

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE HOJAS DE *TAMARINDUS INDICA* L. EN DOS ESTADOS FISIOLÓGICOS

DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY IN LEAF EXTRACTS *TAMARINDUS INDICA* L. ON TWO PHYSIOLOGICAL STATES

M.Sc. ADOLFO RAMOS-MARZÁN,¹ DR. C. JULIO C. ESCALONA-ARRANZ² Y DR. C. JESÚS RODRÍGUEZ-AMADO²

¹ Instituto de Investigaciones Agro-Forestales. UCTB Estación Experimental Agro-Forestal III Frente, finca La Mandarina, Cruce de los Baños, Tercer Frente, Santiago de Cuba, Cuba, C.P. 92700

² Universidad de Oriente. Avenida Patricio Lumumba s/n, Alturas de Quintero, Santiago de Cuba, Cuba

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar la capacidad antioxidante en extractos de hojas de *Tamarindus indica* L. en los estados fisiológicos de floración y fructificación en el período de octubre de 2012 y febrero de 2013, respectivamente. Posterior a la obtención de los extractos fluidos con etanol al 70 %, se cuantificó espectrofotométricamente la concentración de fenoles y flavonoides totales. Luego los extractos fueron sometidos a un fraccionamiento sucesivo con cuatro solventes. A los extractos y las fracciones obtenidas se les determinó la capacidad antioxidante por medición del índice de oxidación. Los resultados se procesaron utilizando el programa estadístico InfoStat 2012. Los niveles más altos de concentración de fenoles totales se obtuvieron en octubre, y de flavonoides en febrero. Los diferentes extractos obtenidos de hojas de *Tamarindus indica* L. mostraron capacidad antioxidante en los dos estados fisiológicos estudiados, siendo para todos los casos los más activos, los extractos de fluido y las fracciones de acetato de etilo.

Palabras claves: *Tamarindus indica*, fenoles, flavonoides, antioxidante, Cuba.

INTRODUCCIÓN

Tamarindus indica L. es un árbol tropical de la familia Caesalpinaceae, de gran tamaño, larga vida y usualmente siempre-verde, nativo de los trópicos del Viejo Mundo. Conocido comúnmente como tamarindo, este árbol se ha plantado

ABSTRACT

The present work was carried out with the objective of determining the capacity antioxidant of extracts of leaves of *Tamarindus indica* L. it indicates respectively in the physiologic states of flowering and fructification corresponding to October of 2012 and February of 2013. Later to the obtaining of the flowing extracts with ethanol to 70 % spectrophotometrically was quantified the phenols and total flavonoids concentration, then the extracts were subjected to a successive division with four solvents, the extracts and the obtained fractions were determined the capacity antioxidant by mensuration of the index of oxidation. The results were processed using the program InfoStat 2012. The highest levels in total phenols were obtained in the month of October and those of flavonoids in February. The different obtained extracts of leaves of *Tamarindus indica* L. they showed capacity antioxidant in the two studied physiologic states, being for all the cases the most active, the extracts of fluid and the fractions of ethyl acetate.

Key words: *Tamarindus indica*, phenols, flavonoids, antioxidant, Cuba.

el Sudán, Etiopía, Kenya y Tanzania, hacia el oeste a través de África sub-Saheliana hasta Senegal [Loinert, 2009]. Ha sido empleado con diferentes fines, entre los que se destacan los nutricionales, terapéuticos y ecológicos.

En este sentido, Prabhakara *et al.* (2004) reportaron que el polvo seco de las hojas de tamarindo, mezclado con aceites de maní y sésamo, es útil como suplemento nutricional debido a los niveles que presenta de proteínas, grasas, hierro y calcio.

Desde el punto de vista farmacológico, extractos foliares de tamarindo han demostrado excelentes propiedades hepatoprotectoras. Notorios son los experimentos realizados por Wenynger y Robineau (1988), Jouyex y Mortimer (1995), Escalona *et al.* (1995) que relacionan estas propiedades con los mecanismos antioxidantes de los fenoles y los flavonoides presentes en diferentes tejidos de la planta.

En el caso particular del trabajo de Jouyex y Mortimer, realizaron un estudio comparativo entre nueve de las especies que con mayor frecuencia se reportan en el Caribe con fines antioxidantes. Sus resultados señalan al tamarindo como una de las principales elecciones, llegando a ser comparable en múltiples ensayos al extracto de *Rosmarinus officinalis* L., una especie con elevada actividad antioxidante [Jouyex y Mortimer, 1995].

Bathia *et al.* (1980) reportaron la presencia de cuatro flavonoides de naturaleza C-glicosídica, cuyas estructuras se corresponden con la orientina, vitexina, isorientina e isovitexina. Además, se han realizado estudios bioquímicos que demuestran la presencia de otros elementos antioxidantes en las hojas como la apigenina, 7-*o*-metilluteolina, y los ácidos *cis* y *trans* ferúlicos [Arya, 1999]. También se ha demostrado la presencia del compuesto fenólico Lupeol, el cual muestra alto poder antioxidante [Ali y Ahmad, 1998]. Aunque Siddhuraju (2007) reportó que los compuestos de las hojas de la especie con mayor potencial antioxidante son aquellos de naturaleza flavonólica y polifenólica.

En un estudio preclínico farmacológico en ratas, se evaluó el efecto hepatoprotector del extracto fluido de hojas del tamarindo y de las fracciones de acetato de etilo y n-butanol a partir de dicho extracto fluido ante ratas Wistar macho por el

modelo de intoxicación hepática por tetracloruro de carbono. Los resultados de las fracciones evaluadas demostraron que las fracciones de acetato de etilo y n-butanol son las que mayor poder antioxidante presentan, debido a la mayor presencia de fenoles y flavonoides en dichas fracciones [Escalona *et al.*, 1995].

Escalona *et al.* (1995) demostraron, en estudio preclínico farmacológico en ratas, que el extracto fluido hidroalcohólico (70 %) de hojas del tamarindo y las fracciones de acetato de etilo y n-butanol obtenidos a partir de dicho extracto, presentan un mayor poder protector de células hepáticas ante el efecto tóxico de tetracloruro de carbono debido a la mayor concentración de sustancias antioxidantes con respecto a las fracciones de cloroformo, n-hexano y acuosa.

Cañizares (2008) demostró que el etanol al 70 % es la combinación hidroalcohólica que mayor cantidad de fenoles y flavonoides extrae de las hojas del tamarindo en la formulación de extractos fluidos, y Urdeneta (2008) determinó químicamente que la fracción de acetato de etilo, a partir de este extracto, es la que mayor concentración de fenoles y flavonoides presenta, incluso superior al n-butanol.

Grotewold (2008) concluyó que la biosíntesis de sustancias antioxidantes en la planta de *Tamarindus indica* L. varía en dependencia del estado fisiológico en que se encuentre la misma.

Al considerar lo antes mencionado, se realizó la siguiente investigación con el objetivo de determinar la capacidad antioxidante de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L. en dos estados fisiológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas estudiadas correspondían con individuos fisiológicamente sanos y en estado adulto. Se encontraban localizadas en la finca Niña Bonita del poblado El Caney, en Santiago de Cuba.

Se seleccionaron dos meses en los que la población se encuentra en su estado de floración y de fructificación: octubre de 2012 y febrero de 2013, respectivamente. En cada caso las hojas se colectaron en el horario de la mañana, y se sometieron posteriormente a un secado al sol. Una vez secas, se procedió a la disminución del

tamaño de partículas para facilitar los procesos extractivos.

Se pesaron 150 g de hojas secas y pulverizadas para la preparación de cada uno de los extractos fluidos correspondiente a cada estado fisiológico. Los mismos se obtuvieron por el método de percolación, tal y como se describe en la Norma Ramal de Salud Pública 311/91. A los extractos obtenidos se les determinó de forma cuantitativa los fenoles y flavonoides totales por técnicas espectrofotométricas.

Los fenoles totales se determinaron empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu a 700 nm. Los resultados se expresaron como ácido tánico a partir de una curva de calibración obtenida para dicho compuesto en el rango de 0,2 a 1,6 ppm (partes por millón). Los flavonoides totales se determinaron por reacción con cloruro de aluminio en metanol a 430 nm. Los resultados se expresaron como quercetina a partir de una curva de calibración obtenida para dicho compuesto en el rango de 1 a 7 ppm.

Los extractos fluidos fueron sometidos a un fraccionamiento sucesivo líquido-líquido con cloroformo, acetato de etilo, n-butanol y finalmente el residuo resinoso que quedó en las paredes del embudo separador se disolvieron en etanol al 70 %. Se generaron así cuatro subfracciones de polaridad y composición diferente, evaluando en cada una de ellas y al extracto fluido de partida el poder antioxidante, por medición del índice de oxidación.

La evaluación de la capacidad antioxidante de los diferentes extractos obtenidos se determinó a través del índice de oxidación por modifi-

cación de la Norma Ramal de la Agricultura 1129/1994 MINAG. A 2 mL del extracto a evaluar previamente diluido en agua destilada, se le añadió 1 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 20 %, se agitó y posteriormente se le adicionaron 30 µL de solución de permanganato de potasio (KMnO₄) al 0,1 N. La variable índice de oxidación se determinó midiendo el tiempo (en segundos) en que desaparece la coloración rosada provocada por la adición del permanganato de potasio. Para cada caso se realizaron tres réplicas (T₁, T₂, T₃). Las fracciones se diluyeron en agua hasta obtener tiempos comprendidos entre los 5 y 120 s. Como positivo se empleó la solución de quercetina.

Los resultados se procesaron utilizando el programa InfoStat 2012. Las concentraciones de fenoles y flavonoides totales en los extractos fluidos obtenidos a partir de *Tamarindus indica* L. con etanol al 70 % correspondientes a octubre y febrero se analizaron mediante el test de student, para muestras independientes. Para el análisis del índice de oxidación entre fracciones se realizó un ANOVA, y posterior Test de los Rangos Múltiples de menores diferencias significativas de Fisher (LSD).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos estados fisiológicos evaluados para la concentración de flavonoides totales. En el estado fisiológico de fructificación se produjeron mayores concentraciones (1,79 mg/mL) de flavonoides totales que en la floración (0,98 mg/mL) (Tabla 1). Resultados similares fueron reportados por Cañazares (2008).

TABLA 1
Prueba t para muestras independientes para concentración de flavonoides totales expresados como quercetina (mg/mL) correspondientes a los estados fisiológicos de floración (octubre) y fructificación (febrero)

Estado fisiológico	Variable		Estadígrafo
	Concentración de flavonoides		
Floración	Media	0,98 EE: ±0,01	t: -47,66 p < 0,0001 p (Var. Hom.): 0,5385
Fructificación	Media	1,79 EE: ±0,01	

El resultado en este experimento está dado porque durante la fase de fructificación la planta presenta mayor probabilidad de ser afectada por múltiples organismos vivos (bacterias, hongos, insectos, aves y mamíferos), y la obligan a producir mayor cantidad de sustancias flavonólicas como mecanismo de defensa [Grotewold, 2008]. Los flavonoides presentan gran importancia para el desarrollo fisiológico de la planta y con varias propiedades farmacológicas. Por ejemplo, El-Siddig (2007) reportó, debido a la presencia de flavonoides en los extractos de esta especie, actividad fungicida frente a cultivos de *Aspergillus niger* y de *Candida albicans*, y fuerte actividad bactericida hacia los cultivos de *Salmonella*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

También se ha demostrado la capacidad antioxidante del flavonoide polihidroxilado presente en la semilla y hojas del *Tamarindus indica* L. Los estudios se realizaron tanto *in vitro* como *in vivo*, en los cuales se demostró que dosis superiores a los 500 mg/kg pueden modular los radicales libres en presencia o ausencia de toxicidad aguda debido a la capacidad antioxidante de dicho flavonoide [Komutarin, 2004].

Según el análisis estadístico realizado, existen diferencias significativas entre los estados fisiológicos de la especie en cuanto a concentración de fenólica, favoreciendo a la etapa de floración (octubre) como la de mayor producción de flavonoides (Tabla 2).

TABLA 2
Prueba t para muestras independientes para concentración de fenoles totales expresados como ácido tánico (mg/mL) correspondientes a los estados fisiológicos de floración (octubre) y fructificación (febrero)

Estado fisiológica	Variable		Estadígrafo
	Concentración de fenoles		
Floración	Media	2,42 EE: ±0,01	t: 10,32 p < 0,0005 p (Var. Hom.): 0,3043
Fructificación	Media	2,19 EE: ±0,02	

Este hecho contrasta con resultados previos en donde se señala la etapa de fructificación como la de mayor producción de fenoles totales [Cañizares, 2008]. Las causas de estas diferencias están relacionadas con los aspectos climatológicos y ecológicos, ya que estas sustancias son sintetizadas por la planta en dependencia del medio en que se encuentre, presentando varias funciones, muchas de ellas de capital importancia para la supervivencia de la misma. Una de las funciones de los fenoles es la atracción de vectores para la polinización y dispersión de las semillas [Andersen y Kenneth, 2006]. Teniendo en cuenta esta función, la planta aumentó la biosíntesis de este metabolito en el período de floración (octubre), lo cual explica los resultados que se muestran en la Tabla 2. Los fenoles se han convertido en un grupo de compuestos con potencialidades desde el punto

de vista fitoquímico y farmacológico [Andersen y Kenneth, 2006].

Estos resultados permiten conocer en qué etapa fisiológica de la especie se debería realizar la colección del material vegetal si se quisiera obtener la mayor concentración de alguno de estos metabolitos para realizar alguna formulación, un estudio fitoquímico o farmacológico, con lo cual se logra un aumento de la actividad farmacológica. En el caso de los fenoles totales, se determinó que la especie en estudio sintetiza mayor cantidad de esta sustancia en la etapa de fructificación.

El tiempo que necesitó el extracto fluido y las fracciones (acetato de etilo, n-butanol, cloroformo y etanol al 70 %) para reducir la solución de permanganato de potasio, se muestra en la Tabla 3.

TABLA 3

Tiempo para la decoloración del permanganato de potasio con 2,0 mL de extracto fluido y sus fracciones en el período de floración (octubre)

Extractos	t (s)	Error estándar
Quercetina	18 a	2,10
Extracto fluido	13,3 a	2,10
Acetato de etilo	14,0 a	2,10
N-butanol	72,7 b	3,63
Etanol al 70 %	79,3 b	3,63
Cloroformo	14,0 a	2,10

Quercetina: se preparó en concentración de 0,005 mg/L.

El extracto fluido fue el que menor tiempo (13,3 s) utilizó para reducir todo el permanganato añadido sin diferenciarse significativamente de la fracción de acetato de etilo y de la fracción de cloroformo que no diferenciaron del tratamiento testigo utilizado (quercetina).

Esto está dado por la presencia de mayores concentraciones de flavonoides en los extractos anteriormente mencionados. Estos tipos de metabolitos presentan un esqueleto común de difenilpiranos, compuesto por dos anillos de fenilos ligados a través de un anillo de pirano (heterocíclico) que le permite establecer un equilibrio electrónico, evitando la oxidación de una determinada molécula, los cuales muestran su presencia en alta concentración en las hojas de la especie en estudio [Urdeneta, 2008]. Komutarin (2004) demostró la capacidad antioxidante de un flavonoide polihidroxilado presente en las semillas y hojas del *Tamarindus indica* L.

Entre las fracciones de n-butanol y etanol al 70 % no existieron diferencias significativas de actividad antioxidante.

Estos resultados muestran similitud con un estudio preclínico farmacológico, donde se evaluó el efecto hepatoprotector por actividad antioxidante del extracto fluido de hojas del tamarindo y de las fracciones de acetato de etilo y n-butanol a partir de dicho extracto fluido, y los resultados demostraron que la fracción de acetato de etilo fue la que mayor poder antioxidante presenta [Escalona *et al.*, 1995].

En la fase fenológica de fructificación se obtuvieron diferencias significativas entre el extracto fluido y sus fracciones (Tabla 4). La fracción de acetato de etilo necesitó 8 s solamente para reducir el permanganato de potasio, superando al resto de los tratamientos utilizados, incluyendo al tratamiento testigo, que necesitó 18 s,

y posteriormente le sigue el extracto de fluido. Este resultado convierte a la fracción de acetato de etilo en la más activa en cuanto a actividad antioxidante, resultados que son similares a los obtenidos por Escalona *et al.* (1995). Debido a la alta capacidad que presenta el acetato de etilo de extraer fenoles totales, en los dos estados fisiológicos estudiados fue la fracción que presentó mayor actividad antioxidante, y entre ambos períodos (floración y fructificación) dicha fracción mostró mayor actividad en la etapa de fructificación, resultado que está correlacionado con los obtenidos en la cuantificación de fenoles totales, ya que las mayores concentraciones de este metabolito se obtuvieron en la etapa de fructificación, y dichos metabolitos presentan alta actividad antioxidante.

TABLA 4

Tiempo para la decoloración del permanganato de potasio con 2,0 mL de extracto fluido y sus fracciones en el período de fructificación (febrero)

Extractos	t (s)	Error estándar
Quercetina	18 b	1,90
Extracto fluido	17,0 b	1,90
Acetato de etilo	8,00 a	1,32
N-butanol	55,7 c	1,95
Etanol al 70 %	103,3 d	2,01
Cloroformo	58,3 c	1,96

Quercetina: se preparó en concentración de 0,005 mg/L.

Sin embargo, para esta etapa las fracciones de n-butanol y cloroformo presentan una mayor actividad que la de etanol al 70 %, según lo revela el análisis estadístico realizado, ya que dicha fracción redujo el permanganato de potasio en 103,3 s, resultado que la convierte en la fracción de menor actividad antioxidante.

Los resultados demuestran el poder antioxidante que presentan las hojas del *Tamarindus indica* L., coincidiendo con los trabajos realizados por Jouyex y Mortimer (1995) y Escalona *et al.* (1995), lo cual reafirma el empleo de esta especie como candidato a una determinada formulación con actividad antioxidante. Se demostró que la etapa de fructificación es el estado fisiológico ideal para realizar la colección del material vegetal para así lograr la mayor actividad farmacológica en una determinada formulación; además, se logró correlacionar la actividad antioxidante correspondiente al período de fructificación con la concentración de flavonoides totales correspondientes a dicha

etapa, ya que el extracto más activo fue el de acetato de etilo correspondiente al estado fenológico de fructificación, el cual necesitó solo 8 s para reducir el permanganato de potasio.

CONCLUSIONES

- Los extractos de hojas de *Tamarindus indica* L. mostraron capacidad antioxidante en los estados fisiológicos de floración y fructificación, siendo para todos los casos los más activos, los extractos de fluido y las fracciones de acetato de etilo.
- La mayor concentración de fenoles totales en hojas del *Tamarindus indica* L. se produjo en la floración; sin embargo, en la etapa de fructificación la concentración de flavonoides fue mayor, lo cual está estrechamente relacionado con la actividad antioxidante de los extractos evaluados.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali, M.; Ahmad, V. 1998: «Chemotropism and antimicrobial activity of *Tamarindus indica*», *Fitoterapia* (IN) (1): 43-46.
- Andersen y Kenneth, R. (ed). 2006: «Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications», *CRC Press Taylor & Francis Group*, Boca Ratón, Florida, 10 (44): 3487-2742.
- Bathia, U. K.; Gupta, S. R.; Shishadi, T.R. 1997: «Phytochemistry», *Journal of Chemical and Environmental* (GB) 5(1): 177-181.
- Cañizares, J. 2008: «Evaluación de la capacidad extractiva de diferentes soluciones hidroalcohólicas de hoja de *Tamarindus indica* L.», 46 h. Trabajo de Diploma en opción al título de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Oriente.
- Chitra Arya. 1999: «Post Infectional Changes in Flavonoids and Phenolic Acids by Fungal Pathogens in *Tamarindus indica* L.», *Res. Journal of Chemical and Environmental* (GB) 3(4): 405.
- El-Siddig, K. 2007. «*Tamarindus indica* L. in: Fruits of the Future, Ed. RPM Print and Design, W. Sussex. 12 (3): 94.
- Escalona, J. C.; Dehesa, M. A.; Bozzan, M. L. 1995: «Evaluación preclínica del efecto hepatoprotector de extractos flavonólicos de las hojas de *Tamarindus indica* L.», *Revista Cubana de Farmacia* (CU) 30(1): 292.
- Grotewold, E. 2008: *The Science of Flavonoids*. New York. Springer Science & Business Media, Inc. (US) 8(3): 301.
- InfoStat. 2012. InfoStat, versión 2012. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Jouyex, M., Mortimer, F. 1995: «Screening of antiradical, antilipoperoxidant and hepatoprotective effects of nine plants extracts used in Caribbean folk medicine», *Phytotherapy Research* (DD) 9(3): 228-230.
- Komutarin, T. 2004: «Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages *in vitro* and *in vivo*», *Food and Chemical Toxicology* (US) 42(4): 649-58, April.
- Loinert, P. J. 2009: *Plant diseases of India-a sourcebook*. New Delhi: Tata McGraw-Hill. 163 p.
- Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) 311 1991: Extractos fluidos y tinturas. Procesos Tecnológicos. MINSAP.
- NRAG 1129. 1994: Norma Ramal de la Agricultura. Extractos de Propóleos. Especificaciones. Ministerio de la Agricultura. Cuba.
- Prabhakara, P.G., Narsing, G., Satyanarayan, A., Raol, D.G. 2004: «Studies on chutney powders based on tamarind (*Tamarindus indica* L.) leaves», *Food Service Research International* (GB) 15(1): 13.
- Siddhuraju, P. 2007: «Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat», *LWT Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* (CH) 40: 982-990.
- Urdeneta, I. 2008: Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L.» 55 h. Trabajo de Diploma en opción al título de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Oriente.
- Wenynger B., Robineau, F. 1988: Seminario TRAMIL 3. La Habana.

RESEÑA CURRICULAR

Autor principal: Adolfo Ramos Marzán

Lic. en Ciencias Farmacéuticas, máster en Biotecnología Vegetal, investigador agregado de la Estación Experimental Agro-Forestal III Frente del Instituto de Investigaciones Agro-Forestales, su labor investigativa ha estado dirigida en las temáticas de Biotecnología y Genética. Ha participado en eventos nacionales e internacionales con resultados relevantes.