

Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal

Dora Marina Gutiérrez Avella, Christopher Alberto Ortiz García, Arturo Mendoza Cisneros.

Universidad Autónoma de Querétaro
Centro Universitario, Cerro de las Campanas, 76010, Querétaro, México.
domagu@uaq.mx

RESUMEN

Se determinó el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos de 14 plantas usadas en la alimentación animal mediante métodos de referencia espectrofotométricos. El contenido de fenoles totales se determinó a partir de un material de referencia interno de ácido gálico. La actividad antioxidante es referida al radical libre estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazil. Los resultados obtenidos mostraron que el contenido de fenoles totales se relaciona muy bien con la actividad antioxidante mostrada por cada extracto de las plantas estudiadas.

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de 8.000 compuestos distintos. Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidróxidos.

Como antioxidantes, los polifenoles pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres [1, 2]. El estrés oxidativo se define comúnmente como el desequilibrio entre las especies oxidantes y reductoras a nivel celular en un organismo [3].

Entre los compuestos fenólicos más importantes se encuentran los flavonoides [4] los cuales, además de su comprobada actividad antioxidante, se les ha atribuido una gran diversidad de efectos terapéuticos, tales como actividades cardiotónica, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antineoplástica, antimicrobial, etc. De aquí la importancia del estudio de las propiedades antioxidantes de los vegetales utilizados en la alimentación humana y animal y uno de los objetivos de este trabajo.

Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales son el ensayo de la vainillina y el de Folin-Ciocalteu. El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando

complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico [5]. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula [6].

Una terapia antioxidante provee una alternativa barata para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo ya que se ha demostrado el efecto antioxidante de productos naturales provenientes de las plantas. Por lo cual es importante el establecimiento de métodos de referencia confiables para la cuantificación de componentes antioxidantes como herramientas para el estudio de plantas y sus posibles usos terapéuticos.

Existe muchos métodos para medir la capacidad antioxidante de una especie o sustancia, un método muy usado se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 520 nm [7]. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical ($R\cdot$) se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia El parámetro IC_{50} , que es la concentración necesaria para obtener un 50% de efecto, es generalmente usado para la interpretación de este método.

Un estudio etnobotánico de las malezas arvenses del estado de Querétaro agrupó 102 especies de

diversas familias, de las cuales 25 son usadas como alimento para ganado vacuno, ovejas, cabras, caballos, aves y algunas de ellas son también de uso medicinal [8]. El objetivo de la presente investigación fue medir el contenido de fenoles totales y determinar la actividad antioxidante de éste extracto fenólico de 14 malezas usadas como forraje que se citan a continuación: Quelite (*Amaranthus hybridus* L.), Nabo o Mostaza (*Brassica rapa* L.), Mirasol (*Cosmos bipinnatus* Cav.), Gramilla (*Cynodon dactylon* Pers.), Pegarropa (*Desmodium molliculum* DC.), Correhuela o Hiedra (*Ipomoea purpurea* Roth.), Malva de quesitos (*Malva parviflora*, L.), Alfalfilla (*Medicago polymorpha* var. *vulgaris* Benth.), Agritos (*Oxalis decaphylla* H.B. & K.), Amargoso (*Parthenium hysterophorus* L.), Ojo de pollo (*Sanvitalia procumbens* Lam.), Shotol delgado (*Simsia amplexicaulis* Pers.), Pasto Johnson (*Sorghum halepense* Pers.), y Shotol o Acahual (*Tithonia tubiformis* Cass.).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos y Materiales

Todos los disolventes utilizados fueron grado reactivo analítico. Los compuestos, carbonato de sodio, 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), ácido gálico, el reactivo de Folin Ciocalteu y el 2,6-di-*t*-butil-4-metilfenol (BHT), fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. El ácido gálico y el DPPH no existen en el mercado como materiales de referencia certificados, por tal motivo fue necesario utilizar como materiales de referencia internos los productos de Sigma cuyas purezas reportadas son 97 % y 90 % respectivamente.

2.2. Material Vegetal

Todas las plantas fueron recolectadas en diferentes localidades del Estado de Querétaro. Se depositaron muestras de referencia de cada especie en el herbario de Querétaro, localizado en la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (Campus Juriquilla). El material fue desecado en un horno a 39 °C, posteriormente se llevó a molienda en un molino manual hasta la obtención de un polvo fino que se pesó y se guardó en frascos ámbar protegidos de la humedad hasta su posterior utilización.

2.3. Preparación de los Extractos para Determinación de Fenoles Totales

Se pesaron 10 g del material seco y pulverizado de cada planta, se pusieron a macerar en metanol acuoso al 80% en un frasco ámbar a temperatura

ambiente durante 24 h agitándolo de vez en cuando, enseguida se filtró y el residuo de esta filtración se extrajo dos veces más de la misma manera. A continuación se reunieron los extractos y se evaporó la mayor parte del disolvente sin calentar más allá de 40 °C. El producto de la evaporación se liofilizó para obtener de esta manera el extracto completamente seco el cual se pesó y se guardó en refrigeración hasta su uso para los siguientes análisis.

2.4. Preparación de los Extractos para la Actividad Antioxidante

Para la determinación de la actividad antioxidante, equivalente a la capacidad de capturar radicales libres, de cada planta, se prepararon 6 concentraciones diferentes de cada extracto comprendidas entre 1,50 mmol/L y 6,0 mmol/L de fenoles en una disolución al 80% de metanol en agua.

2.5. Preparación de los Reactivos y Calibrantes

Los fenoles totales se determinan mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu usando el ácido gálico como material de referencia.

Se preparó una disolución patrón de ácido gálico de 0,1 g/L, para lo cual se pesaron 25 mg de ácido gálico, se colocaron en un matraz aforado de 25 mL y se llevaron a volumen con agua destilada, enseguida se preparó una dilución 1:10 con agua destilada (siempre se utiliza una solución recién preparada).

De la misma manera se preparó una disolución de carbonato de sodio al 20 % pesando 5 g de carbonato de sodio en un matraz aforado de 25 mL, inicialmente se disolvió en 15 mL de agua grado HPLC y se llevó a ultrasonido hasta su completa disolución, finalmente se llevó a su volumen de aforo con agua.

Por otro lado se preparó una disolución 1N del reactivo de Folin Ciocalteu, por medio de una dilución 1:2 del reactivo comercial (2N) en agua destilada; el reactivo se protegió de la luz y se colocó en refrigeración hasta su uso.

A partir de la disolución patrón de ácido gálico, en viales protegidos de la luz, se hicieron las diluciones necesarias con agua destilada para obtener concentraciones de 0 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, 4 mg/L y 5 mg/L para la preparación de la curva de calibración. Esto se realizó tomando respectivamente 20 µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL y 100

μL de la disolución patrón de ácido gálico de 0,1 g/L en viales ámbar de 3 mL, luego se adicionó a cada vial, 250 μL de reactivo de Folin Ciocalteu 1N, se agitó durante 5 min en el ultrasonido, posteriormente se adicionaron 1 250 μL de la disolución de carbonato de sodio al 20 % a cada vial, se llevó a un volumen final de 2 ml con agua destilada y se dejó reposar por 2 h. También se preparó un blanco con todos los componentes excepto la disolución de ácido gálico. Finalmente se leyó la absorbancia a 760 nm en el espectrómetro de ultravioleta-visible (Perkin Elmer Lambda 40).

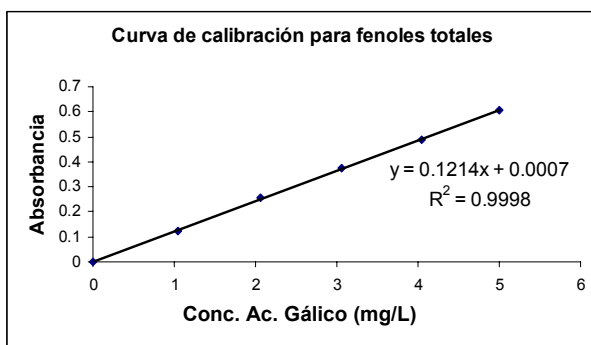


Fig. 1 Curva de calibración de contenido de fenoles.

El contenido de fenoles de cada extracto es expresado en mg/g de peso seco de la planta, basándose en la curva de calibración del material de referencia de ácido gálico, de ahí que se utilice el término "Unidades de ácido gálico equivalentes por gramo de extracto o materia vegetal desecada".

Para la determinación de la actividad antioxidante se preparó una disolución de DPPH de 150 $\mu\text{mol/L}$ en metanol al 80 % para lo cual se pesaron 3,3 mg de DPPH en un matraz volumétrico de 50 mL, se adicionaron 40 ml del disolvente, se agitó en el vortex y se llevó a volumen. Esta disolución se debe usar recién preparada. Se aplicó una corrección por pureza del DPPH de 90 %

Un control positivo de 2,6-di-*t*-butil-4-metilfenol (BHT) de 100 $\mu\text{mol/L}$ fue preparada pesando 1,1 mg de BHT en un matraz volumétrico de 50 mL, se agregan 30 mL de disolvente, se agita en el vortex y finalmente se lleva a volumen con disolución de metanol al 80 %.

2.6. Determinación del Contenido de Fenoles Totales en Cada Extracto

El contenido de fenoles totales se determinó mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu [9]. Se

tomaron 2 mg de cada extracto liofilizado, se colocaron en un matraz erlenmeyer y se les agregó 50 mL de agua destilada y se agitó. Enseguida se tomaron 0,5 mL de cada una de estas disoluciones y se mezclaron con 0,75 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu dejando en reposo a temperatura ambiente por 5 min después de lo cual se agregaron 0,75 mL de carbonato de sodio al 20 %. Se agitaron fuertemente para luego, dejar reposar durante 90 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo se midió la absorbancia a 760 nm. Este procedimiento se realizó con cada una de las plantas objeto de estudio por triplicado.

2.7. Determinación de la Actividad Antioxidante de los Extractos Fenólicos

La capacidad para capturar radicales libres de los extractos fue determinada utilizando como referencia la disolución de 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) de acuerdo al método reportado por Fukumoto y Mazza [10]. EL DPPH se caracteriza por poseer un electrón desapareado que es un radical libre, estabilizado por resonancia. Por esta propiedad, el DPPH se utiliza como material de referencia para determinar el poder antioxidante de una sustancia por captura de radicales libres.

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos de las plantas, objeto de este estudio, se tomaron 20 μL de cada extracto a 6 concentraciones (Sec. 2.4) y se le adicionó a cada uno 200 μL de la disolución de 150 $\mu\text{mol/L}$ de DPPH. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo durante 30 min a temperatura ambiente, en microplacas de 96 pozos protegidas de la luz, después de lo cual, se mide la absorbancia a 520 nm en un espectrómetro Elisa Versa Max Tunable Microplate Reader (Molecular Devices Co.). Los experimentos se llevaron a cabo usando un bloque de diseño al azar. Dentro de cada bloque cada tratamiento se aplicó 3 veces.

La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{Inhibición} = \%I = \frac{A - A_1}{A} \cdot 100, \quad (1)$$

donde A es la absorbancia del blanco, y A_1 es la absorbancia de la muestra.

Sin embargo los resultados obtenidos por este método se reportan como IC_{50} que es la concentración inhibitoria media, es decir, la concentración de compuestos antioxidantes que es capaz de inhibir el 50 % del radical DPPH.

3. RESULTADOS

3.1. Fenoles Totales

El contenido total de fenoles para los extractos metanólicos-acuosos de las 14 malezas estudiadas se muestra en la Tabla 1 [11] y se expresa como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco. El intervalo asociado a cada valor de contenido de fenoles e índice de inhibición en esta tabla representa la desviación estándar de los resultados de la medición.

Tabla 1. Fenoles totales y actividad antioxidante de extractos de malezas.

Especie vegetal	fenoles Totales (mg/g)	IC_{50} (μ g/ml)
<i>D. molliculum</i>	125,82±0,40	221,30±1,01
<i>S. halepense</i>	69,83±1,80	369,82 ± 1,01
<i>C. bipinnatus</i>	65,01±1,00	365,59±1,02
<i>O. decaphylla</i>	59,81±0,78	269,15±1,01
<i>P. hysterothorus</i>	57,13±1,16	289,06±1,01
<i>S. amplexicaulis</i>	52,46±1,70	246,03 ± 1,02
<i>A. hybridus</i>	49,43±1,40	737,90±1,01
<i>S. procumbens</i>	47,60±1,30	862,97±1,02
<i>C. dactylon</i>	47,27±1,80	843,33±1,01
<i>T. tubiformis</i>	41,58±1,80	671,42±1,02
<i>B. rapa</i>	40,18±1,20	893,30±1,02
<i>M. polymorpha</i>	38,56±1,29	618,01±1,01
<i>I. purpurea</i>	24,02±0,24	1963,36±1,00
<i>M. parviflora</i>	21,88±0,52	1577,61±1,02

3.2. Actividad Antioxidante

Los resultados de la actividad antioxidante indican que todos los extractos fueron capaces de atrapar radicales DPPH de una manera dependiente de la concentración. La actividad antioxidante de cada tipo de planta expresada como concentración inhibitoria media (IC_{50}) se muestra en la Tabla 1. La *D. molliculum* mostró la más fuerte actividad antioxidante con una IC_{50} de 221,30 μ g/mL comparada con la *I. purpurea* la cual presentó la más baja capacidad de atrapar radicales DPPH con una IC_{50} de 1963,36 μ g/mL.

4. DISCUSIÓN

El contenido de fenoles en las plantas estudiadas en este trabajo varió desde 21,88 mg de ácido gálico/g para la *M. parviflora* hasta 125,82 mg de ácido gálico/g para la *D. molliculum*. De los resultados obtenidos se observa una clara relación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los extractos de las plantas estudiadas, como era de esperarse. En lo general una planta con mayor contenido de compuestos fenólicos totales presenta una mayor actividad antioxidante, sin embargo se puede observar que algunas plantas presentan una actividad antioxidante superior a lo esperado o por el contrario, una baja actividad que no se relaciona con el contenido de compuestos fenólicos. Esto es indicativo de que la capacidad antioxidante de una planta se debe al efecto combinado de diversos factores, como puede ser la presencia de otro tipo de metabolitos antioxidantes, o bien, una actividad pro-oxidativa que se contrapone al potencial antioxidante.

Así pues, un estudio completo de la actividad antioxidante de una planta requiere de la medición de diferentes magnitudes y por ende, del desarrollo y la normalización de métodos confiables para cada una de estas magnitudes.

5. CONCLUSIONES

Se ha determinado el contenido de fenoles totales en 14 plantas silvestres usadas como forraje, así mismo se midió la actividad antioxidante de estas plantas. Los métodos de referencia utilizados con este propósito no están normalizados, sin embargo, son métodos bien sustentados tanto en la teoría como en la práctica y son ampliamente reportados en la literatura científica que trata sobre la medición de estas magnitudes bioquímicas.

La relación entre actividad antioxidante de diversos extractos vegetales y su acción terapéutica contra padecimientos ocasionados por el estrés oxidativo está bien demostrada. Sin embargo se requiere el establecimiento de métodos confiables para apoyar el tratamiento de enfermedades por medio de agentes antioxidantes.

Este trabajo presenta la aplicación, con propósitos bien definidos, de metodologías ya publicadas y con sustento científico reconocido y con ello se apoya de alguna forma la validación y normalización de este tipo de métodos.

REFERENCIAS

- [1] F.S. Martínez, G.J. González, J.M. Culebras, M.J. Tuñón, Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes, *Nutrición Hospitalaria*, Vol. 17 No.6, 2002, 271-278.
- [2] A. Scalbert, C. Manach, C. Morand, Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 45, 2005, 297-306.
- [3] J.K. Miller, E. Brzezinska-Slebodzinska, Oxidative Stress, Antioxidants, and Animal Function, *Journal of Dairy Science*, Vol. 76 No.9, 1993, 2812-2823.
- [4] K. Narayama, R. Reddy, M. Sripal, M.R. Chaluvadi, D.R. Krishna, Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical, effects and therapeutic potencial, *Indian Journal Pharmacology*, Vol. 33, 2001, 2-16.
- [5] G.L. Peterson, Review of the Folin protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, *Analytical biochemistry*, Vol.100 No.2, 1979, 201-220.
- [6] R. Julkunen-Tiito, Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 33 No.2, 1985, 213-217.
- [7] P. Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, Vol. 26 No. 2, 2004, 211-219.
- [8] G. Suárez, V. Serrano, R. Pelz, P. Balderas, Atlas de Malezas Arvenses del Estado de Querétaro 1ª ed., Universidad Autónoma de Querétaro, México, 2004, 36-37, 48-49, 70-71, 74-77, 84-85, 90-91, 110-111, 138-139, 158-159, 174-175, 190-191, 204-205.
- [9] V. Dewanto, X. Wu, K. Adom, R. Lui, Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity, *Journal of agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50 No.10, 2002, 3010-3014.
- [10] L.R. Fukumoto, G. Mazza, Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 48, 2000, 3597-3604.
- [11] D. Gutiérrez, S. Mendoza, V. Serrano, Proximate composition, mineral content and antioxidant properties of fourteen Mexican weeds used as fodder. *Weed Biology and Management*. En prensa.