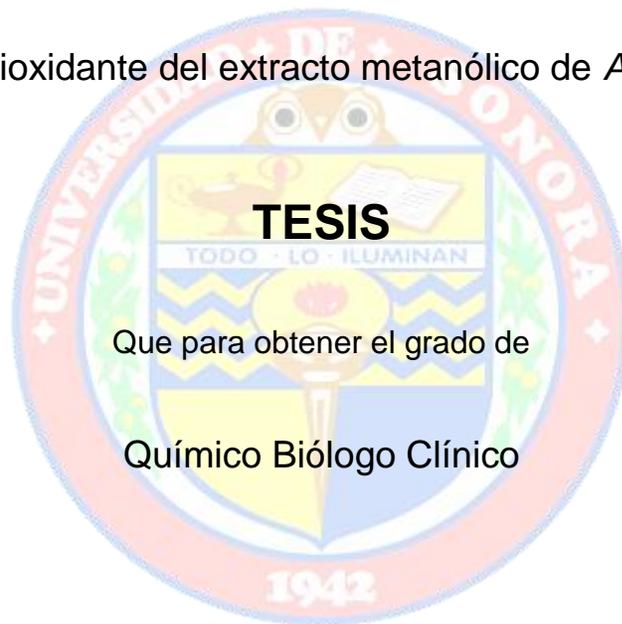


# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y  
AGROPECUARIAS

Actividad Antioxidante del extracto metanólico de *Asparagus spp.*



**TESIS**

Que para obtener el grado de  
Químico Biólogo Clínico

Presenta

**Andreyna Caballero Murrieta**

Caborca, Sonora

Abril de 2013

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar el trabajo de Tesis de **Andreyna Caballero Murrieta**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Químico Biólogo Clínico otorgado por la Universidad de Sonora, Unidad Regional Norte, Campus Caborca.

---

Presidente

Dra. Dora Edith Valencia Rivera

---

Secretario

M.C. Ramón Efraín Lugo Sepúlveda

---

Vocal

Dra. Beatriz Montaña Leyva

---

Suplente

M.C. Eligio Espinoza Ojeda

## **DEDICATORIAS**

### **A Dios:**

Por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

### **A mis padres:**

Cuauhtémoc y Leonila, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a Ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por Ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

### **A mis hermanos:**

Marcela, y Jesús C. para ser un ejemplo de que las metas si se alcanzan cuando uno se lo proponen. (Siguen Ustedes).

**A mi manina:**

A mi viejita chula que desde el cielo me impulsa a seguir adelante y a no dejar nada inconcluso, más que a nadie este gran logro, esta satisfacción es para ti Manina te amo y sé que desde el cielo celebras conmigo.

**A mis tías, primas:**

Porque siempre están conmigo aconsejándome, alentándome y echándome porras gracias las quiero mucho tía Norma, tía Eliza, tía Imelda, a mis primas Claudia, Karina, Abril, Marcia a todas.

Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Sonora por haber sido mi casa en estos últimos años de mi vida, por darme la oportunidad de prepararme.

Le agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a mi asesora la **Dra. Dora Edith Valencia Rivera**. Por haber compartido sus conocimientos, y haberme apoyado en mi tesis, por haber creído en mí, en que lograría sacar el tema adelante una y mil veces más, gracias.

A la **Dra. Beatriz Montaña Leyva** por apoyarnos con el proyecto, y estar al pendiente si ocupábamos algo, muchas gracias.

Al **M.C. Ramón Efraín Lugo** por apoyarnos con el proyecto. Por sus enseñanzas, gracias por ser buen maestro.

Al **M.C. Eligio Espinoza Ojeda** por su apoyo durante el proyecto.



## CONTENIDO

	Página
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	iii
<b>LISTA DE TABLAS</b>	iv
<b>ABREVIATURAS</b>	v
<b>RESUMEN</b>	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	4
2.1. <i>Asparagus spp.</i>	4
2.2. Actividades biológicas del espárrago	9
2.3. Actividad antioxidante	11
2.3.1. Método por el radical DPPH	13
2.4. Caracterización química y biológica del espárrago en México	15
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	16
<b>4. OBJETIVOS</b>	17
4.1. General	17
4.2. Particulares	17
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	18
5.1. Recolección del espárrago	18
5.2. Liofilización del espárrago	18
5.3. Obtención de los extractos metanólicos	21

5.4. Determinación de la actividad antioxidante	21
5.5. Análisis estadístico	22
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>23</b>
6.1. Recolección del espárrago y preparación de la muestra	23
6.2. Rendimiento de la extracción metanólica	24
6.3. Actividad antioxidante de los extractos metanólicos del espárrago	24
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>28</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>30</b>
<b>9. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO</b>	<b>31</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>32</b>
<b>11. APÉNDICES</b>	<b>38</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1A	Rizoma y raíces de una planta de espárrago.	5
1B	Tallo y helecho de una planta de espárrago, con flores, frutos y semillas	6
2	Cultivo de espárrago blanco y espárrago verde.	8
3	Reacción de desprotonación del grupo funcional reactivo	14
4	Ubicación geográfica del Campo San José	19
5	A) Vegetal (espárrago) completo. B) Espárrago parte comestible (EPC). C) Espárrago parte no comestible (EPNC).	20
6	Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de los extractos metanólicos de espárrago (DPPH).	26

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Rendimiento del proceso de liofilización del espárrago.	25
2	Rendimiento de la extracción metanólica.	25
3	Actividad antioxidante (%) de los extractos metanólicos EPC y EPNC	27

## ABREVIATURAS

μg	Microgramo
μM	Micromolar
A-549	Línea celular de carcinoma de pulmón humano
A.C.	Antes de Cristo
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
Ca	Calcio
cm	Centímetros
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EPC	Espárrago parte comestible
EPNC	Espárrago parte no comestible
Fe	Hierro
g	Gramos
HAT	Transferencia de átomos de hidrógeno
HELA	Línea celular de cáncer cérvico uterino
HEPG2	Línea celular de carcinoma de hígado humano
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria a la cual reduce al 50 % la proliferación celular
mBar	Milibar (unidad de presión)
MCF7	Línea celular adenocarcinoma de mama humano
Mg	Magnesio

mL	Mililitros
msnm	Metros sobre nivel del mar
nm	Nanómetros
°C	Grados centígrados
P	Fósforo
pH	Potencial de hidrógeno
p:v	Relación peso-volumen
rpm	Revoluciones por minuto
SET	Transferencia de electrones individuales

## RESUMEN

El espárrago es una planta herbácea perenne de la familia de las liliáceas, que soporta factores climáticos extremos. Es un producto perecedero cuyo brote tierno denominado turión es considerado un alimento gourmet por su exclusivo consumo y sus altos precios. Entre los principales atributos de esta hortaliza se cuentan el ser un producto bajo en calorías, en grasa y colesterol, con alto contenido de vitaminas A, B, C, tiamina y riboflavina, así como rico en potasio y en fosfato de calcio. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la actividad antioxidante del extracto metanólico del espárrago (*Asparagus spp.*). El espárrago fue recolectado en el mes de febrero de 2013 en la región agrícola de la costa de Caborca, Sonora. La capacidad antioxidante fue evaluada por el método químico de estabilización del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). El extracto metanólico de la parte comestible del espárrago (EPC) mostró mayor actividad antioxidante ( $65.26 \pm 0.16$  % de actividad antioxidante) a la concentración de 800  $\mu\text{g/mL}$  que el extracto metanólico de la parte no comestible del espárrago (EPNC,  $45.72 \pm 5.31$  % de actividad antioxidante) evaluado a la misma concentración. Los resultados obtenidos indican que los espárragos de la región de Caborca, Sonora son una fuente natural importante de antioxidantes. Sin embargo es necesario realizar la caracterización química del espárrago de la región para identificar los constituyentes químicos

responsables de la actividad antioxidante mostrada por los extractos metanólicos.

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las plantas representan el recurso natural más utilizado para la búsqueda de compuestos bioactivos y se encuentran en estudio una gran variedad de familias de plantas, algunas como *Umbelliferae*, *Euphorbaceae*, *Papaveraceae*, *Annonaceae* y *Liliaceae* (Bagiu, *et al.*, 2012).

El espárrago es una planta dioica y perenne del género *Asparagus*, perteneciente a la familia de las Liliáceas. Este género comprende unas 100 especies originarias del sur de Europa, Asia y África, algunas de ellas con valor ornamental y sólo una con valor hortícola, *Asparagus officinalis* L. (Gatti *et al.*, 2003). El espárrago ha sido considerado un alimento de gran prestigio desde la antigüedad. Los primeros vestigios del espárrago aparecieron en forma de pinturas en los monumentos egipcios (3,000 A.C.). Eran dibujados atados en manojos con dos o tres ligaduras y en este caso parecían ser utilizados como ofrenda a los dioses. Los médicos griegos y romanos recomendaban su consumo por las múltiples propiedades terapéuticas encontradas en los espárragos silvestres, actualmente conocidos como trigueros. En la farmacopea española, se le atribuyen propiedades medicinales como tónico estomacal, diurético, laxante y antihemorrágico; además de utilizarse también para prevenir la formación de cálculos renales y biliares, e incluso como anticarcinógeno (Fuentes Alventosa, 2009).

El espárrago, además de ser una hortaliza muy apreciada por sus características organolépticas y nutricionales, se puede considerar un alimento de gran calidad funcional ya que contiene diversos fitoquímicos que le confieren una potencial actividad biológica importante. Actualmente, se encuentra reportado en la literatura que esta hortaliza posee una gran variedad de actividades biológicas: antifúngica (Wang *et al.*, 2001; Sautour *et al.*, 2007), anticarcinógeno (Almehdar *et al.*, 2012; Mitra *et al.*, 2012), antioxidante (Kongkaneromit *et al.*, 2011), antiviral (Sabde *et al.*, 2011) hipoglucemiante (Somani *et al.*, 2012), antiparasitaria (Debebe *et al.*, 2012), hepatoprotectora (Rupesh *et al.*, 2011), entre otras. Entre los principales componentes bioactivos del espárrago destacan las saponinas esteroideas, aceites esenciales, asparagina, arginina, tirosina, flavonoides (kaempferol, quercitina y rutina), taninos; también se han identificado ácido fólico, vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, E y algunos oligoelementos como Mg, P, Ca y Fe (Negi, 2010).

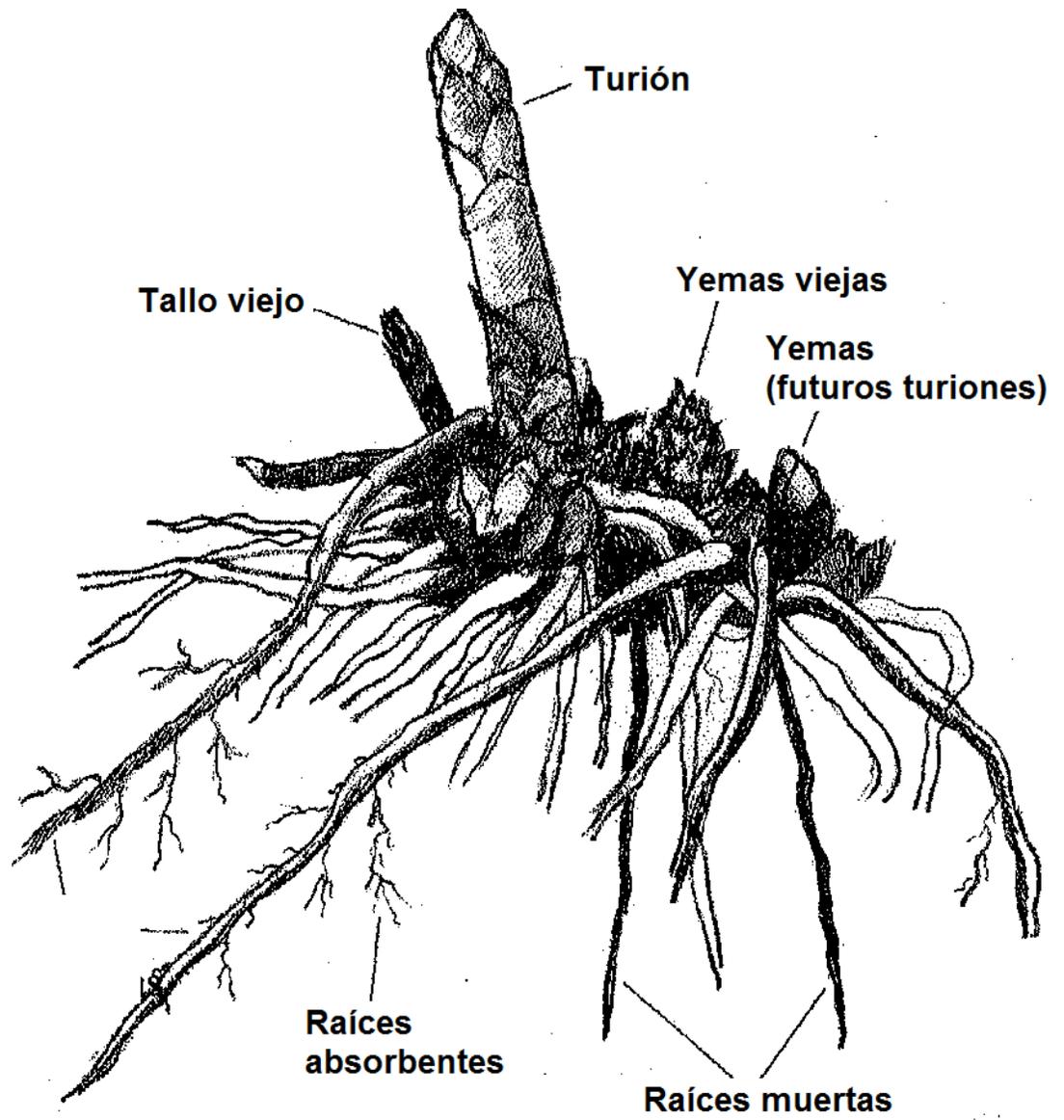
El estudio de las propiedades biológicas del espárrago en México es limitado, debido a que las investigaciones se enfocan principalmente al mejoramiento en la productividad y calidad del cultivo; por lo cual parece necesario profundizar en el conocimiento de los compuestos bioactivos presentes en el vegetal y su función en la prevención de diversas enfermedades. De manera conjunta, con base a las propiedades biológicas reportadas en espárrago cultivado en otras regiones del mundo es de gran interés encontrar un valor agregado a un

producto hortícola de gran importancia económica para la región de Caborca, Sonora mediante el estudio de la actividad antioxidante del espárrago de la región.

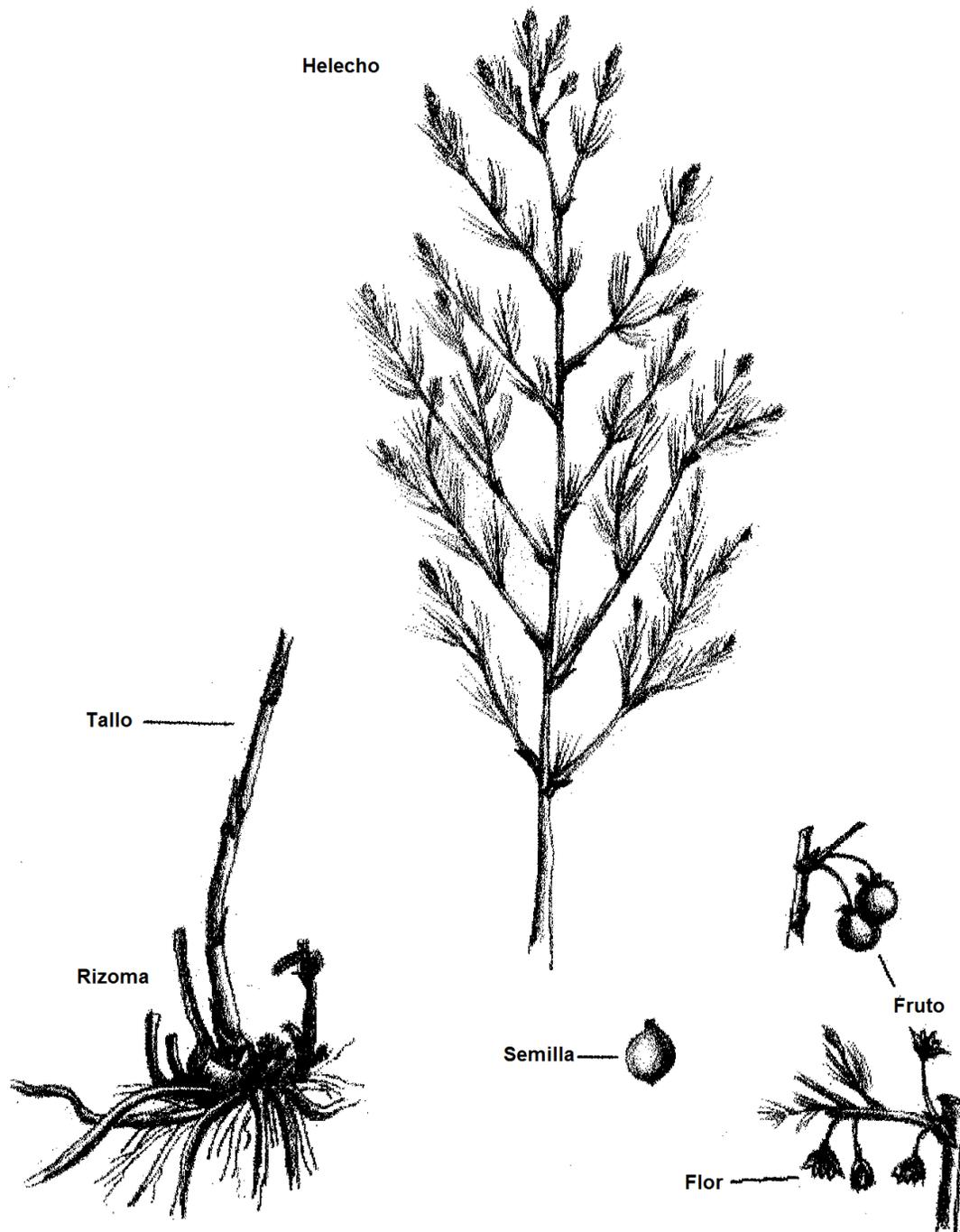
## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. *Asparagus spp.*

El espárrago (*Asparagus officinalis* L. subespecie *officinalis*) es una especie herbácea perenne, monocotiledonea, nativa de Europa y Asia. Es una planta dioica, es decir hay plantas con flores masculinas y plantas con flores femeninas. Pertenece a la familia de las Liliaceae junto con otras 150 especies. Dentro el género *Asparagus* existen otras que no son comestibles, pero que son usadas como plantas ornamentales (*A. sprengeri*, *A. plumosus*, *A. laricinus* y *A. recemosus*) (Fuentes Alventosa, 2009). Como cultivo el espárrago se desarrolló en la zona del Mediterráneo y se expandió hacia el noroeste de Europa en la época de los romanos. Se adapta a una gran variedad de ambientes, tales como climas desérticos (norte de México, Perú) mediterráneos (Chile central y California) marinos (sur de Chile, Nueva Zelanda, Inglaterra) templados fríos (Polonia) por lo cual hoy en día es un cultivo de amplia distribución mundial (del Pozo 1999). La planta del espárrago posee una parte subterránea, la cual está constituida por un rizoma y el sistema radical, que en conjunto forman lo que se denomina “corona” (**Figura 1A**) y una parte aérea compuesta por tallos erectos, ramos y hojas, los cuales constituyen el helecho; sobre el cual se desarrollan las flores y frutos (**Figura 1B**) (del Pozo 1999; Fuentes Alventosa, 2009).



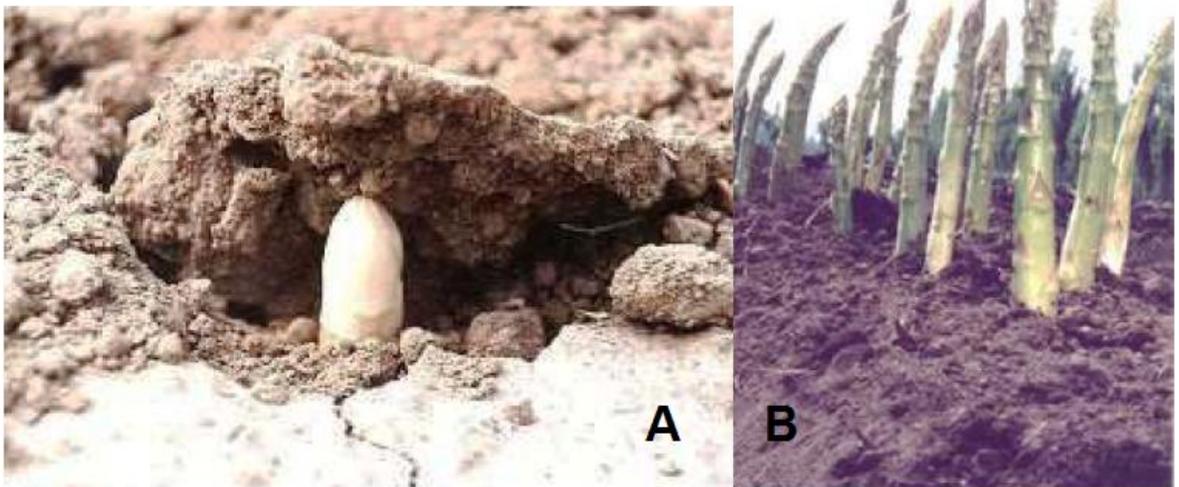
**Figura 1A.** Rizoma y raíces de una planta de espárrago (del pozo 1999).



**Figura 1B.** Tallo y helecho de una planta de espárrago, con flores, frutos y semillas (del Pozo 1999).

El espárrago se clasifica en dos grupos principales: el espárrago verde y el espárrago blanco. Desde el punto de vista botánico, el espárrago blanco y verde constituye la misma planta. La diferencia entre uno y otro surge de la forma en que ha crecido el brote. Mientras los brotes jóvenes de los espárragos están creciendo dentro de la tierra, son de color blanquecino, pero cuando emergen del suelo y se exponen a la luz, adquieren una coloración verde debido a que la misma activa la función clorofílica. El espárrago blanco, por lo tanto, se recolecta tan pronto como emerge de la tierra, mientras que los verdes se espera a cortarlos cuando alcanzan una altura sobre el suelo de unos 20 cm **(Figura 2)** (Perfeti, 1999).

Las características organolépticas y los usos culinarios de cada tipo de espárrago son diferentes. El verde se caracteriza por tener mayor valor nutritivo, textura carnosa y firme, aroma más intenso y sabor ligeramente más dulce, mientras el blanco tiene un mayor contenido en azúcares y más fibra (Fuentes Alventosa, 2009). Ambos tipos de espárragos son cultivados a nivel mundial, aunque tradicionalmente el tipo blanco se ha cultivado en China y Europa, mientras que el tipo verde en México, en el sur de la Península Ibérica, Estados Unidos y Europa.



**Figura 2.** Cultivo de espárrago A) blanco y B) espárrago verde.

## **2.2. Actividades biológicas del espárrago**

El espárrago, además de ser una hortaliza muy apreciada por sus características organolépticas y nutricionales, se puede considerar un alimento de gran calidad funcional ya que contiene diversos fitoquímicos que le confieren una actividad biológica importante (Bast, 2005). Entre estos compuestos destacan los compuestos de tipo fenólicos (como ácidos hidroxicinámicos y flavonoides), saponinas, esteroides, fructanos y polisacáridos de la pared celular. Estudios farmacológicos (Yu *et al.*, 1996; Kamat *et al.*, 2000; Wiboonpun *et al.*, 2004) han demostrado que extractos de espárrago poseen diversas actividades biológicas, siendo de especial interés la capacidad antioxidante y la actividad antitumoral (Kongkaneramt *et al.*, 2011; Almehdar *et al.*, 2012). Otra actividad biológica de gran importancia reportada en el espárrago es su capacidad de influir sobre el metabolismo de lípidos y ayudar a disminuir los niveles de colesterol en el organismo, esta propiedad ha sido atribuida a la presencia de algunos esteroides y saponinas (García *et al.*, 2012), sin embargo, este tipo de compuestos también ha sido reportados con actividad anticarcinógena (Shao *et al.*, 1996). En las últimas décadas se han realizado investigaciones que han revelado que las saponinas procedentes de diferentes vegetales disminuyen los niveles de colesterol en plasma, tanto en animales de experimentación como en humanos. Grandes micelas formadas por la interacción de saponinas con los ácidos biliares conllevan al aumento de su excreción, cuando se consumen

alimentos ricos en saponinas (Oakenfull, 1986; Oakenfull *et al.*, 1990). Por lo tanto, el metabolismo acelerado del colesterol en el hígado causa una disminución del colesterol en plasma.

Yang Shen y colaboradores (Yang Shen, 2011) reportaron la presencia de una saponina, aspacochioside, aislada por primera vez de *Asparagus cochinchinensis* la cual mostró importante actividad antiproliferativa en la línea celular carcinógena, A-549 (carcinoma de pulmón humano). Se ha reportado que espárrago (*Asparagus officinalis* L.) cultivado en la región de Arabia Saudita posee actividad antiproliferativa sobre distintas líneas celulares carcinógenas, con valores de IC<sub>50</sub> (concentración inhibitoria a la cual se reduce al 50 % la proliferación celular) bajos (MCF7, HELA, HEPG2: 19.9, 33.0 y 23.0 µg/mL respectivamente) (Almehdar *et al.*, 2012).

En los últimos años, la evaluación de la actividad antioxidante de los alimentos, así como productos naturales, farmacéuticos y cosméticos ha incrementado; el interés en este campo comenzó a expandirse en la década de 1990 basada en la observación de que muchos productos naturales tienen efectos beneficiosos sobre la salud humana. En este sentido, otra de las actividades biológicas más estudiada en las diferentes especies del género *Asparagus* es la actividad antioxidante. Kongkaneramt Lalana y colaboradores en el 2012, reportaron que

el extracto acuoso de *Asparagus racemosus* posee actividad antioxidante, la cual se la atribuyen a la presencia de compuestos de tipo fenólico (Kongkaneramt et al., 2011). De igual forma se ha reportado que el extracto hidroalcohólico del espárrago silvestre, *Asparagus recemosus*, mostró importante actividad antioxidante (Acharya et al., 2012). *Asparagus officinalis* cultivado en el sureste de Brasil también ha sido reportado con actividad antioxidante significativa (Tiveron et al., 2012). Zhao y colaboradores (Zhao et al., 2012) demostraron que polisacáridos aislados de *Asparagus officinalis* poseen buena actividad antioxidante.

### **2.3. Actividad antioxidante**

Los antioxidantes se definen como una sustancia que incluso en pequeñas cantidades, es capaz de prevenir o retrasar la oxidación de materiales de fácil oxidación, o bien puede definirse como una sustancia que es capaz de inhibir algunas enzimas oxidantes específicas o sustancia que reacciona con agentes oxidantes antes de que cause daño a otras moléculas. (Bhatt et al., 2013). Los antioxidantes naturales más estudiados en los vegetales son los flavonoides, los polifenoles, los carotenoides, la fibra, las vitaminas A, B, C y E, tocoferoles, así como los oligoelementos calcio y selenio, los cuales pueden actuar de forma

independiente o en combinación como agentes anticarcinógenos o cardioprotectores por medio de diversos mecanismos.

Se han desarrollado varios métodos químicos para determinar el potencial antioxidante. En general, existen dos tipos de pruebas químicas que dependen del mecanismo de acción de los antioxidantes. Un tipo de prueba es la que involucra la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y otro tipo de prueba es la que involucra la transferencia de electrones individuales (SET) (Dudonne *et al.*, 2009).

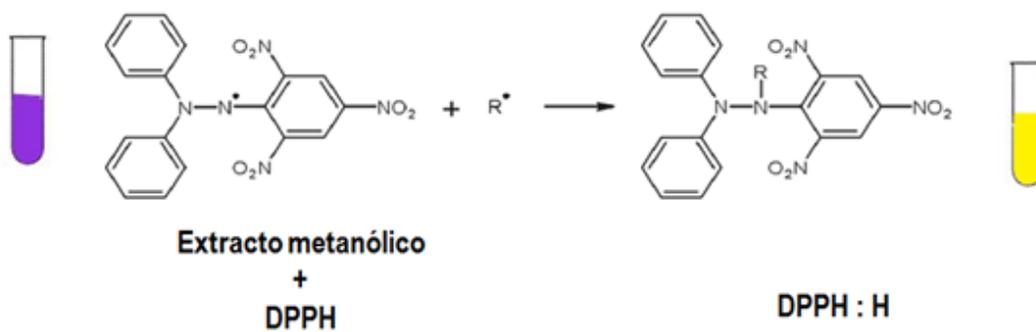
Las pruebas tipo HAT son más relevantes para evaluar la capacidad de los antioxidantes para romper la reacción de oxidación en cadena de los lípidos. Las reacciones HAT dependen del solvente y del pH y generalmente son rápidas, completándose típicamente en segundos o minutos. La mayoría de las pruebas de tipo HAT monitorean la cinética de una reacción competitiva. La cuantificación se deriva de curvas cinéticas. Éste tipo de métodos usualmente están compuestas por un generador de radicales libres sintético, una molécula oxidable y un antioxidante (Karadag *et al.*, 2009).

En los métodos SET, la reactividad relativa se basa en el potencial de desprotonación e ionización del grupo funcional reactivo. Este tipo de ensayos básicamente constan de un antioxidante y una molécula oxidante. El oxidante

extrae un electrón del antioxidante, causando un cambio de color que es proporcional a la concentración de antioxidante. La reacción llega a su fin cuando se detiene el cambio de color (Karadag *et al.*, 2009). Algunas pruebas tipo SET son el método por el radical ABTS<sup>•+</sup> y el método por el radical DPPH<sup>•</sup>.

### 2.3.1. Método por el radical DPPH<sup>•</sup>

Esta técnica presenta la ventaja de que es simple, rápida y requiere solamente de un espectrofotómetro UV-Vis. Se puede llevar a cabo el análisis de un gran número de muestras utilizando microplacas. Sin embargo, solo puede solubilizarse en medios orgánicos y no acuosos, por lo que no es útil para evaluar antioxidantes hidrofílicos. Además, la absorbancia a 517 nm se puede disminuir con la luz, oxígeno o el tipo de solvente. Otra desventaja es que el ion DPPH<sup>•</sup> tiene poca similitud con los radicales encontrados *in vivo*, por lo que los datos no arrojan resultados completamente concluyentes para predecir la actividad de los antioxidantes en medios biológicos (Fukumoto y Mazza, 2000). En la **Figura 3** se muestra la reacción de desprotonación del grupo funcional reactivo.



**Figura 3.** Reacción de desprotonación del grupo funcional reactivo.

## **2.4. Caracterización química y biológica del espárrago en México**

Aún cuando el espárrago tenga numerosas propiedades beneficiosas para la salud, este no atrae al consumidor como planta medicinal, sino como una hortaliza de exquisito gusto, agradable aroma y textura tierna y carnosa. Debido a esto las investigaciones realizadas en México con respecto al espárrago están el momento se han enfocado a mejorar la producción y la calidad de este cultivo. Sin embargo, debido a su riqueza en nutrientes (“fitoquímicos”), el espárrago es un producto interesante que puede ser estudiado como fuente potencial de compuestos químicos bioactivos con posibles aplicaciones para nuevos tratamientos que combatan padecimientos como cáncer, diabetes, obesidad, y estrés, entro otros.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El espárrago es uno de los principales cultivos de la región de Caborca, Sonora, México, ya que presenta buena rentabilidad debido a que posee alta demanda en el mercado internacional. Además, ocasiona gran derrama económica y generación de empleos para la zona durante todo el año, pero principalmente durante la cosecha. Existen reportes en la literatura acerca una amplia gama de actividades biológicas que esta hortaliza posee, sin embargo, no hay estudios sistemáticos sobre la composición química y actividades biológicas del espárrago que se cultiva en Sonora. Por lo cual es necesario incrementar el conocimiento acerca del espárrago lo cual daría un valor agregado a este producto de tanta importancia económica para la región

## 4. OBJETIVOS

En base a lo anterior se plantean los siguientes objetivos:

### 4.1. General

Evaluar la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Asparagus spp.*

### 4.2. Particulares

- 1) Recolectar el vegetal *Asparagus spp.*
- 2) Obtener el extracto metanólico de *Asparagus spp.*
- 3) Evaluación de la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Asparagus spp.* por el método químico del DPPH.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Recolección del espárrago

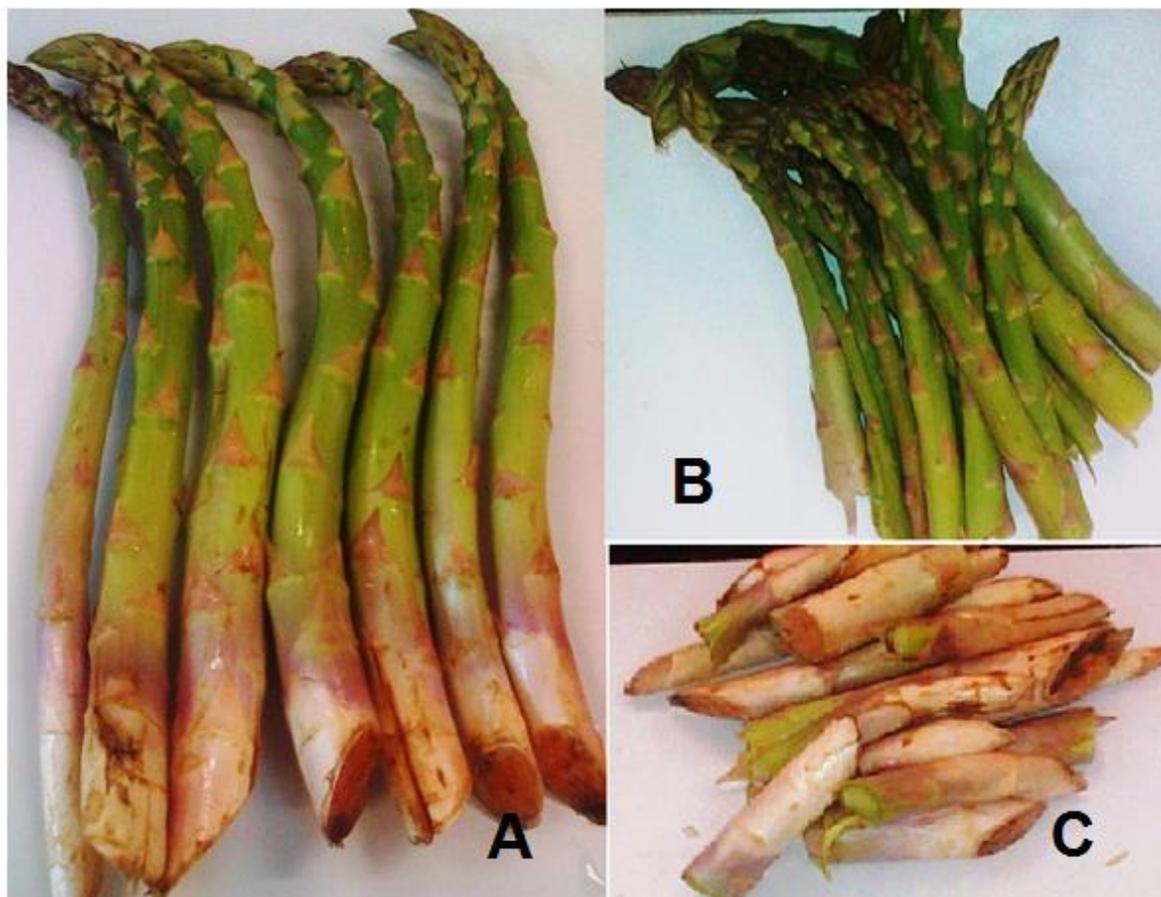
El espárrago se recolectó en el campo agrícola San José (longitud norte 30°40'02", longitud oeste 112°11'52" a 280 msnm.), ubicado en la Costa del Estado de Sonora, en el tramo carretero Caborca – Desemboque (**Figura 4**) durante el mes de febrero de 2013. Una vez cortado el vegetal se empacó en bolsas plásticas, fue transportado a temperatura ambiente y almacenado a 4 °C hasta su procesamiento.

### 5.2. Liofilización del espárrago

La muestra de espárrago (700 g) fue lavada con abundante agua corriente y posteriormente con agua destilada. El espárrago se dividió en dos partes, parte comestible, EPC (550 g, la parte verde del vegetal) y parte no comestible, EPNC (150 g, la parte blanca del vegetal) (**Figura 5**). El vegetal fue cortado en partes pequeñas y uniformes de 1 cm aproximadamente. Fue congelado a -23 °C en bolsas plásticas con cierre hermético y posteriormente liofilizado con la finalidad de deshidratarlo. El espárrago se sometió a liofilización por un periodo de 6 días continuos en un liofilizador LABCONCO, a una temperatura de -46 °C y una presión de 0.370 mBar.



**Figura 4.** Ubicación geográfica del Campo San José (longitud norte  $30^{\circ}40'02''$ , longitud oeste  $112^{\circ}11'52''$  a 280 msnm). Se localiza en el tramo carretero Caborca - Desemboque.



**Figura 5.** A) Vegetal (espárrago) completo. B) Espárrago parte comestible (EPC). C) Espárrago parte no comestible (EPNC).

### **5.3. Obtención de los extractos metanólicos**

El vegetal liofilizado fue pulverizado en un mortero. Para la extracción metanólica se colocó el espárrago molido en metanol en una proporción 1:10 (p: v, por cada gramo de material vegetal se adicionaron 10 mL de solvente). La mezcla se mantuvo en agitación constante durante 7 días a temperatura ambiente y protegida de la luz. Una vez transcurrido el tiempo se filtró con papel Whatman No. 4. El filtrado recuperado se concentró en un evaporador rotatorio (Buchi switzerland, modelo R-215) a presión reducida, a 130 rpm y a temperatura constante de 40 °C (Hernández *et al.*, 2007).

### **5.4. Determinación de la actividad antioxidante**

La actividad antioxidante del espárrago se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por Usia y colaboradores, con ligeras modificaciones (Usia *et al.*, 2002). Las muestras de espárrago (EPC y EPNC) previamente se disolvieron en etanol absoluto y se mezclaron volúmenes iguales de muestra (1 mL) con una solución de DPPH (300  $\mu$ M). Esta mezcla se agitó vigorosamente durante 10 segundos y se dejó reposar por 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 517 nm (Thermo Scientific

GENESYS 10S UV) utilizando como blanco control etanol absoluto. Como control de referencia se utilizó vitamina C (70  $\mu$ M). Los resultados fueron expresados en porcentaje de actividad antioxidante en base a la proporción de degradación de DPPH comparada con el control estándar (mezcla 1:1, etanol:DPPH) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estandar}} \times 100 = \% \text{ inhibicion}$$

$$100\% - \% \text{ inhibicion} = \% \text{ de actividad antioxidante}$$

## 5.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) utilizando las pruebas de comparación múltiple de Tukey-Kramer y Duncan's (Number Cruncher Statistical Software, NCSS 2000).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Recolección del espárrago y preparación de la muestra

La recolección del espárrago se realizó en la zona costera de Caborca, Sonora en el campo San José. Se procesaron 700 g del vegetal el cual fue recolectado en el mes de febrero de 2013. El espárrago se dividió en dos partes: la parte verde del turión (espárrago parte comestible, EPC) y la parte blanca (espárrago parte no comestible, EPNC) (**Figura 5**). Posteriormente, se cortaron en pequeños trozos uniformes (de 1cm aproximadamente). Se obtuvieron 550 g de EPC y 150 g de EPNC. Ambas partes del espárrago fueron congeladas a  $-23^{\circ}\text{C}$  y se procedió a su liofilización; después de la liofilización se obtuvieron 38.28 g del espárrago parte comestible y 13.58 g de la parte no comestible; lo cual indica un alto contenido de agua en el vegetal, 93.04 % de agua en EPC y 90.95 % de de agua en EPNC (**Tabla 1**). Es importante destacar que después de la liofilización el espárrago conservó sus características físicas y estructurales.

## 6.2. Rendimiento de la extracción metanólica

La extracción metanólica de los compuestos bioactivos se llevó a cabo utilizando una proporción 1:10 (p:v). En la **Tabla 2** se muestran los porcentajes de rendimiento para el EPC y EPNC. Se obtuvo menor rendimiento de extracción en el EPNC que para el EPC, 0.85 % y 2.10 %, respectivamente.

## 6.3. Actividad antioxidante de los extractos metanólicos del espárrago

Con la finalidad de evaluar la capacidad de los extractos metanólicos del espárrago de neutralizar radicales libres, se determinó la capacidad antioxidante de cada una de las muestras (EPC y EPNC) utilizando el método espectrofotométrico del DPPH. Las concentraciones evaluadas fueron 100, 200, 400 y 800  $\mu\text{g/mL}$ . Como antioxidante estándar (control positivo) se utilizó vitamina C a una concentración de 70  $\mu\text{M}$ . La actividad antioxidante de los extractos metanólicos del espárrago se ilustra en la **Figura 6**. Ambos extractos metanólicos, EPC y EPNC, mostraron importante actividad antioxidante,  $65.26 \pm 0.16$  y  $45.72 \pm 5.3$  %, respectivamente a la concentración más alta evaluada (800  $\mu\text{g/mL}$ ) (**Tabla 3**). De acuerdo a los resultados obtenidos el espárrago representa una fuente abundante de moléculas antioxidantes.

**Tabla 1.** Rendimiento del proceso de liofilización del espárrago.

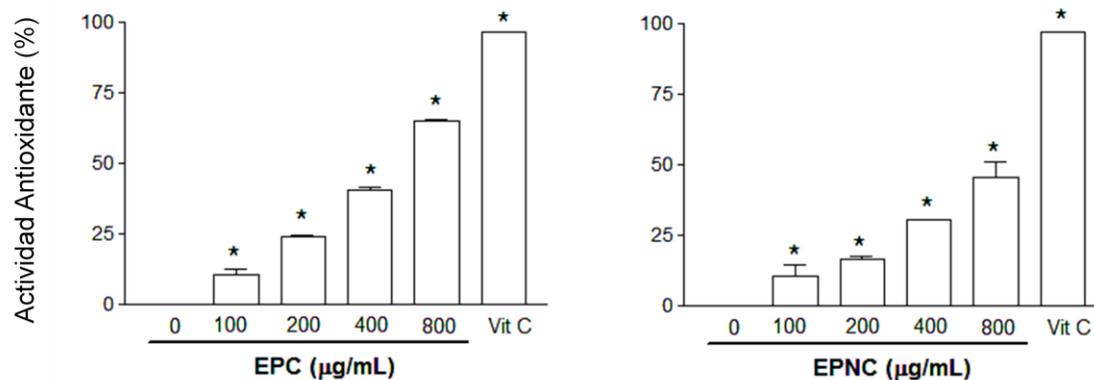
<b>Parte del espárrago</b>	<b>Peso del espárrago fresco (g)</b>	<b>Peso del espárrago liofilizado (g)</b>	<b>Contenido de agua (%)</b>
**EPC	550	38.28	93.04
*EPNC	150	13.58	90.95

\*\*EPC.- Parte comestible del espárrago. \*EPNC.- Parte no comestible del espárrago

**Tabla 2.** Rendimiento de la extracción metanólica.

<b>Parte del espárrago</b>	<b>Peso del espárrago (g)</b>	<b>Extracto metanólico recuperado (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
**EPC	38.28	0.800	2.10
*EPNC	13.58	0.115	0.85

\*\*EPC.- Parte comestible del espárrago. \*EPNC.- Parte no comestible del espárrago.



**Figura 6.** Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de espárrago (DPPH). Diferentes concentraciones de espárrago fueron utilizadas (0-800 µg/mL). Vitamina C (70 µM) fue utilizada como antioxidante estándar. Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan el promedio de tres determinaciones  $\pm$  desviación estándar. Utilizando las pruebas de comparación múltiple de Tukey-Kramer y Duncan's Las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto al control se marcan con asterisco.

**Tabla 3.** Actividad antioxidante (%) de los extractos metanólicos EPC y EPNC.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	**EPC	*EPNC
0	0	0
100	10.63 $\pm$ 1.73	10.77 $\pm$ 4.01
200	23.84 $\pm$ 0.69	16.74 $\pm$ 0.61
400	40.76 $\pm$ 0.7	30.33 $\pm$ 0.9
800	65.26 $\pm$ 0.16	45.72 $\pm$ 5.31

\*\*EPC.- Parte comestible del espárrago. \*EPNC.- Parte no comestible del espárrago.

Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes.

Todos los valores representan la media de tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar.

## 7. DISCUSIÓN

México es un país de una gran riqueza biológica, diversidad de ecosistemas y variabilidad genética, debido a su topografía y variaciones climáticas. Ocupa el cuarto lugar entre los países considerados con gran diversidad biológica y posee cerca del 10 por ciento del total de las especies conocidas, con un gran número de endemismos (Mendoza, 2010). Se han identificado y registrado 4,000 especies con atributos medicinales (15% de la flora total mundial), sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo sólo en el 5% de estas especies (Ocegueda *et al.*, 2005). En este trabajo de tesis, se analizó la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Asparagus spp.* que se cultiva en la región de Caborca, Sonora. El rendimiento obtenido del extracto metanólico del espárrago fue bajo (2.1 % y 0.8 % para EPC y EPNC, respectivamente) en comparación con extractos metanólicos de otras plantas, cuyo rendimiento es aproximado el 100 %; lo cual pudiera deberse a que el metanol no es el disolvente adecuado para realizar la extracción de la mayor cantidad de bioactivos presentes en el espárrago. En lo que respecta a la actividad antioxidante, la parte comestible del espárrago (EPC,  $65.26 \pm 0.16$ ) presentó mayor actividad antioxidante que la parte del espárrago no comestible

(EPNC,  $45.72 \pm 5.31$ ), lo cual indica que en la parte verde del espárrago se encuentran más concentrados los compuestos que aportan dicha actividad. En algunas investigaciones realizadas en extractos hidroalcohólicos y alcohólicos de espárragos cultivados en otras regiones del mundo muestran resultados comparables a los obtenidos en este trabajo (Tiveron *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012; Ferrara *et al.*, 2011).

## 8. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

- La extracción de bioactivos del espárrago con metanol fue de bajo rendimiento.
- Los extractos metanólicos del espárrago de la región agrícola de la costa de Caborca, Sonora poseen importante actividad antioxidante.
- El extracto metanólico de la parte comestible del espárrago (EPC) mostró mayor actividad antioxidante que el extracto metanólico de la parte no comestible del espárrago (EPNC).

## 9. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

- Realizar la caracterización química del espárrago de la región de Caborca, Sonora con el objetivo de aislar e identificar el o los compuestos responsables de la actividad antioxidante encontrada.
- Evaluar el contenido de fenoles totales y flavonoides presentes en el extracto metanólico del espárrago de la región de Caborca, Sonora.
- Evaluar otras actividades biológicas en los extractos metanólicos del espárrago.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Acharya, S. R., N. S. Acharya, J. O. Bhangale, S. K. Shah and S. S. Pofya. 2012. Antioxidant of hepatoprotective action of *Asparagus racemosus willd.* Root extracts. Indian Journal of Experimental Biology 50 (11): 795-801.

Almehdar, H., H. M. Abdallah, A.-M. M. Osman and E. A. Abdel-Sattar. 2012. In Vitro Cytotoxic Screening of Selected Saudi Medicinal Plants. Journal of Natural Medicines 66 (2): 406-412.

Bagiu, R. V., B. Vlaicu and M. Butnariu 2012. Chemical Composition Of In Vitro Antifungal Activity Screening of the *Allium Ursinum L.* (Liliaceae). International Journal of Molecular Sciences 13 (2): 1426-1436.

Bast A. 2005. Functional Food of Nutraceuticals. En: Proceedings of the XI International Asparagus Symposium in Acta Horticulturae.

Bhatt Indra D., Sandeep Rawat and Ranbeer S. Rawal. 2013. Antioxidants in Medicinal Plants. Biotechnology for Medicinal Plants. DOI: 10.1007/978-3-642-29974-2.

Del Pozo Alejofro. 1999. El Cultivo Del Espárrago. INIA. ISSN: 0717-4828.

Dudonne, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M. and Mérillon, J.M. 2009. Comparative Study Of Antioxidant Properties of Total Phenolic Content Of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC Assays. *Journal of Agriculture of Food Chemistry*. 57: 1768–1774.

Fuentes Alventosa. 2009. Caracterización De Componentes Bioactivos Del Espárrago Verde: Obtención de Ingredientes Funcionales a partir de los Subproductos Generados Durante su Transformación Industrial. Servicio De Publicaciones de la Universidad de Córdoba. ISBN-13: 978-84-692-9388-1

Fukumoto, L.R. and Mazza, G. 2000. Assessing Antioxidant of Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Journal of Agriculture of Food Chemistry*. 48:3597-3604.

Gatti, I., López Anido, F., Picardi, L and Cointry, E. Selección de Progenitores en Espárrago. *Horticultura Brasileira*, 21 (2):162-165.

Hernández, J., F. M. Goycoolea, J. Quintero, A. Acosta, M. Castaneda, Z. Dominguez, R. Robles, L. Vazquez-Moreno, E. F. Velazquez, H. Astiazaran, E. Lugo and C. Velazquez. 2007. Sonoran Propolis: Chemical Composition of Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. *Planta Medica*. 73(14): 1469-1474.

Kamat J., Bloor K., Devasagayam P.A., and Venkatachalam S.R. 2000. Antioxidant properties of *Asparagus racemosus* against damage induced by irradiation in rat liver mitochondria. *Journal. Ethnopharmacol.* 71, 425–435.

Karadag, A. Ozcelik, B. and Saner S. 2009. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods.* 2: 41–60.

Kongkaneromit, L., W. Witoonsaridsilp, P. Peungvicha, K. Ingkaninan, N. Waranuch and N. Sarisuta .2011. Antioxidant Activity Of Antiapoptotic Effect of *Asparagus Racemosus* Root Extracts in Human Lung Epithelial H460 Cells. *Experimental of Therapeutic Medicine.*2(1): 143-148.

Mitra, S. K., N. S. Prakash and R. Sundaram 2012. Shatavarins (Containing Shatavarin IV) with Anticancer Activity from the Roots of *Asparagus Racemosus*. *Indian Journal of Pharmacology.* 44(6): 732-736.

Oakenfull D. 1986. Aggregation of saponins and bile acids in aqueous solution. *Aust. J. Chem.* 39: 1671–1683.

Oakenfull D., Sidhu G.S. 1990. Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolaemia. *Eur. J. Clin. Qutr.* 44 (1): 79-88.

Ocegueda, S., Moreno, E. and. Koleff, P. 2005. Plantas Utilizadas en la Medicina Tradicional y su Identificación Científica. Conabio: Biodiversitas. 12-15.

Pérez, R., Ávila, A., Edgill, R., Colon, Y., Quesada, W., Bello, J. and Panfet, C. 2005. Actividad Antitumoral de una Mezcla de Polisacáridos Obtenida de la Especie *Argemone Mexicana* L. Rev. Cubana Plant. Med. 10: 3-4.

Rupesh Kumar M, Fasalu Rahiman O.M, Tamizh Mani T, Mohamed Iyas K, Satya Kumar B, Phaneendra P and Surendra B. 2011. Evaluation of Hepatoprotective Activity of *Asparagus Racemosus* Root Against Paracetamol Induced Acute Liver Injury Rats. Pharmacologyonline. 1: 1059-1066.

Sabde, S., H. S. Bodiwala, A. Karmase, P. J. Deshpote, A. Kaur, N. Ahmed, S. K. Chauthe, K. G. Brahmbhatt, R. U. Phadke, D. Mitra, K. K. Bhutani and I. P. Singh. 2011. Anti-Hiv Activity of Indian Medicinal Plants. Journal of Natural Medicines. 65 (3-4): 662-669.

Sautour, M., T. Miyamoto and M.-A. and Lacaille-Dubois 2007. Steroidal Saponins from *Asparagus Acutifolius*. Phytochemistry. 68 (20): 2554-2562.

Shao, Y., C. K. Chin, C. T. Ho, W. Ma, S. A. Garrison and M. T. Huang 1996. Anti-Tumor Activity of the Crude Saponins Obtained from *Asparagus*. *Cancer Letters*. 104 (1): 31-36.

Tiveron, A. P., P. S. Melo, K. B. Bergamaschi, T. M. F. S. Vieira, M. A. B. Regitano-D'arce and S. M. Alencar. 2012. Antioxidant Activity of Brazilian Vegetables of its Relation with Phenolic Composition. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(7): 8943-8957.

Usia, T., A. H. Banskota, Y. Tezuka, K. Midorikawa, K. Matsushige and S. Kadota. 2002. Constituents of Chinese Propolis of their Antiproliferative Activities. *Journal of Natural Products*. 65 (5): 673-676.

Wang, H. X. and T. B. Ng. 2001. Isolation of a Novel Deoxyribonuclease with Antifungal Activity from *Asparagus Officinalis* Seeds. *Biochemical of Biophysical Research Communications*. 289(1): 120-124.

Wiboonpun., Phuwapraisirisan P and Tip-Pyang S. 2004. Identification of Antioxidant Compound from *Asparagus Racemosus*. *Phytother. Res*. 18, 771-773.

Yu S., Chee-Kok C., Chi-Tang H., Wei M., Garrison S.A. and Ho C. Huang M.-T. 1996. Anti-Tumor Activity of the Crude Saponins Obtained from *Asparagus*. *Cancer Lett.* 104, 31–36.

Zhao, Q., B. Xie, J. Yan, F. Zhao, J. Xiao, L. Yao, B. Zhao and Y. Huang. 2012. In Vitro Antioxidant of Antitumor Activities of Polysaccharides Extracted from *Asparagus Officinalis*. *Carbohydrate Polymers* 87(1): 392-396.

## 11. APÉNDICES

### Apéndice A. Técnica de DPPH.

Este método se basa en la reducción del radical DPPH por los antioxidantes de la muestra. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a 517 nm y la cuantificación se realiza empleando soluciones patrón de ácido ascórbico.

#### Materiales y Equipo

- Tubos Falcon (15 ml)
- Celdas para espectrofotómetro
- Micropipetas de volumen variable (10-1000  $\mu$ L)
- Espátula pequeña
- Matraz volumétrico (25 ml)
- Balanza analítica
- Espectrofotómetro (UV-visible)

### Reactivos

- DPPH (Sigma-Aldrich)
- Etanol absoluto
- Vitamina C (Sigma-Aldrich)

### Procedimiento

1. Colocar en un tubo Falcon 1 mL de la muestra problema y adicionar 1 mL de DPPH (300  $\mu$ M).
2. Agitar vigorosamente durante 10 segundos.
3. Reposar 30 minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente.
4. Leer la absorbancia a 517 nm.

### Cálculos

$$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estandar}} \times 100 = \% \text{ inhibicion}$$

$$100\% - \% \text{ inhibicion} = \% \text{ de actividad antioxidante}$$

Nota: La absorbancia estándar es la absorbancia que presenta la mezcla de DPPH:etanol en proporción 1:1

## **Apéndice B. Preparación de las soluciones de trabajo.**

### Preparación de DPPH 300 $\mu$ M.

1. En un matraz volumétrico limpio y seco, pesar 2.95 mg del reactivo DPPH.
2. Aforar el matraz con etanol absoluto.
3. Reservar protegido de la luz hasta su uso (debe ser preparado en el tiempo de la determinación).

### Preparación del control positivo de actividad antioxidante (Vitamina C, 140 $\mu$ M)

Se preparara una solución madre de 5 mg/mL

140  $\mu$ M = 0.0246 mg/mL

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$C_1 = 5$  mg/mL

$V_1 = X$

$C_2 = 0.0246$  mg/mL

$V_2 = 10$  mL

Se mezclan 50 microlitros de la solución madre de 5 mg/mL de vitamina C con 9950 microlitros de etanol absoluto.

### Preparación de la muestra

1. Se prepara una solución madre de 40 mg/mL de la muestra a evaluar.
2. Todas las diluciones de las muestras se preparan con una concentración 2X (si se desea evaluar 800 microgramos por mililitro, debe prepararse con una concentración de 1600 microgramos por mililitro).