos de *P. quadrangularis* y *A. altilis* en las líneas celulares Hep-G2 y C₂C₁₂, mutuo. Esto evidencia el enorme potencial farmacológico de las especies vegetales provenientes del pacífico colombiano y se convierte en una base científica para el desarrollo de futuras investigaciones sobre otras propiedades terapéuticas de estos extractos medicinales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bernal HY, García H, Quevedo F. Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia; 2011. p. 236.
2. Elekofehinti OO. Saponins: Anti diabetic principles from medicinal plants – A review. *Pathophysiology*. 2015;1:1–9.
3. Gautam B, Vadivel V, Stuetz W, Biesalski HK. Bioactive compounds extracted from Indian wild legume seeds: antioxidant and type II diabetes-related enzyme inhibition properties. *Int J Food Sci Nutr*. 2012;63(2):242–5.
4. Ospina LF, Pinzón R. plantas antidiabéticas colombianas. *Rev Colomb ciencias Quim*. 1995;23:1–14.
5. Torres F, Paz G, Zapata M. Las plantas pueden ser fuente de compuestos antidiabéticos que aún no han sido científicamente validados. *Ciencia & Salud*. 2013;1(3):11–8.
6. Joseph B, Jini D. Insisting into the role of antioxidant enzymes for salt tolerance in plants. *Int J Bot*. 2010;6(4):456–64.
7. Gill NS, Dhawan S, Jain A, Arora R, Bali M. Antioxidant and anti-ulcerogenic activity of wild *Punica granatum* ethanolic seed extract. *J Med Plant*. 2012;6(1):47–55.
8. Mahajan M, Kumar S. Effect of Quercetin and Epicatechin on the transcript Expression and Activity of Antioxidant Enzymes in Tobacco Seedlings. *American J Biochem Mol Biol*. 2013;3(1):81–90.
9. Maldonado O, Nahúm E, Guapillo M, Ceballos G. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico degenerativas. *Rev Médica Univ Veracruzana*. 2010 Jul-Dic:32–9.
10. Siddesha JM, Angaswamy N, Vishwanath BS. Phytochemical screening and evaluation of in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of *Artocarpus altilis* leaf. *Nat Prod Res*. 2011;25(20):1931–40.
11. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*. 1995;28(1):25–30.
12. Bounatirou S, Smiti S, Miguel MG, Faleiro L, Rejeb MN, Neffati M, et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chem*. 2007;105(1):146–55.
13. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice C, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol*. 1999 May;26(9–10):1231–7.
14. Erdemoglu N, Turan NN, Akkol EK, Sener B, Abacioglu N. Estimation of anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant activities on *Arctium minus* (Hill) Bernh. ssp. minus. *J Ethnopharmacol*. 2009 Jan 21;121(2):318–23.

15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
16. Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, et al. Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of Vaccinium Species. *J Agric Food Chem*. 1998;46(7):2686-93.
17. Ramirez C, Andersen M, Gardner PT, Morrice PC, Wood SG, Duthie SJ, et al. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(9):1033-7.
18. Miller NJ, Rice-Evans CA. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS.+ radical cation assay. *Free Radic Res*. 1997;26(3):195-9.
19. Wang Y, Xu K, Lin L, Pan Y, Zheng X. Geranyl flavonoids from the leaves of *Artocarpus altilis*. *Phytochemistry*. 2007;68(9):1300-6.
20. Lin CN, Lu CM, Lin HC, Fang SC, Shieh BJ, Hsu MF, et al. Novel antiplatelet constituents from formosan moraceous plants. *J Nat Prod*. 1996;59(9):834-8.
21. Lu YH, Lin CN, Ko HH, Yang SZ, Tsao LT, Wang JP, et al. Two Novel and Anti-Inflammatory Constituents of *Artocarpus rigida*. *Helv Chim Acta*. 2002;85(6):1626-32.
22. Fukai T, Satoh K, Nomura T, Sakagami H. Antinephritis and radical scavenging activity of prenylflavonoids. *Fitoterapia*. 2003;74(7-8):720-4.
23. Savitha RC, Padmavathy S, Sundhararajan A. Invitro antioxidant activities on leaf extracts of *syzygium malaccense* (L.) merr and perry. *Anc Sci Life*. 2011;30(4):110-3.
24. Pino Benítez N. Plantas útiles del Departamento del Chocó. Parte 1, Extractos. 1st ed. Medellín-Colombia: Uryco Ltda; 2009. p. 312.
25. Cerón I, Higueta J, Cardona C. Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. *Vector* 5. 2011;5(2010):17-26.
26. Bansal P, Paul P, Mudgal J, Nayak P, Thomas Pannakal S, Priyadarsini KI, et al. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in high fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. *Exp Toxicol Pathol*. 2012;64(6):651-8.
27. Mishra A, Sharma AK, Kumar S, Saxena AK, Pandey AK. *Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. *Biomed Res Int*. 2013 August;1:10.
28. Alade GO, Adebajo AC, Omobuwajo OR, Proksch P, Verspohl EJ. Quercetin, a minor constituent of the antihyperglycemic fraction of *Bauhinia monandra* leaf. *J Diabetes*. 2012;4:439-41.
29. Ren Y, Kardono BS, Riswan S, Chai H, Farnsworth NR, Soejarto DD, et al. Cytotoxic and NF-kappaB inhibitory constituents of *Artocarpus rigida*. *J Nat Prod*. 2010;73(5):949-55.

30. Su D, Cheng Y, Liu M, Liu D, Cui H, Zhang B, et al. Comparison of piceid and resveratrol in antioxidation and antiproliferation activities in vitro. PLoS One. 2013;8(1):54-50.
31. Augusta IM, Resende JM, Borges SV, Cristina M, Maia A, Antonieta M, et al. Caracterização física e química da casca e polpa de jambo vermelho (*Syzygium malaccensis*, (L.) Merryl & Perry). Ciência e Tecnol Aliment. 2010;30(4):928-32.
32. Asadujjaman M, Mishuk AU, Hossain MA, Karmakar UK. Medicinal potential of *Passiflora foetida* L. plant extracts: biological and pharmacological activities. J Integr Med. 2014;12(2):121-6.

Recibido: 12 de marzo de 2014.

Aprobado 10 de abril de 2015.

Rivas Mena Kevin Eduardo. Grupo de Investigación en Productos naturales,
Facultad de ciencias básicas. Universidad Tecnológica del Chocó. Quibdó, Colombia.
Correo electrónico: krivamena@gmail.com