

## Evaluación de la actividad antioxidante, contenido de polifenoles totales y actividad antimicrobiana de fracciones de sangre de grado, *Croton lechleri*

Justo Carrión<sup>1</sup>, Rosa Avilés<sup>1</sup>, Kety León<sup>2</sup>, Julio Santiago<sup>1,2,\*</sup>

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

<sup>2</sup> Dirección de Investigación y Desarrollo, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

### Resumen

Se ha evaluado la actividad antioxidante, contenido de polifenoles totales y actividad antimicrobiana de diferentes extractos obtenidos a partir de sangre de grado, *Croton lechleri*, en polvo. Los extractos obtenidos con etanol, metanol, solución hidroalcohólica y por tratamiento con acetato de etilo presentan características diferentes. La fracción etanólica presenta la mayor actividad antioxidante, mientras que el látex original presenta el mayor contenido de polifenoles totales. En cambio, la solución hidroalcohólica presenta mayor actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*.

### Abstract

The antioxidant activity, total polyphenol content and antimicrobial activity of different extracts from dragon's blood, *Croton lechleri*, powder have been evaluated. The fractions obtained with ethanol, methanol, water-alcohol solution and ethyl acetate treatment have different characteristics. The ethanol fraction has the highest antioxidant activity, while the original latex has the highest content of total polyphenols. However, the water-alcohol solution has higher antimicrobial activity against *S. aureus*.

### 1. Introducción

La sangre de grado, *Croton lechleri* (Muell-Arg) (Euphorbiaceae), es un árbol que crece en la zona andina tropical de Perú, Colombia, Ecuador y Bolivia. Su látex es muy utilizado en la medicina tradicional en el tratamiento de úlceras estomacales, gastritis crónicas, cirrosis al hígado, y como cicatrizante de heridas internas y externas [1,2]. Los compuestos químicos presentes en el látex han sido muy investigados, siendo las proantocianidinas las que se encuentran en un 90% del peso seco. Otros compuestos presentes son los alcaloides (taspina), lignanos, derivados de la catequina, polifenoles, etc. [3-5]. A la taspina se le atribuyen las cualidades cicatrizantes, antiinflamatorias y citotóxicas en células tumorales. El proceso de cicatrización es coadyuvado por las proantocianidinas (efecto antioxidante) y los lignanos. Asimismo, el efecto antimicrobiano de los polifenoles coadyuva al efecto cicatrizante general de la resina, provocando la precipitación de las

proteínas de las células, formándose una costra que cubre la herida. Adicionalmente, el contenido de la proantocianidina oligomérica SP-303 presenta actividad antiviral [6].

La sangre de grado presenta actividad antimicrobiana frente a gram-positivos, como: *S. aureus* ATCC 6538 y *S. epidermidis* ATCC 12228; y a gram-negativos: *Pseudomonas* y *Klebsiella* FDA 602 [7]. Igualmente, se ha encontrado que la sangre de grado inhibe el crecimiento de *Helicobacter pylori* en concentraciones elevadas [8].

Se ha demostrado la eficiencia de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas en soluciones hidroalcohólicas de sangre de grado en el tratamiento de quemaduras provocadas en conejos, al igual que las propiedades antimicrobianas de estas películas [9,10]. Igualmente, se ha demostrado que la actividad antioxidante de

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

extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de sangre de grado en polvo disminuía dramáticamente cuando la muestra era tratada con radiación gamma por encima de 5 kGy, sin embargo la actividad antimicrobiana no se modificaba [11].

En este trabajo hemos obtenido diferentes extractos a partir de sangre de grado en polvo y evaluado su actividad antioxidante, contenido de polifenoles totales y actividad antimicrobiana.

## 2. Experimental

### 2.1 Obtención de las fracciones

El latex de sangre grado fue evaporado a 50°C y el polvo obtenido fue extraído con etanol (Scharlau 99,9%), metanol (Scharlau 99,9%) y una mezcla hidroalcohólica al 10%. Esta mezcla fue filtrada, centrifugada (5000 rpm/5 min) y el sobrenadante fue concentrado a 50 °C hasta obtener un polvo rojizo.

Cuando se utilizó acetato de etilo como solvente, prácticamente no se observó ninguna extracción, por lo que se procedió a filtrar la mezcla y se secó el residuo sólido obtenido.

### 2.2 Medida de la actividad antioxidante

Se siguió el método de Brand-Williams modificado por Sandoval [12,13]. Se mezcló 0,2 g de muestra extraída con 4 mL de una mezcla hidroalcohólica al 10% y se filtró con papel Wattmann.

Se preparó una solución stock de 2,2-Difenil-1-picrilhidracil, DPPH 1mM en etanol y se almacenó a 4°C protegiéndola de la luz. A partir de la solución stock se preparó 20 mL de DPPH 100 µM en etanol. 975 µL de esta solución se agregó a 25 µL de la solución de la muestra a estudiar y se leyó la absorbancia a 515 nm. Todos los extractos fueron medidos por duplicado a diferentes concentraciones de 0,3; 1; 5, 10 y 15 µg/mL. Con los valores de absorbancia obtenidas se determinó el porcentaje de captación de radicales libres (DPPH•), mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = ((A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}) * 100,$$

donde  $A_{\text{control}}$  es la absorbancia de la solución de DPPH, y  $A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia de la muestra luego de 15 min.

### 2.3 Medida del contenido de polifenoles totales

Se siguió el método de Folin-Ciocalteu [14].

Preparación de la curva de calibración: se prepararon soluciones de 50-1000 mg/L de ácido gálico en EtOH.

Preparar tubos de ensayo con 1,58 mL de agua destilada y agregar 20 µL de muestra, control o estándar. Luego añadir 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu, esperar 1 min y añadir 300 µL de carbonato de sodio al 20% (p/v). Luego de 2 h se agregó 1 mL de estas soluciones en una cuveta y se midió la absorbancia a 765 nm y se introdujo en la curva de calibración para calcular el contenido de polifenoles totales expresados en equivalente de ácido gálico (EAG) por gramo de muestra.

### 2.4 Actividad antimicrobiana

Se prepararon soluciones hidroalcohólicas de los extractos (0,1 g en 10 mL) y se introdujeron películas de quitosano-alcohol polivinílico, 3x3 cm<sup>2</sup>, por 20 minutos [15]. Luego estas películas fueron cortadas en discos de 0,8 mm de diámetro.

Se preparó un inóculo de  $1 \times 10^8$  UFC/mL de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que fue sembrado con la ayuda de una torunda sobre placas de agar Muller Hinton previamente incubadas. Luego se colocaron los discos de las películas embebidas sobre las placas, se dejó incubando a 37 °C por 24 horas y se midieron los halos de inhibición.

## 3. Resultados y Discusión

El rendimiento de las extracciones fue de 62% con metanol, 70% con etanol y 100% con la solución hidroalcohólica al 10%; mientras que lo recuperado luego del "lavado" con acetato de etilo fue de 95%.

La inhibición de los radicales libres de DPPH es determinado por la decoloración de la solución de violeta a amarillo, el cual es medido espectrofotométricamente a 515 nm. A medida que hay un mayor secuestro de los radicales libres por un antioxidante, la absorbancia disminuye.

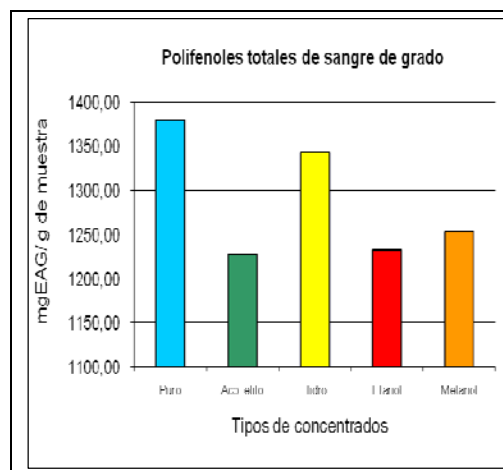
La actividad antioxidante de las diferentes muestras de sangre de grado, a diferentes concentraciones, se muestran en la tabla 1. Se observa que la fracción que presenta el mayor porcentaje de inhibición de los radicales libres del DPPH son la que fueron extraídas con etanol y metanol, seguidas por las fracciones hidroalcohólicas y el látex original, y luego el residuo obtenido del tratamiento con acetato de etilo. Para una concentración de 10 µg/mL se observa mejor estas diferencias.

La fracción que presentó el mayor contenido de polifenoles totales fue el látex de sangre de grado original, seguido de la fracción hidroalcohólica, metanólica, etanólica y del residuo obtenido luego del tratamiento con acetato de etilo, figura 1.

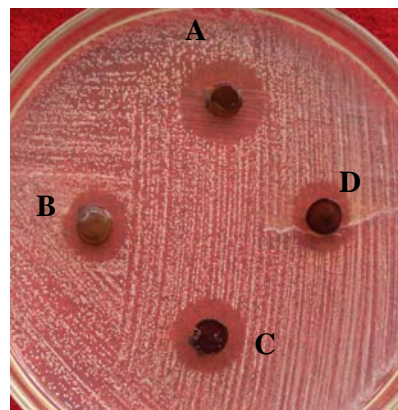
Los extractos etanólico y metanólico presentan actividad antimicrobiana frente a la cepa de *S. aureus*, pero esta actividad se ve disminuida respecto al hidrogel embebido directamente con una solución hidroalcohólica de sangre de grado en polvo sin ningún tratamiento (A), figura 2. Mientras que A presenta un halo de aproximadamente 17-18 mm de diámetro, los demás extractos se encuentran entre 13-15 mm. Esto se observa mejor en las películas preparadas con 20 mL de mezcla de polímeros, mientras que los preparados con 30 mL presentan halos con diámetros menores.

En el caso de las películas embebidas con la muestra "lavada" con acetato de etilo, se observa actividad antimicrobiana frente a la misma cepa y con la misma dimensión que los obtenidos con los otros extractos. Esto es un poco sorprendente ya que esta fracción es la que presenta menor capacidad antioxidante y menor contenido de fenoles totales.

Como en experiencias anteriores, las películas con sangre de grado no han mostrado actividad antimicrobiana frente a las cepas de *E. coli* y *P. Aeruginosa* [9-11].



**Figura 1.** Contenido polifenoles totales de sangre de grado concentrado determinado mediante el método Folin-Ciocalteu.



**Figura 2.** Actividad antimicrobiana de películas embebidas en soluciones hidroalcohólicas sangre de grado (A), en extracto etanólico (B), extracto metanólico (C) y muestra tratada con acetato de etilo (D), frente a *S. Aureus*.

**Tabla 1.** Porcentaje de inhibición de las fracciones de sangre de grado en función de la concentración.

Concentración (µg/ml)	% de Inhibición de los radicales libres de DPPH Fracciones de Sangre de Grado				
	Puro	Acetato de etilo	Hidroalcohólico	Etanol	Metanol
0,3	9,4	4,4	10,9	12,4	7,9
1	16,6	10,3	16,4	19,4	15,4
5	39,6	31,4	44	46,8	43,7
10	59,6	47,4	60,3	67,9	66,8
15	88,9	69	82,2	90,6	89,8

#### 4. Conclusiones

Las fracciones de sangre de grado obtenidas por extracción, a partir de sangre de grado en polvo, con etanol, metanol, solución hidroalcohólica y por tratamiento con acetato de etilo presentan características diferentes. La fracción etanólica presenta la mayor actividad antioxidante, mientras que el latex original presenta el mayor contenido de polifenoles totales. En cambio, la solución hidroalcohólica presenta mayor actividad antimicrobiana, frente a *S. aureus*, que los otros extractos.

#### 5. Bibliografía

- [1] Gupta D, Bleakley B, Gupta R. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008; 115:361-380.
- [2] Chen Z, Cai Y, Phillipson J. Studies on the anti-tumour, anti-bacterial, and wound-healing properties of dragon's blood. *Planta Medica*. 1994; 60(6):541-545.
- [3] Vaisberg A, Milla M, Planas M, Cordova J, Rosas de Agusti E, Ferreyra R, Mustiga M, Carlin L, Hammond G. Taspine is the cicatrizant principle in Sangre de Grado extracted from *Croton lechleri*. *Planta Medica*. 1989; 55:140-143.
- [4] Cai Y, Evans F, Roberts M, Phillipson J, Zenk M, Gleba Y. Biological and chemical investigation of Dragon's Blood from *Croton* species of South America. Part 1. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. *Phytochemistry* 1991; 30:2033-2040.
- [5] De Marino S, Gala F, Zollo F, Vitalini S, Fico G, Visioli F, Iorizzi M. Identification of minor secondary metabolites from the latex of *Croton lechleri* (Muell-Arg) and evaluation of their antioxidant activity. *Molecules* 2008; 13: 1219-1229. Disponible en [www.mdpi.org/molecules/papers/13061219.pdf](http://www.mdpi.org/molecules/papers/13061219.pdf)
- [6] Ubillús R, Jolad S, Bruening R, Kernan M, King S, Sesin D. SP-303, an antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (sangre de drago). *Phytomedicine*. 1994; 1:77-106.
- [7] Zapata R. Actividad antimicrobiana in vitro de la droga comercializada como Sangre de Grado. [Tesis Químico Farmacéutico]. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1987.
- [8] Tamariz J, Capcha R, Palomino E, Aguilar J. Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (*Croton lechleri*) frente al *Helicobacter pylori*. *Revista Medica Herediana*. 2003; 81-88.
- [9] León K, Santiago J. Propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas en extracto de sangre de grado. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2007; 73(3):158-165.
- [10] Rojas N, León K, Villacaqui E, Santiago J. Tratamiento de quemaduras con películas de quitosano-alcohol polivinílico conteniendo sangre de grado: Estudio preliminar. En: Instituto Peruano de Energía Nuclear. Informe Científico Tecnológico 2007. Lima: IPEN; 2008. p. 211-215.
- [11] León K, Castillo P, Santiago J. Efecto de la radiación gamma en la actividad antimicrobiana y antioxidante de la sangre de grado. En: Instituto Peruano de Energía Nuclear. Informe Científico Tecnológico 2007. Lima: IPEN; 2008. p. 187-191.
- [12] Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie. Food Science and Technology*. 1995; 28:25-30.
- [13] Sandoval M, Okuhama N, Angeles F, Melchor V, Candezo L, Lao J, Miller M. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry*. 2002; 79:207-213.
- [14] Vásquez A, Cala M, Miranda I, Tafurt G, Martínez J, Stashenki E. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia Sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*. *Scientia et Technica*. 2007; 33:205-207. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/849/84903354.pdf>
- [15] Carhuapoma W, Santiago J. Caracterización de hidrogeles de quitosano - alcohol polivinílico obtenidos por radiación gamma. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 2005; 6:333-346.