
ALCHORNEA CORDIFOLIA: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y TOXICIDAD

Morales, Abdy

Centro de Investigaciones Psicofarmacológicas
Departamento de Farmacología, Fac. de Medicina, Universidad de Panamá
Panamá, Panamá

<https://orcid.org/0000-0002-4184-2912>
moba245@gmail.com

Mero, Aldahir

Centro de Investigaciones Psicofarmacológicas
Departamento de Farmacología, Fac. de Medicina, Universidad de Panamá
Panamá, Panamá

<https://orcid.org/0000-0002-4546-6096>
aldahirmero_20@hotmail.com

Díaz, Maricelis

Centro de Investigaciones Psicofarmacológicas
Departamento de Farmacología, Fac. de Medicina, Universidad de Panamá
Panamá, Panamá

<https://orcid.org/0000-0002-1943-9748>
maricselis@hotmail.com

Morán-Pinzón, Juan

Centro de Investigaciones Psicofarmacológicas
Departamento de Farmacología, Fac. de Medicina, Universidad de Panamá
Panamá, Panamá

<https://orcid.org/0000-0002-5559-231X>
coljamp@gmail.com

Samba, Nsevolo

Universidad Kimpa Vita, Departamento de Análisis
Clínicos y Salud Pública, Barrio Popular, Angola
Angola, África

<https://orcid.org/0000-0002-3973-6272>
israelsamba2010@hotmail.com

Rodilla, Jesús

FibEnTech- Materiais Fibrosos e Tecnologias Ambientais
Departamento de Química, Universidade da Beira Interior
Covilhã, Portugal

<https://orcid.org/0000-0001-6114-3572>

rodilla@ubi.pt

Guerrero De León, Estela

Sistema Nacional de Investigación
Centro de Investigaciones Psicofarmacológicas
Departamento de Farmacología, Fac. de Medicina, Universidad de Panamá
Panamá, Panamá

<https://orcid.org/0000-0002-0029-1827>

guerrerodleon@gmail.com

Abstract

Alchornea cordifolia is an important crude drug in the African indigenous system for the treatment of pain. Therefore, we decided to determine the antioxidant activity and toxicity profile of the extracts obtained using different solvents (hexane, acetone and ethanol) and different parts of the plant (leaves, bark and roots). To determine the antioxidant activity, concentrations between (0,48-125 µg/ml) were assayed against: DPPH, nitric oxide (NO·), non-enzymatic superoxide anion (●O₂⁻), TBARS, while toxicity was evaluated by *Artemia salina* model.

Against DPPH, extracts obtained from leaves, roots and bark with ethanol and acetone developed antiradical activity between 70 and 80%, effect that was similar to standard quercetin (77,9±4,4%). At low concentrations, the extracts obtained from the root show antiradical activity against NO· between 50 and 60%, close to that performed by Quercetin (74,8±3,5%). Extracts from bark showed significant activity against ●O₂⁻ (Hex=61,6%, Acet=61,2% and Eta=50,1%), very similar to Quercetin (53,0±0,8%). TBARS formation was significantly inhibited by ethanolic and acetic extracts of leaves (95,5% and 94,6%, respectively), showing similar effect to Curcumin (97,2%). In relation to the toxicity assay we observed that extracts obtained from the leaves showed the highest % lethality (Hex=88%; Acet=76%; Eta=42%) at a concentration of 1000 µg/ml.

A. cordifolia is a plant of biological interest, whose antioxidant activities and toxicological profile were described in this study.

Keywords: *Alchornea cordifolia*, toxicity, antioxidant, TBARS, DPPH.

Resumen

Alchornea cordifolia es una importante droga cruda en el sistema indígena africano para el tratamiento del dolor. Por lo tanto, hemos decidido determinar la actividad antioxidante y el perfil de toxicidad de los extractos obtenidos utilizando disolventes con diferente polaridad (hexano, acetona y etanol) y diferentes partes de la planta (hojas, corteza y raíces). Para determinar la actividad antioxidante se utilizaron concentraciones entre (0,48-125 µg/ml) frente a: DPPH, óxido nítrico (NO·), anión superóxido no enzimático (●O₂⁻), TBARS, mientras que la toxicidad se evaluó mediante el bioensayo con el modelo *Artemia salina*. Frente a DPPH, los extractos de hojas, raíces y corteza obtenidos con etanol y acetona desarrollaron actividad antirradical entre 70 y 80%, muy similares a nuestro estándar quercetina (77,9±4,4%). A bajas concentraciones, los extractos obtenidos de la raíz muestran una actividad antirradical frente al NO· entre 50 y 60%, próxima a la registrada por Quercetina (74,8±3,5%). Los extractos obtenidos de la corteza mostraron una actividad significativa frente a ●O₂⁻ (Hex=61,6%, Acet=61,2% y Eta=50,1%), muy similar a Quercetina (53,0±0,8%). La formación de TBARS fue inhibida significativamente por los extractos etanólico y acetónico de las hojas (95,5% y 94,6%, respectivamente), y se observó un efecto similar con la Curcumina (97,2%). Al evaluar la toxicidad de los extractos a una concentración de 1000 µg/ml, observamos que los obtenidos de las hojas mostraron el mayor % de letalidad (Hex=88%; Acet=76%; Eta=42%). *A. cordifolia* es una planta con interés biológico, cuyas actividades antioxidantes y perfil toxicológico fueron descritas en este estudio.

Palabras claves: *Alchornea cordifolia*, toxicidad, antioxidante, TBARS, DPPH.

1. INTRODUCCIÓN

Alchornea cordifolia es una planta originaria de Angola que pertenece a la familia de las Euphorbiaceae. Se utiliza generalmente para tratar infecciones por hongos, bacterias y parásitos [1], dolor, reumatismo, artritis, tos, diarrea y algunas otras enfermedades inflamatorias; sin embargo otros estudios indican que la decocción de las hojas se utiliza como estimulante del sistema nervioso central [2,3].

Así, de forma precisa, se ha descrito que *A. cordifolia* se utilizan en la preparación de remedios para las enfermedades urinarias, respiratorias y trastornos gastrointestinales, y una mezcla de los frutos es administrada para la tos. Los extractos de las hojas han demostrado que inhiben el crecimiento de las bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas [4].

Los diferentes usos etnobotánicos reportados para esta planta la convierten de un blanco de interés para realizar diversos estudios farmacológicos, en donde la evaluación de su perfil de actividad antioxidante podría ser responsable de algunas de las acciones descritas, además de aportar información relevante para la comunidad científica.

2. MÉTODO

A. Preparación de los extractos.

Para todas las partes de las plantas (hojas, corteza y raíz), la extracción se hizo en Soxhlet con hexano (Hex), a la temperatura de ebullición. Después de 48h, recuperamos la solución de hexano e hicimos la evaporación del solvente. En cuanto a la extracción con acetona (Acet) y etanol (Eta), se realizó a temperatura ambiente, después de una semana recuperamos la solución y realizamos la evaporación utilizando un evaporador rotatorio (bomba Büchi VAC V-500® y controlador de presión Büchi Vacuum Controller V-850® y colocadas en un baño a 40°C, Büchi 461 Water Bath®).

Tabla 1. Identificación de los extractos por sus siglas.

	Partes	Extractos
Alchornea cordifolia	Folhas (Hojas)	ALFA-Hex ALFA-Acet ALFA-Eta
	Cascas (Corteza)	ALCA-Hex ALCA-Acet ALCA-Eta
	Raiz (Raíz)	ALRA-Hex ALRA-Acet ALRA-Eta

B- Actividad captadora del radical DPPH.

La determinación del porcentaje de inhibición al radical DPPH se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Pombal et al., 2017 [5]. Empleamos microplacas de 96 pocillos, y colocamos 100 µl de DPPH y 100 µl del extracto a evaluar o quercetina a diferentes concentraciones (0,48-125 mg/ml). Incubamos en la oscuridad durante 30 minutos y posteriormente, los datos de densidad óptica (DO) se obtuvieron a 492 nm. Cada evaluación se realizó por triplicado. Para calcular el porcentaje de inhibición empleamos la Fórmula 1.

$$\text{Fórmula 1} \quad \% \text{ de Inhibición DPPH} = \frac{[DO_{DPPH} - DO_{extracto}]}{DO_{DPPH}} \times 100$$

C. Evaluación de la capacidad atrapadora del óxido nítrico.

50 µl a diferentes concentraciones de los extractos de *A. cordifolia* disueltos en DMSO, fueron mezclados con 50 µl de NTP con 50 µl de Nitroprusiato de Sodio (10 mM) e incubados a 25 °C durante 5 minutos. Adicionamos 50 µl del Reactivo de Griess antes de realizar las determinaciones del radical óxido nítrico (NO·) a 560 nm [6]. Se empleo quercetina disuelta en DMSO como control positivo.

D. Capacidad atrapadora del anión superóxido en un sistema no enzimático.

La actividad inhibitoria frente al anión superóxido (●O₂⁻) fue evaluada mediante sistema no enzimático [7]. Colocamos 50 µl de los extractos a diferentes concentraciones y añadimos 50 µl de cada uno de los siguientes reactivos: PMS (120 µM), NADH (936 µM) y NBT (300 µM). La placa era incubada a 25°C durante 5 minutos, para posteriormente realizar las determinaciones a 560 nm.

E. Ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica.

Para cada 100 µl del homogeneizado de huevo (1:25, v/v en solución PBS, pH 7,4), añadimos 10 µL de extracto y 50 µL FeSO₄ (25 mmol/l) y PBS c.s.p. 300 µl. Incubamos a 37 °C durante 15 minutos, y añadimos 50 µl de ácido tricloroacético al 15% p/v. Centrifugamos la muestra (3,500 rpm x 15 minutos), extraemos 200 µl del sobrenadante y añadimos 100 µl de ácido tiobarbitúrico al 0.8%. Calentamos la mezcla a 95 °C durante 30 minutos. Dejamos enfriar antes de medir la absorbancia de las muestras a 532 nm [8].

F. Toxicidad en Artemia Salina.

Evaluamos la toxicidad in vitro para el camarón de salmuera (*Artemia salina* Leach) como

bioensayo general [9]. En una microplaca de 96 pocillos se colocaron 98 μ l de agua de mar tratada a 25 ppm, 2 μ l del extracto de la planta a una concentración de 1000 μ g/ml (en el pocillo) y 100 μ l de agua mar con 10 a 15 larvas de *Artemia Salina*. La toxicidad se determinó con larvas de 48 horas de edad y la letalidad fue evaluada después de 24 horas de incubación. Los resultados fueron expresados como porcentaje de larvas muertas en los pocillos.

3. RESULTADOS

A. Actividad captadora del radical DPPH.

La actividad captadora de DPPH de los nueve extractos de *A. cordifolia* fue comparada frente a la sustancia patrón, quercetina, que generó una capacidad inhibitoria máxima de $77,9 \pm 4,4\%$, (Tabla 1). En esta sección los extractos obtenidos en acetona y etanol de las tres partes de la planta fueron los que desarrollaron una actividad antirradicalaria similar a Quercetina alcanzando un % de inhibición entre el 70 y 80%, respectivamente.

B. Evaluación de la capacidad atrapadora del óxido nítrico.

A evaluar los extractos de nuestra planta, los que mostraron mayor actividad fueron ALFA-Eta, ALCA-Eta y ALRA-Acet (% de inhibición = $68,1 \pm 0,9$, $61,9 \pm 1,3$ y $65,0 \pm 4,8\%$, respectivamente), efectos muy similares a nuestro flavonoide patrón quercetina ($74,8 \pm 3,5\%$) Tabla 2.

C. Capacidad atrapadora del anión superóxido en un sistema no enzimático.

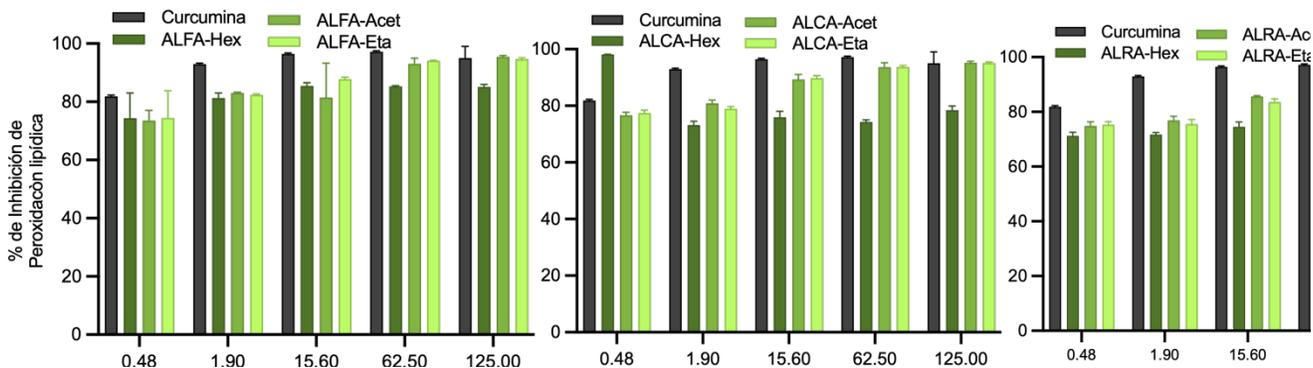
Para el ensayo frente a $\bullet\text{O}_2^-$ observamos que los extractos ALCA-Hex, ALCA-Acet y ALRA-Eta en muestran un % de inhibición de $61,6 \pm 2,3$, $61,2 \pm 3,5$ y $60,0 \pm 1,4\%$, respectivamente, y que fue superior a nuestro patrón quercetina ($53,0 \pm 0,8\%$) (Tabla 2).

Tabla 2. Valores del efecto inhibitorio máximo (Emax) y de la concentración inhibitoria 50 (CI50) obtenidos con los extractos de *A. cordifolia* ensayados contra los radicales DPPH, NO^\bullet y $\bullet\text{O}_2^-$.

Extractos	DPPH		NO^\bullet		$\bullet\text{O}_2^-$	
	Emax (%)	CI ₅₀ (μ g/ml)	Emax (%)	CI ₅₀ (μ g/ml)	Emax (%)	CI ₅₀ (μ g/ml)
Quercetina	$77,9 \pm 4,4$	8,6	$74,8 \pm 3,5$	Nd	$53,0 \pm 0,8$	102,1
ALFA-Hex	$19,9 \pm 2,1^*$	Nd	$49,1 \pm 36,2$	-0,1	$3,4 \pm 7,8^*$	Nd
ALFA-Acet	$77,2 \pm 0,8$	2,7	$44,3 \pm 0,5^*$	Nd	$52,5 \pm 10,7$	Nd
ALFA-Eta	$78,3 \pm 1,4$	3,3	$68,1 \pm 0,9$	445,4	$44,4 \pm 12,8$	Nd
ALCA-Hex	$4,1 \pm 1,1^*$	Nd	$51,6 \pm 2,9$	Nd	$61,6 \pm 2,3$	60,6
ALCA-Acet	$79,4 \pm 0,6$	2,8	$58,9 \pm 0,5$	98,9	$61,2 \pm 3,5$	50,1
ALCA-Eta	$75,7 \pm 2,9$	2,9	$61,9 \pm 1,3$	351,8	$50,1 \pm 3,8$	Nd
ALRA-Hex	$9,4 \pm 6,1^*$	Nd	$59,1 \pm 1,2$	Nd	$34,3 \pm 1,9^*$	-154,1
ALRA-Acet	$82,1 \pm 0,5$	14,2	$65,0 \pm 4,8$	38,2	$51,5 \pm 3,1$	96,7
ALRA-Eta	$70,6 \pm 0,7$	2,7	$53,8 \pm 2,2^*$	-22,8	$60,0 \pm 1,4$	75,1

Los datos de Emax se presentan como la media \pm DS para un n=3. *p<0.05 vs Quercetina. Nd = No determinado.

D. Ensayo de Inhibición de la peroxidación lipídica.



Para evaluar la actividad sobre TBARS de los extractos obtenidos de las hojas observamos que, ALFA-Acet y ALFA-Eta presentaron un % de inhibición máximo del $95.5 \pm 0.4\%$ y $94.6 \pm 0.5\%$. Para los extractos de la corteza, a concentraciones bajas (0,48 mg/ml) el extracto ALCA-Hex (% inhibición = $98,1 \pm 0,1$) muestra una actividad ligeramente superior a la presentada por Curcumina ($97,2 \pm 0,3\%$), mientras que para ALCA-Acet y ALCA-Eta se muestran similares a las logradas por el control, ambos extractos muestran un % de inhibición de un 90% (Figura 1).

Figura 1. Actividad antioxidante de extractos de *A. cordifolia* en la inhibición de la peroxidación lipídica. (A) Extractos de hojas; (B) Extractos de corteza; (C) Extractos de raíz.

E. Toxicidad en Artemia Salina.

Al evaluar la toxicidad de los diferentes extractos a una concentración de $1000 \mu\text{g/ml}$, observamos que los datos obtenidos de las hojas de *A. cordifolia* mostraron el mayor % de letalidad (Hex=88%; Acet=76%; Eta=42%). Así mismo los extractos de la corteza fueron evaluados y presentaron un % de letalidad discreto (Hex=45%; Acet=24%; Eta=2%). Para concluir, los extractos de la raíz obtenidos en hexano, acetona y etanol presentaron datos de letalidad bajos, siendo el extracto en acetona el que no presentó efecto tóxico (Hex=48%; Eta=3%).

4. CONCLUSIONES

En conclusión, nuestro estudio representa un barrido contra varios radicales libres implicados en diferentes patologías. En él se utilizó una serie de ensayos in vitro bien establecidos para caracterizar la actividad antioxidante de los extractos de *A. cordifolia*. Esta actividad encontrada aunada a los reportes de los fitoconstituyentes, podrían justificar los usos etnobotánicos, particularmente antiinflamatorios de los pobladores de África.

REFERENCIAS

- [1] [1] Boniface, P. K., Ferreira, S. B., & Kaiser, C. R. "Recent trends in phytochemistry, ethnobotany and pharmacological significance of *Alchornea cordifolia*". (Schumach. & Thonn.) Muell. Arg. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 191, pp. 216–244), (2016).
- [2] [2] Akanmu, M., Adeloye, A., & Obuotor. "Neuropharmacological effects of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae) in mice". *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(6), (2012).
- [3] [3] Ogunbamila, F. O., & Samuelsson, G. "Smooth muscle relaxing flavonoids from *Alchornea cordifolia*". *Acta Pharmaceutica Nordica*, 2(6), (1990).
- [4] [4] Agbor, G. A., Léopold, T., & Jeanne, N. Y. "The antidiarrhoeal activity of *Alchornea cordifolia* leaf extract". *Phytotherapy Research*, 18(11), 873–876, (2004).
- [5] [5] S. Pombal, Y. Hernández, D. Diez & E. Mondolis. "Antioxidant Activity of Carvone and Derivatives against Superoxide Ion," *Nat Prod Commun.*, vol. 12, no. 5, pp. 653-655, (May 2017).
- [6] [6] S. Lee, S. Sancheti, & M. Bafna, "Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Rhododendron yedoense* var. *Poukhanense* bark". *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 5, no.2, pp. 248-254, (January 2011).
- [7] [7] H.-Y. Lin. & C.-C. Chou, "Antioxidative activities of water-soluble disaccharide chitosan derivatives," *Food Res Int.*, vol. 37, no. 9, pp. 883-889, (April 2004).
- [8] [8] Y. Zhao, J. Dou, & T. Wu, "Investigating the antioxidant and acetylcholinesterase inhibition activities of *Gossypium herbaceum*," *Molecules*, vol. 8, no. 1, pp. 951–962, January 2013.
- [9] [9] McLaughlin JL. & Rogers LL., The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Info J* 32: 513±524, (1998).

AUTORIZACIÓN Y LICENCIA CC

Los autores autorizan a APANAC XIX a publicar el artículo en las actas de la conferencia en Acceso Abierto (Open Access) en diversos formatos digitales (PDF, HTML, EPUB) e integrarlos en diversas plataformas online como repositorios y bases de datos bajo la licencia CC:

Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>.

Ni APANAC XIX ni los editores son responsables ni del contenido ni de las implicaciones de lo expresado en el artículo.