

SIGUIENDO LA PISTA

Actividad alelopática de la cafeína en plántulas de trigo y lenteja

Isabel Maniega Cuadrado¹, Ramón Molero Llamazares², Ana Perea Martínez³ y Raquel Pérez García⁴.

Facultad de C.C. Biológicas y Ambientales. Universidad de León. Alumnos de 5º curso de Biología (curso 2008-09).

(bioimc01@estudiantes.unileon.es)¹, (biorml00@estudiantes.unileon.es)²,
(bioapm01@estudiantes.unileon.es)³, (biorpg00@estudiantes.unileon.es)⁴

La cafeína es un alcaloide que posee efectos aleloquímicos y autotóxicos. En el presente trabajo se ha extraído cafeína de hojas de té, utilizando agua caliente alcalinizada con CaCO₃, extracción con diclorometano y precipitación en mezcla de acetona caliente-hexano, y se ha comprobado la pureza de la cafeína extraída mediante técnicas cromatográficas y espectrofotométricas. Con el extracto obtenido se ha llevado a cabo un ensayo para valorar el efecto que ejerce este alcaloide sobre ciertos parámetros de crecimiento en trigo y lenteja. Mediante este procedimiento se pudo observar que la cafeína inhibía el crecimiento, tanto de la raíz como del tallo, en ambas especies, en un rango amplio de concentraciones, aunque este efecto fue mayor en las raíces.

Introducción

La cafeína, 1,3,7-trimetilxantina (**Figura 1**), es el principio activo mayoritario de las hojas de té y de las semillas de café, y se encuentra también en las hojas de mate y en las semillas de cacao, entre otras especies. Aunque es más abundante en los órganos citados, se sintetiza y se acumula en toda la planta. Se descubrió en las semillas y hojas del café en 1820 (Pacheco y Pohlan, 2005).

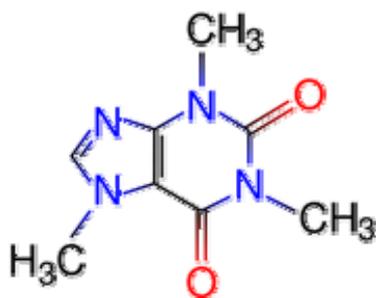


Figura 1. Estructura de la cafeína.

Desde una perspectiva farmacológica, la cafeína es un estimulante. En dosis moderadas promueve efectos positivos como estimulador del sistema nervioso central, del músculo cardíaco y del sistema respiratorio. En exceso produce nerviosismo, irritabilidad, insomnio, temblores musculares y arritmia cardíaca. Puede llegar a provocar dependencia y a ser tóxica, aunque su dosis letal (DL50, dosis que provoca la muerte en el 50% de los individuos) es de 105 mg por kg de peso corporal en ratas. Se ha estimado que la DL50 para el ser humano se encuentra entre 150 y 200 mg por kg de peso corporal (Peters, 1967), lo cual supone el consumo de unas 80-100 tazas de café en un período de tiempo relativamente breve.

En las plantas este alcaloide suele actuar como antialimentario, antimicrobiano y alelopático. El objetivo de este estudio es desarrollar un método para obtener cafeína purificada a partir de hojas de té, con el fin de analizar su posible efecto alelopático sobre el crecimiento de plántulas de trigo y lenteja.



Figura 2. Plantación de té de la India (izquierda) y hojas secas de té negro de la India (derecha).

Material y métodos

Extracción de la cafeína

Para extraer la cafeína se utilizaron hojas secas de té negro de la India (**Figura 2**). Como en la mayor parte de las extracciones de metabolitos secundarios, el principal problema que se plantea es separar el metabolito objeto de interés de los muchos otros con los cuales viene mezclado.

En un matraz se colocaron 12,5 g de hojas de té secas, 5 g de CaCO_3 (de este modo se formaron sales cálcicas de los compuestos no deseados, que quedaron en la fase acuosa) y 125 ml de agua. La mezcla se calentó durante 30 minutos con agitación y, tras interrumpir el proceso, se decantó la mayor parte del sobrenadante y el resto se filtró.

El decantado y el filtrado se reunieron en un embudo de decantación y se extrajeron con 25 ml de diclorometano. Tras dejarlo reposar, se separaron las fases orgánica y acuosa, y se filtró la fase orgánica a través de sulfato magnésico anhidro.

Se repitió la extracción de la fase acuosa con otros 25 ml de diclorometano, que a su vez se volvió a secar con sulfato magnésico anhidro. Se juntaron las fases orgánicas en un matraz de fondo cónico, y el disolvente (diclorometano) se eliminó a presión reducida en un rotavapor. Como resultado se formó un residuo blanquecino adherido a la pared del matraz, que se recrystalizó utilizando la técnica de mezcla de disolventes. Para ello se disolvió en unos pocos mililitros de acetona caliente, y a continuación se añadió, gota a gota, hexano hasta que apareció turbidez. La disolución se enfrió en un baño de hielo, y el producto se recogió por filtración a vacío.

Valoración del grado de pureza de la cafeína extraída

Valoración cualitativa

Se realizó mediante una cromatografía en capa fina (TLC). Este método separa los compuestos de una mezcla por la diferente afinidad de éstos, ya sea a la gel de sílice (componente de la placa) o a la fase móvil. Se empleó una placa de gel de sílice G (Sigma) de 12 cm de largo por 9 cm de alto, y se utilizó como fase móvil cloroformo-metanol en una proporción 9:1. La cafeína purificada se disolvió en metanol (7,5 mg/ml). Como estándar se utilizó una solución de cafeína comercial (Sigma) en metanol (7,5 mg/ml). Se emplearon además como muestras de referencia cafeína purificada de café y otra muestra de cafeína purificada de té.

Se colocaron 20 μL de cada una de las muestras de cafeína sobre la placa y, después de dejarlas secar, se colocó la placa dentro de una cámara de vidrio, en cuyo interior había cloroformo-metanol en una proporción 9:1. Al cabo de tres horas se examinó la placa bajo luz ultravioleta y se marcaron las manchas que se observaron.

La placa se sumergió brevemente en una bandeja que contenía una solución de ácido sulfúrico al 10% en etanol y se calentó en estufa a 80°C hasta que se desarrollaron completamente los colores.

Valoración cuantitativa

Se realizó una recta patrón con concentraciones conocidas de cafeína comercial (25,8 - 386,6 μM), midiendo su absorbancia a 254 nm, y se extrapoló sobre ella el valor de la concentración de tres muestras de cafeína purificada disueltas en metanol.

A partir de la solución de cafeína comercial utilizada en la valoración cualitativa (7,5 mg/ml) se llevaron a cabo las distintas diluciones en metanol utilizadas en la investigación.

Determinación de la actividad alelopática de la cafeína

El ensayo se realizó sobre dos especies modelo, una monocotiledónea (trigo) y una dicotiledónea (lenteja). Las pruebas de alelopatía se hicieron en bandejas de plástico que contenían papel de filtro completamente humedecido con un volumen (4 a 8 ml) de una solución prueba (distintas concentraciones de cafeína disuelta en agua en el rango 10^{-5} - 5×10^{-3} M). Cinco bandejas de plástico, cada una conteniendo 20 semillas (10 de trigo y 10 de lenteja), fueron incubadas en oscuridad a 25 °C, y se determinaron a los 5 días las longitudes de la raíz y de la parte aérea de las plántulas. En el caso de las plántulas de trigo, se midió únicamente la longitud de la raíz más larga de cada plántula.

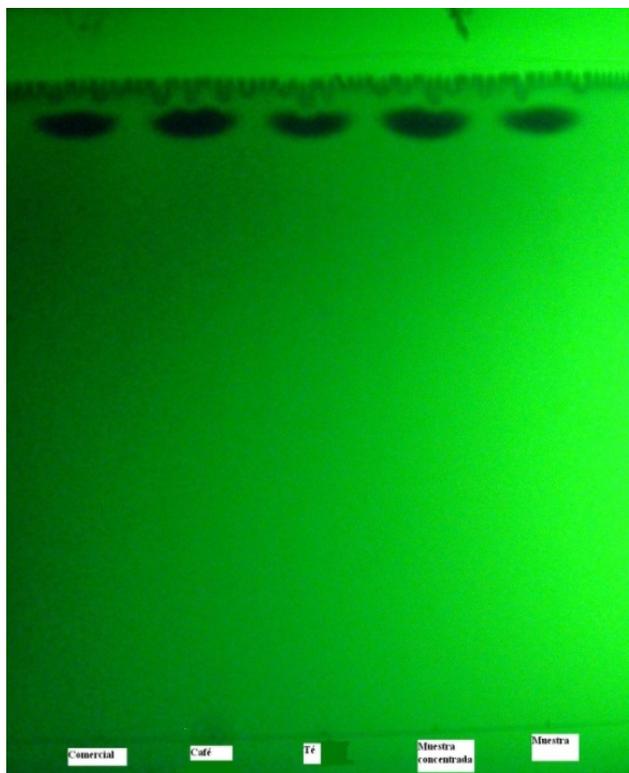
Resultados

Purificación de la cafeína

Se obtuvieron 42,4 mg de cafeína a partir de 12,5 g de hojas de té. El rendimiento obtenido fue muy bajo.

Valoración del grado de pureza de la cafeína

En la cromatografía en capa fina (TLC), bajo luz ultravioleta, se observó una única mancha que migra con un R_f próximo a 1, semejante al de la cafeína comercial (**Figura 3**).



Teniendo en cuenta el alto grado de pureza de la muestra, se llevó a cabo una valoración cuantitativa mediante espectrofotometría. La ecuación de la recta patrón resultante fue $y = 0,0037x - 0,0104$, y el coeficiente de correlación de 0,9987. Según estos datos, la pureza de la muestra fue prácticamente del 100%.

Figura 3. TLC de (izda. a dcha.) cafeína comercial (Sigma), cafeína extraída de café, cafeína extraída de té, nuestra cafeína extraída concentrada y nuestra cafeína extraída diluida.

Determinación de la actividad alelopática

Para determinar la actividad alelopática utilizamos diferentes concentraciones de nuestra muestra de cafeína (10^{-5} - $5 \cdot 10^{-3}$ M), y una solución control de cafeína comercial (Sigma) 10^{-3} M. No se apreciaron diferencias entre los resultados obtenidos con cafeína comercial o cafeína purificada, ambas a una concentración 10^{-3} M.

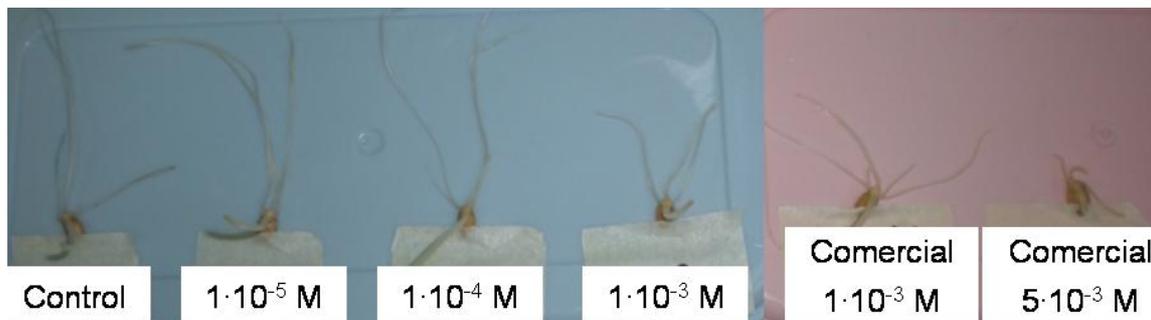


Figura 4. Crecimiento de plántulas de trigo en presencia de diferentes concentraciones de cafeína.

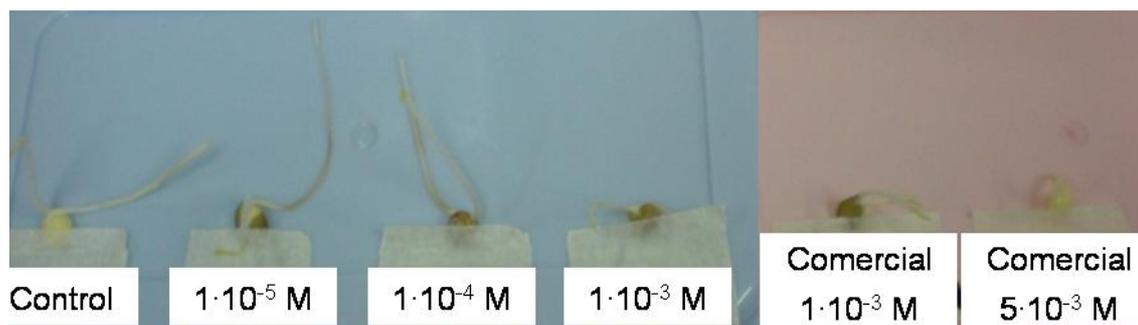


Figura 5. Crecimiento de plántulas de lenteja en presencia de diferentes concentraciones de cafeína

La germinación de las semillas de trigo y lenteja no quedó afectada por la cafeína, en el rango de concentraciones ensayado.

Sin embargo se observó claramente que la cafeína inhibió el crecimiento, tanto de la raíz como del tallo, en ambas especies (**Figuras 4 y 5**). Las raíces de las plántulas sometidas a las concentraciones más altas del inhibidor adquirieron un aspecto mazudo.

El efecto fue mayor a medida que aumentó la concentración de cafeína. Para corroborarlo, se realizó el cálculo de la I_{50} (**Figuras 6 y 7**) siendo éste de $2,5 \times 10^{-3}$ M y $8,0 \cdot 10^{-4}$ M para tallo y raíz de trigo, y de $2,0 \cdot 10^{-3}$ M y 10^{-3} M para tallo y raíz de lenteja respectivamente. De este modo se comprobó que la cafeína resultó ser más tóxica sobre el crecimiento del tallo con respecto al de la raíz, ya que se necesitaron concentraciones de cafeína más bajas para afectar a las raíces que al resto de órganos.

También se observó que a bajas concentraciones (10^{-5} M) este aleloquímico promovió el crecimiento del tallo de plántulas de trigo y de la raíz de plántulas de lenteja.

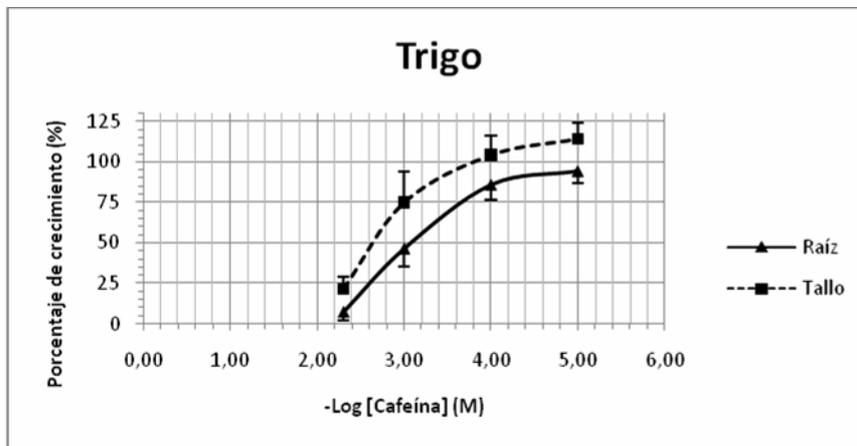


Figura 6. Longitudes de la raíz más larga (▲) y del tallo (■) de plántulas de trigo, expresadas como porcentaje de crecimiento con respecto el control, en función de la concentración de cafeína. Se representa la media \pm desviación típica (n = 10).

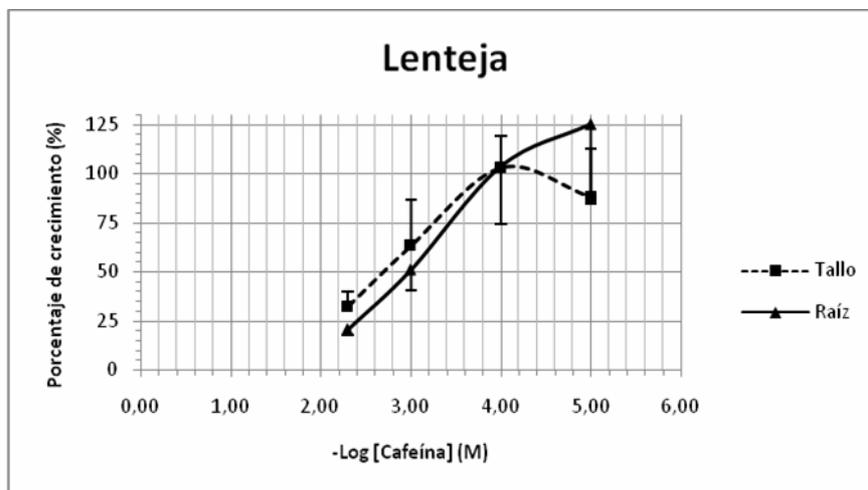


Figura 7. Longitudes de la raíz (▲) y del tallo (■) de plántulas de lenteja, expresadas como porcentaje de crecimiento con respecto el control, en función de la concentración de cafeína. Se representa la media \pm desviación típica (n = 10).

Discusión

El método utilizado para la extracción proporcionó cafeína con un grado de pureza del orden del 100%. El rendimiento fue bajo, ya que la concentración de cafeína en hojas de té es del orden del 3% (Cloughley, 1982). No obstante, hay que

tener en cuenta que el protocolo seguido no iba orientado a extraer la mayor cantidad posible de cafeína, sino cafeína de un alto grado de pureza.

Se observa claramente que la cafeína inhibe el crecimiento, tanto de la raíz como del tallo, en ambas especies. Sin embargo, se requieren concentraciones de cafeína más bajas para afectar a las raíces que al resto de órganos [trigo: I_{50} (raíz): $8,0 \times 10^{-4}$ M; lenteja: I_{50} (raíz): 10^{-3} M]. Otros estudios realizados con semillas de arroz reflejan que la cafeína inhibe más el crecimiento de las raíces que de los tallos, aunque la acumulación de cafeína fuera similar en ambos órganos. Aparentemente, los tallos tienen mecanismos más eficientes que las raíces para mantener el crecimiento en presencia de cafeína (Smyth, 1992).

Además, las raíces presentaron un aspecto mazudo. Esto puede ser debido a que la cafeína inhibe la mitosis en las raíces (Rizvi y Rizvi, 1987; Suzuki y Waller, 1987). Este efecto alelopático puede tener un sentido adaptativo importante para las plantas que producen y liberan cafeína al suelo, ya que podría afectar al crecimiento de la raíz de las plantas competidoras adyacentes y reducir el acceso de éstas a nutrientes y agua (Friedman y Waller, 1983).

La promoción del crecimiento del tallo de plántulas de trigo y de la raíz de plántulas de lenteja a bajas concentraciones de cafeína (10^{-5} M) puede interpretarse como un fenómeno de hormesis (Schabenberger et al., 1999; Cedergreen, 2008), observado en otros sistemas, debido a la potenciación de los sistemas de defensa, por ejemplo frente a destoxificación de xenobióticos.

En resumen, se pudo apreciar que la cafeína produce un efecto alelopático, inhibiendo el crecimiento tanto del tallo como de la raíz, en la monocotiledónea y en la dicotiledónea estudiadas. Este efecto fue más pronunciado en las raíces, sobre las cuales además ejerció un cambio morfológico, confiriéndolas una apariencia mazuda. Por tanto la hipótesis planteada sobre la presencia de efecto alelopático de la cafeína sobre plántulas de trigo y lenteja se ve claramente aceptada.

Bibliografía

- Cedergreen, N. (2008) Herbicides can stimulate plant growth. *Weed Res.* 48: 429-438.
- Cloughley, J.B. (1982) Factors influencing the caffeine content of black tea: Part 1 —The effect of field variables. *Food Chem.* 9: 269-276.
- Friedman, J., Waller, G.R. (1983) Caffeine hazards and their prevention in germinating seeds of coffee (*Coffea arabica* L.). *J. Chem. Ecol.* 9: 1099-1106.
- Pacheco, A., Pohlan H.A.J. (2005) Plantas aromáticas como cultivo intercalado, experiencias y efectos alelopáticos sobre el café (*Coffea arabica* L.). *Memorias en extenso. Primer Congreso Internacional de plantas medicinales en Villahermosa, Tabasco, México*, pp. 207-216.



- Peters, J.M. (1967) Factors affecting caffeine toxicity: a review of the literature. *J. Clin. Pharmacol.* 7: 131–141.
- Rizvi, S.J.H., Rizvi, V. (1987) Improving crop productivity in India: Role of allelochemicals. In: Waller G. R.(ed). *Allelochemicals: role in agriculture and forestry*. ACS Symp series 330. Washington DC Amer. Chem. Soc.
- Schabenberger, O., Tharp, B.E., Kells, J.J., Penner, D. (1999) Statistical tests for hormesis and effective dosages in herbicide dose response. *Agron. J.* 91: 713-721.
- Smyth, D.A. (1992): Effect of methylxanthine treatment on rice seedling growth. *J. Plant Growth Regul.* 11: 125-128.
- Suzuki, T; Waller, G.R. (1987) Allelopathy due to purine alkaloids in tea seeds during germination. *Plant Soil* 98: 131-136.