

Área de la ciencia: Ciencias y Tecnología de los alimentos

Cuantificación de compuestos fenólicos totales, taninos totales y actividad antioxidante de dos plantas medicinales del Paraguay: Tapekue (*Acanthospermum australe*) y Ñandypa (*Genipa americana* L.)¹

Elba Lucía Ramírez Garay²
elbilu_ramirez@hotmail.com

Resumen

Se analizaron dos plantas medicinales de uso tradicional en el Paraguay: Tapekue (*Acanthospermum australe*) y Ñandypa (*Genipa americana* L.). Los análisis consistieron en la cuantificación de compuestos fenólicos totales (CFT) y taninos totales (TT) a través del método de Folin-Ciocalteu y la determinación de la actividad antioxidante por medio de la capacidad captadora del radical DPPH•, de ambas plantas. Los valores de CFT en los extractos acuosos y etanólicos de Ñandypa fueron $169,86 \pm 29,97$ y $369,10 \pm 68,51$ AGE mg/100 g de hoja seca, respectivamente. En tanto que para los extractos acuosos y etanólicos de Tapekue fueron $314,01 \pm 39,26$ y $1119,92 \pm 73,15$ AGE mg/100 g de hoja seca, respectivamente.

Los valores de TT en los extractos acuosos y etanólicos de Ñandypa fueron $53,59 \pm 39,92$ y $149,78 \pm 47,66$ AGE mg/100 g de hoja seca, respectivamente. Para el Tapekue, los TT solo fueron cuantificables en el extracto etanólico con $525,48 \pm 56,04$ AGE mg/100 g de hoja seca.

Las actividades antiradicalarias (DPPH) fueron mayores para los extractos de *Acanthospermum australe*, mientras que las menores actividades se observaron en los extractos de *Genipa americana* L.

Palabras Clave: Actividades antiradicalarias, DPPH, Folin-Ciocalteu, Plantas medicinales.

Abstract

Two medicinal plants of traditional use in Paraguay were analyzed: Tapekue (*Acanthospermum australe*) and Ñandypa (*Genipa americana* L.). The analyzes consisted in the quantification of total phenolic compounds (TPC) and total tannins (TT) through the Folin-Ciocalteu method and the determination of the antioxidant activity by means of the DPPH • radical capturing capacity of both plants. The TPC values in the aqueous and ethanolic extracts of Ñandypa were 169.86 ± 29.97 and 369.10 ± 68.51 AGE mg / 100 g of dry leaf, respectively. Meanwhile for the aqueous and ethanolic extracts of Tapekue were 314.01 ± 39.26 and 1119.92 ± 73.15 AGE mg / 100 g of dry leaf, respectively.

The TT values in the aqueous and ethanolic extracts of Ñandypa were 53.59 ± 39.92 and 149.78 ± 47.66 AGE mg / 100 g of dry leaf, respectively. For Tapekue, TTs were only quantifiable in the ethanolic extract with 525.48 ± 56.04 mg AGE / 100 g of dry leaf.

Anti-radical activities (DPPH) were higher for the *Acanthospermum australe* extracts, while the lowest activities were observed for the *Genipa americana* L.

Keywords: Anti-radical activities, DPPH, Folin-Ciocalteu, Medicinal plants.

¹ Recibido:29/09/2019 Aprobado:29/10/2020

² Mg. en Tecnología y Seguridad Alimentaria. Profesora Investigadora de la Universidad Nacional de Itapúa (UNI)

Introducción

Las plantas medicinales son el recurso terapéutico por excelencia de la medicina tradicional. Su acción preventiva o curativa se debe a sustancias químicas que provocan un efecto fisiológico en el organismo. Estas sustancias se conocen como principios activos y, generalmente, son producto del metabolismo secundario de la planta. Estos compuestos se clasifican en diferentes tipos; fenoles, terpenoides, compuestos nitrogenados o alcaloides (Harborne, 1980).

Acanthospermum australe (Loefl.) Kuntze es una planta herbácea perteneciente a la familia *Asteraceae* (Martins *et al.*, 2006) conocida comúnmente en Paraguay como “tapekue”. Es muy utilizado en la medicina tradicional. El ramo se utiliza para la preparación de té, por infusión o decocción, y tiene propiedades tónicas, provoca la secreción del sudor, ayuda a la digestión, también facilita la expulsión de lombrices intestinales, es antidiarreico, antipalúdico, antianémico, aromático, combate la blenorragia, ayuda a reducir la fiebre (Rodrigues y Carvalho, 2001). Para uso externo, la planta entera se utiliza para afecciones de la piel. En forma de baño, está indicado contra el dolor lumbar, dolor de riñón o extremidades, úlceras, heridas y micosis (Martins *et al.*, 2006). Es bueno para lavar las heridas ulcerosas y como antiinflamatorio.

La planta de *Genipa americana* L. es una especie del género *Genipa*, conocida también comúnmente en nuestro país como “ñandypa”. Está ampliamente distribuida a lo largo de las áreas tropicales y subtropicales de América Latina (De Almeida Barbosa, 2008). Las hojas se emplean para el tratamiento de la diabetes; la decocción de hojas y corteza se utiliza para la disminución de los niveles de colesterol y como adelgazante (González de García *et al.*, 2011). Por otro lado, el estrés oxidativo ocurre cuando existe un desequilibrio entre la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la cantidad de antioxidantes, destruyendo las células vivas al causar daño a los componentes celulares como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que eventualmente conduce hasta la

muerte celular (Rezaeizadeh, Zuki y Abdollahi, 2011). Estos se originan como productos normales del metabolismo celular. Se producen de forma endógena por las mitocondrias durante la reacción en la cadena respiratoria y de manera exógena por diversas fuentes, como las radiaciones ultravioletas y los contaminantes (Afanas'ev, 2010). Los radicales libres altamente reactivos, incluidos el superóxido, el radical hidroxilo y el radical peroxilo, generalmente provocan la degradación de las proteínas, la peroxidación lipídica y la oxidación del ADN, asociándolos con la aparición de muchas enfermedades crónicas, como diabetes, cánceres y aterosclerosis (Jayathilake, Rizliya y Liyanage, 2016).

Un compuesto antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar los radicales libres al inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas. Estudios recientes han informado que los antioxidantes naturales obtenidos a partir de plantas medicinales protegen de los efectos tóxicos y dañinos de los radicales libres y tienen una amplia gama de actividades biológicas, que incluyen actividad antimicrobiana, antimutagénica, antialérgica, antioxidante y actividad anticancerígena (Lobo *et al.*, 2010).

Según la literatura, existe una gran cantidad de plantas medicinales que contienen polifenoles como componente bioactivo que pueden usarse para el tratamiento de enfermedades en las que las EROs y los radicales libres juegan un papel importante (Patil, Kadam y Ghosh, 2009).

Los compuestos polifenólicos son metabolitos secundarios que se encuentran en numerosas especies de plantas medicinales y se informa que tienen múltiples funciones para contrarrestar los radicales libres y también inhiben diferentes tipos de enzimas oxidantes (Rezaeizadeh, Zuki y Abdollahi, 2011). De ahí que radica la importancia de su estudio, en plantas medicinales como potencial antioxidante.

El presente trabajo tuvo por objetivo cuantificar la cantidad de compuestos fenólicos totales, taninos totales a través del método Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante mediante el secuestro del radical 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•), de dos plantas

medicinales de uso tradicional en Paraguay; Tapekue (*Acanthospermum australe*) y Ñandypa (*Genipa americana* L.).

Materiales y Métodos

Material vegetal

Los materiales vegetales empleados fueron las hojas frescas de *Acanthospermum australe* y *Genipa americana* L., adquiridas en la zona de Cambyreta (27°35'S, 55°76'O).

Preparación de las plantas medicinales.

Las plantas medicinales de ñandypa (*Genipa americana* L.) y tapekue (*Acanthospermum australe*) fueron lavadas con abundante agua corriente para retirar restos de polvo, arena y piedra, luego se las dejaron secar al sol durante 4 horas. Finalmente se retiraron los tallos y las hojas secas, y las hojas verdes fueron apartadas para su posterior secado en estufa.

Secado y pulverización de las hojas secas

Las hojas fueron secadas en una estufa de secado (Digisystem Laboratory Instruments Inc) a 45°C, durante 72 horas, hasta obtener una humedad de aproximadamente 7 a 8%. Así las hojas secadas a la estufa, de ambas plantas, fueron pulverizadas utilizando un molinillo.

Preparación de los extractos acuosos y etanólicos de las plantas medicinales

Para la preparación de los extractos acuosos, se realizaron infusiones al 5% según la Farmacopea Nacional Argentina VI^o Edición (Codex Medicamentarius Argentino, 1982). Así, se pesaron 5 g de las hojas pulverizadas de cada planta medicinal, luego fueron transferidas a un vaso de precipitado donde se adicionaron 100 mL de agua destilada herviendo, dejándolo actuar durante 20 minutos. Posteriormente fueron filtrados con filtros de papel Whatman N°1, y el residuo se lavó con agua destilada hasta volumen final de 100 ml de extracto.

Los extractos etanólicos fueron preparados pesando 5 g de las hojas pulverizadas de cada muestra, luego en un erlenmeyer con tapa se adicionaron 100 mL del disolvente etanol 70%

(p/v). Las muestras fueron homogenizadas y agitadas en un agitador orbital (Numak) por 24 horas, a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Luego los extractos fueron filtrados con filtros de papel Whatman N°1, y el residuo se lavó con etanol 70% hasta volumen final de 100 ml de extracto.

Cuantificación de Compuestos Fenólicos Totales.

Para la determinación de compuestos fenólicos se utilizó el método de Folin-Ciocalteu siguiendo el procedimiento descrito por Azrul *et al.* (2014) con pequeñas modificaciones. Así, se adicionaron 50 µL extracto (a concentración de 3 mg/mL) y 50 µL de solución de Folin Ciocalteu, se incubó por 2 min, se añadió 50 µL de carbonato de sodio al 7,5% y se completó con agua destilada a un volumen final de 2 mL. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora en la oscuridad. Todas las muestras fueron realizadas por triplicado. Las concentraciones de fenoles totales fueron determinadas por interpolación de una recta de calibración, utilizando solución de ácido gálico en concentraciones de 5 a 25 µg/mL. Los resultados obtenidos fueron expresados en mg equivalente de ácido gálico por 100 g de hoja seca.

Determinación de Taninos Totales (TT)

La cuantificación de taninos totales (TT) se realizó siguiendo el método descrito por Galeano *et al.* (2017). Para ello, se empleó 1 mL de extracto y se adicionó 500 µL de solución de polivinil polipirrolidona (PVPP). Se incubó por 15 min a 10°C en oscuridad, se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y finalmente se midió la absorbancia del sobrenadante a 750 nm (Azrul *et al.*, 2014). Los TT se determinaron por diferencia, utilizando los resultados obtenidos en la determinación de compuestos fenólicos totales y los no taninos, ya que la cantidad de taninos totales se puede calcular restando la cantidad de no taninos a partir de la cantidad de fenoles totales. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados expresados en mg equivalente de ácido gálico por 100 g de hoja seca.

Determinación de la actividad antioxidante por el método de la capacidad captadora del radical DPPH•

La actividad antioxidante se determinó utilizando una adaptación de la técnica previamente descrita por Oliveira *et al.* (2009), con algunas modificaciones. Se utilizó solución metanólica del radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidracido (DPPH•) en 9 diluciones de cada extracto, desde 23,4 a 5000,0 µg/mL y diluciones convenientes de solución de BHT como referencia. Se realizó una mezcla para la reacción con 900 µL del DPPH• y 100 µL de cada dilución y se evaluó el porcentaje de inhibición (% I) por la disminución de absorbancia del DPPH• a 515 nm, a través de la siguiente fórmula;

$$\% I = [(Absorbancia \text{ con el blanco} - Absorbancia \text{ con la muestra}) / (Absorbancia \text{ con el blanco})] \times 100$$

Además, se calculó el IC50 (concentración de la muestra que captura el 50% de los radicales DPPH•) a los 30 min de reacción en la oscuridad, mediante un análisis de regresión del porcentaje de captación de DPPH• versus la concentración necesaria de los extractos, para inhibir la mitad de dicho radical.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron expresados en IC50 (µg/mL).

Análisis estadístico de los datos.

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos fue efectuado a través del software Microsoft Office Excel 2010® (Microsoft Corporation, Washington). En todos los test t elaborado se utilizó un nivel de significancia de 0,05, siendo que si $P < 0,05$ los resultados difieren significativamente.

Resultados y Discusión

Compuestos Fenólicos Totales

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Contenido de fenoles totales en extractos de ambas plantas.

Compuestos Fenólicos Totales (AGEmg/100 g de hoja seca)		
Planta	Extracto Acuoso	Extracto Etanólico
<i>Genipa americana</i> L.	169,89 ^{a, A} ± 29,97	369,10 ^{b, A} ± 68,51
<i>Acanthospermum australe</i>	314,01 ^{a, B} ± 39,26	1119,92 ^{b, B} ± 73,15

Medias con letras diferentes indican que existen diferencias significativas, de acuerdo con el test t ($p < 0,05$). "Letras minúsculas" corresponden al análisis de extractos de la misma especie (horizontal). Las "letras mayúsculas" corresponden al análisis del mismo extracto entre las dos especies (vertical).

Los resultados indican que la planta con mayor cantidad de compuestos fenólicos totales fue el *Acanthospermum australe*, tanto en el extracto acuoso como en el extracto etanólico, con valores de 314,01 y 1119,92 mg equivalente de ácido gálico/100g de hoja seca, respectivamente. En cuanto que los extractos de *Genipa americana* L. presentaron menores valores, 169,89 y 369,10 mg equivalente de ácido gálico/100 g de hoja seca, respectivamente. A través del análisis estadístico se observa una variación significativa en el contenido de compuestos fenólicos totales, tanto en los extractos acuosos y etanólicos de la misma planta, como en ambas plantas.

Galeano *et al.* (2017) estudiaron la actividad antioxidante de extractos acuosos de cuatro plantas medicinales de uso popular, determinando el contenido de compuestos fenólicos totales, de los cuales el extracto acuoso de ñandypa (*Genipa americana* L.) fue el que presentó la concentración más baja, por lo que coincide con el resultado obtenido en este estudio.

En cuanto a los extractos de tapekue (*Acanthospermum australe*) son escasos los estudios realizados sobre la cuantificación de compuestos fenólicos totales, pero existen trabajos que evidencian la presencia de flavonoides en los extractos hidroetanólicos de esta planta, tal como el realizado por Rocha-Martins *et al.* (2011). Los extractos etanólicos

de ambas muestras fueron superiores a la de los extractos acuosos evidenciando la importancia del solvente utilizado en la extracción de los polifenoles.

Taninos Totales (TT)

Tabla 2. Contenido de taninos totales en extractos de ambas plantas.

Taninos Totales (AGEmg/100 g de hoja seca)		
Planta	Extracto Acuoso	Extracto Etanólico
<i>Genipa americana</i> L.	53,59 ^a ± 39,22	149,78 ^b . ^A ± 47,66
<i>Acanthospermum australe</i>	n.q	525,48 ^B ± 56,04

n.q= no cuantificable.

Medias con letras diferentes indican que existen diferencias significativas, de acuerdo con el test t ($p < 0,05$). "Letras minúsculas" corresponden al análisis de extractos de la misma especie (horizontal). Las "letras mayúsculas" corresponden al análisis del mismo extracto entre las dos especies (vertical).

Los resultados obtenidos en la cuantificación de Taninos Totales (TT) demuestran la presencia de los mismos en el extracto acuoso y etanólico de *Genipa americana* L., con 53,59 y 149,78 mg equivalente de ácido gálico/100 g de hoja seca, respectivamente y, de acuerdo al test t ($p < 0,05$), existen diferencias significativas entre ambos extractos. Sin embargo, para el extracto acuoso de *Acanthospermum australe*, los taninos totales no fueron posibles de cuantificar, caso contrario al extracto etanólico que presentó una concentración de 525,48 mg equivalente de ácido gálico/100 g de hoja seca.

Los taninos son metabolitos secundarios de las plantas que se caracterizan por ser solubles en agua (Isaza, 2007), como así también en alcohol. Eso explicaría la presencia de los mismos en el extracto acuoso de *Genipa americana* L. Galeano *et al.* (2017) cuantificaron taninos totales en extractos acuosos de cuatro plantas medicinales de uso tradicional (kangorosa, carqueja, estevia y ñandypa) de las cuáles esta última presentó la menor cantidad de taninos totales de entre todas las demás.

No obstante, la no cuantificación en el extracto acuoso del *Acanthospermum australe* indicaría la presencia taninos en estado puro ya que éstos son insolubles en agua (Haslam, 1998). Caso contrario con el extracto etanólico que exhibió una cantidad considerable, evidenciando la afinidad de los taninos con el solvente (etanol 70).

Actividad antioxidante; capacidad captadora del radical DPPH•.

Tabla 3. Actividad antioxidante de los extractos de ambas plantas.

Actividad antiradicalaria (IC50, µg/mL)		
Planta	Extracto Acuoso	Extracto Etanólico
<i>Genipa americana</i> L.	275,24 ^a . ^A ± 15,27	294,11 ^a . ^A ± 84,56
<i>Acanthospermum australe</i>	174,59 ^a . ^B ± 5,81	37,32 ^b . ^B ± 0,08

>100µg/mL= Actividad antiradicalaria moderada a baja.

<100µg/mL= Actividad antiradicalaria elevada.

Medias con letras diferentes indican que existen diferencias significativas, de acuerdo con el test t ($p < 0,05$). "Letras minúsculas" corresponden al análisis de extractos de la misma especie (horizontal). Las "letras mayúsculas" corresponden al análisis del mismo extracto entre las dos especies (vertical).

De acuerdo con el análisis estadístico de los resultados de la tabla, los valores de IC50 (µg/mL) del extracto acuoso (275,24 µg/mL) y el extracto etanólico (294,11 µg/mL) de la planta de ñandypa (*Genipa americana* L.) no difieren significativamente. Esto indicaría que los compuestos fenólicos totales presentes en las muestras poseen actividad antiradicalaria moderada a baja (>100 µg/mL), además de que, como se refirió anteriormente, los extractos de ñandypa (*Genipa americana* L.) contienen menores cantidades de polifenoles y taninos totales, en relación a las muestras de tapekue (*Acanthospermum australe*), lo que reflejaría su baja actividad antioxidante. Galeano *et al.* (2017) determinaron la actividad antioxidante del extracto acuoso de ñandypa (*Genipa americana* L.), evidenciando menor potencial antioxidante, en comparación con otras plantas en estudio.

En relación a los extractos de tapekue (*Acanthospermum australe*) y de acuerdo con el test t ($p < 0,05$), tanto el extracto acuoso (174,59 $\mu\text{g/mL}$) como el extracto etanólico (37,32 $\mu\text{g/mL}$) presentan diferencias significativas, siendo el etanólico el que presentó una mayor actividad antiradicalaria ($< 100 \mu\text{g/mL}$), entretanto que el acuoso presentó una actividad antiradicalaria moderada ($> 100 \mu\text{g/mL}$).

Al comparar ambas muestras de plantas, una vez más se evidencia que el tapekue (*Acanthospermum australe*) es el que presenta mayor potencial antioxidante. Este resultado era de esperarse debido a que sus extractos presentaron mayor cantidad de fenoles totales y taninos totales en comparación con los extractos de *Genipa americana* L. Por lo tanto, según los resultados arrojados en este análisis, existe una correlación positiva entre la cantidad de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante de las plantas.

Conclusiones

Tanto los extractos de la planta de Ñandypa (*Genipa americana* L.) como la del Tapekue (*Acanthospermum australe*) poseen cantidades considerables de compuestos fenólicos totales y presentan actividad antioxidante. Las muestras de *Acanthospermum australe* presentaron mayor cantidad de compuestos fenólicos totales y mayor actividad antioxidante.

Referencias

Afanas'ev, I. (2010) "Signaling and damaging functions of free radicals in aging-free radical theory, hormesis, and TOR", *Aging Dis.*, 1(2), pp. 75–88.

Azrul, L. M. *et al.* (2014) "Tannins quantification in *Terminalia catappa* leaves extract and antihelminthic potential evaluation", *Journal of Natural Products*, 5(7), pp. 98–103.

De Almeida Barbosa, D. (2008). Avaliação Fitoquímica e Farmacológica de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) (Doctoral

dissertation, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro).

Galeano, M. *et al.* (2017) Actividad antioxidante de extractos acuosos de plantas medicinales de uso popular en la ciudad de Posadas, Misiones. Laboratorio Central. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM, pp. 200-203.

González de García, M., Brítez, L., González, Y., & Degen de Arrúa, R. (2011). Morfoanatomía comparativa de *genipa americana* L. (Rubiaceae) y *sorocea bonplandii* (Baill.) W. Burger, Lanj. & Wess. Boer (Moraceae) comercializadas en el mercado de San Lorenzo. *Rojasiana*, 93-101.

Harborne, J. (1980) "Plant phenolics", *Plant Physiology*, pp. 329–395.

Haslam, E. (1998) "Practical Polyphenolics, from structure to molecular recognition and physiological action", Cambridge University Press, UK.

Jayathilake, C., Rizliya, V. y Liyanage, R. (2016) "Antioxidant and free radical scavenging capacity of extensively used medicinal plants in Sri Lanka", *Italian Oral Surgery*. Elsevier Srl, 6(Icsusl 2015), pp. 123–126. doi: 10.1016/j.profoo.2016.02.028.

Lobo, V. *et al.* (2010) "Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health", *Pharmacogn Rev*, 4(8), pp. 118–126.

Martins, L. R. R., Mourão, K. S. M., Albiero, A. L. M., Cortez, D. A. G., Dias-Filho, B. P., & Nakamura, C. V. (2006). Estudo morfoanatômico preliminar do caule e da folha de *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze (Asteraceae-Heliantheae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(1), 42-52.

Oliveira, A. P. *et al.* (2009) "Ficus carica L.: Metabolic and biological screening", *Food and Chemical Toxicology*, 47, pp. 2841–2846.

Patil, S., Kadam, V. y Ghosh, R. (2009) "In vitro antioxidant activity of methanolic extract of stem bark of *Gmelina arborea* Roxb. (Verbenaceae)", *Intern. J Pharm Tech Res*, 1(4), pp. 1480–1494.

Rezaeizadeh, A., Zuki, A. B. y Abdollahi, M. (2011) “Determination of antioxidant activity in methanolic and chloroformic extracts of *Momordica Charantia*”, *Afr J Biotechnol*, 24, pp. 4932–4940.

Rocha-Martins, L. *et al.* (2011) “*In vitro* antiviral activity from *Acanthospermum australe* on herpesvirus and poliovirus”, *Pharmaceutical Biology*, 49(1), pp. 26–31.

Rodrigues, V. y Carbalho, D. (2001) “Levantamento etnobotânico de plantas medicinais do domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais”, *Ciencias Agrotec*, 25, pp. 102–123.