

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE LA SANGRE DE GRADO TRATADA CON RADIACIÓN GAMMA

K. León^a, P. Castillo^b, J. Santiago^{a,c}

^a Instituto Peruano de Energía Nuclear, Lima Perú.

^b Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Ica Perú

^c Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú.

Resumen

Se ha irradiado sangre de grado (*Croton lechleri*) en polvo a diferentes dosis de radiación gamma (5, 8, 15, 25 y 40kGy). La propiedad antioxidante de estas muestras disminuye con el incremento de la dosis de irradiación. Sin embargo, no se observaron cambios notorios en sus espectros UV-visible e infrarrojo, lo que nos sugiere que no hubo mayores cambios en la constitución del látex en polvo después de la irradiación. Igualmente, las propiedades antimicrobianas de las soluciones hidroalcohólicas de estas muestras irradiadas, embebidas en películas de quitosano-PVA, frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* no se modificaron en comparación con las muestras de sangre de grado sin irradiar. Estas películas tienen actividad sólo frente a *S. aureus*.

Palabras claves: Quitosano, PVA, hidrogel, sangre de grado, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante.

I. INTRODUCCIÓN

A pesar del gran avance de la medicina moderna en la última década, el interés del consumidor en la medicina tradicional ha continuado incrementándose. Las plantas medicinales han sido empleadas desde tiempos remotos en el tratamiento de un gran número de enfermedades (obesidad, tensión arterial, sedativos, etc.).¹

Sin embargo, las plantas medicinales, al igual que las frutas y alimentos, no están exentas de microorganismo y patógenos. La contaminación microbiológica de plantas medicinales es un serio problema para la preparación de formulaciones farmacéuticas a partir de las mismas. La calidad microbiológica y fisico-química de las plantas medicinales en los productos elaborados a partir de las mismas depende de diferentes factores: lugar de cultivo, técnica de cosecha, transporte, formas de embalaje, almacenamiento, etc.² Si a esto le adicionamos la contaminación microbiológica y química ocurridas durante las etapas de producción, procesamiento y almacenamiento de los productos finales, podemos prever que estos productos contienen una carga microbiana no despreciable.³ 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.⁴

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 deterioro de la capa de ozono).⁵ 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 3-10kGy 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,^{3,6,7} pero también puede producir modificaciones químicas que alteren sus características fisico-químicas.^{8,9} 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 que deben recibir especies vegetales (uña de gato, yacón, hojas de sen, chanca piedra, maca) en diferentes presentaciones.¹⁰

La sangre de grado (*Croton lechleri*) es muy utilizado en la medicina tradicional en el Perú:

tratamiento de úlceras estomacales, gastritis crónicas, y como cicatrizante de heridas internas y externas. Por estas características ha sido considerado como aditivo en la formulación de películas para el tratamiento de lesiones a la piel de difícil cicatrización, úlceras o quemaduras graves. 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 *Klebsiela* FDA 602.¹¹ Igualmente se ha encontrado que la sangre de grado inhibe el crecimiento de *Helicobacter pylori* en concentraciones elevadas.¹² Sin embargo el látex también contiene una carga microbiana no despreciable que es necesario eliminar previamente.

En este trabajo se ha irradiado 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.

II. PARTE EXPERIMENTAL

Materiales:

El quitosano proviene de Fluka (viscosidad >400mPa.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.

En la preparación de las soluciones hidroalcohólicas se utilizó etanol de 70° destilado previamente. Estas soluciones fueron al 10%.

La irradiación gamma de las muestras se realizó con un Gammacell 220 Excel (MSD Nordion) de actividad 14kGy/h, mientras que los espectros UV-visible fueron obtenidos con un espectrofotómetro Biochrom, modelo Libra 22S, 99342. Los espectros IR fueron obtenidos en USAQ (UNMSM) con un equipo Nicolet Impact 410.

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 40kGy.

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 el cual consiste en determinar la capacidad de secuestro o de neutralización del radical libre DPPH de una muestra.

Un mg de muestra fue disuelta en 10mL de etanol al 96%. A partir de esta solución se prepararon diluciones de 10 y 50µg/mL. Cada una de estas diluciones se trató con la solución de DPPH de la siguiente manera: En un tubo de ensayo se colocó 1,8mL de muestra y 0,7mL de la solución de DPPH 0,3mM en etanol al 96%. Se dejó en reposo a temperatura ambiente durante treinta minutos. Se midió la absorbancia a 517nm. Se preparó un blanco de la muestra en solución etanólica. Estas determinaciones se realizaron por triplicado. El tubo control consistió en una solución de DPPH en etanol, el que fue leído a 517nm.

La evaluación de la actividad antioxidante se expresa como porcentaje y se determina de acuerdo a la siguiente fórmula, utilizando la rutina (un flavonoide) como patrón de comparación.^{13,14}

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

Donde:

AA% = % de actividad antioxidante

A_m = Absorbancia de la muestra

A_b = Absorbancia del blanco

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

Preparación de hidrogeles de quitosano-PVA

Se prepararon soluciones de quitosano al 1% en ácido acético 0,1M y de PVA al 10% en agua destilada a 80°C. Se mezclaron estas soluciones en una proporción de 4:6 (quitosano/PVA), se dispensaron 20mL de esta solución en placas petri (125mm de diámetro) y se empacaron en bolsas de polietileno para ser irradiadas a 15kGy. Luego, las películas fueron enjuagadas con agua destilada y

secadas a temperatura ambiente durante cuatro días.¹⁵

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 de 3x3cm fueron embebidos en estas soluciones durante 20 minutos. Se llevaron a secar durante 4 días a temperatura ambiente.

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).¹⁶ 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 24h 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 (bola de algodón envuelta en gasa) 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 10mm 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.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la sangre de grado irradiada

La sangre de grado en polvo presentó una coloración marrón, la que se mantuvo después del tratamiento con rayos gamma, incluso a 40kGy. 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, Figura N° 1.

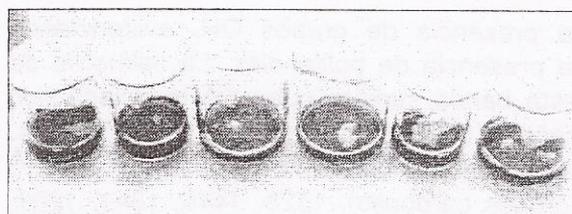


Figura N° 1. Soluciones hidroalcohólicas de muestras de sangre de grado sin irradiar e irradiadas con rayos gamma a diferentes dosis (5, 8, 15, 25 y 40kGy).

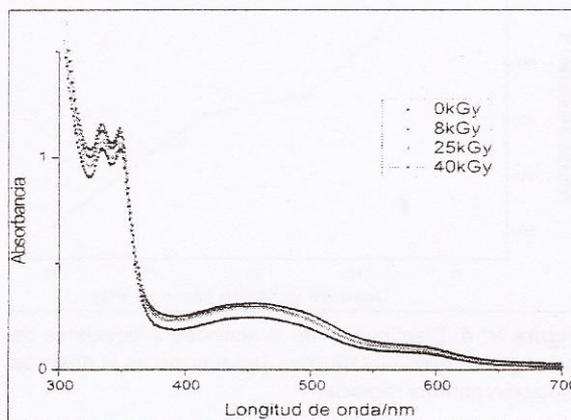


Figura N° 2. Espectro UV-visible de las soluciones hidroalcohólicas de sangre de grado irradiadas a 0, 8, 25 y 40kGy.

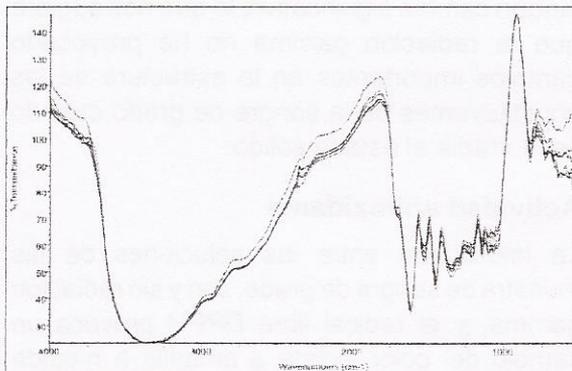


Figura N° 3. Espectros IR de las muestras de sangre de grado sin irradiar e irradiadas a 5, 8, 15, 25 y 40kGy.

Los espectros UV-visible de las soluciones hidroalcohólicas de sangre de grado irradiadas presentan poca diferencia. En todos los casos, en el rango UV se observa una banda muy intensa a 229nm, junto con bandas más débiles a 332 y 347nm, Figura N° 2. En el rango visible se observa una banda ancha a 455nm con un hombro a 600nm. La intensidad de la banda a 455nm es menor para la solución de la sangre de grado sin irradiar, en comparación con las irradiadas a 8, 25 y 40kGy.

El espectro IR de la sangre de grado en polvo sin irradiar se caracteriza por la presencia de una banda intensa y ancha con una transmitancia máxima a 3330cm⁻¹ 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 532cm⁻¹.

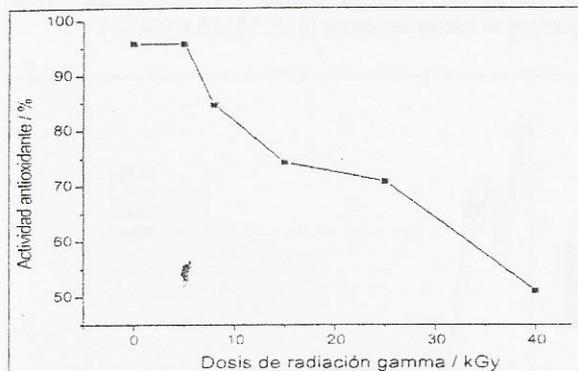


Figura N° 4. Disminución de la actividad antioxidante de la sangre de grado (a 10µg/mL) en función de la dosis de radiación gamma recibida.

Los espectros IR de todas las muestras de sangre de grado con y sin radiación muestran los mismos picos, Figura N° 3. No se observó ningún cambio significativo, lo que nos 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.

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 517nm después de veinte a treinta minutos de reacción.¹⁷

La actividad antioxidante de la muestra de sangre de grado irradiada a 5kGy y la no irradiada presentan prácticamente el mismo valor. En cambio los valores para las muestras irradiadas a 8, 15, 25 y 40kGy disminuyen rápidamente, Figura N° 4. 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 estos compuestos disminuye con la radiación gamma. Sin embargo, en el espectro IR la señal de los grupos -OH son enmascaradas por la intensa señal de los grupos carboxílicos también presentes en estos compuestos.

De otro lado, el tratamiento de las muestras a dosis hasta de 5kGy no modifica la actividad antioxidante haciendo.

Actividad antimicrobiana

Los hidrogeles obtenidos por radiación gamma son películas transparentes, flexibles y con una ligera coloración amarillenta. Esta coloración cambia a marrón 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 N° 5. Este hecho sugiere que el componente o componentes responsables de dicha 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 40kGy es mínima.

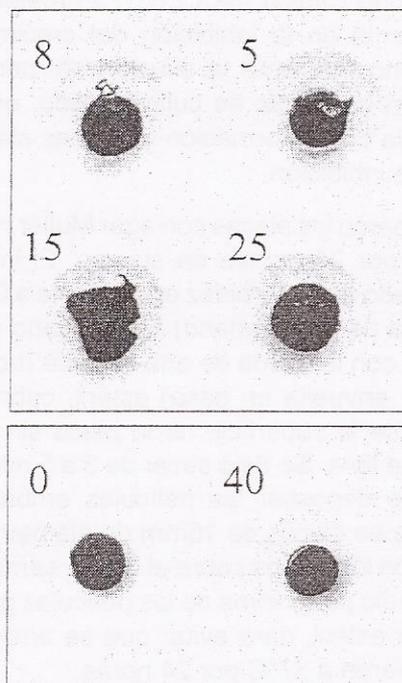


Figura N° 5. Pruebas de actividad antimicrobiana con los hidrogeles embebidos en solución hidroalcohólica de sangre de grado irradiada a las dosis de 0, 5, 8, 15, 25 y 40 kGy, frente a *S. aureus*.

IV. CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que la radiación gamma no produce efectos significativos en los constituyentes de la sangre de grado cuando ésta se encuentra en forma de polvo. En todo caso, si ha habido cambios, éstos no han podido ser detectados por espectroscopia UV-visible o infrarroja. Incluso, la actividad

antimicrobiana no es afectada a pesar de que la muestra fue irradiada a 40kGy. Sin embargo, la actividad antioxidante se mantiene casi constante hasta una dosis de 5kGy (dosis de irradiación para lograr una descontaminación importante de plantas medicinales), pero luego disminuye a medida que se incrementa la dosis de irradiación.

Agracecimientos

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".

REFERENCIAS

- Vieira I., Leal A., Krambrock K., Tambourg E., Identificação de Plantas Mediciniais Irradiadas Através da Ressonância Paramagnética Eletrônica, *Braz. J. Food Technol.*, **10**, 63-69(2007).
- Guidelines on good agricultural and collection Practices (GACP) for medicinal plants. World Health Organization, Geneva, 2003.
- Farkas, J., en Irradiation of dry food ingredients, CRC Press. Boca Raton, FL. 153, 1988.
- Bandekar J., Kamat A., Thomas P., Microbiological quality of the dairy product pedha and its improvement using gamma radiation, *J. Food Safety*, **18**, 221-230 (1998).
- López-Medina J., López-Aranda J., Medina J., Miranda L., Soria C., Domínguez F., Vázquez-Ortiz E., Flores F., Strawberry production from transplants fumigated with methyl bromide alternatives, *Span. J. Agric. Res.*, **5**, 407-416(2007).
- Ingram M., Farkas J., Microbiology of foods pasteurized by ionising radiation, *Acta Aliment.* **6**, 123(1977).
- Hanis T., Mnukova J., Jelen P., Klir P., Perez B., Pesek M., Effect of Gamma Irradiation on Survival of Natural Microflora and Some Nutrients in Cereal Meals, *Cereal Chem.* **65**, 381-383(1988).
- Chung B., Lee Y., Baek M., Kim J., Wi S., Kim J., Effects of low-dose gamma-irradiation on production of shikonin derivatives in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* S., *Radiat. Phys. Chem.*, **75**, 1018-1023(2006).
- M. Byun, C. Jo, T. Jeon, C. Hong, Effects of gamma irradiation on color characteristics and biological activities of extracts of *Lonicera japonica* (Japanese honeysuckle) with methanol and acetone, *Lebens. Wiss. Technol.*, **37**, 29-33(2004).
- Vargas J., Vivanco M., Linares M., Mamani E., Huamanlazo P., Quispe F., Aplicaciones de la tecnología de irradiación en plantas medicinales en el Perú, *Informe Científico Tecnológico IPEN 137*(2005).
- Zapata R., Actividad antimicrobiana *in vitro* de la droga comercializada como Sangre de Grado. Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico. UNMSM. Lima, Perú, 1987.
- Tamariz J., Capcha R., Palomino E., Aguilar J., Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (*Croton lechleri*) frente al *Helicobacter pylori*, *Rev. Med. Hered.*, **81-88**(2003).
- Castillo P., Lock O., Compuestos con actividad antioxidante en la especie *Lepechinia meyenii* (Walp), *Rev. Soc. Quím Perú*, **71**, 227-236(2005).
- Mensor L., Menezes F., Leitao G., Reis A., Dos Santos T., Coube C., Leitao S., Screening of Brazilian plants extracts for antioxidant activity by the use of DPPH Free radical method. *Phytotherapy Res.* **15**, 127-130(2001).
- León K., Santiago J., Propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas en extracto de sangre de grado, *Rev. Soc. Quím. Perú*, **73**, 158-165(2007).
- Performance standards of antimicrobial susceptibility testing. 2002; document N° NCCLS M100-S12, 1975.
- Yen G., Chang Y., Sep F., Chiang H., Isolation and characterization of antioxidant compounds from *Aspergillus candidus* broth filtrate, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1426-1431(2001).
- Pérez R., Vargas R., Martínez F., García E., Hernández B., Actividad antioxidante de los alcaloides de *Boconá arborea*. Estudio sobre seis métodos de análisis. *Ars Pharmaceutica*, **44**, 5-21(2003).