

# Efecto de la radiación gamma en la actividad antimicrobiana y antioxidante de la sangre de grado

Kety León<sup>1</sup>, Patricia Castillo<sup>2</sup>, Julio Santiago<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Dirección de Investigación y Desarrollo, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

<sup>2</sup> Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Av. Los Maestros S/N, Ica, Perú

<sup>3</sup> Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química e Ing. Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Venezuela S/N, Lima 1, Perú

## Resumen

El tratamiento de hierbas medicinales y alimentos por radiación gamma, permite su descontaminación, pero también puede producir modificaciones químicas que se manifiestan en un cambio de sus propiedades biológicas. Se han irradiado muestras de sangre de grado (*Croton lechleri*) en polvo a dosis de 5, 8, 15, 25 y 40 kGy de radiación gamma. La propiedad antioxidante de estas muestras, determinadas mediante el método de neutralización de radicales del DPPH, disminuye con el incremento de la dosis de irradiación. En contraste, las propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-PVA embebidas con las soluciones hidroalcohólicas de las muestras irradiadas frente a cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* no se modificaron en comparación con las películas conteniendo sangre de grado sin irradiar. Las películas estudiadas presentaron actividad sólo frente a *S. aureus*. El estudio por espectroscopía UV-visible e infrarrojo no reveló cambios notorios en sus espectros, lo que sugiere que no hubo mayores modificaciones en la constitución del látex en polvo después de la irradiación.

## Abstract

The application of gamma radiation in medicinal plants and foods allows its decontamination, but also it can produce chemical modifications that are manifest in a change in their biological properties. Sangre de grado (*Croton lechleri*) has been irradiated as powder at different gamma rays doses (5, 8, 15, 25 y 40 kGy). The antioxidant properties of these samples, measured by the DPPH method, decrease with the gamma radiation doses. Furthermore, the antimicrobial activity against *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* of the chitosan-PVA film containing the irradiated sangre de grado samples were not modified in comparison with the similar material with not irradiated sangre de grado. The studied films exhibit activity only against *S. aureus*. However changes in the UV-visible and FT-IR spectra were not observed, indicating gamma radiation did not provoke chemical changes in the components of the sangre de grado.

## 1. Introducción

La contaminación microbiológica de plantas medicinales es un serio problema que influye en las formulaciones farmacéuticas a partir de los extractos que contienen los principios activos. La calidad microbiológica y fisico-química de las plantas medicinales depende de diferentes factores: lugar de cultivo, técnica de cosecha, transporte, formas de embalaje, almacenamiento, etc. [1]. Si a esto le adicionamos la contaminación química y microbiológica ocurrida durante las etapas de producción, procesamiento y almacenamiento de los productos finales, podemos prever que estos productos contienen una carga microbiana no despreciable [2]. Algunos de

estos microorganismos presentan un grave riesgo para la salud humana, especialmente si se encuentran en productos que se consumen sin ningún tratamiento térmico [3].

La inclusión de procesos de descontaminación es por lo tanto un paso importante hacia la seguridad del consumidor y la eficacia terapéutica de las plantas medicinales. La descontaminación puede lograrse por métodos convencionales: tratamiento térmico y fumigación con gases como el óxido de etileno o bromuro de metilo (cuyo uso ya ha sido prohibido por razones de salud, seguridad y por contribuir al

\* Correspondencia autor: jsantiago@ipen.gob.pe

deterioro de la capa de ozono) [4]. El tratamiento con radiaciones ionizantes es un método de descontaminación de alimentos que ha sido poco aplicado en plantas medicinales. La aplicación de la radiación gamma produce una rápida reducción de los niveles de contaminación microbiana: una dosis de 3-10 kGy reduce la población de aerobios mesófilos totales de especerías y hierbas secas altamente contaminadas a niveles por debajo de  $10^3$ - $10^4$  CFU/g [2,5,6], pero también puede producir modificaciones químicas que alteren sus características físico-químicas [7,8]. Por dicha razón, muchos países han regulado la dosis máxima que pueden recibir estos productos. En el Perú también se ha estudiado la dosis adecuada de radiación gamma para diversas especies, tales como uña de gato, yacón, hojas de sen, chanca piedra, maca y sangre de grado, para su descontaminación [9].

La sangre de grado (*Croton lechleri*) es muy utilizada en la medicina tradicional en el Perú en el tratamiento de úlceras estomacales, gastritis crónicas y como cicatrizante de heridas internas y externas. La sangre de grado presenta actividad antimicrobiana frente a gram-positivos, *S. aureus* ATCC 6538 y *S. epidermidis* ATCC 12228 y a gram-negativos, *Pseudomonas* y *Klebsiela* FDA 602 [10]. Igualmente, se ha encontrado que la sangre de grado inhibe el crecimiento de *Helicobacter pylori* en concentraciones elevadas [11]. Por estas características, el látex de sangre de grado ha sido incluido como aditivo en la formulación de películas para el tratamiento de lesiones a la piel de difícil cicatrización, úlceras o quemaduras graves [12].

A pesar de poseer las propiedades mencionadas arriba, el látex también contiene una carga microbiana no despreciable que es necesario eliminar previamente. Estudios recientes, de descontaminación del látex de sangre de grado por radiación gamma, muestran que se requiere una dosis de 5kGy para disminuir la población de microorganismos aerobios mesófilos (UFC/g) de  $6,0 \times 10^4$  a  $3,5 \times 10^2$ , y de 8 kGy para disminuir dicha población por debajo de 20 UFC/g [9]. Sin embargo, la radiación gamma no solamente produce la disminución de microorganismos, sino que también puede producir cambios químicos en los constituyentes de las plantas, modificando ciertas propiedades biológicas. Por ejemplo, se ha reportado recientemente que la

radiación gamma provoca un incremento del aroma de los granos de café, mediante el rompimiento de los enlaces glicosídicos que unen a los polifenoles [13]. También se ha reportado que el potencial antioxidante de los granos de soya se incrementa después de la irradiación con rayos gamma [14]. Igualmente, la radiación con electrones también produce un efecto positivo en limones procedentes de Corea, *Citrus unshiu* [15].

En este trabajo se ha irradiado muestras la sangre de grado en polvo con rayos gamma a diferentes dosis para evaluar la variación de la propiedad antioxidante en función de la dosis aplicada. Igualmente, se ha introducido en películas de quitosano-PVA un extracto hidroalcohólico de sangre de grado irradiada y se ha evaluado las propiedades antimicrobianas de las películas obtenidas.

## 2. Experimental

### Materiales

El quitosano proviene de Fluka (viscosidad  $>400$  mPa.s, 1% en ácido acético al 1%), el 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH) proviene de Sigma, mientras que el ácido acético glacial, agar EMB, agar *Pseudomonas* P, agar Baird Parker, agar Casoy, caldo Casoy y agar Muller Hinton, provienen de Merck. Las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 fueron adquiridas en el Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú).

El látex de sangre de grado (*Croton lechleri*) fue obtenido en Oxapamapa, Cerro de Pasco, Perú. Se utilizó etanol de 70° en la preparación de las soluciones hidroalcohólicas (agua/etanol 9:1) de sangre de grado.

La irradiación gamma de las muestras se realizó en un Gammacell 220 Excel (MSD Nordion) con una actividad de 14kGy/h (01-10-2007). Los espectros UV-visible fueron obtenidos con un espectrofotómetro Biochrom, modelo Libra 22S, 99342. Los espectros IR fueron obtenidos en el laboratorio USAQ (UNMSM) en un equipo Nicolet Impact410.

### Irradiación de sangre de grado en polvo

El látex colectado fue evaporado a sequedad a 40°C. Las muestras en polvo fueron empacadas en bolsas de polietileno de baja densidad y tratadas con radiación gamma a las dosis de 5, 8, 15, 25 y 40 kGy.

### Evaluación de la actividad antioxidante de la sangre de grado irradiada

La actividad antioxidante se evaluó mediante el método de neutralización del radical libre DPPH. En este método se determina la capacidad de secuestro o de neutralización, por parte de los componentes de una muestra, del radical libre del DPPH. Se disolvió 1 mg de muestra en 10 mL de etanol al 96%. A partir de esta solución se prepararon diluciones de 10 y 50 µg/mL. Cada una de estas diluciones fueron tratadas con la solución de DPPH de la siguiente manera: en un tubo de ensayo se colocó 1,8 mL de muestra y 0,7 mL de la solución de DPPH 0,3 mM en etanol al 96%. Se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se midió la absorbancia a 517 nm. Estas determinaciones se realizaron por triplicado. El tubo control consistió en una solución de DPPH en etanol.

La evaluación de la actividad antioxidante se expresa como porcentaje y se determina de acuerdo con la siguiente fórmula, utilizando rutina como patrón de comparación [16,17].

$$AA\% = 100 - 100 [(A_m - A_b) / A_{control}]$$

Donde:

AA% = % de actividad antioxidante

$A_m$  = Absorbancia de la muestra

$A_b$  = Absorbancia del blanco (solución etanólica de la muestra)

$A_{control}$  = Absorbancia de la solución de DPPH

### Preparación de los hidrogeles conteniendo sangre de grado irradiada

Se prepararon soluciones hidroalcohólicas de sangre de grado irradiadas a todas las dosis con una concentración de 0,1g/10mL. Los hidrogeles [18] de 3x3 cm fueron embebidos en estas soluciones durante 20 minutos y se secaron durante 4 días a temperatura ambiente. Luego, se cortaron discos de 10mm para ser utilizados en la prueba de evaluación de la actividad antimicrobiana.

### Evaluación de la actividad antimicrobiana de hidrogeles embebidos

El método utilizado para las pruebas en películas fue de difusión en agar de Kirby-Bauer siguiendo las recomendaciones del Comité Nacional de Control de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS) [19]. El método se fundamenta en la inhibición del

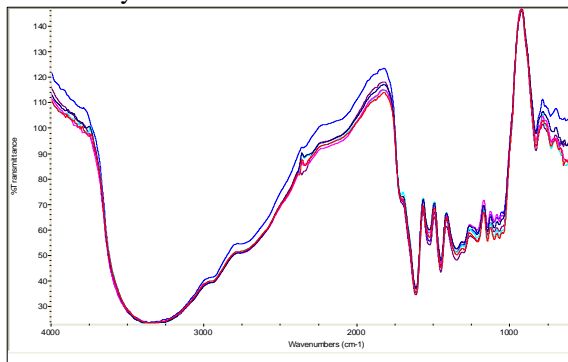
crecimiento bacteriano mediante la difusión del principio activo en un medio de cultivo sólido, que se evidencia con la formación de zonas claras o halos de inhibición.

Se incubaron las placas con agar Muller Hinton a 37 °C por 24 h antes de su uso. El inóculo (preparado a una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de Mac Farland) fue aplicado sobre la placa con la ayuda de una torunda estéril, cubriendo totalmente la superficie de la placa sin dejar una zona libre. Se dejó secar de 3 a 5 minutos antes de depositar las películas embebidas cortadas en discos de 10 mm de diámetro. Se colocaron los discos sobre el medio sembrado y se añadió por encima de las películas gotitas de agua estéril, para evitar que se arruguen, se incubaron a 37 °C por 24 horas.

## 3. Resultados y Discusión

### Caracterización de la sangre de grado irradiada

La sangre de grado en polvo presentó una coloración marrón que se mantuvo después del tratamiento con rayos gamma, incluso a 40 kGy.

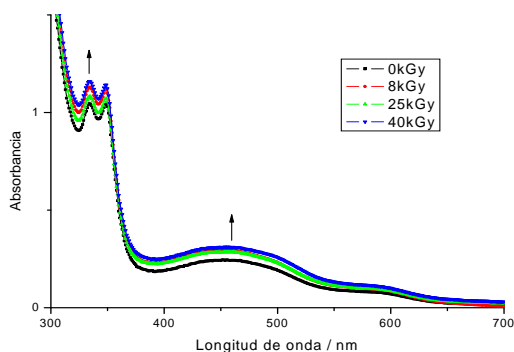


**Figura 1:** Espectros IR de las muestras de sangre de grado sin irradiar e irradiadas a 5, 8, 15, 25 y 40 kGy.

Los espectros IR de todas las muestras de sangre de grado irradiadas y sin irradiar muestran los mismos picos (Figura 1). No se observó ningún cambio significativo, lo que sugiere que la radiación gamma no ha provocado cambios importantes en la estructura de los constituyentes de la sangre de grado cuando se le irradia al estado sólido. Estos espectros se caracterizan por la presencia de una banda intensa y ancha con una transmitancia máxima a 3330cm<sup>-1</sup> que puede deberse a la presencia de grupos OH, evidenciando la presencia de polifenoles. La asimetría de esta banda sugiere que está mezclada con señales provenientes de grupos carboxílicos. Otros picos importantes se

observan a 1610 (grupos carbonilo), 1528, 1446, 1349, 1205, 820 y 532  $\text{cm}^{-1}$ .

La solubilidad de la sangre de grado en polvo tampoco se modificó con la radiación gamma. Las soluciones hidroalcohólicas presentaron la misma coloración, marrón rojiza. Los espectros UV-visible de estas soluciones presentaron poca diferencia. En todos los casos, en el rango UV se observa una banda muy intensa a 229 nm junto con bandas más débiles a 332 y 347 nm. En el rango visible (Figura 2) se observa una banda ancha a 455 nm con un hombro a 600 nm. La intensidad de la banda a 455 nm se incrementa con la dosis de irradiación.

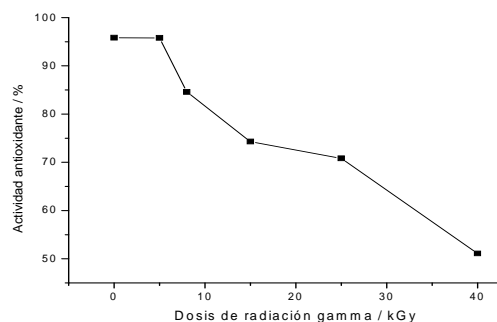


**Figura 2:** Espectro UV-visible de las soluciones hidroalcohólicas de sangre de grado irradiadas a 0, 8, 25 y 40 kGy.

### Actividad antioxidante

La interacción entre las soluciones de la muestra de sangre de grado, con y sin radiación gamma y el radical libre DPPH provoca un cambio del color violeta a amarillo a medida que disminuye la concentración del radical libre. Este cambio de coloración se cuantifica con la ayuda del espectrofotómetro a 517 nm después de veinte a treinta minutos de reacción [20,21].

La actividad antioxidante de la muestra de sangre de grado irradiada a 5 kGy y la no irradiada presentan prácticamente el mismo valor. En cambio los valores para las muestras irradiadas a 8, 15, 25 y 40 kGy disminuyen rápidamente (Figura 3). Teniendo en cuenta que la actividad antioxidante de la sangre de grado está principalmente relacionada con su contenido en polifenoles, podemos pensar que la concentración de estas moléculas disminuye con la radiación gamma. Sin embargo, en el espectro IR la señal de los grupos  $-\text{OH}$  son enmascaradas por la intensa señal de los grupos carboxílicos también presentes.

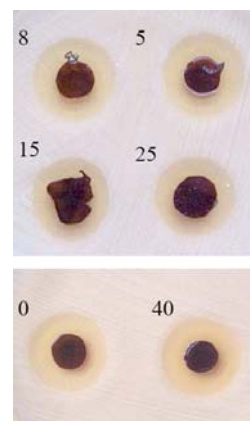


**Figura 3:** Disminución de la actividad antioxidante de la sangre de grado (a 10  $\mu\text{g/mL}$ ) en función de la dosis de radiación gamma recibida.

### Actividad antimicrobiana

Los hidrogeles obtenidos por radiación gamma son películas transparentes, flexibles y con una ligera coloración amarillenta. Esta coloración cambia a marrón rojizo al embeber la solución hidroalcohólica de sangre de grado.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las películas embebidas en solución hidroalcohólica de la sangre de grado irradiada nos muestra que esta actividad se mantiene frente a *S. aureus* inclusive a la dosis de 40 kGy (Figura 4). Este hecho sugiere que el componente o componentes responsables de la actividad antimicrobiana no han sido afectados por la radiación gamma. La diferencia de actividad antimicrobiana de las películas con sangre de grado sin irradiar y la irradiada a 40 kGy es mínima. No se observa actividad antimicrobiana frente a las otras cepas probadas.



**Figura 4:** Pruebas de actividad antimicrobiana con los hidrogeles embebidos en solución hidroalcohólica de sangre de grado irradiada a las dosis de 0, 5, 8, 15, 25 y 40 kGy, frente a *S. aureus*.

#### 4. Conclusiones

Este estudio demuestra que la radiación gamma no produce, en base a los datos obtenidos por espectroscopía UV-visible o infrarroja, cambios significativos en los constituyentes de la sangre de grado en polvo. Incluso, la actividad antimicrobiana no es afectada a pesar que la muestra fue irradiada a 40 kGy. Sin embargo, la actividad antioxidante se mantiene casi constante hasta una dosis de 5 kGy (dosis de irradiación para lograr una descontaminación importante de plantas medicinales), pero luego disminuye rápidamente a medida que se incrementa la dosis de irradiación.

#### 5. Agradecimientos

Al Ing. Juan Ruiz de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana por la extracción, caracterización y donación del látex de sangre de grado utilizado en este estudio. Igualmente, al Third World Academy of Science (TWAS) por el financiamiento parcial de este trabajo que cubre un aspecto del proyecto de investigación: “*Leishmanicidal effects of Croton lechleri extract desorbed from a biopolymer*”.

#### 6. Bibliografía

[1] World Health Organization. Guidelines on good agricultural and collection Practices (GACP) for medicinal plants. Geneva; 2003.  
[2] Farkas J. Irradiation of dry food ingredients. Florida: CRC Press; 1988.  
[3] Bandekar J, Kamat A, Thomas P. Microbiological quality of the dairy product pedha and its improvement using gamma radiation. J. Food Safety. 1998; 18:221-230.  
[4] López-Medina J, López-Aranda J, et al. Strawberry production from transplants fumigated with methyl bromide alternatives. Span. J. Agric. Res. 2007; 5:407-416.  
[5] Ingram M, Farkas J. Microbiology of foods pasteurized by ionising radiation. Acta Aliment. 1977; 96:123.  
[6] Hanis T, Mnukova J, et al. Effect of gamma irradiation on survival of natural microflora and some nutrients in cereal meals. Cereal Chem. 1998; 65:381-383.  
[7] Chung B, Lee Y, et al. Effects of low-dose gamma-irradiation on production of shikonin derivatives in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* S. Radiat. Phys. Chem. 2006; 75:1018-1023.  
[8] Byun M, Jo C, Jeon T, Hong C. Effects of gamma irradiation on color characteristics and biological activities of extracts of

*Lonicera japonica* (Japanese honeysuckle) with methanol and acetone. Lebens. Wiss. Technol. 2004; 37:29-33.

[9] Vargas J, et al. Aplicaciones de la tecnología de irradiación en plantas medicinales en el Perú. En: Instituto Peruano de Energía Nuclear. Informe Científico Tecnológico 2005. Lima: Perú; 2006. 137-140.

[10] Zapata R. Actividad antimicrobiana in vitro de la droga comercializada como Sangre de Grado. [tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico]. Lima: UNMSM; 1987.

[11] Tamariz J, Capcha R, et al. Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (*Croton lechleri*) frente al *Helicobacter pylori*. Rev. Med. Hered. 2003; 4(2):81-88.

[12] León K, Santiago J. Propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas en extracto de sangre de grado. Rev. Soc. Quím. Perú. 2007; 73:158-165.

[13] Variyar P, Ahmad R, et al. Flavoring components of raw onsooned Arabica coffee and their changes during radiation processing. J. Agric. Food Chem. 2003; 51:7945-7950.

[14] Variyar P, Limaye A, et al. Radiation-induced enhancement of antioxidant contents of soybean (*Glycine max* Merrill). J. Agric. Food Chem. 2004; 52: 3385-88.

[15] Jong-Wan K, Byung Cheol L, et al. Effect of electron-beam irradiation on the antioxidant activity of extracts from Citrus unshiu pomaces. Radiation Physics and Chemistry. 2008; 77:87-91.

[16] Castillo P, Lock O. Compuestos con actividad antioxidante en la especie *Lepechinia meyenii* (Walp). Rev. Soc. Quím Perú. 2005; 71:227-236.

[17] Mensor L, Menezes F, et al. Screening of Brazilian plants extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytotherapy Res. 2001; 15:127-130.

[18] Performance standards of antimicrobial susceptibility testing. 2002; Document N° NCCLS M100-S12, 1975.

[19] Yen G, Chang Y, Sep F, et al. Isolation and characterization of antioxidant compounds from *Aspergillus candidus* broth filtrate. J. Agric. Food Chem. 2001; 49:1426-1431.

[20] Pérez R, Vargas R, et al. Actividad antioxidante de los alcaloides de *Boconia arborea*. Estudio sobre seis métodos de análisis. Ars Pharmaceutica. 2003; 44:5-21.