

ISSN 0328-087 X

**ANUARIO LATINOAMERICANO
DE EDUCACIÓN QUÍMICA**

ALDEQ

*"La comunicación:
Un aporte a la integración"*

AÑO XIX

N° XXI



SAN LUIS ARGENTINA

2005 - 2006

EXPERIENCIA DE LABORATORIO PARA EL ESTUDIO DE REACCIONES QUE INVOLUCRAN RADICALES LIBRES

Montaña, M.P.; Debattista, N.B.; Pappano, N.B.

Proyecto 9101- Area de Química Física
Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia
Universidad Nacional de San Luis.
Chacabuco 917 - D5700BWS - San Luis - Argentina.
E-mail: mpaulina@unsl.edu.ar

Resumen

Los radicales libres y su efecto sobre la salud humana son de importancia creciente, debido a que diversas especies oxidantes reactivas, que contribuyen al fenómeno conocido como estrés oxidativo en el organismo, están involucradas en muchos procesos patológicos como por ejemplo inflamación, aterosclerosis, cáncer, envejecimiento, etc. A continuación se propone una experiencia de laboratorio para que los alumnos conozcan una reacción de generación y detección del radical libre superóxido. Esta práctica puede ser desarrollada dentro de la currícula de asignaturas de Química Física de carreras como Licenciatura en Química, Analista Químico, Bioquímica.

Abstract

Free radicals and their effect on human health have a high importance. There are diverse reactive oxygen species that contribute to oxidative stress on human organism. These species are involved in many pathological processes such as inflammation, atherosclerosis, cancer, aging, etc. In the present work an experience of laboratory is proposed, in which superoxide anion radical is generated and detected. This practice can be developed in subjects as Physical Chemistry of Chemistry, Biochemistry, Chemical Analyst careers.

Introducción

La ejecución de trabajos prácticos de laboratorio son de gran importancia para los alumnos de carreras como Licenciatura en Química, Analista Químico, Bioquímica, etc., ya que a través de ellos desarrollan habilidades y destrezas operativas fundamentales para su futuro profesional. Además, permiten vincular conceptos teóricos con medidas experimentales arribando a conclusiones que ilustran los primeros. Sumando la aplicación de estos conocimientos a problemas y temáticas de actualidad, así como la transferencia de las investigaciones realizadas por docentes, se llega a una excelente instancia formativa para los alumnos.

En el Proyecto 9101 "Estructura, reactividad y bioactividad de flavonoides y otros compuestos biológicos" de la Universidad Nacional de San Luis se investigan propiedades químicas y biológicas de diversos flavonoides. Se han llevado a cabo estudios sobre la capacidad antioxidante que tienen estos compuestos, lo que permite presentar un nuevo trabajo práctico de laboratorio, el cual puede ser aplicado en asignaturas relacionadas con la Química Física a nivel de segundo o tercer año universitario.

Las sustancias antioxidantes son aquellas que, por distintos mecanismos, protegen a las células del efecto nocivo de especies oxigenadas reactivas tales como anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (HO^{\cdot}), radical NO^{\cdot} , entre otros (MONTAÑA, 2003, 909). El desbalance entre estas especies y

los antioxidantes tiene como resultado lo que se conoce como *estrés oxidativo*, el cual está relacionado con enfermedades tales como cáncer, aterosclerosis, isquemia, hipoxia tisular, etc (VINSON, 1995, 2800), siendo de creciente interés la determinación de la capacidad antioxidante de diversas sustancias (BERGMAN, 2003, 753)

El trabajo práctico de laboratorio que se propone a continuación tiene como objetivo estudiar reacciones en las que interviene el anión radical superóxido, determinando la concentración inhibitoria de dos flavonoides, la cual es la menor cantidad de flavonoide capaz de eliminar el anión superóxido generado.

Para despertar las inquietudes de los estudiantes frente a una situación particular, se sugiere iniciar un diálogo a partir de preguntas motivadoras que conducen a plantear los objetivos del Trabajo Práctico de Laboratorio. Las preguntas pueden ser las siguientes:

- ¿Qué son los radicales libres?
- ¿Qué efectos tienen los radicales libres sobre los seres vivos?
- ¿Qué papel juegan los antioxidantes para la salud humana?
- ¿Qué son los flavonoides? ¿Dónde se encuentran?
- ¿Qué propiedades presentan los flavonoides?
- ¿Cuáles son los flavonoides más conocidos?

Objetivos

Se espera que los estudiantes sean capaces de:

- Descubrir la importancia de las reacciones entre radicales libres y los antioxidantes para la salud del ser humano.
- Adquirir destrezas y conocimientos para abordar el estudio experimental de un sistema de generación y detección del radical libre superóxido.
- Estudiar reacciones en las que interviene el radical libre superóxido, determinando la concentración inhibitoria mínima de dos flavonoides.
- Elaborar conclusiones a partir de los resultados experimentales integrando diferentes conceptos.

Metodología

El radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) bajo estudio se genera mediante una reacción enzimática *in vitro* entre el sustrato hipoxantina y la enzima xantina oxidasa (XO). El $O_2^{\cdot-}$ en esta reacción es el primer producto de la reducción de oxígeno molecular y puede oxidar a hidroxilamina presente en el medio y producir el ión nitrito (HU, 1995, 327). Como este último ión puede ser detectado espectrofotométricamente a bajas concentraciones, esta reacción provee un medio sensible y conveniente para la medición de la concentración de $O_2^{\cdot-}$.

Los flavonoides son sustancias presentes en frutas, ostras, vino, vegetales, etc. Quercetina y rutina son dos miembros de esta familia de compuestos abundantes en la naturaleza y de fácil obtención. Debido a sus características estructurales, estas sustancias constituyen un buen modelo de antioxidante, por lo que se los seleccionó para ilustrar esta experiencia de laboratorio.

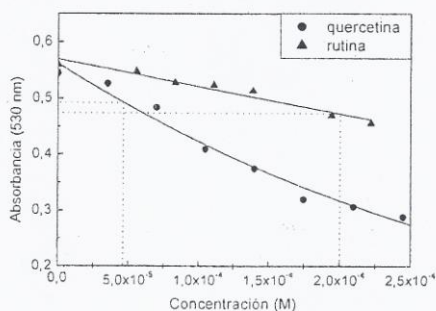
Se debe disponer de las siguientes soluciones:

- Solución A, la cual contiene hipoxantina ($1,2 \times 10^{-3}$ M), hidroxilamina ($1,2 \times 10^{-3}$ M) y EDTA ($6,0 \times 10^{-3}$ M)
- Solución reguladora de pH 7
- Solución "madre" de flavonoide en metanol ($5,0 \times 10^{-3}$ M)
- Solución de xantina oxidasa (0,75 U/mL)

Las soluciones de trabajo se preparan mezclando 2 mL de solución A, 1,4 mL de solución reguladora de pH 7 y volúmenes crecientes de solución "madre" de flavonoide, completando con metanol a 0,2 mL en todos los casos, dejando una mezcla testigo sin flavonoide. La reacción se inicia con el agregado de 10 μ L de xantina oxidasa. Las mezclas se incuban a 37 °C durante 30 min, tiempo suficiente para que la enzima actúe a velocidad máxima y siempre se produzca la misma transformación del sustrato. Se detiene la reacción con el agregado de HCl (1 M) y se añade el reactivo colorante [N-(1-naftil)-etilendiamina/ácido sulfanilico] (VOGEL, 1960, 899). Las muestras se mantienen a 25 °C durante 45 min y se miden las absorbancias a 530 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu 160A, con celdas de 1 cm de camino óptico.

Resultados

A partir de los datos experimentales se construyen gráficas de absorbancia vs. concentración de flavonoide, como se muestra en la figura. Los valores se ajustan por regresión, permitiendo calcular gráficamente el 25 % de la concentración inhibitoria (CI_{25}). Estos valores se obtienen calculando el 75 % del valor de la absorbancia del testigo (sin flavonoide), interpolando este valor sobre la curva y extrapolando al eje de las abscisas, como se indica en la figura.



Curvas de Absorbancia vs. Concentración de los flavonoides.

En la tabla se informan los valores correspondientes al 25 % de la concentración inhibitoria obtenidos para los dos flavonoides bajo estudio.

Concentración inhibitoria (IC₂₅) de los flavonoides ensayados.

Flavonoide	IC ₂₅ (M)
Quercetina	$4,739 \times 10^{-3}$
Rutina	$2,000 \times 10^{-4}$

En base a preguntas como las que se listan a continuación, los estudiantes pueden realizar un informe detallado del Trabajo Práctico de Laboratorio. Este informe constituye una herramienta eficaz para interpretar los resultados experimentales y vincular los distintos conceptos de una manera orgánica.

- ¿Qué es un radical libre? ¿Cuál es su importancia para la vida?
- ¿Cuál es la reacción de generación enzimática del radical anión superóxido?
- ¿En qué consiste el método del nitrito?
- ¿En qué se basa la espectrofotometría UV - Vis?
- ¿Qué son los flavonoides? ¿Cómo se obtienen?
- ¿Qué propiedades biológicas presentan los flavonoides?
- A partir de los resultados obtenidos: ¿cómo justifica la diferencia de IC₂₅ obtenidas para quercetina y para rutina?

Conclusiones

Este Práctico de Laboratorio puede desarrollarse en una jornada de 3 horas de trabajo, permitiendo a los alumnos integrar conocimientos de distintas disciplinas químicas, como por ejemplo: Química Física (reacciones radicalarias, relaciones estructura-actividad, espectrofotometría, etc), Química Orgánica (colorantes, flavonoides), Química Analítica (método del nitrito), Química Biológica (generación enzimática del radical), entre otros. Esto puede lograrse con la elaboración de una guía de estudio conteniendo los tópicos teóricos más importantes, orientando a los alumnos en la búsqueda bibliográfica en diferentes áreas, posibilitando la interrelación con lo desarrollado en la experiencia. Se puede transferir nuevos resultados de investigaciones llevadas a cabo por el grupo, ampliando a modo de discusión la presente experiencia.

Bibliografía

- Bergman M, Perelman A, Dubinsky Z & Grossman S. 2003. *Scavenging of reactive oxygen species by novel plucurinated flavonoid antioxidant isolated and purified from spinach*. *Phytochemistry* 62 (5), pp 753-762.
- Hu JP, Calomme M, Lasure A, De Bruyne T, Pieters L, Vlietinck A & Vanden Berghe. 1995. *Structure - activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity*. *Biol. Trace Elem. Res.* 47, pp 327-331.
- Montaña MP, Pappano NB, Debattista NB, Ávila V, Posadaz A, Bertolotti SG & García NA. 2003. *The activity of 3- and 7-hydroxyflavones as scavengers of superoxide radical anion generated from photo-excited riboflavin*. *Can. J. Chem.* 81 (8), pp 909-914.
- Vinson JA, Dabbagh YA, Serry MM & Jang J. 1995. *Plant flavonoids, especially tea flavonoids, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease*. *J. Agric. Food Chem.* 43 (11), pp 2800-2802.
- Vogel AI. 1960. *Química Analítica Cuantitativa, Teoría y Práctica*. Vol. II. Ed. Kapelus, Argentina.