



Evaluación electroquímica del efecto antioxidante de extractos de semillas de naranja y limón sobre la oxidación de adenina y guanina

Hernández Núñez Issamar Primavera², Alarcón Ángeles Georgina^{1*}, Gómez Hernández Martín¹, Alvarado Hurtado Luz María², Ortega Almanza Leticia¹

¹Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Sistemas Biológicos. Prolongación Canal de Miramontes 3855 Ex Hacienda San Juan de Dios, Tlalpan, Ciudad de México, C.P. 14387, México.

²Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Biológicas, Carretera Torreón-Matamoros Km 7.5, Torreón. C.P. 27275, México.

*Autor para correspondencia: galarcon@correo.xoc.uam.mx

Recibido:

12/Junio/2016

Aceptado:

5/Septiembre/2016

Palabras clave

Extracto de semillas, Efecto antioxidante, Guanina, Adenina, SPE

Keywords

Seed extract, Guanine, Adenine

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de las semillas de limón y naranja mediante sonicación. Su efecto antioxidante se evaluó por medio de voltamperometría diferencial de pulsos (DPV) utilizando electrodos impresos de grafito. El efecto antioxidante de ambos extractos se midió basándose en la señal electroquímica de adenina y guanina en presencia y ausencia de radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Los extractos mostraron su capacidad antioxidante, ante la inhibición de la oxidación de las bases púricas. Por lo que, en presencia del extracto, se logró proteger a la adenina y guanina del daño oxidativo causado por los radicales libres ($\cdot\text{OH}$), para llevar a cabo los análisis se utilizó como referencia al ácido ascórbico.

ABSTRACT

The antioxidant capacity of aqueous seed extracts of orange and lime obtained via sonication were evaluated in this work. The antioxidant effect was evaluated by differential pulse voltammetry (DPV) using graphite screen printed electrodes. The antioxidant capacity of both extracts was measured based on the electrochemical signal of adenine and guanine in presence and absence of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$). Both extracts proved having antioxidant capacity, by inhibiting the oxidation of purine bases. In presence of $\cdot\text{OH}$, they also showed to protect adenine and guanine from avoiding the formation of oxidation products. Ascorbic acid was used as reference.

Introducción

En la actualidad, las propiedades antioxidantes de hierbas, especias y frutos son de gran interés debido a que se sabe que son capaces de estabilizar o desactivar radicales libres (Sandesh et al., 2014; Ajila y Brar, 2012; Singh et al., 2012; Abassi et al., 2015; Fuchs et al., 2004).

Los radicales libres se generan naturalmente en las células y pueden dañar moléculas como DNA, por lo que se han relacionado con enfermedades degenerativas, como diabetes, cataratas, arterioesclerosis, inflamación crónica, cáncer, entre otras (Kim y Son, 2011; Ajila y Brar, 2012; Singh et al., 2012; Abassi *et al.*, 2015; Fuchs *et al.*, 2004).

En general todos los seres vivos tienen un sistema de antioxidantes para inhibir a los radicales, así como un mecanismo para remover moléculas dañadas por daño oxidativo, sin embargo, este sistema puede ser ineficiente y, por lo tanto, se recomienda la ingesta de antioxidantes mediante la alimentación. Se ha estudiado la extracción de antioxidantes naturales que puedan proteger al cuerpo de radicales libres y retardar el progreso de las enfermedades degenerativas (Kim y Son, 2011; Oboh et al., 2015).

La extracción por medio de sonicación es ideal para la obtención de antioxidantes, debido a que son moléculas susceptibles a la oxidación por distintos factores como luz, calor y oxígeno. El método de acción es por medio de la creación de burbujas generadas por la propagación de las ondas acústicas, el choque de estas burbujas rompe las paredes celulares, incrementando la liberación de compuestos extraíbles (Singanusong et al., 2015; Annegowda et al., 2012).

Es posible encontrar antioxidantes en distintas partes de un fruto o vegetal, como raíces, hojas, semillas, entre otros. Es por ello que es posible utilizar subproductos para su obtención. Existen estudios previos de la cuantificación de la capacidad antioxidante de distintos frutos y partes de ellos, como semillas, cascara, hojas, e incluso aceites esenciales (Sandesh et al., 2014; Misharina y Samunseko, 2008; Sofi et al., 2015; Kim y Son, 2011).

En este trabajo se evaluó el efecto antioxidante de extractos de semilla de naranja y limón sobre las bases púricas de DNA. El estudio se basó en el daño inducido por radicales $\cdot\text{OH}$, generados por la reacción Fenton, en Adenina y Guanina, comparándose con el efecto antioxidante del ácido ascórbico.

Metodología

Reactivos

Guanina (Sigma), adenina (Sigma), ácido ascórbico (Sigma), FeSO_4 (Baker Analyzed), EDTA (Baker Analyzed), H_2O_2 (T. Baker).

Las semillas de limón se extrajeron directamente del fruto, en el caso de la naranja se obtuvieron de un puesto de jugos. Posteriormente, se lavaron con agua potable y se secaron durante dos días a temperatura ambiente, posteriormente se secaron en una estufa a vacío durante 24 horas a 70°C .

Se preparó una solución de 1 g de semillas de limón trituradas en 25 ml de agua Millipore. Posteriormente, la mezcla se sonicó durante dos horas, se filtró a través de una membrana de 1 micra. Se repitió el procedimiento anterior con semillas de naranja.

Los radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$) fueron generados a partir de la reacción Fenton con soluciones 10 mM de H_2O_2 , EDTA y FeSO_4 , manteniendo una relación 6:3:1.

Equipo

Los experimentos se realizaron empleando un equipo Potenciostato Autolab, electrodos serigrafados de grafito de la marca Dropsens. Las soluciones de trabajo fueron preparadas utilizando sustancias químicas grado reactivo analítico y agua desionizada. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura y presión atmosférica. Todos los experimentos se repitieron usando una solución de ácido ascórbico 100 μM , para ser utilizado como referencia.

Los voltamperogramas fueron obtenidos en el software Nova 1.6 por Voltamperometría Diferencial de Pulso (DPV) en una ventana de potencial de -0.1 a 1.2 V.

Solución de semilla de naranja y limón

Se prepararon soluciones de las semillas de naranja de concentraciones: 6.68×10^{-3} , 13.36×10^{-3} y 20.04×10^{-3} g mL^{-1} . Se diluyó la solución en NaCl 1mM y se completó 1.5 ml con buffer de acetatos pH 4.86. Se repitió el mismo procedimiento con el extracto de semillas de limón en concentraciones de 6.678×10^{-3} , 13.35×10^{-3} y 20.03×10^{-3} g mL^{-1} .

Solución de semillas, adenina y guanina

A las soluciones anteriores se les agregó adenina y guanina, obteniendo una solución de concentración de 100 μM de ambas bases y se obtuvo la respuesta electroquímica a través de DPV. Se repitió el mismo

procedimiento con las semillas de limón. Y se determinó la concentración óptima del extracto.

Solución de semillas y reacción Fenton

Se preparó un sistema, con una concentración de $6.68 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ de semilla de naranja agregando NaCl 1 mM, reactivo Fenton y buffer pH 4.86. Se mantuvo en agitación durante 3 minutos a 400 rpm.

Se repitió el procedimiento anterior con la solución de semillas de limón.

Solución de semillas, reacción Fenton, adenina y guanina 100 μM

Se realizó el procedimiento anterior agregando adenina y guanina para que tuvieran una concentración final de 100 μM . El tiempo de reacción, así como la concentración de OH, y el extracto de semilla fueron optimizados previamente.

Para todos los estudios se utilizó una concentración del extracto de semilla de $6.678 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ y tiempo de reacción de 3 min.

Resultados y discusión

Caracterización extracto de semillas de naranja y limón

El extracto de semilla de naranja y el de semilla de limón muestran 3 señales de oxidación: 0.120 V, 0.793 V en ambos extractos, y una tercera en semilla de naranja 0.376 V (Figura 1 Aa) y en limón 0.233 V (Fig. 1 Ab). Ambos extractos funcionan como antioxidantes, ya que, se encuentran en potenciales de oxidación más negativos que las bases púricas, por lo que requiere de menor energía que los analitos de interés (adenina y guanina) para oxidarse (Figura 1 B).

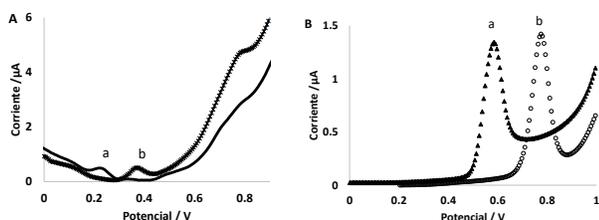


Figura 1. A. Extracto de semilla de naranja (a) y limón (b) $6.682 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$. B. (a) guanina y (b) adenina 10 μM .

Efecto de extracto de semillas sobre adenina y guanina

Al agregar extracto de semillas de naranja la señal típica de guanina y adenina se corre a un potencial de oxidación mayor: 0.78 V y 1.1 V, respectivamente, incluso mayores que cuando se encuentra en presencia de ácido ascórbico: 0.72 y 1.04 V. Mientras que, con el extracto de semillas de naranja ($6.682 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$) la señal de guanina aumenta en un 93.49% y adenina 46.32% a comparación de cuando se encuentra con ácido ascórbico (Figuras 2A y 2B).

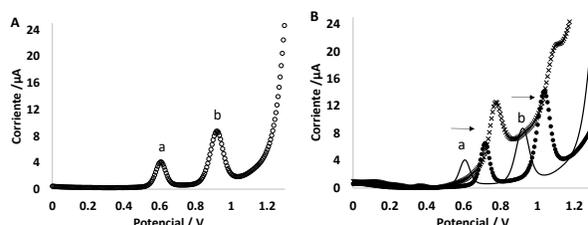


Figura 2. A. Adenina y guanina 100 μM , B. Adenina y guanina en presencia de: extracto de semillas de naranja (\times) $6.682 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$, ácido ascórbico 100 μM (\bullet).

De acuerdo con los resultados, las semillas de naranja tienen un poder antioxidante mayor respecto a el ácido ascórbico, ya que para oxidar las bases púricas se requiere de mayor energía, aunado a ello, se observó un incremento significativo en la corriente, lo que indica que se mejora la estabilidad de las especies, al evitar la oxidación *in situ* producida por factores ambientales como oxígeno.

Por otra parte, cuando la guanina y la adenina se encuentran en presencia del extracto de semilla de limón, ambas especies son desplazadas hacia potenciales mayores y presentan una intensidad de corriente mayor, incluso mayores que cuando se encuentran en presencia de ácido ascórbico 100 μM (Figura 3), ubicándose en 0.8045 y 0.125 V e incrementando su corriente en un 34.64% y 9.81% respectivamente. La concentración del extracto de semilla fue evaluada y se determinó que no existen diferencias significativas.

Tanto el desplazamiento como el incremento en la señal analítica son indicativos de que ambos extractos tienen una capacidad antioxidante incluso mayor que el ácido ascórbico. Una explicación a este fenómeno está relacionada con la diversidad de sustancias (nomilina, limonina) presentes en las semillas de los frutos, las cuales poseen en su estructura grupos funcionales como fenol e hidroxilo, lo que otorga su carácter antioxidante.

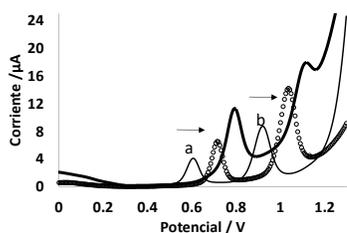


Figura 3. Adenina y guanina 100 μM , en presencia de: extracto de semillas de limón (■) $6.682 \times 10^{-3} \text{ g ml}^{-1}$, ácido ascórbico 100 μM (○).

Oxidación de bases púricas por $\cdot\text{OH}$ y su protección por extractos de semilla de naranja y limón

Para corroborar la eficiencia de la capacidad antioxidante de los extractos de las semillas, se analizó su efecto sobre la oxidación de las bases púricas en presencia de radicales libres.

Las siguientes observaciones fueron encontradas:

Existe una interacción entre el extracto y el radical. Lo que causa que la señal analítica, producida por la reacción Fenton (Figura 4Aa), y asociada con la producción de radicales libres, sea nula (Figura. 4Ac).

La interacción genera la disminución de las señales asociadas con la semilla de naranja (Figura 4Ab y 4Ac) y limón (Figura 4Bc).

Por lo anterior, se puede deducir que los extractos inhiben la generación y/o estabilizan los radicales hidroxilos.

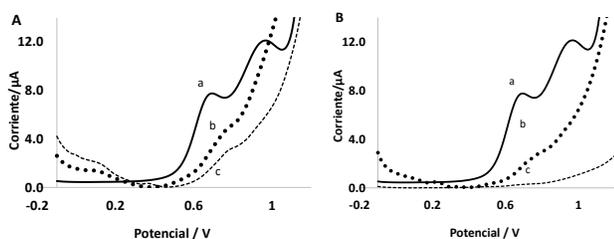


Figura 4. A. Reacción Fenton (a). Extracto semilla de naranja (b). Reacción Fenton con extracto semilla de naranja $6.678 \times 10^{-3} \text{ g ml}^{-1}$ (c). **B.** Reacción Fenton (a). Extracto semilla de limón (b). Reacción Fenton con extracto semilla de limón $6.678 \times 10^{-3} \text{ g ml}^{-1}$ (c).

Con el fin de caracterizar el efecto producido por los radicales libres sobre las bases púricas, se obtuvo el DPV a partir de la interacción de los $\cdot\text{OH}$ con la mezcla de adenina y guanina con cada una de las semillas, su

efecto antioxidante se muestra en la Figura. 5.

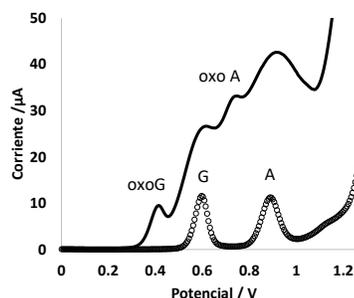


Figura 5. Adenina y guanina 100 μM , interacción de adenina y guanina con radicales libres producidos a partir de la reacción Fenton.

En la figura 5, es posible apreciar el cambio en la señal electroquímica de la guanina (G) y la adenina (A), debido a la interacción con los radicales libres, es evidente la formación de una nueva especie alrededor de 0.4 V, ésta es producto del daño oxidativo causado por los radicales libres, y esta asociada con la 8-oxoguanina (oxoG) (Oliveira-Brett, et al., 2013), es decir un producto de degradación oxidativa de la guanina. Por otra parte, es importante resaltar que la señal característica de la adenina no se observa, por lo que se deduce que la adenina ha reaccionado con los radicales libres, cabe señalar que, algunos estudios reportan como un producto de degradación oxidativa (2,8-oxoadenina) de dicha base la presencia de una especie alrededor de 0.7V, lo que coincide con el pico observado en el DPV figura. 6. Es claro entonces que los DPVs obtenidos permiten caracterizar el daño oxidativo producido por los radicales libres sobre las bases púricas.

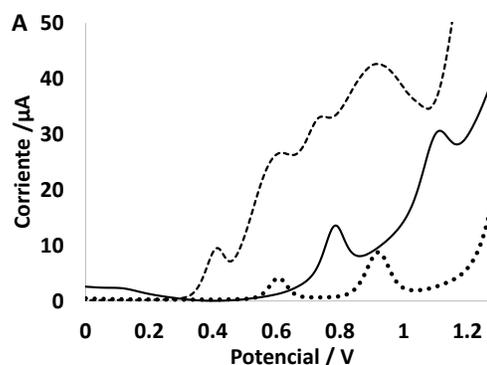


Figura 6. A y G 100 μM (•) en SBF, Interacción A y G con radicales libres (--), Interacción A y G con radicales libres(--) en presencia de extracto de semilla de naranja $6.682 \times 10^{-3} \text{ g ml}^{-1}$ (línea continua).

Para probar la capacidad antioxidante de los extractos de semillas, se hizo reaccionar las bases púricas con los radicales libres en presencia del antioxidante. La Fig. 6, muestra la eficiencia del extracto al evitar el daño oxidativo de los radicales libres sobre guanina y adenina, como se observa en el DPV, ambas señales electroquímicas se mantienen inalteradas, además la señal tanto de la reacción Fenton como de los productos de degradación es nula, como era de esperarse, ya que como se mostró (Figura 7), el extracto de semilla reacciona con los radicales libres y por lo tanto inhibe cualquier daño oxidativo sobre las bases púricas.

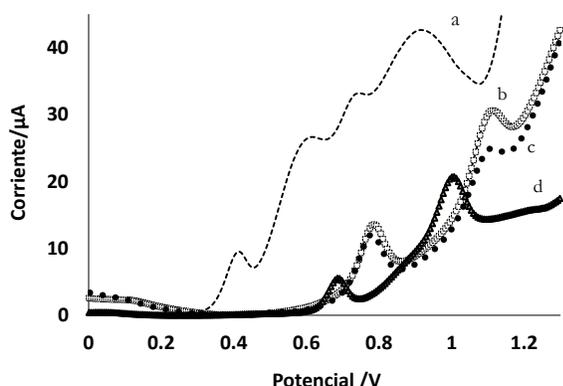


Figura 7. Adenina y guanina 100 µM con reacción Fenton en presencia de: (a) Ácido ascórbico 100 µM (b) Extracto de semilla de naranja 6.682×10^{-3} , (c) Extracto de semilla de limón 6.682×10^{-3} g ml⁻¹.

En comparación con la capacidad antioxidante del ácido ascórbico aun cuando este inhibe la reacción entre los radicales libres y las bases púricas, resultado ser más débil su efecto antioxidante ya que como se observa en la Fig 7. la alteración de las especies es menor cuando se tiene los extractos que cuando se tiene el ácido ascórbico.

Conclusiones

Los extractos de semilla de naranja y limón tienen un efecto antioxidante mayor que el ácido ascórbico sobre la oxidación electroquímica de las bases púricas.

El extracto de semilla de naranja tiene una capacidad antioxidante mayor que el de limón, ya que aumenta la intensidad de corriente de guanina en un 11.53% y adenina 14.52% en comparación con el de limón. Cabe señalar que las bases púricas se desplazan a potenciales más positivos comparados con el ácido ascórbico

Además, la señal de los radicales $\cdot\text{OH}$, al encontrarse en presencia de los extractos, desaparece, lo mismo sucede cuando se encuentran en presencia de ácido ascórbico,

por lo que este tipo de antioxidantes inhibe la actividad de los radicales libres. Por lo tanto, el daño oxidativo sobre las bases púricas se inhibe por completo cuando se tienen los extractos de semilla. Así que el extracto de semillas de limón o bien naranja puede funcionar como un buen antioxidante y puede ser incluido en la dieta del hombre para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo causado por diversos factores.

Agradecimientos

GAA y MGH desean agradecer al SIN por el reconocimiento y estímulo otorgado.

Referencias

- Abbasi A.M., Shah M.H. y Khan M.A. (2015). *Phytochemicals and Nutraceuticals*. Springer International Publishing Switzerland, pp.31-65.
- Ajila C.M., Brar S.K. (2012). *Role of Dietary Antioxidants in Cancer*. Nutrition, Diet and Cancer. Springer, pp. 377-412.
- Annegowda H., Bhat R., Min-Tze L., Karim A., Mansor S. Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits. 2012. *J. Food Sci Technol.* 49(4): 510-514.
- Fuchs J., Podda M., Packer L. (2004). *Redox-Genome Interactions in Health and Disease*. Marcel Dekker, pp. 152.
- Hlavatá L., Vyskocil V., Beníková K., Borbélyová M., Labuda J. (2014). DNA-based biosensors with external Nafion and chitosan membranes for the evaluation of the antioxidant activity of beer, coffee, and tea. *Cent.Eur.J.Chem.*, 12: 604 - 611.
- Kim Y., Son D. (2011). Antioxidant Effects of Solvent Extracts from the Dried Jujube (*Zizyphus jujube*) Sarcocarp, Seed and Leaf via Sonication. *Food Sci. Biotechnol.* 20(1): 167- 173.
- Misharina T., Samusenko A. (2008). Antioxidant Properties of Essential Oils from Lemon, Grapefruit, Coriander, Clover, and Their Mixtures. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 45(4): 438 - 442.
- Oboh G., Bello F., Ademosun A., Akinyemi A., Adewuni T. (2015). Antioxidant, hypolipidemic, and anti-angiotensin-1-converting enzyme properties of lemon (*Citrus limon*) and lime (*Citrus aurantifolia*) juices. *Comp Clin Pathol.* 24:1395-1406.



Oliveira-Brett A.M., Diculescu V., Piedade J.A.P. (2002). Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrod. *Bioelectrochem.* 55(1): 61-62.

Sandesh P., Velu V., Singh R. (2014). Antioxidant activities of tamarind (*Tamarindus Indica*) seed coat extracts using in vitro and in vivo models. *J Food Sci Technol.* 53(1):104-117.

Singanusong R., Nipornram S., Tochampa W., Rattanatraiwong P. 2015. Low Power Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) and Lime (*Citrus aurantifolia*) Peels and the Antioxidant. *Food Anal. Methods.* 8(5): 1112-1123.

Singh A., Jain A., Sarma B.K., Jha A. y Singh H.B. 2012. Natural Antioxidants and Their Role in Cancer Prevention. En: *Nutrition, Diet and Cancer*, Shankar S. y Srivastava R.K. (eds). Springer. Netherlands, pp. 563-583.

Sofi F., Raju C., Lakshmisha I., Sing R. (2016). Antioxidant and antimicrobial properties of grape and papaya seed extracts and their application on the preservation of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) during ice storage. *J Food Scie Technol.* 53(1): 104 - 117.