

Trabajo científico

Capacidad antioxidante y antibacteriana de extractos de residuos de candelilla

Antioxidant and antibacterial capacity of candelilla extracts residues

Edgardo A. Burboa,¹ Juan A. Ascacio-Valdés,² Alejandro Zugasti-Cruz,² Raúl Rodríguez-Herrera,² Cristóbal N. Aguilar²

¹Programa de Ingeniería Forestal con énfasis en Biotecnología. Universidad Autónoma Indígena de México, Mochicahui, El fuerte, Sinaloa, México

²Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México

Resumen

En este trabajo se obtuvieron extractos de tallos de candelilla sin cera. Éstos fueron obtenidos a reflujo con etanol 50 % a temperatura ambiente, los extractos fueron tratados con autoclave para hidrolizar los compuestos obtenidos y usarlos en pruebas posteriores, la determinación de capacidad antioxidante, capacidad hemolítica y capacidad antimicrobiana. En cuanto a la capacidad antioxidante, el extracto hidrolizado a 100 °C por 15 minutos (E15) fue el que mostró la mayor capacidad antioxidante. El máximo valor para la prueba de hemólisis se obtuvo con el extracto hidrolizado a 100 °C por 5 minutos (E5), éste fue el más tóxico para las células sanguíneas. La actividad antimicrobiana fue evaluada contra *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis* y *Xanthomonas axonopodis*. Todos los extractos presentaron actividad antimicrobiana, la más clara contra *Clavibacter michiganensis*.

Abstract

In this work, extracts of candelilla stalks without wax were obtained. The extracts were obtained in reflux conditions with 50 % ethanol at room temperature, the extracts were treated with autoclave for hydrolyzing the obtained compounds and used in subsequent tests, the determination of antioxidant capacity, hemolytic capacity and antimicrobial capacity. In the antioxidant capacity, the extract hydrolyzed at 100 °C for 15 minutes (E15) showed the highest antioxidant capacity. The maximum value for the hemolysis test was obtained with the extract hydrolyzed at 100 °C for 5 minutes (E5), it was more toxic to the blood cells. The antimicrobial capacity was evaluated against *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis* and *Xanthomonas axonopodis*. All extracts showed antimicrobial capacity, the highest against *Clavibacter michiganensis*.

Palabras clave: tallos de candelilla sin cera, capacidad antioxidante, capacidad hemolítica, capacidad antimicrobiana.

Key words: candelilla stalks without wax, antioxidant capacity, hemolytic capacity, antimicrobial capacity.

Correspondencia:

Dr. Juan A. Ascacio-Valdés
Departamento de Investigación en Alimentos
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Coahuila
Blvd. V. Carranza s/n Col. República Oriente C.P. 25280,
Saltillo, Coahuila
Tel. 844 416 12 38, Fax: 844 415 95 34
e-mail: alberto_ascaciovaldes@uadec.edu.mx

Fecha de recepción: 16 de diciembre de 2013
Fecha de recepción de modificaciones: 24 de abril de 2014
Fecha de aceptación: 9 de mayo de 2014

Introduction

La candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) es una especie vegetal de gran importancia económica en el norte de México. Se utiliza para la extracción de cera de candelilla la cual se emplea para diversos fines en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, así como también para aplicaciones tradicionales terapéuticas. La extracción de cera de candelilla genera 140 toneladas de residuos (tallos sin cera) que generalmente se destinan al desecho, sin embargo, se ha demostrado que los tallos de candelilla sin cera tienen un alto contenido de fitoquímicos, principalmente compuestos polifenólicos como los elagitaninos y el ácido elágico¹ (figura 1) que le dan un valor agregado a dicho residuo. En los últimos años los elagitaninos y el ácido elágico han tenido gran aplicación en diferentes ramas de la industria, como la alimentaria, farmacéutica y cosmética principalmente, debido a que poseen un alto potencial antioxidante el cual desempeña un papel muy importante contra el estrés oxidativo, el cual tiene incidencia directa en el desarrollo de diferentes líneas de cáncer.² También se ha reportado que estos compuestos tienen un efecto positivo en contra de afecciones inflamatorias, cardiovasculares y neurodegenerativas,³ así como también es conocida la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno causada por la exposición a diferentes agentes endógenos (ejercicio excesivo e isquemia, inclusive la digestión de algunos alimentos y la misma respiración)⁴ y exógenos (como el tabaquismo, consumo de algunas drogas, exposición a radiación ionizante y rayos ultravioleta), causando daños a moléculas importantes como el DNA, causando desórdenes mutagénicos y el papel que desempeñan los elagitaninos y el ácido elágico en la prevención de este tipo de problemas es determinante.⁵ Otro aspecto importante de los elagitaninos y el ácido elágico es el potencial biológico que poseen en contra de microorganismos, se ha reportado que extractos de plantas como *Pteleopsis hylodendron* contienen principalmente derivados de ácido elágico activos contra ciertas bacterias patógenas como *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Salmonella pyogenes*.⁶

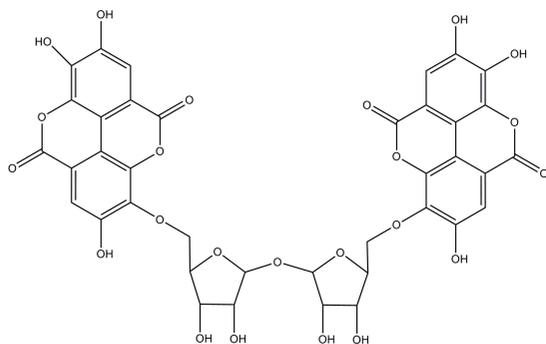


Figura 1. Elagitanino presente en los tallos de candelilla sin cera.

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad antioxidante, la capacidad hemolítica (para evaluar la toxicidad de los extractos de tallos de candelilla sin cera para su posible aplicación contra el estrés oxidativo) y la capacidad antimicrobiana, con el fin de establecer a los tallos de candelilla sin cera como fuente de obtención de compuestos de alto valor agregado con propiedades biológicas importantes con potencial aplicación en distintas ramas de la industria.

Material y métodos

Recolección del material vegetal

Los tallos de candelilla fueron recolectados en el km 66 de la carretera Saltillo-Monclova, Coahuila, en el ejido el Forlón, la planta se cortó desde la base de los tallos para evitar dañar las raíces (así lo recomienda la Norma Oficial Mexicana NOM-018-RECNAT-1999), las muestras se colocaron en bolsas negras para su almacenamiento en el laboratorio.

Extracción de la cera

La extracción fue realizada por el método tradicional con ácido sulfúrico. Los tallos fueron colocados en un contenedor de acero inoxidable y se sumergieron en una solución de ácido sulfúrico al 20 % en agua y se colocaron en una estufa de calentamiento hasta alcanzar el punto de ebullición. Se comenzó a observar una espuma grisácea en la superficie de la solución y ésta fue recolectada en vasos de precipitados, se solidificó y se obtuvo así la cera de candelilla.

Preparación del material vegetal

Los tallos residuales provenientes de la extracción de cera fueron lavados con agua destilada para la eliminación del excedente de ácido sulfúrico. Posteriormente los tallos se colocaron en una estufa de calentamiento a una temperatura de 60 °C por un periodo de 48 h para su deshidratación. Una vez deshidratados los tallos fueron molidos en un molino de cuchillas hasta obtener un polvo, éste fue almacenado en bolsas negras hasta su procesamiento.

Obtención de los extractos

En un matraz erlenmeyer de 250 mL se colocaron 80 mL de etanol al 50 %, se colocó en una parrilla de calentamiento hasta que alcanzó los 100 °C, enseguida se agregó a la solución 20 g de candelilla en polvo sin cera, se dejó 45 minutos en ebullición, se repuso la pérdida de etanol 50 % por evaporación cuando fue necesario; el extracto obtenido se pasó por papel filtro y en recipientes de vidrio se colocó en una estufa a 60 °C para la evaporación del etanol (aproximadamente 24 horas); se le agregaron 10 mL de agua destilada al líquido obtenido para disminuir su viscosidad.

El extracto obtenido anteriormente se distribuyó en cuatro tubos con tapón de rosca y a cada tubo se le dio un tratamiento de hidrólisis en autoclave como se muestra en la tabla 1.

Los extractos se guardaron en refrigeración (4 °C) y en ausencia de luz hasta su posterior uso.

Tabla 1. Tratamientos de los extractos obtenidos

Clave	Tratamiento
E0	Extracto sin tratamiento
E5	Hidrólisis a 100° C durante 5 minutos
E10	Hidrólisis a 100° C durante 10 minutos
E15	Hidrólisis a 100° C durante 15 minutos

Prueba de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos fue determinada por el método DPPH⁷ (1,1-difenil-1,2-picrilhidrazil), este compuesto es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y que absorbe radiación a 517 nm, de forma que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos. En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el extracto de candelilla sin cera, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debida a la cesión de electrones de las especies antioxidantes presentes en el extracto.

Para establecer la concentración inicial del DPPH se agregó en tubos de ensayo protegidos de la luz una solución de 100 µL de metanol al 100 % y 2.9 mL de DPPH 60 µM, la absorbancia fue monitoreada a 517 nm con la finalidad de observar el efecto de los extractos en el radical empleado. A su vez, se realizó una dilución 1:100 de cada extracto con agua destilada y se mantuvieron en oscuridad durante 30 minutos, posteriormente se procedió a leer la absorbancia a 517 nm.

Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de inhibición del radical DPPH causado por los extractos evaluados.

$$\%Inhibición = \left(\frac{Abs. Inicial - Abs. Final}{Abs. Inicial} \right) 100$$

Donde:

%inhibición = Porcentaje de inhibición del radical DPPH provocado por la muestra evaluada.

Abs.Inicial = Absorbancia a 517 nm de la concentración inicial del DPPH.

Abs.Final = Absorbancia a 517 nm de la concentración final del DPPH.

Ensayo de hemólisis y actividad antioxidante utilizando sulfato férrico

Se extrajeron 5 mL de sangre humana en tubos con anticoagulante EDTA de adultos saludables. Posteriormente la sangre fue centrifugada a 3000 g durante 5 min a 4 °C. El plasma contenido en el sobrenadante fue desechado y el paquete

de eritrocitos se lavó con 1 mL de solución Alsever (glucosa al 2.5 %, citrato de sodio al 0.8 %, disuelto en agua destilada estéril). Una vez lavados los eritrocitos fueron almacenados en solución Alsever por periodos no mayores de 7 días a 4 °C.

Los eritrocitos mantenidos en la solución de Alsever fueron centrifugados a 3000 g durante 5 min a 4 °C. El plasma del sobrenadante fue desechado y el paquete de eritrocitos se lavó con 1 mL de solución Alsever; el procedimiento fue repetido dos veces más.

Se tomaron 100 µL del pellet de eritrocitos y se diluyeron en 10 mL de solución Alsever, 150 µL de esta suspensión se diluyeron con diferentes concentraciones de solución Alsever y extractos de candelilla para evaluar la actividad hemolítica. Para la evaluación de la actividad antioxidante se utilizaron 100 µL de sulfato férrico (como agente inductor de la oxidación para la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de candelilla) a una concentración de 20,000 ppm, éste se diluyó con 150 µL de la solución anterior de eritrocitos y se mezclaron con las diferentes concentraciones de solución Alsever y extractos evaluados. Las muestras totales se llevaron hasta volúmenes de 2 mL.

Las concentraciones evaluadas para cada extracto fueron de 5 µg, 50 µg, 500 µg y 5000 µg. Se tomó un volumen de cada extracto equivalente a las concentraciones evaluadas.

Se utilizó la solución Alsever y eritrocitos como control negativo en ambas pruebas. En el ensayo de actividad hemolítica se usó como control positivo agua destilada y eritrocitos; mientras que para la actividad antioxidante se le agregó 100 µL de sulfato férrico 20,000 ppm a la solución Alsever y eritrocitos.

Todas las muestras fueron incubadas en baño de agua regulado con agitación constante a 37±0.5 °C durante 30 minutos y centrifugadas a 3000 g durante 5 min a 4 °C. La concentración de hemoglobina en el sobrenadante fue cuantificada por la lectura de la absorbancia a 415 nm.

Los datos obtenidos en los ensayos se procesaron con la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{Abs. Muestra - Abs. C -}{Abs. C + - Abs. C -}$$

Donde:

%H = Porcentaje de hemólisis o actividad antioxidante.

Abs.Muestra = Absorbancia de la muestra a 415 nm.

Abs.C+ = Absorbancia del control positivo a 415 nm.

Abs.C- = Absorbancia del control negativo a 415 nm.

Los resultados se analizaron con el programa estadístico SAS bajo un diseño de experimentos completamente al azar con tres repeticiones, se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple de medias con el método de Tukey, se analizó cada extracto por separado, y con un nivel de significancia del 95 %.

Actividad antimicrobiana

Los microorganismos utilizados en este trabajo fueron *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis* y *Xanthomonas axonopodis*; estas son consideradas especies fitopatógenas de interés agrícola y forestal. Las bacterias fueron facilitadas por el Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila, éstas estaban previamente identificadas y purificadas.

Para obtener el inóculo se preparó caldo de infusión cerebro-corazón en tubos con tapón de rosca, después se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Los tubos fueron inoculados con los microorganismos seleccionados y se incubaron por 24 horas. La suspensión de los inóculos fue conservada en refrigeración (4 °C) hasta su posterior uso.

La actividad antibacteriana de los extractos de candelilla sin cera fue evaluada por el método de difusión por disco. El medio de cultivo fue preparado con agar infusión cerebro-corazón adicionado con 1.5 % de agar bacteriológico, se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos; y se colocaron 20 mL del medio estéril en placas Petri, bajo condiciones de asepsia

Se agitaron los tubos que contenían la suspensión del microorganismo y se inocularon las placas Petri con ayuda de un hisopo estéril para conseguir un crecimiento bacteriano de modo masivo.

Se cortaron discos de papel filtro con un diámetro de 0.5 cm, fueron esterilizados y se sumergieron en los extractos E0, E5, E10 y E15; se utilizaron discos impregnados con un penicilina a 200 ppm como control positivo. Se colocaron los discos impregnados en las placas Petri usando pinzas estériles.

Una vez inoculadas las cajas y colocados los discos, éstas se incubaron a 37 °C por un periodo de 24 h, después se midió el diámetro del halo de inhibición de los discos.

Se calcularon los porcentajes de inhibición en relación con el control positivo de penicilina 200 ppm. Los experimentos se analizaron bajo un diseño completamente al azar con dos repeticiones, se realizó un ANOVA y una prueba de comparación múltiple de medias con el método de Tukey mediante el uso del programa estadístico (SAS).

Resultados y discusión

Actividad antioxidante

Después de procesar los datos con la fórmula antes mencionada, se obtuvieron los siguientes resultados (figura 2).

No se encontraron diferencias significativas entre el extracto sin hidrólisis y el extracto con 5 minutos de hidrólisis (91.45 %). A los 10 minutos de hidrólisis se observa la actividad antioxidante más baja (88.82 %), mientras que a los 15 minutos se observó la máxima actividad, ésta es de 92.33 %. La actividad antioxidante manifestada en los extractos es atribuida al contenido de polife-

noles presentes en el material vegetal evaluado, es bien sabido el potencial antioxidante de los polifenoles presentes en el reino vegetal.^{8,9}

Actividad hemolítica

Los resultados de la actividad hemolítica de los extractos se presentan en la siguiente figura (figura 3).

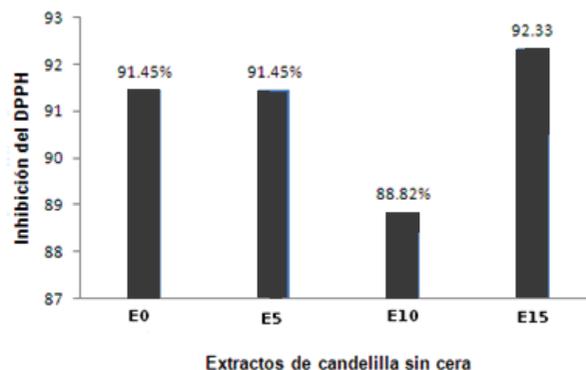


Figura 2. E0: extracto sin tratamiento; E5, E10 y E15: hidrólisis a 100 °C por 5, 10 y 15 minutos respectivamente

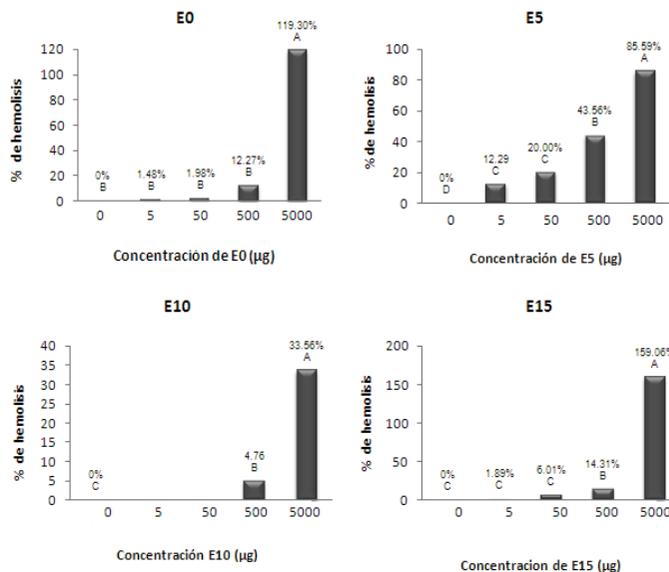


Figura 3. 0: control negativo eritrocitos y solución Alsever; E0, E5, E10 y E15: extractos de tallos de candelilla tratados a 0, 5, 10 y 15 minutos de hidrólisis a 100 °C respectivamente.

Es posible observar que a medida que se incrementa la dosis de los extractos el daño a las células de eritrocitos también incrementa. Sin embargo, también es evidente que algunas concentraciones de extractos no son significativamente diferentes al control negativo (E0, E10 y E15), esto significa que el extracto no está produciendo hemólisis a éstas concentraciones o el daño es muy bajo.

Actividad antioxidante utilizando sulfato férrico

Los datos obtenidos en ésta prueba fueron procesados, y se realizó análisis de varianza con un nivel de confiabilidad del 95 % utilizando el programa SAS, se determinó que todas las concentraciones de los extractos de candelilla sin cera son significativamente diferentes y que existen tratamientos diferentes a los demás.

Se realizó una prueba de comparación múltiple de medias con el método de Tukey con una confiabilidad del 95 %,

La prueba de Tukey mostró que en la muestra E0 que las concentraciones 5 μg , 50 μg y 500 μg son inferiores al daño producido en los eritrocitos por el hierro, esto puede deberse a algún mecanismo de protección contra efectos del hierro provocado por el extracto a esas concentraciones.^{10,11}

En los demás extractos utilizados (E5, E10 y E15) todas las concentraciones evaluadas no tuvieron diferencia significativa al control negativo o sus porcentajes de hemólisis fueron superiores, por lo que se obtuvo una hemólisis superior o igual a la producida por el hierro por sí solo, los resultados se muestran en la figura 4.

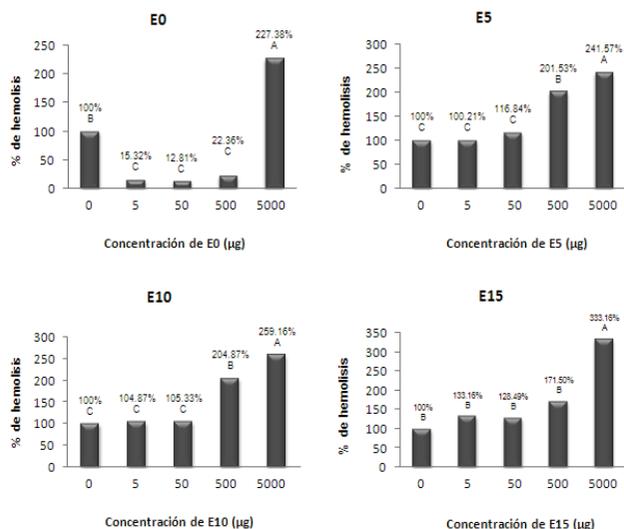


Figura 4: 0, Control positivo de eritrocitos (solución Alsever y sulfato férrico); E0, E5, E10 y E15: extractos de candelilla tratados a 0, 5, 10 y 15 minutos de hidrólisis a 100 °C respectivamente.

Actividad antimicrobiana

En el caso de la actividad antibacterial se observó que los tratamientos de hidrólisis en los extractos no influyen de manera significativa en la actividad antibacterial, E0, E5, E10 y E15 tienen potencial antibacterial similar, en el caso *Erwinia amylovora* y *Clavibacter michiganensis*. Para *Xanthomonas axonopodis* si se encontraron diferencias estadísticamente significativas y para esta bacteria los extractos evaluados tuvieron un comportamiento diferente.

Para encontrar los extractos significativamente diferentes se realizó una prueba de comparación múltiple de medias con el

método de Tukey, para la bacteria *Xanthomonas axonopodis*, los resultados mostraron que E0, E5 y E10 tienen medias similares y superiores a E15. Con este análisis realizado se demuestra que el contenido de compuestos presentes en los extractos de tallos de candelilla sin cera (principalmente compuestos fenólicos) fue capaz de inhibir el crecimiento microbiano, demostrando así el potencial antimicrobiano que tienen este tipo de compuestos contra bacterias de importancia biológica.^{12,13}

En la figura 5 se muestran de manera gráfica los resultados de los porcentajes de inhibición de los extractos de candelilla sin cera en los microorganismos evaluados.

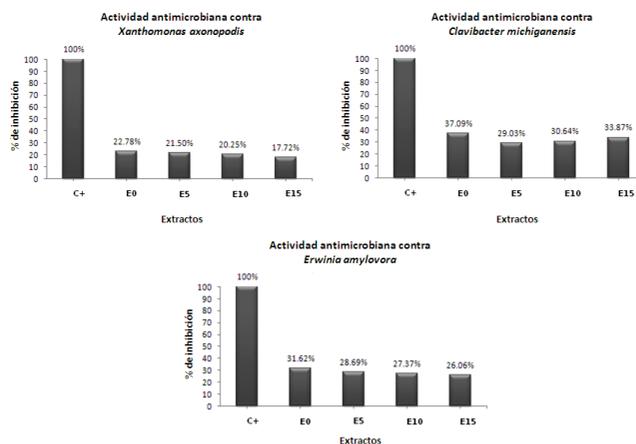


Figura 5. Actividad antimicrobiana de extractos de tallos de candelilla sin cera.

Conclusiones

En general todos los extractos muestran una actividad antioxidante aceptable. Todos los extractos evaluados presentaron hemólisis a la concentración de 5000 μg . El extracto de candelilla sin hidrólisis no fue hemolítico en las concentraciones 500 μg , 50 μg y 5 μg . Los resultados de la actividad antimicrobiana mostraron que los extractos de tallos de candelilla sin cera fueron efectivos contra *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas axonopodis* y *Clavibacter michiganensis*, siendo ésta última la bacteria más susceptible a dichos extractos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONACyT y al proyecto CONAFOR-CONACYT -2008 – 91633 “Diseño de un proceso de alto rendimiento en la extracción de cera de candelilla de alta calidad y formulación de productos de uso final a partir de cera de preparada” por el apoyo para el desarrollo de ésta investigación.

Referencias

1. Ascacio-Valdés J, Burboa E, Aguilera-Carbó AF, Aparicio M, Pérez-Schmidt R, Rodríguez R, Aguilar CN. Antifungal ellagitannin isolated from *Euphorbia antisyphilitica* Zucc. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013; 3(1): 41-46.
2. Huetz P, Mavaddat N, Mavri J. Reaction between ellagic acid and an ultimate carcinogen. *J Chem Inf Model*. 2005; (45): 1564-1570.
3. Faria A, Monteiro R, Mateus N, Azevedo I, Calhau C. Effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice intake on hepatic oxidative stress. *Eur J Nutr*. 2007; (46): 271-278.
4. Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J Agric Food Chem*. 2002; (50): 2200-2260.
5. Cuzzocrea S. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in arthritis. *Curr Pharm Des*. 2006; (12): 3351-3370.
6. Atta-Ur-Rahman, Ngounou FN, Choudhary MI, Malik S, Makmoor T, Nur-E-Alam, Zareen S, Lontsi D, Ayafor JF, Sondengam BL. New antioxidant and antimicrobial ellagic acid derivatives from *Pteleopsis hylodendron*. *Plant Med*. 2001; (67): 335-339.
7. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*. 2004; 26(2): 211-219.
8. Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonoga Y. Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2000; (891): 183-188.
9. Hakkinen SH. Ellagic acid content in berries: influence of domestic processing and storage. *Eur Food Res Technol*. 2000; (212): 75-80.
10. Klein G, Kim J, Himmeldirk K, Cao Y, Chen X. Antidiabetic and anti-obesity activity of *Lagerstroemia speciosa*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2007; (4): 401-407.
11. Clifford MN, Scalbert A. Ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*. 2000; (80): 1118-1125.
12. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol*. 2000; (31): 247-256.
13. Naz S, Siddiqi R, Rasool SA, Sayed SA. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *J Food Sci*. 2007; (72): 341-345.