

Contenido de polifenoles en *Ligaria cuneifolia* y su relación con la capacidad antioxidante

Cecilia B. Dobrecky^{1*}, Ezequiel Moreno¹, Mariana Garcés², Silvia Lucangioli³, Rafael Ricco¹, Pablo Evelson², Marcelo L. Wagner¹

¹ Cátedra de Farmacobotánica, ²Cátedra de Química General e Inorgánica IBIMOL UBA-CONICET, ³Departamento de Tecnología Farmacéutica-CONICET. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956, CABA (1113) República Argentina.

* Autor a quien dirigir la correspondencia: lcdobrec@ffyb.uba.ar

Resumen

Ligaria cuneifolia (R et P.) Tiegh. (Loranthaceae) es una especie hemiparásita conocida vulgarmente con el nombre de “muérdago criollo”, “liga” o “liguilla”. Esta especie es utilizada popularmente como agente hipotensor y, debido a su similitud morfológica, constituye el sustituto natural del muérdago europeo (*Viscum álbium* L. –Viscaceae–). *L. cuneifolia*, al igual que las otras especies de la familia Loranthaceae, son ricas en flavonoides, especialmente flavonoles, compuestos que podrían ser determinantes de su acción biológica. El objetivo de este trabajo consiste en valorar el contenido de polifenoles en diferentes extractos y evaluar la relación de estos compuestos con la actividad antioxidante. Para ello, se procede a la cuantificación de fenoles totales, de ácidos hidroxicinámicos, flavonoides totales y de taninos condensados en las fracciones acetato de etilo, butanólica y acuosa. En estas mismas fracciones se realiza también la determinación de actividad antioxidante total hidrosoluble mediante el método de ABTS y la capacidad antioxidante total liposoluble mediante el método de DPPH. Los resultados obtenidos permiten suponer que, si bien la fracción butanólica presenta mayor capacidad antioxidante mediante el método de DPPH, asociado a un mayor contenido de taninos condensados de alto peso molecular, la fracción acetato de etilo presenta mayor contenido de polifenoles, que implica un significativo poder antioxidante liposoluble y mayor capacidad antioxidante mediante el método de ABTS.

Polyphenol Composition in *Ligaria cuneifolia* (Loranthaceae) and its Relationship with the Antioxidant Capacity

Summary

Ligaria cuneifolia (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae) is a hemiparasitic plant commonly known as “Argentinean mistletoe”, “liga” or “liguilla”. This plant is frequently used as a hypotensive agent and due to its morphological similarity, it is considered as the natural substitute for the European mistletoe (*Viscum álbium* L. –Viscaceae–). *L. cuneifolia*, as some other members of the Loranthaceae family, contains high levels of flavonoids, and especially flavonols, which may be responsible for its biological properties. The goal of the present study is

Palabras clave: capacidad antioxidante - *Ligaria cuneifolia* - flavonoides.

Key words: antioxidant capacity - *Ligaria cuneifolia* - flavonoids.

to evaluate the flavonoid content in different extracts and correlate this with the antioxidant capacity. For this purpose, the total phenol, hydroxycinnamic acid, total flavonoid, and condensed tannins contents are quantified in the butanolic, ethyl acetate and aqueous fractions of the extracts. The total hydrosoluble antioxidant capacity, the ABTS method, and the total liposoluble antioxidant capacity, the DPPH method, are performed on the same three fractions. Even though the butanolic fraction has the highest level of condensed tannins of high molecular weight, which explains the significant DPPH antioxidant capacity, the ethyl acetate fraction has the highest levels of total flavonoids, total phenol, and hydroxycinnamic acids which accounts for the predominant ABTS antioxidant capacity and a significant liposoluble antioxidant power.

Introducción

Ligaria cuneifolia (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae) es una especie hemiparásita vulgarmente conocida con el nombre de “muérdago criollo”, “liga” o “liguilla”. Es una especie sudamericana que se encuentra en Perú, Bolivia, Argentina, Chile, Brasil y Uruguay. En la Argentina presenta una gran dispersión; se extiende desde Salta y Jujuy, en el Norte, hasta La Pampa en el Sur, y desde Entre Ríos y al noreste de Buenos Aires hasta la precordillera andina (Varela y col., 2001).

Son plantas hemiparásitas que se desarrollan sobre vástagos leñosos, dependen del hospedante para vivir, de donde obtienen el agua y los nutrientes minerales; son organismos fotosintetizadores ya que producen sus propios carbohidratos.

Por su condición de hemiparásitas, en general están desprovistas de raíces; al germinar la semilla da lugar a un disco de adhesión en el hipocótilo que le permite aferrarse a la superficie de las ramas y de los tallos del hospedante. Luego generan un cono de penetración que crece entre los tejidos hasta llegar al xilema por donde circulan el agua y las sales (Abbiatti, 1946; Becker, 1986; Luther y col., 1987).

Esta especie es utilizada popularmente como agente hipotensor y, debido a su similitud morfológica, constituye el sustituto natural del muérdago europeo (*Viscum album* L. –Viscaceae–). *L. cuneifolia*, al igual que las otras especies de la familia Loranthaceae, son ricas en flavonoides, especialmente flavonoles, compuestos que podrían ser determinantes de su acción biológica. Debido a su utilización tradicional y a sus compuestos activos, *L. cuneifolia* también ha sido considerada para el tratamiento de

ciertos desórdenes en los que el estrés oxidativo es la principal causa involucrada en el mecanismo de la enfermedad.

El estrés oxidativo puede ser definido como el incremento que se produce, por encima de los valores fisiológicos, en las concentraciones en el estado estacionario intracelular de las especies reactivas del oxígeno, como anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), y oxígeno singulete (1O_2). Esta situación conduce a cambios en los niveles de las defensas antioxidantes que pueden incrementarse como una respuesta protectora, o disminuir, debido a su acción como antioxidantes (Sies, 1985).

Los compuestos antioxidantes encontrados en los extractos pueden disminuir la ocurrencia del estrés oxidativo por varios mecanismos que incluyen el atrapamiento de los radicales libres, la inhibición de los procesos de peroxidación lipídica y la capacidad de actuar como quelantes de metales (Dasgupta y De, 2007); estos mecanismos constituyen los fundamentos moleculares para las acciones farmacológicas descriptas.

Las propiedades químicas de los polifenoles, en términos de la habilidad de los hidrógenos fenólicos como atrapadores de radicales libres, sugiere su capacidad antioxidante. Borneo y col. (2009) realizaron un *screening* de la capacidad antioxidante entre distintas especies que crecen en la provincia de Córdoba, entre las cuales se encuentra *L. cuneifolia*. Esta especie presentó altos valores de capacidad antioxidante, resultados que concuerdan con los datos obtenidos en este trabajo.

El objetivo de este trabajo consiste en valorar el contenido de polifenoles en diferentes extractos de *L. cuneifolia*, y evaluar la relación de estos compuestos con la actividad antioxidante.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se emplearon ejemplares recolectados en Barreal, departamento de Calingasta, provincia de San Juan (1.478 ms.n.m. 31°28'S 69°25' O).

Hospedante: *Prosopis flexuosa* D.C. y *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz emend. Burkart (Fabaceae, subf. Mimosoidea).

Los ejemplares se identificaron por medio de claves adecuadas y la comparación con material de herbario. Un ejemplar fue depositado en el herbario del Museo de Farmacobotánica "Juan A. Domínguez" (BAF).

Preparación de las fracciones

Las hojas y los tallos herbáceos (20 g de cada uno) fueron molidos en un molinillo de cuchillas rotativas, a un tamaño de partículas no mayor a 5 mm.

Se realizó una limpieza del material para eliminar grasas y clorofilas con hexano y diclorometano. Luego, el material fue sometido a extracciones sucesivas con mezclas de metanol-agua (100 %, 80 % y 50 %), en un agitador orbital (150 rpm) durante 24 horas, a temperatura ambiente.

Se eliminó el solvente orgánico mediante el empleo de un evaporador rotatorio; los residuos acuosos obtenidos se mezclaron y posteriormente, se realizaron particiones con acetato de etilo y butanol. Se obtuvieron así 3 fracciones para su estudio posterior: acetato de etilo, butanol y acuosa. Los rendimientos de cada fracción fueron: 30 %, 15 % y 25 % (m/m), respectivamente.

Contenido de polifenoles

Se determinó el contenido de fenoles totales de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu (Makkar

y col., 1993); taninos condensados, mediante la reacción de la proantocianidina (Waterman y Mole, 1994); flavonoides totales, de acuerdo con la técnica de Maksimovic y col. (2005); ácidos hidroxicinámicos totales mediante una modificación de la metodología descripta por Dao y Friedman (1992).

Capacidad antioxidante in vitro

Se evaluó la capacidad antioxidante de las fracciones mediante los ensayos de ABTS (Campos y Lissi, 1997) y DPPH (Sánchez-Moreno y col., 1998). Los resultados fueron expresados como μmol de trolox por g de fracción.

Las concentraciones de trolox utilizadas para la curva de calibración fueron de 6,65; 13,3 y 19,95 μM .

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como valor medio \pm DS y representan el promedio de 4 determinaciones. Para el análisis de los resultados se utilizó ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey. La significancia estadística se considera en $p < 0,05$. Los cálculos estadísticos se realizan con el programa InfoStat, versión 2014 (Di Rienzo y col., 2014).

Resultados

A continuación se presentan los resultados obtenidos para la cuantificación de polifenoles y la determinación de capacidad antioxidante mediante los métodos de ABTS y DPPH.

Los mayores valores de polifenoles totales fueron obtenidos en las fracciones butanólica y acetato de etilo (Tabla 1).

Tabla 1.- Cuantificación de polifenoles de las fracciones de *L. cuneifolia*

| Fracción | Fla | Tan | Fen | Ác. Hid. |
|------------------|----------------|-----------------|-------------------|----------------|
| Acuosa | 0,3 \pm 0,3 | 0,15 \pm 0,03 | 417,3 \pm 130,0 | 4,8 \pm 3,4 |
| Butanólica | 14,3 \pm 3,0 | 0,74 \pm 0,03 | 624,0 \pm 78,9 | 7,0 \pm 2,5 |
| Acetato de etilo | 90,7 \pm 8,5 | 0,49 \pm 0,04 | 796,9 \pm 122,2 | 23,7 \pm 2,2 |

Fla: flavonoides totales (mg rutina/g fracción); **Tan:** taninos condensados (Abs 550 nm/g fracción); **Fen:** fenoles totales (mg de ácido tánico/g fracción); **Ác. Hid.:** ácidos hidroxicinámicos totales (mg ácido clorogénico/g fracción). Resultados expresados como media \pm DS.

La fracción acetato de etilo presentó los valores más altos de flavonoides totales, fenoles totales y ácidos hidroxycinámicos totales. La fracción butanólica presentó la mayor concentración de taninos condensados.

A partir del análisis estadístico de los valores obtenidos se observaron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales, flavonoides totales, taninos condensados y ácidos hidroxycinámicos totales, entre las diferentes fracciones analizadas (Tabla 1).

En cuanto a la actividad antioxidante, la fracción acetato de etilo presentó mayor actividad con el método de ABTS, mientras que la fracción butanólica con el método del DPPH (Tabla 2). En todos los casos, el análisis estadístico demuestra diferencias significativas en los resultados obtenidos.

Tabla 2.- Actividad antioxidante de las fracciones de *L. cuneifolia*

| Fracción | Capacidad antioxidante ($\mu\text{mol trolox/g}$ fracción) | |
|------------------|--|----------------|
| | DPPH | ABTS |
| Acuosa | 16 \pm 4 | 1215 \pm 79 |
| Butanólica | 62 \pm 6 | 5604 \pm 60 |
| Acetato de etilo | 45 \pm 7 | 10230 \pm 48 |

Resultados expresados como media \pm DS.

Discusión y conclusiones

Los resultados obtenidos indican que las fracciones presentan diferencias significativas entre sí para cada una de las determinaciones realizadas.

La fracción acuosa presentó el menor contenido de todos los metabolitos analizados, y resultó ser la fracción con la menor actividad antioxidante.

La fracción butanólica presentó el mayor contenido de taninos condensados, que otorga mayor capacidad antioxidante liposoluble, determinada mediante el método de DPPH.

La fracción acetato de etilo presentó el mayor contenido de flavonoides totales, ácidos hidroxycinámicos y fenoles totales, y un notable aporte de taninos condensados, que se correlaciona con la mayor capacidad antioxidante determinada mediante el método de ABTS.

Agradecimientos

Proyecto UBA 20020130100641BA y al Sr. Mauricio Ferrés, de *Platarío S.A.*

Referencias bibliográficas

- Abbiatti D. (1946). "Las Lorantáceas Argentinas". *Rev. Museo La Plata* 7: 1-110.
- Becker, H. (1986). "Botany of European Mistletoe (*Viscum album* L.)". *Oncology* 43 (supl. 1): 2-7.
- Borneo, R.; León, A.E.; Aguirre, A.; Ribotta, P.; Cantero, J.J. (2009). "Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system". *Food Chem.* 112: 664-670.
- Campos, A.M.; Lissi, E.A. (1997). "Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols". *Int. J. Chem. Kinet.* 29: 219-224.
- Dao, L.; Friedman, M. (1992). "Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry". *J. Agric. Food Chem.* 40: 2152-2156.
- Dasgupta, N; De, B. (2007). "Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study". *Food Chem.* 101: 471-474.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. *InfoStat* versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. En línea <<http://www.infostat.com.ar>> [Consulta: Junio 2014].
- Luther, P.; Becker, H. (1987). "Parasitische Phase". *Die Mistel: Botanik, Lektine, Medizinische Anwendung*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York: 27-35.
- Makkar, H.P.S.; Bluemmel, M.; Borowy, N.K.; Becker, K. (1993). "Gravimetric determination

- of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods". *J. Sci. Food Agric.* 61: 161-165.
- Maksimovic, Z.; Malencic, D.; Covacevic, N. (2005). "Polyphenol contents and antioxidant activity of *Mayadis stigma* extracts". *Biores Tech* 96: 873-87.
- Sánchez-Moreno, C.; Larrauri, J.; Saura-Calixto, F. (1998). "A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols". *J. Sci. Food Agric.* 76(2): 270-276.
- Sies H. (1985). "Oxidative stress: Introductory remarks". In: *Oxidative stress*, Sies H. (Ed.). Academic Press: San Diego: 1-7.
- Varela, B.; Fernández, T.; Taira, C.; Cerdá Zolezzi, P.; Ricco R.; Caldas López E.; Álvarez E., Gurni A.; Hajos S.; Wagner M. (2001). El "muérdago criollo", *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. –Loranthaceae– Desde el uso popular hacia el estudio de los efectos farmacológicos. *Dominguezia* 17(1): 31-50.
- Waterman, P.G.; Mole, S. (1994). "Analysis of phenolic plant metabolites. Methods in ecology". Blackwell Scientific Publications. London: 80.