

Artículo Original

Polifenoles totales y actividad antioxidante *in vitro* del extracto acuoso de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don

Total polyphenols and *in vitro* antioxidant activity of the aqueous extract of the bark of *Brunfelsia grandiflora* D. Don

Leonardo Giraldo^{1,a}, Norma Ramos^{1,b}, Américo Castro^{1,c}

Recibido: 16/05/2022 Aceptado: 30/06/2022 Publicado: 31/08/2022

Resumen

Brunfelsia grandiflora D. Don “chiric sanango” es una planta oriunda de la amazonia peruana, perteneciente a las solanáceas y es utilizada en la medicina tradicional por la población selvática. La investigación tuvo como objetivo determinar el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante *in vitro* del extracto acuoso de su corteza. La cuantificación de los polifenoles totales se realizó aplicando el método de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante por el método de eliminación de radicales libres por transferencia de electrones empleando el 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), el método de capacidad antioxidante reductor férrico (FRAP) y el método por transferencia de hidrógeno empleando el ácido 2,2-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS⁺). El contenido de polifenoles totales fue de 30,17 mg de ácido gálico/100g del extracto y la actividad antioxidante por el método DPPH fue de 11,86 mg Trolox/g muestra; por el método FRAP fue de 113,9 µmol de equivalentes de ácido ascórbico/g de muestra y por el método ABTS⁺ de 80,38 mg Trolox/g muestra. Por lo que se puede concluir que el extracto acuoso es una fuente accesible de antioxidantes.

Palabras clave: Antioxidante; *Brunfelsia grandiflora* D. Don; polifenoles totales.

Abstract

Brunfelsia grandiflora D. Don “chiric sanango” is a plant native to the Peruvian Amazon, belonging to the Solanaceae and is used in traditional medicine by the jungle population. The objective of the research was to determine the content of total polyphenols and the *in vitro* antioxidant activity of the aqueous extract of its bark. The quantification of total polyphenols was carried out by applying the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant activity by the method of elimination of free radical by electron transfer using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) the capacity method ferric reducing antioxidant (FRAP) and the hydrogen transfer method using 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS⁺). The content of total polyphenols was 30,17 mg of gallic acid/100g of the extract and the antioxidant activity by the DPPH method was 11,86 mg Trolox/g sample; by the FRAP method it was 113,9 µmol of ascorbic acid equivalents/g sample and by the ABTS⁺ method it was 80,38 mg Trolox/g sample. Therefore, it can be concluded that the aqueous extract is an accessible source of antioxidants.

Keywords: Antioxidant; *Brunfelsia grandiflora* D. Don, total polyphenols.

¹ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú

a Autor para correspondencia: leonardo.giraldo@unmsm.edu.pe - ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9953-0957>

b E-mail: nramosc@unmsm.edu.pe - ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4361-1330>

c E-mail: acastroi@unmsm.edu.pe - ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8012-967X>

Citar como:

Giraldo, L., Ramos, N., & Castro, A. (2022). Polifenoles totales y actividad antioxidante *in vitro* del extracto acuoso de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don. *Ciencia e Investigación* 2022 25(1):61-66. doi: <https://doi.org/10.15381/ci.v25i1.23476>

INTRODUCCIÓN

El cuerpo humano posee un sistema complejo de defensas enzimáticas y defensas antioxidantes que contrarrestan a los efectos nocivos de radicales libres y oxidantes; los radicales libres son responsables de causar una gran variedad de enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurales, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, envejecimiento y aterosclerosis. Existe evidencia científica que los antioxidantes pueden ser de gran importancia en la prevención y mejora de la calidad de vida al prevenir o posponer la aparición de enfermedades degenerativas. Además, tienen un potencial para ahorros sustanciales en el costo de prestación de asistencia sanitaria¹.

Las plantas medicinales se consideran fuentes potenciales de compuestos antioxidantes naturales, tales como los polifenoles, taninos, estilbenos y cumarinas. Estos compuestos pueden desempeñar un papel importante al actuar a diferentes niveles en la cadena fisiopatológica para la prevención de radicales libres y daños oxidativos².

Una de las plantas medicinales más importantes del noreste de la amazonia es un pequeño arbusto perteneciente a las solanáceas llamado *Brunfelsia grandiflora* D. Don y conocida como “chiric sanango”³; utilizada por una diversidad de curanderos en procesos de iniciación y aprendizaje de la medicina tradicional practicados por la población amazónica en Perú. Existen investigaciones donde han descubierto los compuestos más importantes que se encuentran en las hojas, tallos, raíces y corteza de la raíz son cumarinas, como esculetina y escopoletina; una metilendiamina, como brunfelsamidina; alcaloides no identificados, como manacina y manaceína; alcaloides tropánicos, como escopolamina; alcaloides pirrolidínicos, como cuscohigrina y saponinas esteroideas que pertenecen al tipo de saponinas furostan^{4,5}. También se describe la elucidación estructural completa de un nuevo triglicósido de flavonol acilado mediante espectroscopia de RMN 2D en 14T, siendo esta especie uno de los remedios nativos más importantes empleados contra el reumatismo, la artritis, la fiebre y las mordeduras de serpientes en la región alta del Amazonas⁶.

El objetivo del presente estudio fue determinar el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante *in vitro* del extracto acuoso de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don “chiric sanango”; con el fin de aportar un mayor conocimiento al estudio de esta planta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo y diseño de la investigación

Aplicada y experimental.

Colecta e identificación del material biológico

La corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don “chiric sanango” se colectó en la comunidad nativa de Canaán de Cachiyacú, distrito de Contamana, provincia de Ucayali, Región Loreto.

Tratamiento de la muestra y análisis del material biológico.

La corteza colectada se secó y se extrajo el floema el cual se pulverizó en un molino de cuchillas obteniendo 250g a partir de cuánto inicialmente? y posteriormente se sometió a un proceso de evaporación-condensación con 2 L. de agua destilada y luego se filtró en caliente usando papel Wathman No. 42. El filtrado se concentró en un evaporador rotatorio y posteriormente se secó a 45°C, resultando 15,7g. de extracto. Luego se pulverizó usando un molino de laboratorio y se almacenó en un frasco ámbar a 8°C hasta el análisis.

Determinación de compuestos fenólicos totales:

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por ISO 14502-1 modificado⁷. Se preparó una curva de calibración de ácido gálico cuyo rango de concentración fue de 10 – 50 µg/mL. La muestra metanólica del material biológico se preparó a 0,02 g/mL y se diluyó a 0,8 mg/mL de material biológico. A 100µL de la muestra se adicionó 500µL de Sol. Folin-Ciocalteu (1: 9 con agua bidestilada); dejándose en reposo por 5 min., luego se agregó 400µL de Na₂CO₃ 7,5% (w/v) agitando vigorosamente, se protegió de la luz y se mantuvo en reposo por 60 min. a temperatura ambiente. Las medidas de absorbancias se realizaron a 765nm un espectrofotómetro GENESYS™ 10S UV-VIS.. Se analizó por triplicado y el contenido fue expresado en mg de ácido gálico/100g de muestra biológica..

Determinación de la actividad antioxidante.

Se valoró la actividad antioxidante por los métodos DPPH, ABTS^{•+} y FRAP.

Modelo del radical DPPH

La actividad de captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) se realizó siguiendo el método de Brand Williams y Col.⁸ con algunas modificaciones. Este método se basa en la decoloración del radical DPPH por la acción de los antioxidantes. El radical DPPH es un sólido de color púrpura con un electrón desapareado, cuando se estabiliza el radical libre frente a un antioxidante se torna un color amarillo pálido. La capacidad antioxidante es directamente proporcional a la disminución de la absorbancia a 517nm; comparándose con la curva de referencia construida con Trolox, empleado como patrón primario, Los resultados fueron expresados como valores TEAC (IC 50 Trolox µg/mL / IC 50 DPPH muestra mg/mL).

Se realizó un blanco conteniendo 400µL del solvente de la muestra y 800µL de metanol. En un tubo de ensayo se colocó 400µL de la muestra (solvente, sustancia patrón Trolox y extracto de *Brunfelsia grandiflora* D. Don) y 800µL de la solución de trabajo de DPPH, se agitó y mantuvo en reposo por 30 min. protegido de la luz. Se calculó el porcentaje de inhibición (% Inh.) usando la siguiente formula:

$$\% Inh. = \frac{(Abs_{DPPH} - Abs_{Muestra})}{Abs_{DPPH}} \times 100$$

Modelo del radical ABTS^{•+}

La actividad de captación del radical ABTS^{•+} (ácido 2,2-azinobis-3-etil benzotiazolina-6-sulfónico) se realizó según el método de Re y col.⁹ con algunas modificaciones, el cual se fundamenta en la decoloración del radical catión ABTS^{•+} (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato). El ABTS^{•+} es un radical cromógeno que se puede generar enzimática o químicamente a partir de la oxidación del ABTS^{•+}; este radical es fácilmente soluble en agua y otros solventes orgánicos y reacciona con la mayoría de los antioxidantes sintéticos y naturales^{10,2}.

Se realizó un blanco que contenía 20µL del solvente de la muestra y 980µL de agua bidestilada. Se adicionó 20µL de la muestra (solvente, sustancia patrón Trolox y Extracto de *Brunfelsia grandiflora*) y 980µL de la solución ABTS^{•+}. Se agitó y mantuvo en reposo por 7 min. protegido de la luz. Se realizaron las lecturas a 734 nm y se expresó los resultados como valores TEAC (IC 50 Trolox µg/mL / IC 50 ABTS muestra mg/mL). Se calculó el porcentaje de inhibición (% Inh.) usando la siguiente formula:

$$\% Inh. = \frac{(Abs_{ABTS} - Abs_{Muestra})}{Abs_{ABTS}} \times 100$$

Modelo FRAP

El poder antioxidante de la reducción del ion férrico según Benzie F. y Stain J.¹¹ es un método colorimétrico que se fundamenta en la reducción del complejo [Fe(TPTZ)]⁺³ a [Fe(TPTZ)]⁺² debido a la presencia de agentes antioxidantes donadores de electrones en medio ácido (pH= 3,6). La reducción del complejo férrico se evidencia en el cambio de coloración de incoloro a azul intenso a 593nm. Un volumen de 50µL de las muestras (Ácido ascórbico y extracto de *Brunfelsia grandiflora* D. Don a diferentes concentraciones), se mezcló con 950µL de reactivo FRAP (2,5mL de la solución 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (10mM) en HCl 40 mM; 25mL de buffer acetato 300 mM y 2.5mL de

FeCl₃ 20mM a un pH de 3.6). La absorbancia se midió a 593nm después de 15 min. Se utilizó una curva de calibración de ácido ascórbico (AA) y la actividad del extracto de *Brunfelsia grandiflora* D. Don se expresaron como µmol de equivalentes de ácido ascórbico/g de extracto.

RESULTADOS

Compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales del extracto acuoso de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don se determinó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu. La curva de calibración fue lineal ($y = 0,0011x + 0,0099$, $R^2 = 0,999$) en el rango de (10 – 50 µg/mL de ácido gálico). La muestra analizada tuvo un contenido de compuestos fenólicos de 24,34 µg/mL que al ser expresado en corteza de *Brunfelsia grandiflora* se obtuvo 30,17 mg de ácido gálico/ 100g de sólido del extracto acuoso de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don.

Actividad antioxidante

Los resultados obtenidos de la actividad antioxidante evaluado por los ensayos DPPH (Figura 1) y ABTS^{•+} (Figura 2), se presenta en la Tabla 1. Mientras que el resultado obtenido mediante el ensayo FRAP, el cual es un método antioxidante reductor, se encontró una actividad del extracto de *Brunfelsia grandiflora* de 113,9µmol de equivalentes de ácido ascórbico/g de muestra.

DISCUSIÓN

La cuantificación de los compuestos fenólicos totales en el extracto del floema de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don “chiric sanango”, resultó en un valor inferior al reportado por Rongai D. y col.¹² al evaluar los extractos de plantas antifúngicas, dentro de las cuales se evaluó las hojas de *Brunfelsia calyicina*, encontraron 136,71mg equivalente de ácido gálico/g peso seco. Este hallazgo es consistente con los resultados reportados por Castro y col.¹³, quienes encontraron presencia de

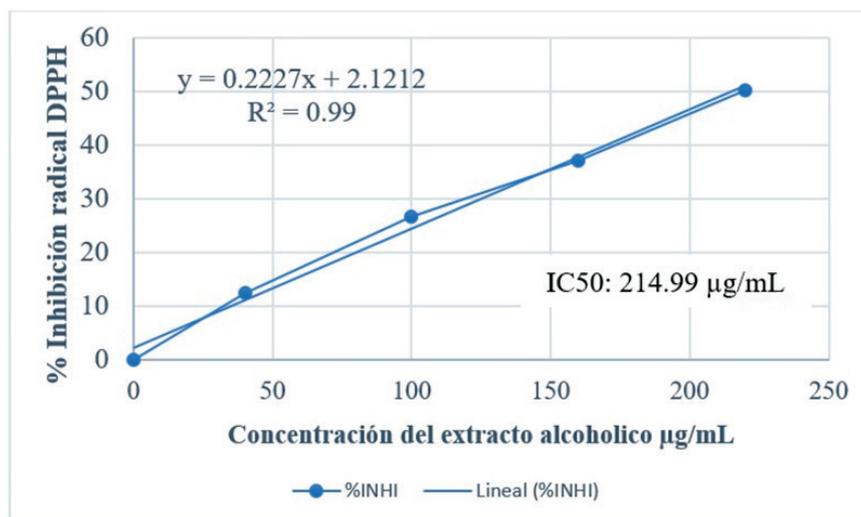


Figura 1. Extracto de *Brunfelsia grandiflora* frente al radica DPPH para determinar el IC50.

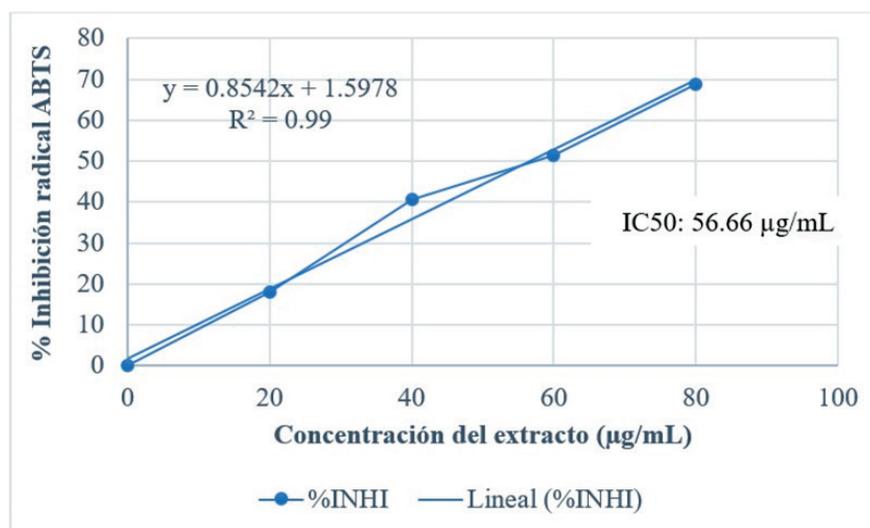


Figura 2. Extracto de *Brunfelsia grandiflora* frente al radical $ABTS^{\cdot+}$ para determinar el IC50.

Tabla 1. Actividad antioxidante del extracto de *Brunfelsia grandiflora* D. Don expresada como capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).

Ensayo	TEAC mg Trolox/g muestra
DPPH	11,86 mg Trolox/g muestra
ABTS ^{·+}	80,38 mg Trolox/g muestra

polifenoles, flavonoides, alcaloides, lactonas insaturadas y glicósidos. Siendo los flavonoides quienes están involucrados en la actividad antioxidante¹⁴.

La actividad antioxidante del extracto acuoso, fue evaluado por los ensayos DPPH, ABTS^{·+} y FRAP; ensayos basados en la transferencia de electrones donde la prueba DPPH proporcionó información sobre la reactividad de los compuestos de prueba con un radical libre el 2, 2-difenil-picrilhidracilo (DPPH) mostrando una fuerte banda de absorción a 517nm en espectroscopia visible, siendo la eficacia de los antioxidantes a menudo asociados con su capacidad para eliminar radicales libres estables¹⁵. En el presente estudio, (Tabla 1), la muestra que produjo una inhibición del 50% del radical DPPH (IC50) 11,86mg Trolox/g muestra.

El mecanismo del método ABTS^{·+} para la evaluación de la actividad antioxidante es la misma que la del método DPPH, pero el método ABTS^{·+} es más confiable que el método DPPH debido a la solubilidad del reactivo¹⁶; ABTS^{·+} es un radical libre protonado y, por lo tanto, se utilizó en este estudio para examinar la capacidad de los extractos de hojas para reducir el radical con carga positiva en solución. Este ensayo también se incluyó en este estudio porque ABTS^{·+} es sensible en un amplio rango, desde antioxidantes muy potentes hasta antioxidantes muy débiles, lo cual estos últimos podrían no ser detectados por el ensayo DPPH. Los compuestos con un grupo OH en el anillo aromático que se encuentran inactivos frente al radical DPPH son significativamente

activos frente a ABTS^{·+}¹⁷ por lo que se puede ver una diferencia entre los resultados obtenidos en la Tabla 1 donde la actividad eliminadora de ABTS^{·+} varía significativamente.

El ensayo FRAP es uno de los métodos antioxidantes reductores que tiene la capacidad de producir Fe (II) a partir de Fe (III) indicándose esto como el “poder antioxidante”¹³ Un valor alto de FRAP indica un alto potencial redox, y los compuestos con un alto potencial redox pueden donar electrones a los radicales libres y convertirlos en un estado inofensivo, poniendo fin a sus reacciones radicales¹⁸. El poder reductor del extracto se expresó como valor FRAP, el cual fue 113,9µmol de equivalentes de ácido ascórbico/g de muestra que al compararlo con los resultados obtenidos por Palomino L y col.¹⁹ quienes utilizaron el antioxidante sintético butil hidroxitolueno presenta una débil actividad captadora de radicales libres.

Los agentes antioxidantes pueden ser desde compuestos simples hasta muy polimerizados y pueden tener un alto peso molecular, como son los polifenoles que poseen capacidad quelante y dadores de hidrógeno. Los radicales libres atacan lugares con una alta densidad electrónica y tienen carácter electrofílico, como uniones de O₂ y grupos sulfidrido o nitrogenados que encontramos en el glutatión²⁰. Shalaby y col. indican que el método de DPPH es un método simple, rápido y económico para estudiar la capacidad antioxidante de extractos ya sea de plantas, alimentos, entre otros. De la misma manera,

estos autores mencionan que el método ABTS⁺ se ha empleado para analizar la capacidad relativa de captación de radicales de fenoles y flavonoides. El ABTS⁺ es soluble en soluciones acuosas y orgánicas; es también una mejor opción y más sensible que el DPPH. Asimismo, ellos mencionan que el ensayo FRAP es simple; así como económico, rápido y no requiere equipo especializado. Una desventaja del reactivo FRAP es que no puede detectar especies como antioxidantes del grupo sulfhidrilo como las proteínas y el glutatión y que actúen por transferencia de H⁺ 21,22.

En la presente investigación, el extracto del floema de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* D. Don “chiric sanango”, posee una actividad antioxidante *in vitro* donde los compuestos fenólicos y otros fitoquímicos pueden ser los responsables de esta actividad antioxidante, los cuales pueden contribuir a la actividad terapéutica

CONCLUSIÓN

Sobre la base de los resultados obtenidos, el extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* D. Don “chiric sanango” presenta un contenido de polifenoles totales de 30,17 mg de equivalente de ácido gálico/100g de extracto de corteza cuya actividad antioxidante se evaluó mediante los ensayos DPPH (11,86 mg Trolox/g muestra), ABTS⁺ (80,38 mg Trolox/g muestra) y FRAP (113,9 μmol de equivalentes de ácido ascórbico/g de muestra). Estos resultados indican que este extracto representa una fuente de antioxidantes naturales pudiendo ser una alternativa a los antioxidantes sintéticos. Este estudio es el primer informe sobre la actividad antioxidantes del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* D. Don “chiric sanango”

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharm J [Internet]. 2013;21(2):143–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Capanoglu E, Kamiloglu S, Ozkan G, Apak R. Evaluation of antioxidant activity/capacity measurement methods for food products. In: Apak R, Capanoglu E, Shahidi F, editors. Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications [Internet]. 2017. p. 273–83. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119135388>
- Evans Schultes R. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes XXXV: Miscellaneous notes on biodynamic plants of the northwest Amazon. J Ethnopharmacol. 1985;14(2–3):125–58.
- Luzuriaga-Quichimbo CX, Del Barco MH, Blanco-Salas J, Cerrón-Martínez CE, Ruiz-Téllez T. Chiricaspi (*Brunfelsia grandiflora*, solanaceae), a pharmacologically promising plant. Plants. 2018;7(3):1–11.
- Jauregui X, Clavo ZM, Jovel EM, Pardo-De-Santayana M. “Plantas con madre”: Plants that teach and guide in the shamanic initiation process in the East-Central Peruvian Amazon. J Ethnopharmacol [Internet]. 2011;134(3):739–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.01.042>
- Brunner G, Burger U, Castioni P, Kapetanidis I, Christen P. A novel acylated flavonol glycoside isolated from *Brunfelsia grandiflora* ssp. *grandiflora*. Structure elucidation by gradient accelerated NMR spectroscopy at 14T. Phytochem Anal. 2000;11(1):29–33.
- International Organization of Standardization. Iso 14502-1. Determination Subst Charact Green Black Tea. 2005;1–10.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Sci Technol. 1995;28(1):25–30.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med [Internet]. 1999;26(9/10):1231–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584998003153>
- Walker RB, Everette JD. Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation. J Agric Food Chem. 2009;57(4):1156–61.
- Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol. 1999;299(1995):15–27.
- Rongai D, Pulcini P, Pesce B, Milano F. Antifungal activity of some botanical extracts on *Fusarium oxysporum*. Open Life Sci. 2015;10(1):409–16.
- Castro L. AJ, Juárez E. JR, Ramos C. NJ, Ruez G. JE, Retuerto P. FO, Gonzales E. SA. Análisis estructural del extracto etanólico del tallo de. Cienc Invest. 2012;15(2):71–7.
- Tang D, Dong Y, Ren H, Li L, He C. A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common food mung bean and its sprouts (*Vigna radiata*). Chem Cent J. 2014;8(1):1–9.
- Krishnaraju A V., Rao C V., Rao TVN, Reddy KN, Trimurtulu G. Antioxidants. Am J Infect Dis [Internet]. 2009;5(2):60–7. Available from: <https://thescpub.com/abstract/ajidsp.2009.60.67>
- Teow CC, Truong V Den, McFeeters RF, Thompson RL, Pecto K V., Yencho GC. Antioxidant activities, phenolic and β-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. Food Chem. 2007;103(3):829–38.
- Kortei NK, Suetor JM, Aboagye G, Tettey CO, Kpodo FM, Esuman EK. Comparative study of the bioactive and chemical properties of three different solanum spp. From Ghana. Food Res. 2020;4(5):1773–84.
- Ozkan EE, Ozden TY, Toplan GG, Mat A. Phenolic content and biological activities of *lycium barbarum* l (Solanaceae) fruits (goji berries) cultivated in Konya, Turkey. Trop J Pharm Res. 2018;17(10):2047–53.
- Palomino G LR, García P CM, Gil G JH, Rojano BA, Durango R DL. Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from Antioquia (Colombia). Vitae. 2009;16(3):388–95.
- Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr Rev. 1998;56(11):317–33.
- Shalaby E.; Shanab S. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. African J Pharm Pharmacol [Internet]. 2013;7(10):528–39. Available from: <http://www.academicjournals.org/AJPP>

22. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal.* 2006;19(6-7):669-75.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento

Auofinanciado.