

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA EN HOJAS E INFLORESCENCIAS DE *Gnaphalium Meridanum* (*Gnaphalium cf. Polycephalum Michx.*)

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITY IN LEAVES AND INFLORESCENCES OF *Gnaphalium Meridanum* (*Gnaphalium cf. Polycephalum Michx.*)

Rubén Darío Torrenegra¹, Diana Hernández Cruz², Ingrid Alarcón García², Jeanet Rodríguez Mayusa³

¹Docente Investigador. Facultad de Ciencias. U.D.C.A.-Calle 222 No. 55-37, Bogotá D.C. rtorrenegra@udca.edu.co

²Estudiantes de Química. Facultad de Ciencias. U.D.C.A.-Calle 222 No. 55-37, Bogotá

³Docente Investigador. M.Sc. Biología. Facultad de Ciencias. U.D.C.A. Calle 222 No. 55-37, Bogotá D.C. jerodriguez@udca.edu.co

RESUMEN

Especies del género *Gnaphalium*, son conocidas popularmente como *vira-viras*, es ampliamente reconocido por sus propiedades antineoplásicas y sus especies se usan principalmente para tratar problemas de inflamaciones de la próstata. En este estudio se evaluó la actividad antioxidante y citotóxica de los extractos totales y fracciones de distintas polaridades obtenidas a partir de hojas e inflorescencia de la especie *Gnaphalium Meridanum* (*Gnaphalium cf. Polycephalum Michx.*). La actividad antioxidante de los extractos y fracciones se evaluó empleando el ensayo de captación del radical libre DPPH y la actividad citotóxica se determinó con el ensayo de reducción del MTT empleando la línea celular de macrófagos murinos J-774. Se encontró que las inflorescencias son potencialmente antioxidante, con un 9,50% de captación del radical por cada mg/L de la fracción etanólica. La fracción de acetato de etilo mostró citotoxicidad sobre las células J-774 con un DL₅₀ de 120,4 mg/L.

Palabras claves: *Gnaphalium meridanum*, actividad citotóxica, MTT, actividad antioxidante, DPPH.

SUMMARY

The *Gnaphalium* genus species, are popularly known as *vira-vira*, is widely recognized for its anticancer properties and its species are mainly used to treat prostate inflammation problems. In this study, the antioxidant and cytotoxic activities,

of total extracts and fractions of different polarities obtained from leaves and inflorescences of *Gnaphalium Meridanum*, were evaluated (*Gnaphalium Polycephalum Michx.*). The antioxidant activity, of extracts and fractions, was assessed by using the DPPH method and the cytotoxic activity was determined by the MTT assay, using the cell line J-774 murine macrophages. It was found that the inflorescences are potentially antioxidant, with 9.50% of the capture free radical per each mg/L of ethanolic fraction. The ethyl acetate fraction showed cytotoxicity against J-774 cells with a LD₅₀ of 120.4 mg/L.

Key words: *Gnaphalium meridanum*, cytotoxic activity, MTT, antioxidant activity, DPPH.

INTRODUCCIÓN

Un amplio número de especies de la familia *Asteraceae*, entre estas las de los géneros *Gnaphalium* y *Achyroclines*, son conocidos comúnmente como *vira-vira* en varias regiones del país. Son especies de climas fríos y paramos que abundan en diferentes altitudes de manera silvestre como malezas. La especie *Gnaphalium meridanum* (*Gnaphalium cf. Polycephalum Michx.*) es una de las tantas plantas usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de afecciones de la próstata, más específicamente como antiinflamatorio y anticancerígena, también es usada como hemostático y contra infecciones de la piel (BERDONCES, 2006). En este trabajo de investigación se llevó a cabo el estudio

de la actividad antioxidante y citotóxica de los extractos y fracciones de diferentes polaridades de las partes áreas del *Gnaphalium meridanum* (*Gnaphalium*. cf. *polycephalum* Michx.) con el fin de evaluar su potencial como anticancerígeno como es recomendado etnobotánicamente.

La actividad antioxidante de sus extractos podría relacionarse al mecanismo de acción en la citotoxicidad de la planta. Estudios sobre *Gnaphalium meridanum* comprobaron las propiedades antiinflamatorias y antihemorrágicas e identificaron, sitosterol, luteolina y acacetina (4'-metil éter de Apigenina) en el extracto etanólico de hojas (PEDRAZA, 1984), compuestos polifenólicos (flavonoides) que se caracterizan ampliamente por sus propiedades antioxidantes. Una sustancia citotóxica tiene diferentes mecanismos de acción y uno es por la inhibición de los promotores tumorales invo-

lucrados en los procesos de óxido - reducción, por lo que es importante conocer la capacidad antioxidante de dicha sustancia.

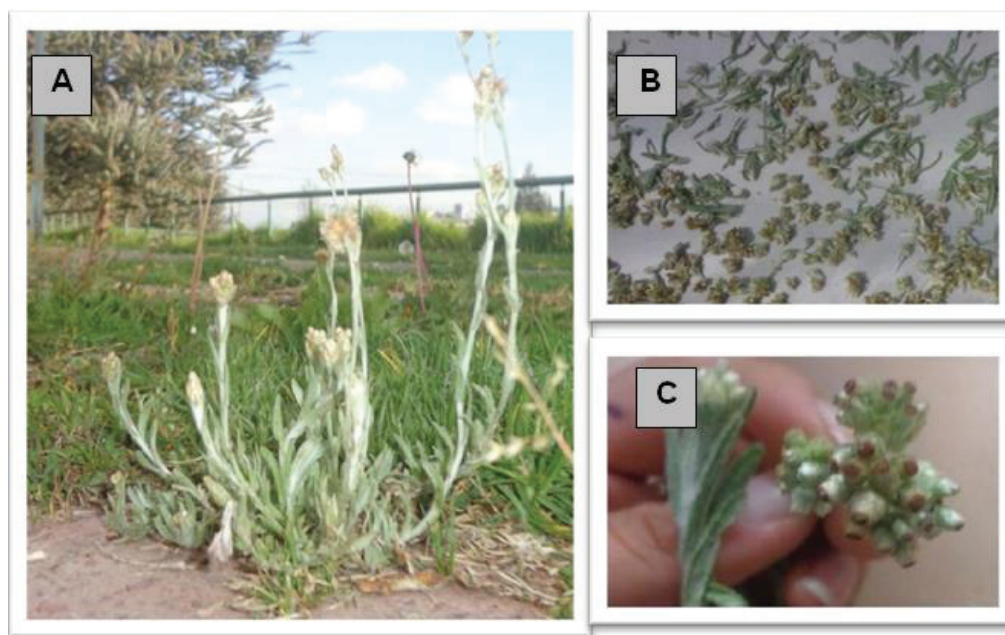
MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal se colectó en el municipio de Mosquera, Cundinamarca, en el humedal el Guali - tres esquinas.

La identificación taxonómica la realizó el biólogo S. Díaz y se depositó un ejemplar en el Herbario Nacional Colombiano con el número COL 566670, la planta se identificó como *Gnaphalium polycephalum*, y se determinó sinónimo de *Gnaphalium meridanum* teniendo en cuenta las características taxonómicas. (Figura 1)

Figura 1. Fotos de plantas de *Gnaphalium meridanum* (A)

Ejemplar recolectado (B)Proceso desecado. (C)Inflorescencia.

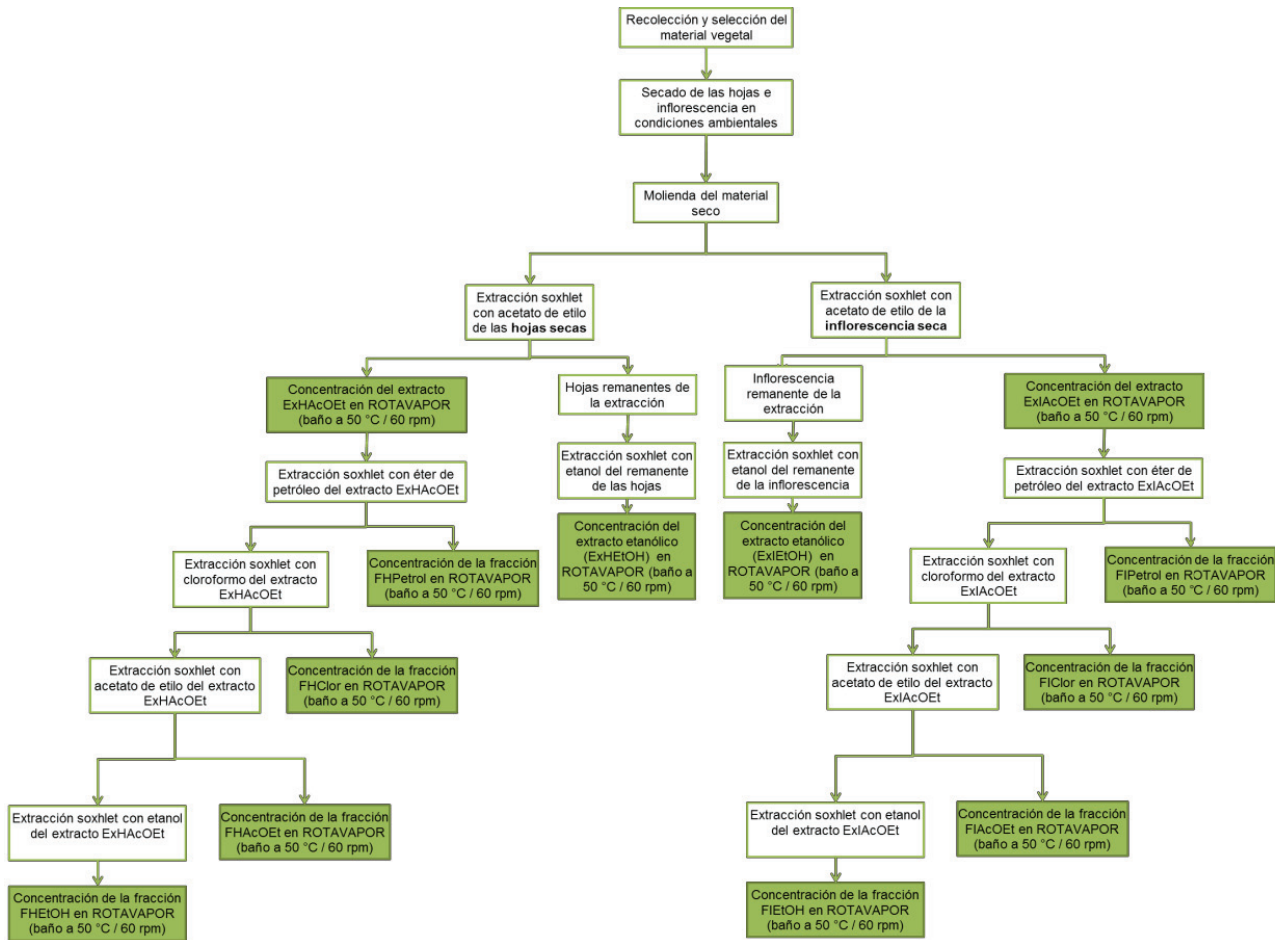


Obtención de los extractos y fracciones

Se recolectó la planta completa, en estado fresco y en etapa de floración y se secó al aire libre en la sombra, se separaron las hojas e inflorescencia, y se molieron. El material vegetal molido 427,2 g hojas y 329 g de inflorescencias y por separado se extrajeron con AcOEt en un equipo soxhlet, se dejó hasta agotamiento. El marco vegetal se extrajo luego con EtOH. Los extractos filtrados se concentraron en un rotaevaporador Heidolph a presión reducida que se denominó ExHAcOEt, ExHEtOH, ExlfAcOEt y ExlfEtOH para hojas e

inflorescencias respectivamente, se separaron 20 g ExHAcOEt y 15 g del ExlfEtOH extracto total de inflorescencia, y se sometieron, cada uno, a extracción s/l en un equipo soxhlet hasta agotamiento, utilizando como solvente petróleo Petrol, CHCl₃, AcOEt, EtOH sucesivamente. Los líquidos fueron concentrados en un rotavapor Heidolph a presión reducida obteniéndose las fracciones FHPetrol, FHClor, FHA-cOEt, FHEtOH para las hojas y FlfPetrol, FlfClor, FlfAcOEt, FlfEtOH para las inflorescencias (Figura 2)

Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de extracción y fraccionamiento del material vegetal *G. meridanum*



RESULTADOS Y DISCUSION

Evaluación de actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos y fracciones de las hojas e inflorescencias de *G. meridanum* se determinó utilizando la técnica de decoloración del DPPH. Se prepararon soluciones de concentración de 500, 100 y 10 mg/L de la muestra a analizar en MeOH (extractos y fracciones) y se mezclaron 0,1mL de cada una de ellas con 0,9mL de DPPH• 0.004% m/v. Como blanco se utilizó MeOH y como controles positivos y de referencia se usaron soluciones de quercetina de 12,8 mg/L, 6,4 mg/L y 0,64 mg/L y soluciones de Trolox de 25 mg/L, 12,5 mg/L y 1,25 mg/L (Tabla 1).

Todas las lecturas de absorbancia se hicieron a 517nm (Espectrofotómetro Genesys 20) luego de 10 minutos. Cada ensayo se hizo por triplicado y se obtuvo la absorbancia promedio en cada caso. Se determinó el porcentaje de Captación de Radical Libre DPPH, también denominada capacidad antioxidante, según las siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Captación} = [A_{0\text{min}} - A_{10\text{min}} / A_{0\text{min}}] \times 100$$

$A_{0\text{min}}$ absorbancia al tiempo cero de reacción, $A_{10\text{min}}$ absorbancia a los 10 minutos de reacción.

Tabla 1. Porcentajes de captación del radical libre de los controles positivos.

MUESTRA	Concentración (mg/L)	% Captación
TROLOX	25,03	96,3
	12,51	92,96
	1,25	29,47
QUERCETINA	12,8	94,63
	6,4	54,61
	0,64	15,05

Para los extractos se trabajó con concentraciones de 500, 100 y 10 mg/L, se realizaron mediciones de curva cinética a 360 segundos y se hizo una lectura de longitud de onda de 517 nm, descrita como la absorbancia óptima para la solución de DPPH en solución metanólica (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de Captación del radical libre de los extractos totales de hojas e inflorescencias determinados por la técnica DPPH

MUESTRAS	Concentración (mg/L)	% Captación
ExHAcOEt	500	93,06
	100	29,76
	10	2,27
ExHEtOH	500	92,81
	100	91,8
	10	16,14
ExIfAcOEt	500	95,85
	100	81,55
	10	18,45
ExIfEtOH	500	92,72
	100	95,03
	10	39,43

Para las fracciones de hojas e inflorescencia se trabajaron concentraciones de 500, 100 y 10 mg/L, se realizaron mediciones de curva cinética a 300 segundos y se leyó en 517 nm, longitud de onda óptima para la solución de DPPH en metanol.

Tabla 3. Porcentaje de Captación del radical libre de las fracciones de hojas e inflorescencias determinados por la técnica DPPH

		Concentración (mg/L)	% Captación
Hojas	Fracciones	500	29,81%
	FHPetrol	100	11,84
	FHPetrol	10	8,25
	FHPetrol	500	32,15
	FHClor	100	10,26
	FHClor	500	89,09
	FHAcOEt	100	25,68
	FHAcOEt	100	4,57
	FHEtOH	10	93,36
	FHEtOH	500	34,00

Inflo-rescencias	FlfPetrol	100	34,00
	FlfPetrol	500	25,30
	FlfPetrol	100	9,20
	FlfClor	500	88,12
	FlfClor	100	63,50
	FlfAcOEt	500	95,45
	FlfAcOEt	100	76,32
	FlfEtOH	500	94,09
	FlfEtOH	100	93,55

Evaluación de la actividad citotóxica

La actividad citotóxica para los extractos fue determinada a través de la medición indirecta del porcentaje de mortalidad celular por la técnica del MTT.

Las células se conservaron en condiciones de esterilidad en N₂ líquido (-190°C) hasta su descongelamiento para activar la línea celular. Se empleó la línea celular de macrófagos murinos J-774, se descongeló un vial 1'000.000 células y se adicionaron en una caja de cultivo estéril de 75 cm² con medio de cultivo RPMI, la caja fue llevada a incubación en condiciones estándar (37°C, 5% de CO₂, y 100% HR (humedad relativa)) durante una semana. Posteriormente las células fueron despegadas de la superficie (tripsina 0, 05%) de la caja de cultivo y el medio se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se retiró y las células se suspendieron nuevamente en un volumen conocido de medio RPMI, se tomó una alícuota y se realizó el conteo celular en el microscopio. Las células se sirvieron en placas de 96 pozos con una densidad de 50.000 células por pozo e incubadas durante 24 horas en condiciones estándar. Para el tratamiento se adicionaron los extractos y fracciones de *G. meridarium* en cada uno de los pozos asignados durante el ensayo. Los extractos se adicionaron en concentraciones de 500 y 100 mg/L, se realizaron tres replicas por concentración, y se incubaron en condiciones estándar durante 16 horas. Pasado el tiempo de tratamiento se adicionó en una concentración de 0,5 mg/mL de reactivo MTT en cada pozo, y se incubó en condiciones estándar durante 3 horas, luego se solubilizaron los cristales de formazan formados en DMSO y se procedió con la lectura por fluorescencia en 535 nm y 595 nm en un equipo TECAN.

La actividad citotóxica se correlaciona con la viabilidad celular que se expresa como la cantidad porcentual de células viables, después de ser tratadas con los extractos.

$$\%MORTALIDAD = (1 - \frac{Abs \text{ Tratamiento} - Abs. \text{ Medio de cultivo}}{Abs \text{ Residual}}) \times 100$$

Abs Residual

Donde Abs Residual=Abs. Blanco celular- Abs Medio de cultivo.

Abs. Medio Cultivo es la absorbancia medida para el medio de cultivo sin tratamiento con extracto ni cultivo de células.

Abs. Blanco Celular es la absorbancia medida para la cantidad específica de células sin tratamiento con extracto, después de haber sido incubadas con el reactivo de tinción MTT.

Abs. Tratamiento es la absorbancia medida para cada muestra de células incubadas con tratamiento de extracto y reactivo de tinción MTT.

Para la actividad citotóxica de los extractos totales, se reportan los datos de porcentaje de mortalidad sobre la línea tumoral de macrófagos murinos J-774 y el DL50 para cada extracto.

Se determinó la dosis efectiva del extracto total en acetato de etilo de la inflorescencia necesario para disminuir la población celular en un 50% (DL₅₀) por interpolación de los datos obtenidos en un rango de 100 mg/L a 500 mg/L.

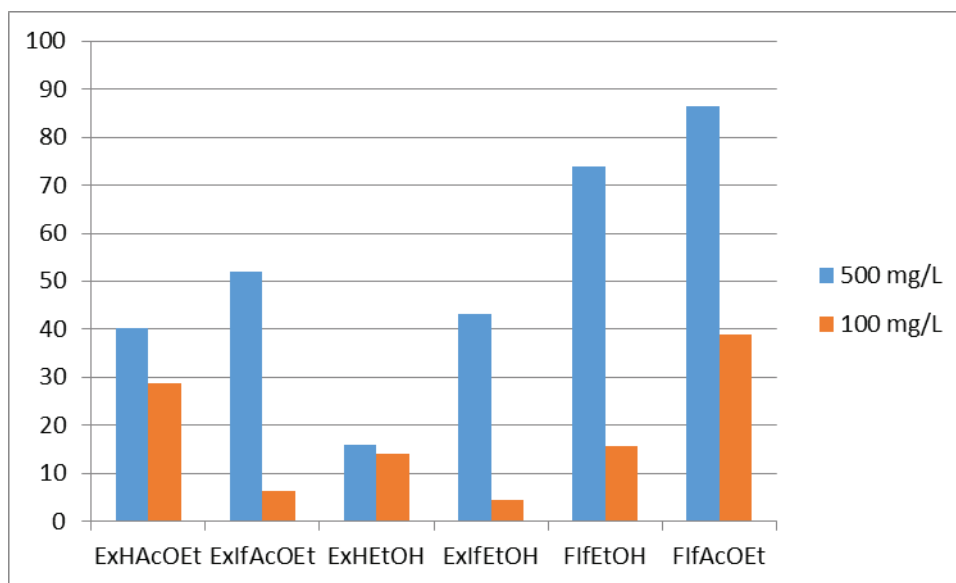
Tabla 4. Correlación de datos obtenidos para actividad antioxidante y citotoxicidad

	% CAPTACIÓN		%MORTALIDAD		CE ₅₀ mg/L	DL ₅₀ mg/L
	500 mg/L	100 mg/L	500 mg/L	100 mg/L		
ExHAcOEt	93,1	29,8	40,2	28,8	166,3	838,1
ExIfAcOEt	95,9	81,5	52,1	6,3	55	539,5
ExHEtOH	92,8	91,8	16	14	50,3	1366
ExIfEtOH	92,7	95	43,1	4,6	54,6	608,9
FHEtOH	93,4	34	-	-	207,8	-
IfEtOH	94,1	93,5	73,9	15,6	42,7	407,3
FHAcOEt	89,1	25,7	-	-	253,4	-
IfAcOEt	95,4	76,3	86,5	38,9	60,1	120,4
FHClor	32,1	10,3	-	-	1180,3	-
IfClor	88,1	63,5	-	-	-	-
FHPetrol	29,8	11,8	-	-	12662	-
IfPetrol	25,3	9,2	-	-	1762	-

En los resultados obtenidos para actividad antioxidante y citotoxicidad se evidencio que la especie *Gnaphalium meridatum* (*Gnaphalium cf. Polycephalum Michx*) posee metabolitos con características polares, posiblemente flavonoides, con potencial para captar radicales libres y disminuir el porcentaje de supervivencia en células tumorales (Figura3)

También se evidenció que la inflorescencia es significativamente mejor frente a las hojas en los dos aspectos, encontrando que los extractos y fracciones con mayor propiedad antioxidante se encontraron en la fracción etanólica de la inflorescencia, a la cual le podemos atribuir el porcentaje de captación obtenido para el extracto total en acetato de etilo.

Figura 3. Porcentaje de mortalidad de células de la línea celular tumoral de Macrófagos murinos J-774



CONCLUSIONES

Los extractos totales en acetato de etilo de hojas e inflorescencia de *Gnaphalium meridanum* (*G.cf polycephalum Michx*) poseen actividad antioxidante y citotóxica.

Los extractos evaluados *Gnaphalium meridanum* (*G.cf polycephalum Michx*) se encontró que el de mayor captación de radical libre fue el de inflorescencia en etanol con un 9,50%.

La fracción de mayor captación de radical libre es la obtenida en etanol a partir del extracto total en acetato de etilo de la inflorescencia de *Gnaphalium meridanum* (*G.cf polycephalum Michx*) con un 9,36%.

Las muestras evaluadas en citotoxicidad la que presenta mayor mortalidad sobre la línea celular tumoral de macrófagos murinos J-774, es la fracción obtenida en acetato de etilo a partir del extracto total en acetato de etilo de la inflorescencia con un 3,89% de muerte celular.

BIBLIOGRAFÍA

- BARRÓN, R; et. al. 2011. Flavonoides y Actividad Antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev En Revista Fitotecnia Mexicana. Vol. 34. Ciudad de México: [s.n.], p. 151 – 157.
- BERDONCES, J. L. 2002. Gran Enciclopedia de las plantas Medicinales. Diccionario de las plantas medicinales, volumen 2. Barcelona – España: Editorial Oena, p. 1151, 1152.
- BROUSSALIS, A. M, et. al. 1989. Aspectos Fitoquímicos de Especies Argentinas del Género *Achyrocline* En Acta Farmacéutica Boanaerense. Buenos Aires: Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires. p. 11 – 16.
- CASTAÑEDA, C.B; RAMOS, LL. E; IBAÑEZ V.L. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas En Revista Horizonte Médico Vol. 8. Lima – Perú: Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres, 2008. p. 56 – 72.
- CORREA, J E; BERNAL, H Y. 1990. Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Tomo V. Bogotá – Colombia: [s.n.], p. 476 – 513.
- DEJERASSI, C; HALL, L. 1993. Dictionary of Natural Products, First Supplement [Diccionario de Productos Naturales, Primer Anexo], [s.n.]. p. 402.
- DÍAZ, C; HEINZEN, H. 2006. Variaciones en el perfil de Flavonoides y en la cantidad de Quercetina libre en

- diferentes extractos de *Achyrocline saturoides* En Acta Farmacéutica Boanaerense. Buenos Aires: Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires. p. 574 – 577.
7. ESCARRIA, S; TORRENEGRA, R; ANGARITA, B. 1997. Colombian Plants of the Gnaphalium Genus (I) [Plantas Colombianas del Genero Gnaphalium (I)] En Revista Latinoamericana de Química, [s.n.], 1977. p. 148.
 8. FERRARO, G. 1983. Flavonoides: Actualización de su Uso en Terapéutica En Acta Farmacéutica Boanaerense. Buenos Aires: Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires. p. 97 – 103.
 9. GARCIA B, H. 1975. Flora Medicinal de Colombia, Tomo II. Imprenta Nacional, Bogotá. p. 30.
 10. KUSKOSKI, M, et al. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos En Ciencia e Tecnología de Alimentos, Campinas: Sociedad Brasileira de Ciencia y Tecnología de Alimentos. p. 726 – 723.
 11. LAM, Jonathan, et al. 2008. Baseline Mechanical Characterization of J774 Macrophages [Bases de la Caracterización del Mecanismo de Macrófagos J774] En Biophysical Journal, Vol. 96. Boston: Biophysical Society, p. 248 – 254.
 12. MARTÍNEZ, A. 2005 Flavonoides. Medellín – Colombia: [s.n.],. 76 p.
 13. MARTÍNEZ V, J B. 2007. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Helio- carpus terebinthinaceus*. Huajapan de León, Oaxaca: Universidad Tecnológica de la Mixteca. p 68.
 14. MARTINO, V. 2000. Los Flavonoides como Promisorios Agentes Preventivos y Terapéuticos En Acta Farmacéutica Boanaerense. Buenos Aires: Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires. p. 303 – 308.
 15. MINISTERIO DE PROTECCION SOCIAL. 2008. Vademécum Colombiano de plantas medicinales, Plantas Aprobadas por el Instituto Nacional de Vigilancia de medicamentos y alimentos (INVIMA). Bogotá – Colombia: Ministerio de protección social. p. 223.
 16. MOLYNEUX, P. 2003. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity [Uso del radical estable DPPH en la evaluación de actividad antioxidante]. Reino Unido: Easynet. p. 211 – 219.
 17. MOSQUERA, O. 2005. Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales En Revista Scientia et Technica. Pereira – Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira. p. 231 – 234.
 18. MUÑOZ J, A M. 2007. Evaluación de la actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en vinos producidos en Perú En Revista de la Sociedad Química del Perú. Lima – Perú: Sociedad Química del Perú. p. 30-40.
 19. PEDRAZA P, G S. 1984. Contribución al estudio de los flavonoides y sus glicosidos en *Gnaphalium meridatum* y sus posibles efectos fisiológicos. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. p 95.
 20. PÉREZ T, G; MARTÍNEZ S, G. 2001. Los Flavonoides como Antioxidantes Naturales En Acta Farmacéutica Boanaerense. Buenos Aires: Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires. p. 297 – 306.
 21. POKORNY, J, YANISHLIEVA, N; GORDON, M. 2005. Antioxidants in food. Practical applications. Traducido por José David Aramayona Alonso, 1 ed. Zaragoza – España: Editorial ACRIBIA. p. 1 – 148.
 22. QUINTANAR E, M A; CALDERÓN S, J V. 2009. La capacidad antioxidante total bases y aplicaciones En Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal. [s.n.]. p. 89-101.
 23. TORRENEGRA, R; ESCARRIA, S; BOGOTA, C. 1979. Plantas Colombianas del Genero Gnaphalium (II) En Revista Latinoamericana de Química, [s.n.]. p. 83 - 84.
 24. TORRENEGRA, R. 1980. 5,7-Dihidroxy – 3,6,8 – Trimetoxiflavona from the Flowers of *Gnaphalium elegans* [5,7-Dihidroxy – 3,6,8 – Trimetoxiflavona desde las Flores de *Gnaphalium elegans*] En Phytochemistry, Vol. 19. Pergamon Press Ltd. Inglaterra. p. 2795 – 2796.
 25. TORRENEGRA, R. 1992. Diterpenes from *Gnaphalium graveolens* and *Gnaphalium pellitum* [Diterpenos de *Gnaphalium graveolens* y *Gnaphalium pellitum*] En Phytochemistry, Vol. 31. Pergamon Press Ltd. Gran Bretaña. p. 2415 - 2418

