

# ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE CALLOS OBTENIDOS POR CULTIVO IN VITRO Y PLÁNTULAS DE *Cynara cardunculus* L.

Graciela Fernández\*, Eduardo Lorenzo, Nancy Apóstolo y Adriana Rosso

\* Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Departamento de Ciencias Básicas. Universidad Nacional de Luján.

C.C. 221, (6.700) Luján , Buenos Aires, República Argentina.

## Resumen:

Se comparó el contenido de sustancias con actividad antioxidante en callos obtenidos por cultivo in vitro con el de hojas de plántulas de *Cynara cardunculus* L. (cardo de Castilla).

Se detectó una actividad antioxidante -similar a la del antioxidante sintético 2 tert-butil-4-hidroxianisol (BHA)- que se justificaría, en gran parte, por la presencia de derivados de ácido cafeico y del flavonoide luteolina.

Los resultados obtenidos indican que el material cultivado in vitro significa una ventaja alternativa, por su calidad homogénea, en la actividad antioxidante, a diferencia del material obtenido por cultivo in vivo, más expuesto a variaciones fenotípicas.

## EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Cynara cardunculus* L. IN VITRO CULTURE

### Summary

In this work the contents of substances with antioxidant activity in callus obtained by in vitro culture and leaves of plantlets of *Cynara cardunculus* L. (Cardoon) was compared.

An antioxidant activity, very similar to the synthetic antioxidant 2 tert-butyl-4-hydroxianisol (BHA) was detected and this result could be the responsible of the presence of caffeic acid derivatives and the flavonoid luteolin.

The achieved results show that the material cultured in vitro could bring an homogeneous quality in antioxidant activity, different from the obtained from cultivated plants in vivo, sometimes affected by fenotipic variations.

### Introducción

Desde la antigüedad se han usado extractos de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae)(alcachofa) como medicación para distintas enfermedades por sus propiedades hepatoprotectoras, diuréticas, coleréticas e hipocolesterolémicas (1,2,3). Los responsables de estos efectos son los flavonoides y los derivados del ácido cafeico<sup>(1-4)</sup>. Se ha determinado la presencia de flavonoides derivados de la

**Palabras claves:** *Cynara cardunculus* , cardo de Castilla , actividad antioxidante, hepatoprotector, in vitro.

**Key words:** *Cynara cardunculus*, cardoon, antioxidant activity, hepatoprotective, in vitro culture.

luteolina ( 5, 7, 3', 4' tetrahidroxiflavona ) en *C. scolymus*<sup>(2)</sup>, así como en otras especies<sup>(5, 6)</sup>. Además, se registró la presencia de derivados de ácidos cafeico, como los ácidos monocafeoilquínicos (ácido clorogénico, neoclorogénico y cryptoclorogénico) y ácidos dicafeoilquínicos (cinarina) en *C. scolymus*<sup>(1, 2, 3, 7)</sup>.

La presencia de radicales libres en el organismo desencadena fuertes reacciones oxidativas capaces de ocasionar muerte celular, provocando hepatotoxicidad , cardiotoxicidad , envejecimiento celular, entre otros. Tanto los flavonoides como los derivados de ácido cafeico, actúan como antioxidantes al atrapar los radicales libres o al inhibir la acción de ciertas enzimas en las reacciones oxidativas<sup>(3, 4, 5, 8, 9)</sup>.

El empleo de antioxidantes naturales tiene la ventaja de no provocar efectos secundarios, como se ha comprobado que producen los antioxidantes sintéticos BHA (2 tert-butil-4hidroxianisol) y BHT (2,6 ditert-butil-4- metilfenol) en pulmón e hígado<sup>(10)</sup>.

*Cynara cardunculus* L. (cardo de Castilla) es una especie espontánea de la provincia de Buenos Aires (República Argentina); es originaria del Mediterráneo y crece como maleza en suelos sueltos y bien drenados<sup>(11)</sup>. En las partes vegetativas de esta especie se han identificado cinarina<sup>(12, 13)</sup> y flavonas<sup>(12)</sup>, como *C. scolymus*.

El cultivo in vitro es una alternativa válida para la obtención de antioxidantes naturales derivados de material vegetal libre de variaciones climáticas, genéticas y estacionales. Por esta razón, en este trabajo se propone comprobar la actividad antioxidante y la presencia de los derivados de ácidos cafeicos y flavonoides de los callos obtenidos por cultivo in vitro de *C. cardunculus*.

## **Materiales y Métodos**

Las plántulas de *C. cardunculus* L. fueron obtenidas a partir de semilla y crecieron en una cámara de cultivo. Las plantas adultas fueron recolectadas de los alrededores de la Universidad Nacional de Luján, provincia de Buenos Aires. Los ácidos cafeico y clorogénico se compraron a Sigma Chemical Co. y el BHA a Fluka AG. La luteolina y la cinarina se obtuvieron a partir de una droga comercial.

### **Cultivo in vitro**

Para la producción de callos se usaron, como explanto, láminas de hojas jóvenes de *C. cardunculus*.

Los explantos se cultivaron en medio de cultivo compuesto por solución salina de Murashige-Skoog<sup>(14)</sup> con vitaminas de Fossard<sup>(15)</sup>, sacarosa 30 g l<sup>-1</sup>,

caseína 0,8 g l<sup>-1</sup>, BA (benciladenina) 1 mg l<sup>-1</sup>, NAA (ácido naftalenacético) 3 mg l<sup>-1</sup> y agar 7 g l<sup>-1</sup>.

El cultivo se mantuvo en una temperatura de  $24 \pm 1$  °C y un fotoperíodo de 16 horas. luz con lámparas fluorescentes blanco frío. Los periodos de cultivo y subcultivos fueron de 30 días.

### **Cromatografía**

Para los callos derivados del cultivo *in vitro* y las hojas de plántulas de *C. cardunculus* secados a 60 °C se prepararon extractos en una proporción de 1 gr de material vegetal en 10 ml de metanol caliente en baño de agua a 60 °C durante 10 minutos. El extracto fue evaporado hasta un volumen de 2 ml<sup>(16)</sup>.

Se realizaron cromatografías en capa delgada con 50 ml de extracto del material vegetal y 20 ml de droga testigo en cromatofolios de silica-gel 60 F254 Merk®. Se probaron dos fases móviles: (A) HCl 0.1 N y (B) acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100 : 11 : 11 : 27). Se realizó la detección con luz UV a 254-365 nm y el revelado con éster 2-aminoetil difenil bórico 1% en metanol<sup>(16)</sup>.

### **Determinación de actividad antioxidante**

Se utilizaron vástagos adultos, flores, hojas de plántulas y callos derivados del cultivo *in vitro* de *C. cardunculus*.

Se siguieron tres métodos de extracción: *Método 1*: acetona a 5 °C (acetona fría). *Método 2*: metanol a 5 °C (metanol frío). *Método 3*: metanol en baño de agua a 60 °C (metanol caliente). En los tres métodos se utilizó 1 g de material vegetal por cada 10 ml de solvente.

La actividad antioxidante de los extractos se determinó por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) y se midió la absorbancia a 532 nm<sup>(7)</sup>. A las muestras de 0.5 y 1 ml de cada extracto vegetal llevado a sequedad, se les adicionaron 1 ml de ácido linoleico 2,5 % en etanol absoluto, 2 ml de buffer fosfato pH 7 50 mM y 1ml de agua destilada. Simultáneamente, se realizó un control que contenía 1 ml de etanol en lugar del extracto vegetal. Las mezclas de incubación se colocaron en un baño de agua a 30 °C en oscuridad con agitación y se tomaron alícuotas durante 7 días.

### **Determinación cuantitativa del ácido clorogénico**

Se usaron extractos de callos derivados del cultivo *in vitro* y de hojas de plántula de *C. cardunculus*.

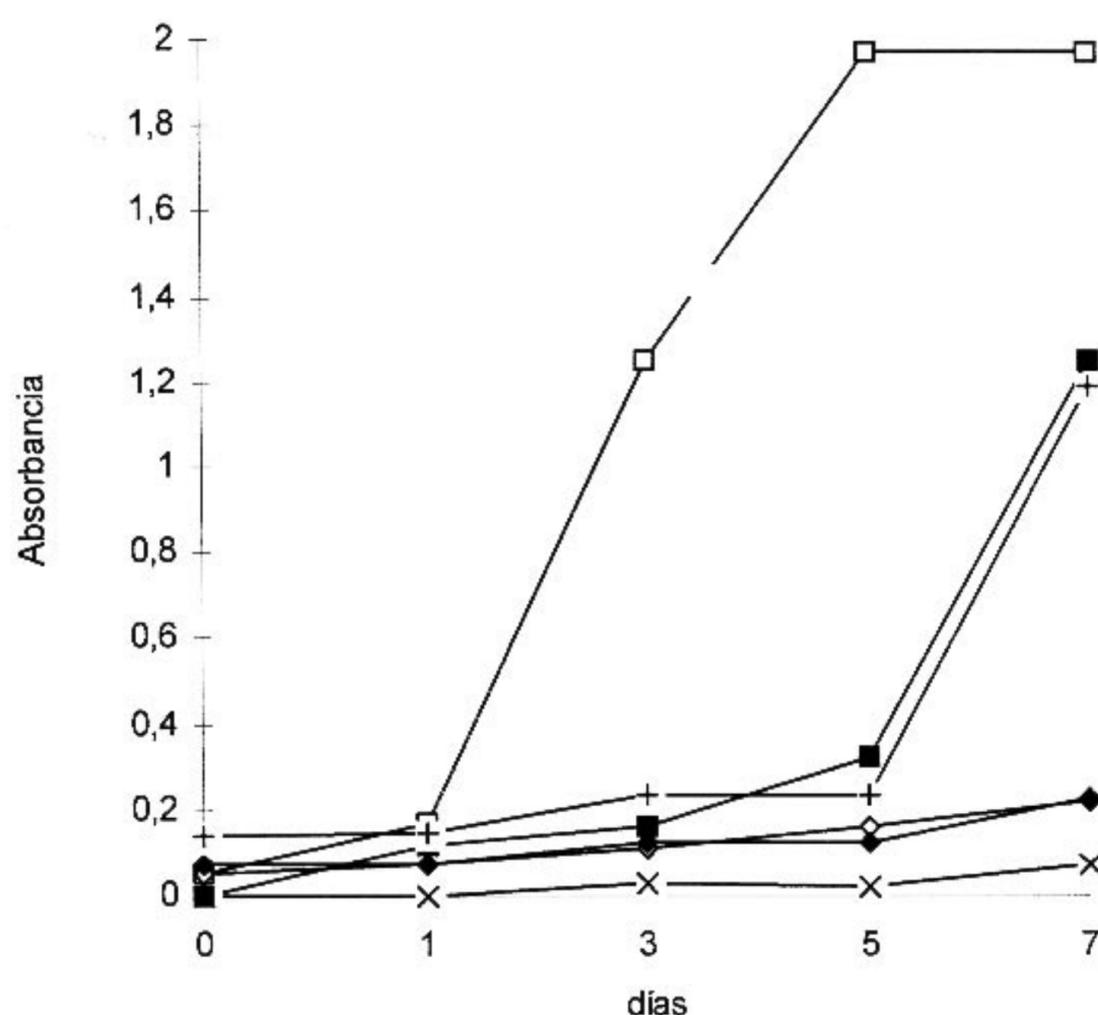
Los extractos fueron preparados con 1 g de material vegetal, a los cuales se les agregaron 5 ml de metanol y se incubaron en baño de agua a 60 °C por 10 minutos. El extracto se filtró y se diluyó adecuadamente para su análisis espectrofotométrico.

Las mediciones espectrofotométricas se realizaron en un aparato Shimadzu UV 240. Se realizó la curva de calibración con solución estándar de ácido clorogénico en metanol (0.25 a 5 mg/ml). Las determinaciones se hicieron a 322 nm y los resultados se expresaron como mg de ácido clorogénico/ml.

## Resultados

La fase móvil que mostró mejor resolución en la cromatografía en placa delgada fue la B (ver métodos). Se detectó la presencia de ácido clorogénico (Rf 0.57), cinarina (Rf 0.72) y ácido cafeico (Rf 0.98) en los extractos de hojas de plántula y de callos. La presencia de luteolina (Rf 0.65) se detectó en plántula, pero no en callos.

Los tres métodos de extracción para la determinación de la actividad antioxidante mostraron un comportamiento similar en plántula y callos para las concentraciones ensayadas. Hasta el quinto día, tanto las plántulas como los callos mostraron una actividad comparable a la del BHA, actividad que comenzó a disminuir a partir del séptimo día (Fig. 1, 2 y 3).



**Figura 1.** - Extracción con acetona fría: actividad antioxidante de la plántula y los callos in vitro de *C. cardunculus* (volumen a 0.5 ml y 1.0 ml; absorbancia a 532 nm.). Referencias: -□-, control ; -x-, BHA 0.02 %; -◇-, plántula 0.5 ml ; -◆-, plántula 1.0 ml; -■-, callos 0.5 ml ; -+-, callos 1.0 ml.

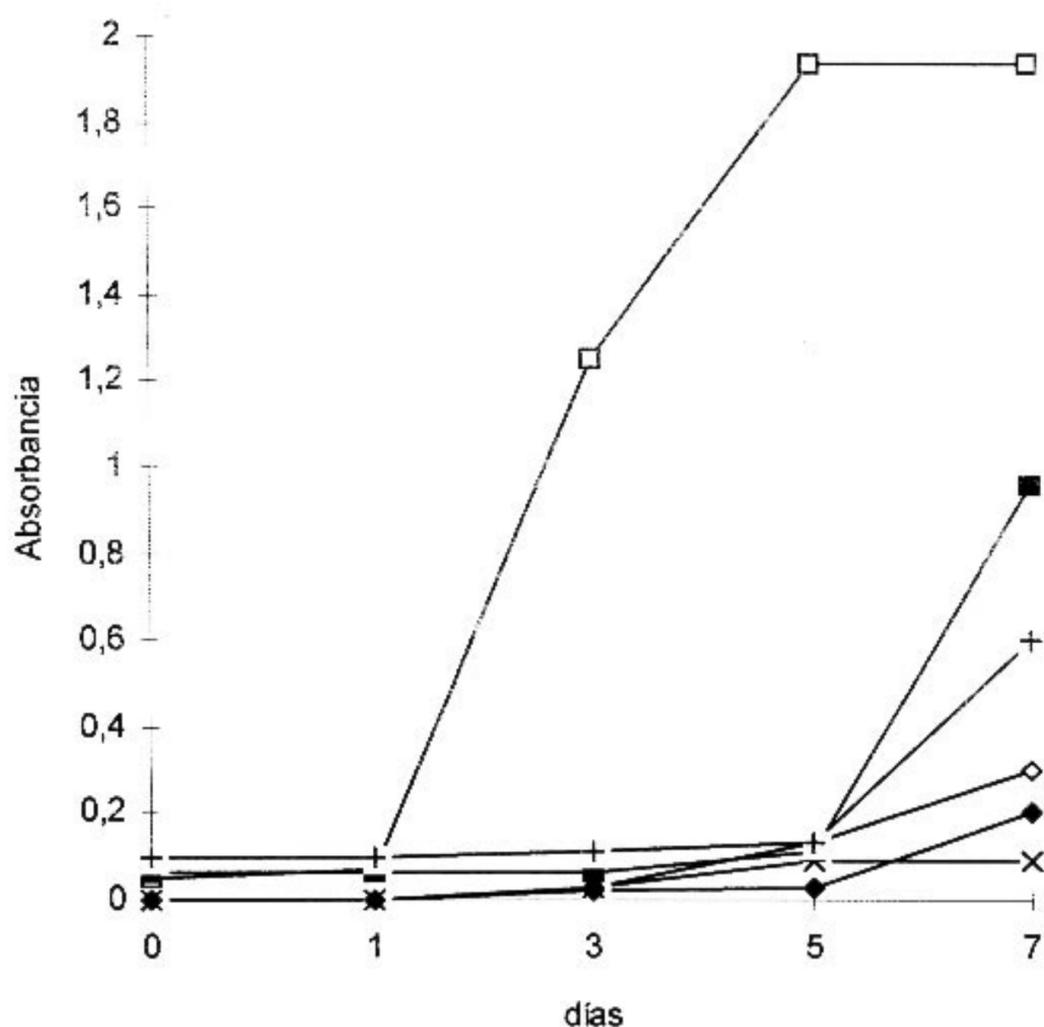


Figura 2.- Extracción con metanol frío, actividad antioxidante de plántula y callos in vitro de *C. cardunculus* (volumen a 0.5 ml y 1.0 ml; absorbancia a 532 nm). Referencias: -□-, control; -x-, BHA 0.02 %; -◇-, plántula 0.5 ml; -◆-, plántula 1.0 ml; -■-, callos 0.5 ml; -+-, callos 1.0 ml.

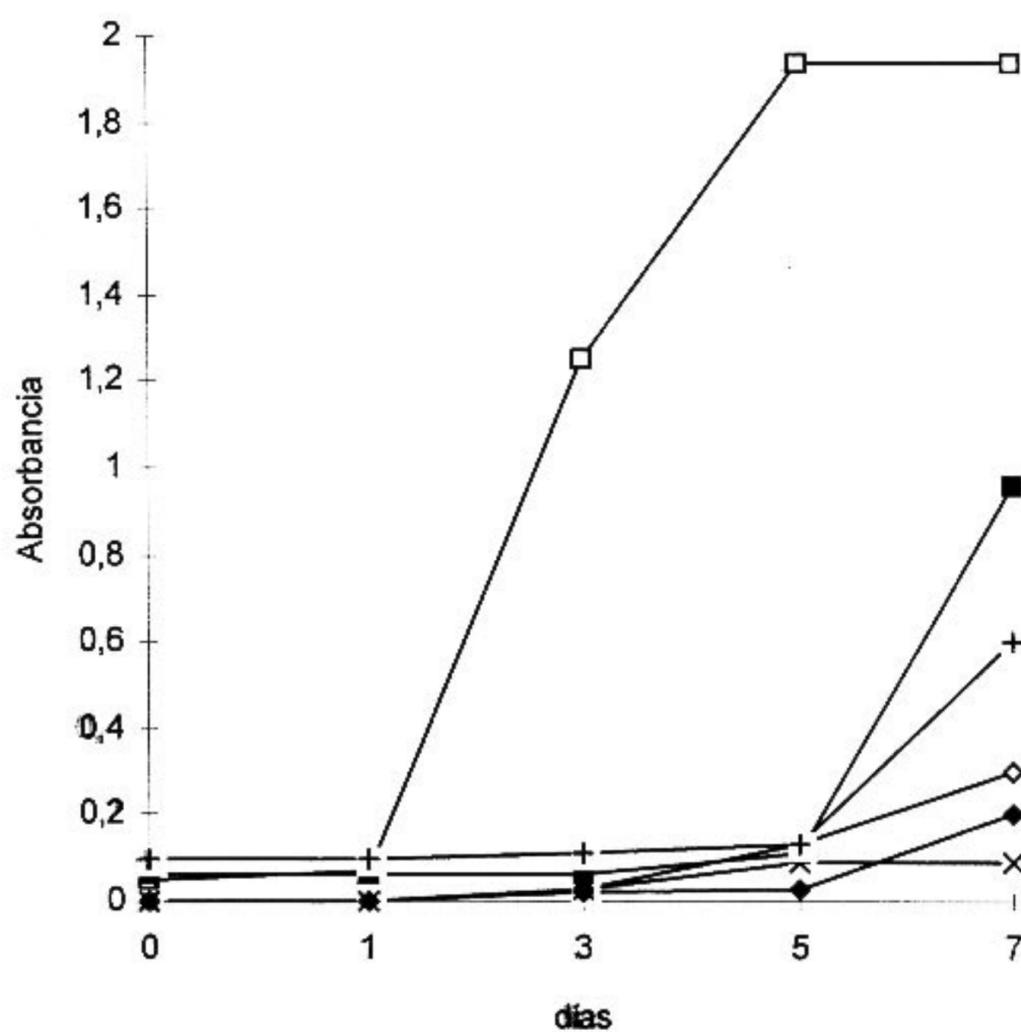
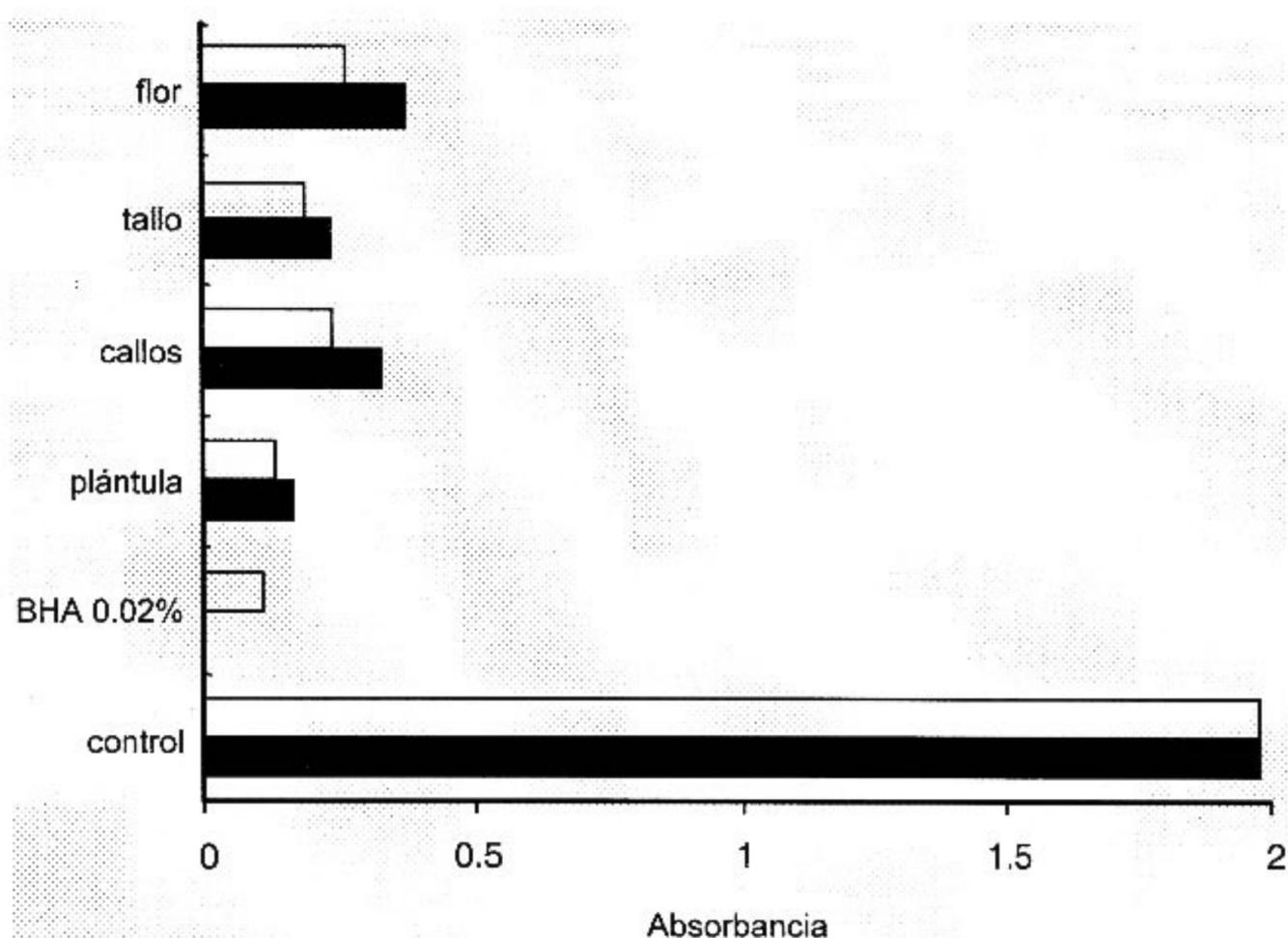


Figura 3.- Extracción con metanol caliente: actividad antioxidante de plántula y callos in vitro de *C. cardunculus* (volumen a 0.5 ml y 1.0 ml; absorbancia a 532 nm). Referencias: -□-, control; -x-, BHA 0.02 %; -◇-, plántula 0.5 ml; -◆-, plántula 1.0 ml; -■-, callos 0.5 ml; -+-, callos 1.0 ml.

Se utilizó también el método de extracción 1 (acetona fría) para analizar la actividad antioxidante de otras partes de la planta adulta en comparación con la plántula y los callos. El tallo y las flores de la planta adulta mostraron un comportamiento similar al obtenido en callos y plántulas (Fig. 4).



**Figura 4.-** Actividad antioxidante de otras partes vegetales en relación a plántula y callos de *C. cardunculus*. Extracción en acetona fría a los cinco días de actividad para volumen 0.5 ml ■ y 1.0 ml □ . Absorbancia a 532 nm .

Los resultados del análisis espectrofotométrico cuantitativo (Tabla 1) mostraron que el contenido de ácido clorogénico en los callos era mayor que el de la plántula.

| Extractos de | mg ácido clorogénico / gr PF | mg ácido clorogénico / gr PS |
|--------------|------------------------------|------------------------------|
| callos       | 367.5                        | 4966.21                      |
| plántulas    | 279.0                        | 2536.36                      |

**Tabla 1. -** Contenido de ácidos cafeilquínicos (expresados en ácido clorogénico) en callos in vitro y plántulas de *C. cardunculus*. Referencias : PF, peso fresco ; PS, peso seco a 60 °C hasta peso constante.

## Discusión y Conclusión

Se comprobó que tanto en la plántula como en los callos hay una efectiva actividad antioxidante. Aunque en callo la actividad es menor, el contenido de ácido clorogénico es mayor que en plántula. La mayor actividad antioxidante en plántula podría explicarse por la presencia de los derivados de ácido cafeico y de luteolina, señalada por varios autores, como un potente inhibidor de enzimas, por ejemplo, la lipoxigenasa<sup>(2, 5, 6, 9)</sup>.

Todas las drogas vegetales seleccionadas para usos como digestivos, colagogos, coleréticos y hepatoprotectores tienen un alto contenido de ácidos dicafeilquínicos<sup>(3)</sup>. Así, la presencia de cinarina, ácido cafeico y ácido clorogénico en *C. cardunculus* L. ofrece una alternativa para la obtención de drogas de uso farmacológico.

Los resultados obtenidos con el estudio de los extractos de callos in vitro permiten señalar que el cultivo de tejidos vegetales constituye una eficaz alternativa para una constante y homogénea provisión de los antioxidantes naturales mencionados. Su eficacia reside en que están exentos de las variaciones genéticas, climáticas y estacionales, y a las inherentes al momento de cultivo y recolección, que afectan a los cultivos in vivo.

## Referencias bibliográficas

1. Ben-hod, G.; Basnizki, Y.; Zohary, D. and Mayer, A.M. (1992). "Cynarin and Chlorogenic acid content in germinating seeds of Globe Artichoke *Cynara scolymus* L." *J. Genet. & Breed.* 46: 63-68.
2. Bombardelli, E.; Gabetta, B. and Martinelli, E.M. (1977). "Gas-liquid chromatography and mass spectrometric investigation on *Cynara scolymus* extracts". *Fitoterapia* 4: 143- 151.
3. Debenedetti, S.L.; Palacios, P.S.; Wilson, E.G. and Coussio, J.D. (1991). "Contribución al control de calidad de plantas medicinales argentinas : Análisis por HPLC de su contenido en ácidos cafeilquínicos". Presentación premio CAEME. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.
4. Lietti, A. (1977). "Choleretic and cholesterol lowering properties of two Artichoke extracts". *Fitoterapia* 4: 153-158.
5. Larson, R.A. (1988). "The antioxidants of higher plants". *Phytochemistry* 27(4): 969-978.
6. Lee, Y.; Howard, L.R. and Villalón, B. (1995). "Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper *Capsicum annum* cultivars". *J. Food Sci.* 60(3): 473 - 476.
7. Panizzi, L. and Scarpatti, M.L. (1954). "Isolamento e costituzione del principio attivo del carciofo". *Gazzeta Chimica* 84: 792-815.
8. Pratt, D.E. (1972). "Water soluble antioxidant activity in soybean". *J. Food Sci.* 37: 322-323.
9. Torel, J.; Cillard, J. and Cillard, P. (1986). "Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical". *Phytochemistry* 25 (2): 383-385.
10. Inatani, R.; Nakatani, N. and Fuwa, H. (1983). "Antioxidative effect of the constituents of rosemary *Rosmarinus officinalis* L. and their derivatives". *Agric. Biol. Chem.* 47 (3): 521-528.
11. Cabrera, A. and Zardini, E. (1972). "Flora de los alrededores de la Provincia de Buenos Aires". ACME. Buenos Aires.

12. Grançal, D.; Nagy, M.; Suchy, V. and Novomesky, P. (1994). "Cynarin from fresh flowers buds of *Cynara cardunculus*". *Fitoterapia* 65(3): 282.
13. Panizzi, L. and Scarpatti, M.L. (1964). "Sugli acidi 1,4 - ed 1,5 dicaffeilchinicic". *Gazzeta Chímica* 95: 71-82.
14. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco". *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
15. de Fossard, R.A. (1976). "Tissue Culture for Propagator". 2ªedic. University of New England . Dept. Bot. Amidale. Australia .
16. Wagner, H.; Blatt, S. and Zgainski, E.M. (1984). "Plant drug analysis : thin layer chromatography atlas". Springer - Verlag. Berlin.