
Actividad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. (cadillo).

In vitro antioxidant activity of the ethanolic extract of *Cenchrus echinatus* L. (cadillo).

A actividade antioxidante *in vitro* do extracto etanólico *Cenchrus echinatus* L. (cadillo).

César Braulio Cisneros Hilario^{1,2}, Jorge Luis Arroyo Acevedo¹.

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la actividad antioxidante *In vitro* del extracto etanólico del *Cenchrus echinatus* (cadillo), el que se desarrolló en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú. La actividad antioxidante *in vitro* se evaluó mediante los ensayos de captación de radicales DPPH y ABTS, utilizando como control positivo Trolox. La principal medida de resultados fue la determinación de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) del extracto etanólico de cadillo frente sobre el radical DPPH y ABTS. Obteniéndose una actividad antioxidante de 92.90 % frente al Trolox a una concentración de 12.50 µg/mL y de 64.59 % a una concentración de 130 µg/mL de extracto de cadillo, así mismo se encontró CI₅₀ de 4.40 µg/mL para Trolox y de 98.10 µg/mL para el extracto. Por lo tanto se ha demostrado que el extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. (cadillo), presenta efecto antioxidante.

Palabras clave: Actividad antioxidante, extracto etanólico, *Cenchrus echinatus* L. DPPH, ABTS

Abstract

The present work aimed to determine the *in vitro* antioxidant activity of the ethanolic extract of *Cenchrus echinatus* L. (cadillo), which was developed in the Laboratory of Pharmacology of the Faculty of Medicine of the National University of San Marcos, Lima, Peru. Antioxidant activity *in vitro* was evaluated by the DPPH and ABTS radical uptake assays using Trolox as a positive control. The main measure of results was the determination of the inhibitory concentration 50 (IC₅₀) of the ethanolic extract of cadillo front on the radical DPPH and ABTS. An antioxidant activity of 92.90% against Trolox at a concentration of 12.50 µg/mL and of 64.59% at a concentration of 130 µg/mL of cadillo extract was obtained, as well as IC₅₀ of 4.40 µg/mL for Trolox and 98.10 µg/mL for the extract. Therefore, the ethanolic extract of *Cenchrus echinatus* L. (cadillo) has been shown to have an antioxidant effect.

Keywords: Antioxidant activity, ethanolic extract, *Cenchrus echinatus* L. DPPH, ABTS

Resumo

Este estudo teve como objetivo determinar a atividade antioxidante *in vitro* de extrato etanólico de *Cenchrus echinatus* (cadillo), que foi desenvolvido no laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Nacional de San Marcos, Lima-Peru. A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada por meio de ensaios de absorção e DPPH ABTS radicais, utilizando Trolox como um controle positivo. O desfecho primário foi a determinação da concentração inibidora 50 (CI₅₀) do extracto etanólico em cardo contra radical DPPH e ABTS. A obtenção de atividade antioxidante de 92,90% em comparação com Trolox, a uma concentração de 12,50 mg/ml e 64,59% para uma concentração de 130 ug/mL de extracto de cardo, de igual modo IC₅₀ encontrado foi 4,40 mg/mL para Trolox e 98,10 g/mL para o extracto. Assim, tem sido mostrado que o extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. (cadillo) tem efeito antioxidante.

Palavras-chave: atividade antioxidante, extracto etanólico, *Cenchrus echinatus* L. DPPH, ABTS

¹ Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú, cbraulio_cisnerosh@hotmail.com, ccisneros@sineace.gob.pe

² Dirección de Evaluación y Certificación de la Educación Superior Universitaria. DEC-ESU-SINEACE, Lima-Perú.

**Recibido el 30 de marzo de 2017
Aceptado el 16 de junio del 2017**

Introducción

Hoy en día las plantas medicinales y sobretodo sus metabolitos secundarios son de gran interés por su uso farmacológico, de las cuales 120 aproximadamente son utilizados en la industria farmacéutica (Wang *et al.*, 2011). Se ha demostrado que los compuestos fenólicos poseen gran actividad antioxidante, y son componentes importantes en nuestra alimentación. Asimismo es utilizado para tratar algunas enfermedades cancerígenas y desordenes cardíacos (Agarwal, 2002).

Nuestro organismo está expuesto a una gran variedad de especies reactivas oxigenadas y nitrogenadas que pueden generarse a partir de fuentes endógenas, relacionadas con el metabolismo del oxígeno y con las diversas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunitario, o de fuentes exógenas, como el tabaco, la contaminación del aire, la radiación UV, el ozono y ciertos medicamentos (De Souza, et al., 2004).

Aunque la exposición a las especies reactivas oxigenadas procedentes de fuentes exógenas sea extremadamente elevada, la exposición a fuentes endógenas es mucho más importante y extensa, debido a que es un proceso que se da de forma continua en las células de nuestro organismo a lo largo de la vida (Loizzo, et al., 2008).

El daño causado por el ataque de especies reactivas oxigenadas y nitrogenadas (SRO y SRN) puede originar lesiones en el ADN, pérdida de función de enzimas, incremento de la permeabilidad celular, disrupción de la señalización en la célula y, en ocasiones, muerte celular necrosis o apoptosis. Por tales motivos, estas especies reactivas se relacionan con enfermedades como el cáncer, la diabetes, entre otras (Martínez, 2005).

El oxígeno es esencial para los organismos vivos, sin embargo, la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y radicales libres (RL) es inevitable en el metabolismo aeróbico, estas especies provocan daños acumulativos en moléculas como proteínas, lípidos y ADN. No obstante, el organismo tiene sus propios mecanismos de defensa. En determinadas situaciones las defensas antioxidantes pueden verse desbordadas por la excesiva generación de ERO. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, el cual está asociado a numerosas enfermedades y al proceso normal de envejecimiento. (Lee et al., 2004).

Los polifenoles ejercen efecto antioxidante al neutralizar directamente los radicales libres causando la quelación de metales. Así mismo interactúan con las vías de señales celulares estimulando las defensas antioxidantes endógenas celulares, limitando el riesgo de daño oxidativo producido por los radicales libres. Modulan la proliferación celular y la prevención de diversos tipos de cáncer. Por otro lado, sus efectos prooxidantes, pueden inducir apoptosis evitando el desarrollo del crecimiento tumoral (Weng, 2012).

Múltiples estudios han evidenciado que el *Cenchrus echinatus* L, posee abundante cantidad de compuestos fenólicos (Cisneros & Córdova, 2011; Cisneros y col, 2013 & Cisneros y col 2015), además de haber demostrado actividad antineoplásica frente al cáncer de mama (Aggarwal, 2003), además de constituirse a los productos vegetales como una nueva alternativa para tratar múltiples enfermedades, entre ellas el cáncer de mama, por tales motivos nos propusimos evaluar la actividad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico *Cenchrus echinatus* L. (cadillo).

Material y Métodos

Para determinar la actividad antioxidante *in vitro* del extracto etanólico de obtenido de la planta completa de cadillo se utilizó la prueba de inhibición del radical DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidracilo) de Brand-Williams, 1995 con modificaciones, el que fue expresado como concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) µg de extracto/mL, este valor corresponde a la concentración del extracto que reduce en un 50% la absorbancia de una solución metanólica de DPPH a 517nm, con una absorbancia inicial de 0.600 utilizando como estándar el reactivo TROLOX (6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid).

La de actividad antioxidante se determinó aplicando la siguiente fórmula: AA% = 100-((Am-Ab)x100/A control); donde: AA% = porcentaje de actividad antioxidante, Am = Absorvancia de la muestra, Ab = Absorvancia del blanco, A control = Absorbancia del reactivo DPPH.

Para determinar la curva de calibración, se preparó una solución del Trolox 1 mM o 250 ug/ML de la cual se realizan 5 diluciones por cada concentración, haciendo reaccionar 300 uL de Trolox con 2700 uL de DPPH. Se mantuvo en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente, realizando la lectura en un espectrofotómetro UV/VIS a 517 nm.

Para la determinación de la CI50, se realizaron diluciones del extracto de *Cenchrus echinatus* L. a concentraciones de 1.56, 3.12, 6.25 y 12.50 ug/mL, para lo cual se trabajó con 300 uL de muestra de cada uno de las diferentes diluciones y se hizo reaccionar con 2700 uL de DPPH, manteniéndolo en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente, para después realizar la lectura en un espectrofotómetro UV/VIS a 517 nm.

La reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS), se fundamenta en la generación del radical ABTS⁺ mediante la adición de persulfato de potasio antes de la adición de la muestra, lo que evita que el componente de la misma pueda reaccionar con el reactivo, a pH = 7.1 y 37 °C simulando las condiciones fisiológicas. Para lo cual se preparó el reactivo ABTS⁺ 7 mM, el que logró diluyendo 0.0154 g ABTS con 4 mL de agua ultra pura, luego se adicionó 0,0027 g de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) y se agitó 30 minutos y se dejó reposar en oscuridad, durante 12 a 18 horas. Posteriormente se toma una alícuota de 1 mL y se adiciona 70 mL de agua destilada y se mide la absorbancia a 734 nm el cual debe estar entre 0,7 ± 0,02.

Para la reacción entre el Trolox con ABTS, para lo cual se procedió a preparar diluciones por triplicado de una muestra patrón de Trolox 1 mM de las cuales se midió 1960 uL de la solución ABTS y se mezcló con 40 uL de Trolox. Se homogeneizó por 1 minuto y se midió la absorbancia a 7 minutos de reacción, a 734 nm. De la misma manera se pesó una cantidad de extracto de cadillo y se disolvió con metanol de lo cual se hizo reaccionar 1960 uL de la solución ABTS con 40 uL del extracto diluido, se homogenizó por 1 minuto y se midió la absorbancia a 7 minutos de reacción, a 734 nm. Y se determinó la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC). (Arnao, 2003).

Resultados

Tabla 1. Marcha fitoquímica del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L.

Reacción de identificación	Metabolito Secundario	Cantidad
Gelatina	Taninos	+++
Tricloruro férrico	Compuestos Fenólicos	+++
Dragendorff	Alcaloides	+++
Mayer	Alcaloides	+++
Hidróxido de sodio	Quinonas	++
Alfa naftol	Glicósidos	++
Liebermann	Esteroides y triterpenos	-
Shinoda	Flavonoides	+++
Ninhidrina	Aminoácidos libres	+++

Leyenda: (+++) = Abundante cantidad; (++)=Regular cantidad o positivo, (+)=Poca cantidad o trazas; (-)=Ausencia.
Tomado de Cisneros y col, 2015.

Tabla 2. Inhibición del radical DPPH frente al trolox

Concentración Trolox µg/mL	Abs (nm)	% AA
12.5	0.044	92.9
6.25	0.196	68.6
3.125	0.386	38.1
1.5625	0.493	21.0
0	0.624	0.0

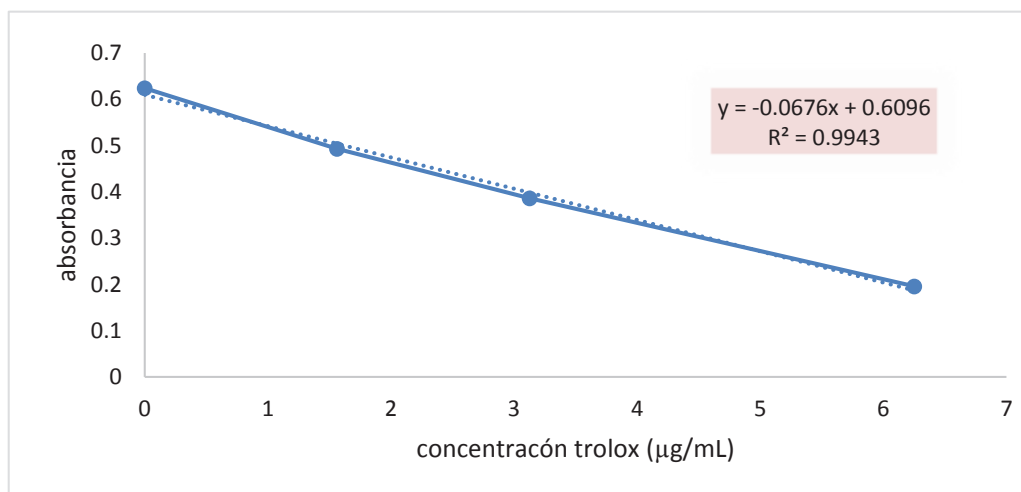


Figura 2. Curva de calibración de Trolox por el método de DPPH.

Tabla 3. Inhibición del radical DPPH frente al extracto etanólico de cadillo

Extracto etanólico cadillo µg/mL	Abs	% AA
130	0.216	64.59
65	0.394	35.41
32.5	0.482	20.98
16.25	0.56	8.20
0	0.61	0.00

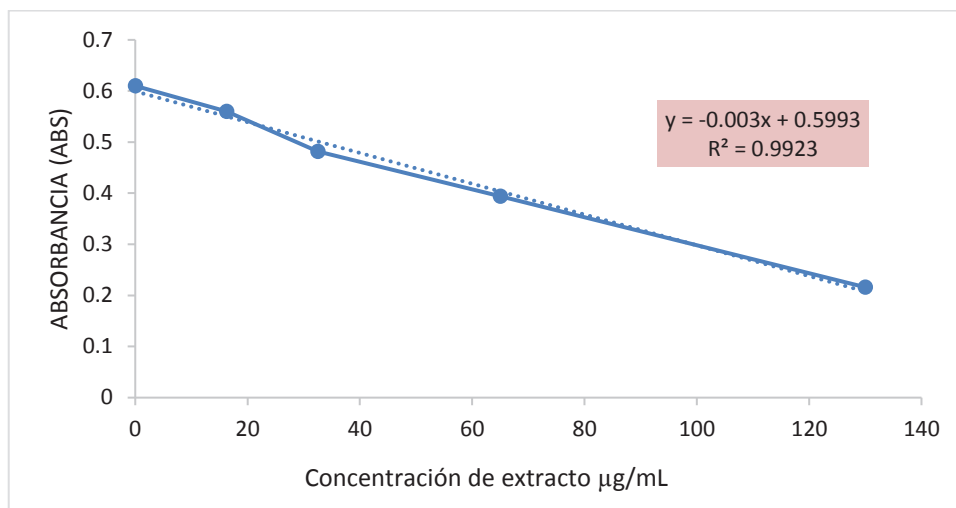


Figura 2. Curva de calibración de extracto etanólico de cadillo por el método de DPPH.

Tabla 4. Determinación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical 1,1 difenil-2-picri-hidrazil (DPPH) del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L.

Sustancia Ensayada	Concentración (µg/mL)	Porcentaje de actividad antioxidante (%AA)	CI ₅₀ (µg/mL)
Trolox	12.50	92.90	4.40
	6.25	68.60	
	3.13	38.10	
	1.56	21.00	
	0.00	0.00	
Extracto	130.00	64.59	98.10
	65.00	35.41	
	32.50	20.98	
	16.25	8.20	
	0.00	0.00	

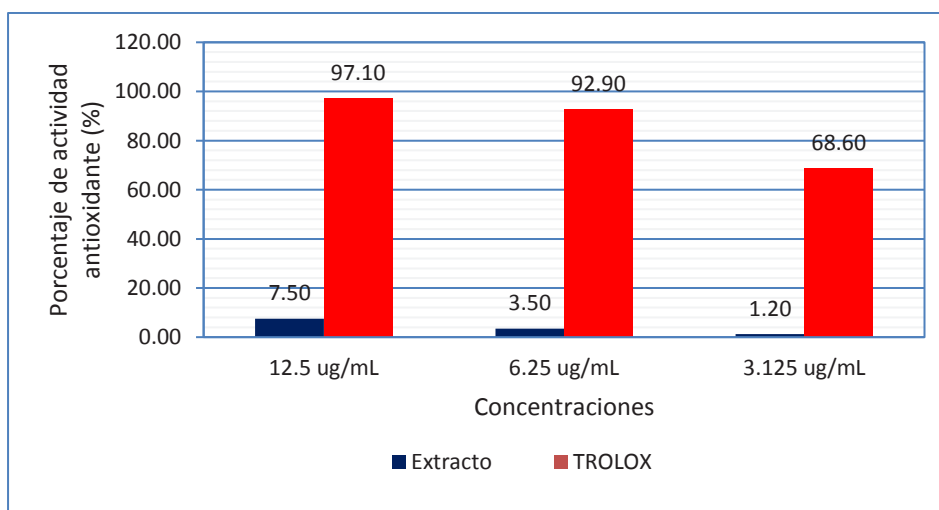


Figura 03. Comparación de la actividad antioxidante mediante la captación del radical DPPH del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L.

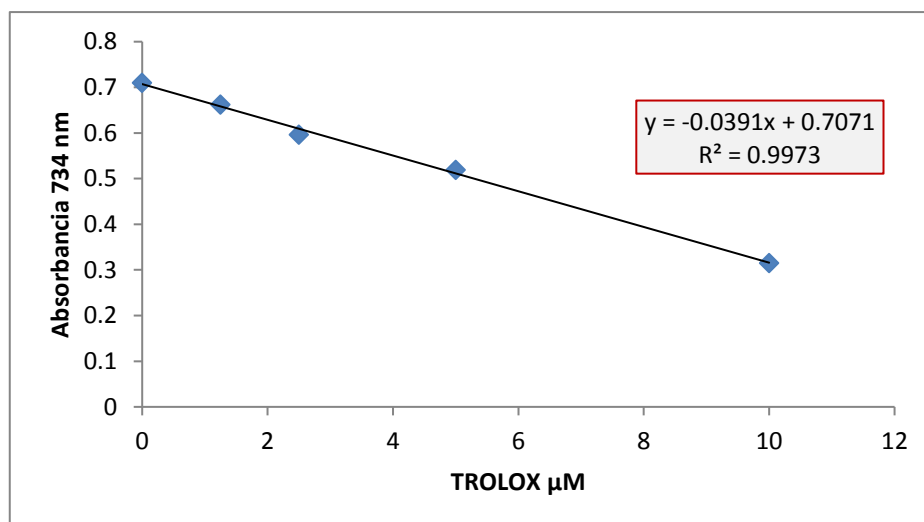


Figura 4. Inhibición del radical ABTS frente al Trolox

Tabla 5. Determinación de la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) en el extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L.

Ecuación de la recta del estándar Trolox: $y = -0.0391x + 0.7071$			
Peso de muestra	120 mg		
Absorbancia de la muestra	0.210	0.211	0.195
Factor de dilución (FD)	10	10	10
μM equivalente a Trolox	12.71	12.69	13.10
μM equivalente a Trolox X FD	127.14	126.88	130.97
mg de extracto / mL	60 mg/mL		
μM Trolox /g extracto	2.12	2.11	2.18
μM Trolox /g extracto	2.14 \pm 0.03		

Discusión

La marcha fitoquímica del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. (Tabla 1) evidenció la presencia de metabolitos secundarios, tales como grupos taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides y aminos libres en abundante cantidad, así como quinonas y glicósidos en regular cantidad.

En la tabla 4 y figura 3. Se observa una actividad antioxidante de 92.90 % frente al Trolox a una concentración de 12.50 $\mu\text{g/mL}$ y de 64.59 % a una concentración de 130 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de cadillo, así mismo se encontró CI_{50} de 4.40 $\mu\text{g/mL}$ para Trolox y de 98.10 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto de cadillo, todo esto puede deberse a la complejidad estructural de los de los metabolitos secundarios, entre ellos a los polifenoles donde sus moléculas varían entre estructuras simples como el ácido gálico hasta complejas como son los taninos, con alta capacidad antioxidante (Tan et al., 2013), de la misma forma el extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. también evidencia elevada concentración de estos metabolitos (Cisneros y col, 2013).

La actividad antioxidante de sus polifenoles se asocia con sus características estructurales. Las estructuras que poseen grupos hidroxilos en las posiciones γ'' y $4''$ del anillo B y OH en C-3 e insaturación del anillo C, permiten estructuras mesoméricas estables con capacidad eficiente de captura de radicales libres, requisito para una máxima capacidad antioxidante (Dahlawi et al., 2012).

Es conocido que el estrés oxidativo no solo induce daños celulares a través del daño a proteínas, lípidos y ADN. También puede alterar vías de señales sensibles a cambios redox implicadas en la respuesta de la apoptosis. En este sentido, las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden ser los desencadenantes del proceso apoptótico (Díaz & Salirrosas, 2012).

En los últimos años han sido descritas numerosas propiedades de estos compuestos, como la posibilidad de inhibir el ciclo celular, la proliferación celular y el estrés oxidativo, y de inducir la detoxificación de enzimas, la apoptosis, y de estimular el sistema inmune (Del Río et al., 2009).

Las actividad antioxidante y anticarcinogénica de los polifenoles de la dieta han sido ampliamente estudiadas en diferentes líneas celulares y en animales de experimentación. Además, diversos estudios epidemiológicos han mostrado una asociación entre el consumo de alimentos y bebidas ricos en polifenoles y la disminución del riesgo de padecer enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo, como el cáncer.

Conclusión

Por lo tanto, el extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. (cadillo), presenta actividad antioxidante *in vitro*.

Referencias bibliográficas

- Aggarwal, B. B., Kumar, A., Bharti, A. C. (2003). Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2003; 23(1A):363-98.
- Arnao, I., Seminario, J., Cisneros, R., Trabucco. (2011). Potencial antioxidante de 10 accesiones de yacón, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson, procedentes de Cajamarca-Perú. *An Fac med.* 72(4):239-43.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 22, 25-30.
- Cisneros, C., Arroyo, J., Carrillo, K. (2015). Efecto hipolipemiante del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. “cadillo” en ratas. *Rev. Conocimiento para el desarrollo*, 6(2):57-64. Universidad San Pedro. Chimbote-Perú.
- Cisneros, C., Arroyo, J., Fernández, A., Silva, P. (2013). Efecto protector del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. “cadillo” sobre la cirrosis hepática inducida en rata. *Rev. Conocimiento para el desarrollo*, 4(1):45-52. Universidad San Pedro. Chimbote-Perú.
- Cisneros, C., Córdova, E. (2011). Efecto protector del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. (cadillo) sobre las lesiones gástricas inducidas por indometacina y etanol en ratones. *Rev. Conocimiento para el desarrollo*, 2(1):99-108. Universidad San Pedro. Chimbote-Perú.

- Dahlawi H, Jordan-Mahy N, Clench MR, Le Maitre CL. (2012) Shares bioactive extracts of pomegranate fruit in leukemia cell lines *in vitro* are promising for new therapeutic agents for leukemia. *Nutr Cancer*; 64:100-10.
- Del Rio, D., Valtuena, S., Pellegrini, N., Bianchi, M. A., Ardigo, D., Franzini, L., et al. (2009). Intervention study with a high or low antioxidant capacity diet: effects on circulating b-carotene. *European Journal of Clinical Nutrition*, 5, 63–1220.
- De Sousa AC, Alviano DS, Blank AF, Alves PB, Alviano CS, Gattas CR. (2004). “Melissa officinalis L. Essential oil antitumoral and antioxidant activities,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (9): 2485–2489.
- Diaz, S., Salirrosas, M. (2012). Cáncer de próstata metastásico asociado a valores bajos de antígeno prostático específico. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 29(4):571-4.
- Lee, J., Koo, N., Min, D.B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3:21-33.
- Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. (2008). Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. *Cell Proliferation*. 41(6): 1002–1012.
- Martinez ME. (2005). Primary prevention of colorectal cancer: lifestyle, nutrition, exercise. *Recent Results Cancer Res*. 166:177-211.
- Tan LY, Yin WF, Chan KG. (2013). Piper nigrum, Piper betel and gnetum - natural food sources with anti-quorum sensing. *Sensors (Basel)*. 20; 13:3975-85.
- Wang, O., Liu, S., Zou, J., Lu, L., Chen, L., Qiu, S., et al. (2011). Anticancer Activity of 2a, 3a, 19b, 23b-Tetrahydroxyurs-12-en-28-oic Acid (THA), a Novel Triterpenoid Isolated from *Sinojackia sarcocarpa*. *PLoS ONE* 6(6): e21130. doi:10.1371/journal.pone.0021130.
- Weng, C.J., Yen, G.C. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treat Rev*. 38(1) :76-87.