

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE HOJAS DEL *TAMARINDUS INDICA* L. EN DOS ESTADOS FISIOLÓGICOS DE LA ESPECIE

Adolfo Ramos Marzan

Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao (ECICC), Cuba

Introducción

Desde los albores de la humanidad las especies vegetales han sido utilizadas con fines terapéuticos para el tratamiento de diferentes enfermedades, con magníficos resultados. Sin embargo, estos usos no han estado sustentados en la mayoría de los casos en un basamento científico. Cuba cuenta con una flora variada y abundante en la que se encuentran numerosas especies con propiedades medicinales como el tamarindo, como comúnmente se le conoce.

El cocimiento de las hojas es un excelente vermífugo. Sus infusiones son útiles en los estados febriles y en los desórdenes biliares. Su uso más extendido es en el tratamiento de las afecciones del hígado (Escalona y col., 2001). Un análisis de la composición química de sus hojas revela que los compuestos con mayor potencial antioxidante son de naturaleza flavonólica y polifenólica (Siddhuraju, 2007).

Desde el punto de vista farmacológico, extractos provenientes de las hojas del tamarindo, han demostrado excelentes propiedades hepatoprotectoras, comparable al extracto de *Rosmarinus officinalis*, una especie con elevada actividad hepatoprotectora (Jouyex y Mortimer, 1995).

En un estudio preclínico farmacológico realizado en Cuba, se evaluó el efecto hepatoprotector del extracto fluido de hojas del tamarindo y fracciones de acetato de etilo y n-butanol, a partir de dicho extracto fluido ante ratas Wistar macho por el modelo de intoxicación hepática por tetracloruro de carbono. Los resultados de las fracciones evaluadas demostraron que el acetato de etilo y n-butanol son las de mayor poder antioxidante (Escalona y col., 1995).

Teniendo en cuenta, la necesidad de definir las fracciones responsables del poder antioxidante y la etapa del ciclo de vida del tamarindo en la cual este efecto se logra con una mayor intensidad, nos propusimos como hipótesis La evaluación de la capacidad antioxidante del extracto fluido de la especie *Tamarindus indica* L. y las fracciones derivadas de éste en diferentes estados fisiológicos de la planta, permitirá conocer cuales son los metabolitos responsables de la actividad antioxidante de la especie y en que etapa del ciclo de vida de la planta es de esperar una mayor actividad farmacológica.

Para dar cumplimiento a esta hipótesis nos trazamos el siguiente objetivo, evaluar la capacidad antioxidante de extractos de hojas de tamarindo en los períodos de floración y fructificación.

Materiales y métodos

En el presente trabajo se evaluó la capacidad antioxidante de extractos fluidos al 70 % en etanol de hojas de tamarindo en diferentes estados fisiológicos de la planta (floración y fructificación) y de fracciones obtenidas a partir de éste a través de los ensayos de inactivación del peróxido de hidrógeno y medición del índice de oxidación. La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de tecnología farmacéutica del Departamento de Farmacia de la Universidad de Oriente en el período comprendido, septiembre de 2008 a mayo de 2009.

Obtención de los extractos fluidos: Se pesaron 150 gramos de droga seca y pulverizada en una Balanza técnica NAGEMA de procedencia alemana para la preparación de cada uno de los extractos fluidos correspondiente a cada estado fisiológico. Los mismos fueron obtenidos por el método de percolación, como se describe en la Norma Ramal de Salud Pública 311/9. La concentración de dichos extractos se realizaron en un Rotoevaporador KIKA-WERKE.

Caracterización química de las fracciones: A las fracciones obtenidas se les realizó una caracterización química por determinación de los fenoles y flavonoides totales por los métodos espectrofotométricos descritos anteriormente.

Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos.

- **Capacidad de inactivación del Peróxido de Hidrógeno:** La capacidad de los extractos de inactivar el peróxido de hidrógeno se determinó acorde con el método descrito por Ruch y col. (1989) con modificaciones. La solución de peróxido de hidrógeno se preparó en buffer fosfato salino a pH 7.4, y se determinó espectrofotométricamente a 230 nm su concentración, con un valor de absorptividad molar de $81 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Beers y Sizer, 1952).

Se evaluaron dos niveles de concentración para cada extracto evaluado a los tiempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos respectivamente. Las mediciones se realizaron empleando como blanco, la solución a evaluar disuelta en agua más la adición del volumen equivalente de buffer fosfato a pH 7.4. Como control se empleó la solución de peróxido de hidrógeno en agua destilada, mientras que como control positivo se empleó solución de quercetina.

- **Determinación del índice de oxidación:** Se realizó por modificación de la Norma Ramal de la Agricultura 1129/1994 MINAG. A dos mL del extracto a evaluar previamente diluido en agua destilada, se le añadió un mL de H_2SO_4 al 20% se agitó y posteriormente se le adicionaron 30 μL de solución de KMnO_4 al 0.1 N. La variable a medir fue el tiempo (en segundos) en que desaparece la coloración rosada provocada por la adición del permanganato de potasio. Las fracciones se diluyeron en agua hasta obtener tiempos comprendidos entre los 5 y 120 segundos. Como controles se emplean los solventes empleados en cada extracto, al nivel de dilución al cual resulta positivo en ensayo; mientras que como control positivo se emplea la solución de quercetina.

Análisis estadístico: Los resultados se procesaron utilizando el programa STATGRAPHIC PLUS para Windows Versión 5.1. La comparación de las medias en las variables fisicoquímicas y químicas de los extractos fluidos y sus fracciones se realizó mediante la prueba t-student. Para garantizar la aplicabilidad de éste test se determina la igualdad de varianzas por realización del test F para la comparación de las desviaciones típicas. Para el análisis de la capacidad extractiva de las diferentes fracciones y el análisis del índice de oxidación entre fracciones se realizó un ANOVA y posterior Test de los Rangos Múltiples de menores diferencias significativas de Fisher (LSD) y el Test de los Rangos Múltiples de mayor diferencia significativa de Tukey identificando así las diferencias de actividad entre los extractos. Para las construcciones de las curvas de calibración se empleó el análisis de regresión lineal.

Resultados y Discusión

La capacidad antioxidante de los extractos se evaluó por los ensayos de capacidad de inactivación del Peróxido de Hidrógeno y medición del índice de oxidación.

Para el ensayo de la capacidad de inactivación del peróxido de hidrógeno, la disminución de la absorbancia a 230 nm de la muestra de reacción en el tiempo es sinónimo de actividad, pues esta longitud de onda es característica del peróxido de hidrógeno y la disminución de la absorbancia presupone degradación o transformación del peróxido de hidrógeno producto de la acción del extracto evaluado.

Capacidad de inactivación del Peróxido de Hidrógeno del extracto fluido y sus fracciones para el estado de floración de la planta.

El peróxido de hidrógeno se mantuvo estable durante el tiempo de experimentación, por lo que la disminución de la absorbancia en las muestras deben asumirse por la acción antioxidante que ejercen los extractos y fracciones de hojas del tamarindo sobre el peróxido de hidrógeno que se encuentra en el medio (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de absorbancia obtenidos para el mes octubre (Floración).

| | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | Dif. |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| H_2O_2 | 0,299 | 0,299 | 0,299 | 0,299 | 0,299 | 0,298 | 0,297 | 0,002 |
| Quercetina (0,250 $\mu\text{g/mL}$) | 0,382 | 0,374 | 0,370 | 0,367 | 0,362 | 0,358 | 0,356 | 0,026 |
| Quercetina (0,375 $\mu\text{g/mL}$) | 0,392 | 0,383 | 0,374 | 0,365 | 0,345 | 0,325 | 0,305 | 0,087 |
| Ext. Fluido (25,0 $\mu\text{g/mL}$) | 0,477 | 0,470 | 0,462 | 0,453 | 0,452 | 0,443 | 0,438 | 0,039 |
| Ext. Fluido (37,5 $\mu\text{g/mL}$) | 0,451 | 0,440 | 0,430 | 0,428 | 0,420 | 0,418 | 0,412 | 0,039 |

| | | | | | | | | |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| n-hexano (2,5 mg/mL) | 0,435 | 0,433 | 0,430 | 0,427 | 0,423 | 0,422 | 0,422 | 0,013 |
| n-hexano (3,0 mg/mL) | 0,446 | 0,445 | 0,443 | 0,438 | 0,436 | 0,435 | 0,434 | 0,012 |
| Cloroformo (0,5 mg/mL) | 0,432 | 0,429 | 0,425 | 0,421 | 0,419 | 0,419 | 0,418 | 0,014 |
| Cloroformo (1,0 mg/mL) | 0,469 | 0,468 | 0,465 | 0,463 | 0,462 | 0,460 | 0,460 | 0,009 |
| Ac. Etilo (0,100 mg/mL) | 0,452 | 0,449 | 0,448 | 0,443 | 0,440 | 0,440 | 0,438 | 0,014 |
| Ac. Etilo (0,125 mg/mL) | 0,460 | 0,461 | 0,450 | 0,442 | 0,441 | 0,440 | 0,438 | 0,022 |
| n-butanol (50,0 µg/mL) | 0,460 | 0,453 | 0,446 | 0,446 | 0,433 | 0,428 | 0,422 | 0,038 |
| n-butanol (100,0 µg/mL) | 0,508 | 0,499 | 0,492 | 0,477 | 0,468 | 0,466 | 0,464 | 0,044 |
| Etanol 70% (0,5 mg/mL) | 0,626 | 0,625 | 0,623 | 0,622 | 0,621 | 0,621 | 0,620 | 0,006 |
| Etanol 70% (1,5 mg/mL) | 0,504 | 0,497 | 0,489 | 0,487 | 0,482 | 0,471 | 0,466 | 0,038 |

Capacidad de inactivación del Peróxido de Hidrógeno del extracto fluido y sus fracciones para el estado de fructificación de la planta (Tabla 2)

Tabla 2. Valores de absorbancia medios obtenidos para el mes de febrero (fructificación).

| | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | Dif. |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ext. Fluido (5,5 µg/mL) | 0,430 | 0,425 | 0,420 | 0,414 | 0,409 | 0,404 | 0,401 | 0,029 |
| Ext. Fluido (25 µg/mL) | 0,407 | 0,403 | 0,399 | 0,391 | 0,385 | 0,379 | 0,376 | 0,031 |
| n-hexano (1,5 mg/mL) | 0,467 | 0,466 | 0,462 | 0,460 | 0,458 | 0,457 | 0,457 | 0,010 |
| n-hexano (2,5 mg/mL) | 0,451 | 0,447 | 0,444 | 0,439 | 0,436 | 0,434 | 0,431 | 0,020 |
| Cloroformo (0,5 mg/mL) | 0,469 | 0,465 | 0,461 | 0,457 | 0,456 | 0,454 | 0,453 | 0,016 |
| Cloroformo (1,0 mg/mL) | 0,452 | 0,448 | 0,443 | 0,440 | 0,435 | 0,435 | 0,434 | 0,018 |
| Ac. Etilo (0,100 mg/mL) | 0,437 | 0,436 | 0,433 | 0,431 | 0,428 | 0,426 | 0,424 | 0,013 |
| Ac. Etilo (0,125 mg/mL) | 0,434 | 0,428 | 0,423 | 0,420 | 0,417 | 0,416 | 0,413 | 0,021 |
| n-butanol (50,0 µg/mL) | 0,452 | 0,447 | 0,444 | 0,444 | 0,442 | 0,439 | 0,439 | 0,013 |
| n-butanol (75 µg/mL) | 0,407 | 0,400 | 0,398 | 0,398 | 0,397 | 0,397 | 0,397 | 0,010 |
| Etanol 70% (1 mg/mL) | 0,450 | 0,445 | 0,441 | 0,438 | 0,436 | 0,435 | 0,434 | 0,016 |
| Etanol 70% (2 mg/mL) | 0,442 | 0,437 | 0,432 | 0,428 | 0,425 | 0,419 | 0,417 | 0,023 |

Para el extracto fluido a igual concentración de 25 µg/mL el valor de disminución de la absorbancia es menor en el mes de febrero que en el mes de octubre, presuponiendo una mayor actividad para el mes correspondiente a la etapa de floración. Similar inferioridad de actividad para el mes de febrero se observa para la fracción de n-butanol a la concentración de 50 µg/mL; sin embargo éste mes de febrero correspondiente al estado de fructificación presenta mayor actividad en las fracciones de n-hexano 2,5 mg/mL y cloroformo 0,5 y 1 mg/mL que sus homólogas en el estado de floración. Para el caso de la fracción de acetato de etilo los valores de inactivación del peróxido de hidrógeno son casi idénticos para ambos meses.

Determinación del índice de oxidación: Los valores de los tiempos obtenidos para cada fracción y el extracto fluido para el mes de octubre se reflejan en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de concentración (mg de droga cruda/mL) y tiempos de decoloración del permanganato para el extracto fluido y sus fracciones en el período de floración.

| Muestra | Concen mg/mL | Relación (conc) | T ₁ (seg) | T ₂ (seg) | T ₃ (seg) | Media | D. Est. |
|------------------|-----------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|-------------|
| Quercetina | 5 ppm | - | 20 | 14 | 20 | 18 | 3,46 |
| Extracto | 0,5 | 1 | 13 | 12 | 15 | 13,3 | 1,53 |
| Fluido | | | | | | | |
| Acetato de Etilo | 1,67 | 1/3,34 | 13 | 15 | 14 | 14,0 | 1,00 |
| N-Butanol | 1,67 | 1/3,34 | 79 | 67 | 72 | 72,7 | 6,02 |
| ETOH | 1,67 | 1/3,34 | 75 | 78 | 85 | 79,3 | 5,13 |
| Cloroformo | 10 | 1/20 | 13 | 15 | 14 | 14,0 | 1,00 |

Los valores reflejan que la quercetina, flavonoide de alto poder antioxidante es capaz de mostrarse activo a concentraciones en el orden de partes por millón. El extracto fluido es el extracto que a menores concentraciones obtiene una buena respuesta, logrando reducir todo el permanganato añadido en sólo 13.3 segundos como promedio. La fracción de acetato de etilo (segunda en actividad) logra una respuesta similar, pero a una concentración tres veces superior que la del extracto fluido.

Las fracciones de acetato de etilo, n-butanol y la de etanol al 70% manifiestan actividad a la misma concentración. El análisis estadístico de sus valores arroja que entre las fracciones de n-butanol y etanol al 70% no existen diferencias significativas de actividad, por lo que a pesar de sus valores diferentes pueden ser considerados como equiactivas, mientras que la fracción de acetato de etilo resulta la más activa de las tres. La fracción clorofórmica resulta por ende la menos activa de todas, necesitando de altas concentraciones para poder manifestar su actividad.

Los valores de los tiempos en segundos obtenidos para cada fracción y el extracto fluido del mes de febrero se reflejan en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores de concentración (mg de droga cruda/mL) y tiempos de decoloración del permanganato para el extracto fluido y sus fracciones en el período de fructificación.

| Muestra | Concen mg/mL | Relación (conc) | T ₁ (seg) | T ₂ (seg) | T ₃ (seg) | Media | D. Est. |
|---------------------|-----------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|------------|
| Quercetina | 5 ppm | - | 20 | 14 | 20 | 18.0 | 3,46 |
| Extracto Fluido | 0,5 | 1 | 14 | 20 | 17 | 17.0 | 3,51 |
| Acetato de Etilo | 1,67 | 1/3,34 | 9 | 8 | 7 | 8.00 | 1.00 |
| N-Butanol | 1,67 | 1/3,34 | 59 | 57 | 51 | 55,7 | 4,16 |
| ETOH | 1,67 | 1/3,34 | 101 | 103 | 106 | 103,3 | 2,51 |
| n-hexano | 30 | 1/60 | 40 | 43 | 47 | 43,3 | 3,50 |
| Cloroformo | 50 | 1/100 | 60 | 56 | 59 | 58,3 | 2,08 |

En la anterior tabla se observa como al igual que en el período de floración (mes de octubre) el extracto fluido es el que obtiene los tiempos de decoloración del permanganato preestablecidos en la investigación, a una menor concentración. De las fracciones, y en coincidencia también con la etapa de floración, la fracción de acetato de etilo es la más activa.

A niveles mucho más altos de concentración, la fracción de n-hexano demuestra mayor actividad que la de cloroformo, la cual constituye sin dudas la de menor actividad.

El análisis estadístico entre iguales fracciones procedentes de los dos estados fisiológicos en estudio exige el hecho de que en ambos casos la concentración sea la misma. Es por ello que este análisis es solamente aplicable a los extractos fluidos y a las fracciones más activas: las de acetato de etilo, n-butanol y etanol al 70%. Para los extractos fluidos, los tiempos en que se logra la decoloración son estadísticamente iguales, mientras que para las fracciones en todos los casos se observan diferencias significativas favorables para el mes de febrero (estado de fructificación).

Correlación de la concentración de fenoles y flavonoides totales y el índice de oxidación:

Desde el punto de vista cualitativo es de señalar que las fracciones con mejores índices de oxidación (independientemente del mes de estudio que se trate) son aquellas en donde se determinan las mayores concentraciones de compuestos fenólicos y flavonólicos, o sea los extractos fluidos y las fracciones de acetato de etilo, n-butanol y etanol al 70 por ciento. No obstante a ello esta relación es más evidente en el caso de los compuestos fenólicos, pues el orden de actividad (extracto fluido > acetato de etilo > n-butanol > etanol al 70%) coincide exactamente con los valores totales de fenoles en el mes de febrero, sin embargo, para el mes de octubre la no diferencia de actividad entre las fracciones de n-butanol y etanol al 70% resulta divergente con respecto a las concentraciones de fenoles totales de las mismas. Para la

variable concentración de flavonoides una divergencia adicional lo constituye cuando la fracción de n-hexano con menor concentración que la de cloroformo tiene mayor actividad que esta.

El extracto fluido por su parte es el contenedor de la totalidad de las sustancias que se determinan en cada una de las fracciones, por lo que no resulta extraño el hecho de que en él se obtengan las mayores concentraciones de estos metabolitos y por ende mayor actividad.

Conclusiones

1. Los extractos fluidos constituyen los extractos más activos en la capacidad de inactivación del peróxido de hidrógeno, no existiendo uniformidad en la intensidad en cuanto al estado fisiológico de la planta respecta, pues mientras que el extracto fluido y la fracción de n-butanol son las más activas en el período de floración, en el de fructificación las fracciones de cloroformo y n-hexano son más activas que sus homólogas del estado de floración.

2. La capacidad de inactivación del peróxido de hidrógeno por los extractos y fracciones del tamarindo es baja.

3. Los extractos fluidos son los de mayores índices de oxidación, mientras que de las fracciones, la de acetato de etilo constituye la más activa.

4. Existe evidencia cualitativa de correlación entre índice de oxidación y concentración de fenoles totales en mayor grado que la observada entre índice de oxidación y concentración de flavonoides.

Bibliografía

Beers, R.F; Sizer, I. W. A spectrofluorometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem. 195, 133-1, 1995.

Escalona JC., Dehesa MA., Boizzan ML. Evaluación preclínica del efecto hepatoprotector de extractos flavonólicos de las hojas de *Tamarindus indica* L. Revista Cubana de Farmacia, 30(1) :292, 1995

Escalona JC, Villalón C, Rondón L, Escudero M, Pérez R, "Estudio de la acumulación de flavonoides en las hojas de una población de *Tamarindus indica* L". Rev Cub Quím; XIII (3): 3-8, 2005.

Jouyex M, Mortimer F. Screening of antiradical, antilipoperoxidant and hepatoprotective effects of nine plants extracts used in Caribbean folk medicine. Phytotherapy Research, 9 (3): 228-230, 1995.

Prabhakara, PG Narsing G, Satyanarayan A, Raol DG. Studies on chutney powders based on tamarind (*Tamarindus indica* L.) leaves. Foodservice Research Inter., 15 (1): 13, 2004.

Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) 312" Extractos fluidos y tinturas. Métodos de Ensayo", MINSAP; 1991.

Ruch, R. J.; Cheng, S. J.; Klauning, J. E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10, 1003-1008, 1989.

Siddhuraju P. Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. LWT, 40: 982–990, 2007.