

INHIBICIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA POR COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN HORTALIZAS

Isis Páez-Cartaya*¹ y José L. Rodríguez-Sánchez²

¹Grupo Empresarial LABIOFAM. Avenida Independencia, km 16 ½, C.P. 10800, La Habana, Cuba.

²Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Carr. al Guatao, km 3 ½, CP 19200, La Habana, Cuba.

E-mail: esp23.desarrollo@labiofam.co.cu

RESUMEN

Se evaluó el efecto protector de los polifenoles en quimbombó, acelga, cebolla blanca, lechuga y berenjena, en la oxidación *in vitro* del sistema modelo yema de huevo. De cada vegetal se cuantificó el contenido de polifenoles y se evaluó a diferentes concentraciones de estos la oxidación de los lípidos. Se calculó la inhibición de cada extracto y se estimó el parámetro CI_{50} (concentración de fenoles que inhibe el 50 % de la oxidación). Las CI_{50} halladas fueron: 8,6 (lechuga); 15,8 (berenjena); 29,9 (cebolla blanca); 32,9 (quimbombó) y 37,9 (acelga). Estos resultados permiten concluir que la lechuga y la berenjena tienen los polifenoles de mejor calidad antioxidante.

Palabras clave: hortalizas, polifenoles, oxidación *in vitro*, lípidos.

ABSTRACT

Inhibition of lipid peroxidation by phenolic compounds present in vegetables

The protective effect of polyphenols on okra, chard, white onion, lettuce and eggplant was evaluated in the *in vitro* oxidation of the egg yolk model system. From each plant, the polyphenol content was quantified and the oxidation of the lipids was evaluated at different concentrations. Inhibition of each extract was calculated and the IC_{50} parameter (phenol concentration inhibiting 50 % of the oxidation) was estimated. The IC_{50} found were: 8,6 (lettuce); 15,8 (eggplant); 29,9 (white onion); 32,9 (okra) and 37,9 (chard). These results allow concluding that lettuce and eggplant have the best antioxidant quality polyphenols.

Keywords: vegetables, phenolic compounds, *in vitro* oxidation, lipids.

INTRODUCCIÓN

El balance negativo entre la generación de radicales libres y las defensas antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, el cual está asociado a numerosas enfermedades (alteración cardiovascular, iniciación de procesos cancerosos, formación de cataratas) y al proceso normal de envejecimiento (1).

En general, los radicales libres pueden reaccionar con cualquier molécula orgánica, pero son los lípidos los puntos de acción con mayor trascendencia fisiopatológica, originando la peroxidación lipídica (2). La peroxidación lipídica ocurre en el cuerpo como resultado de la oxidación de ácidos grasos insaturados (3). En condiciones de estrés oxidativo, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son susceptibles a sufrir modificaciones oxidativas, lo cual les confiere mayor poder aterogénico (4).

***Isis Paez Cartaya:** Licenciada en Ciencias Alimentarias (IFAL, 2015). Labora en la Unidad de Desarrollo e Innovación del Grupo Empresarial Labiofam. Sus principales líneas de trabajo son la tecnología del yogur y la formulación de aromas y colorantes naturales a partir de la extracción de compuestos bioactivos de las plantas.

Las enfermedades cardiovasculares constituyen actualmente una causa frecuente de discapacidad y muerte prematura en el mundo. En este sentido nuestro país no constituye una excepción, pues han sido la principal causa de defunción desde 1970 (5). Estudios epidemiológicos han mostrado que dietas ricas en alimentos vegetales reducen de forma significativa la incidencia y tasas de mortalidad de enfermedades degenerativas causadas por el estrés oxidativo (6). Este efecto protector ha sido atribuido principalmente a los compuestos fenólicos (7).

La mayoría de los países, incluida Cuba, ha concebido recomendaciones nutricionales para la población encaminadas al incremento del consumo de frutas y hortalizas frescas, pero no especifican cuáles son las más adecuadas según el estado de salud (8).

Muchos sustratos y sistemas de reacción han sido usados para el estudio de la peroxidación lipídica y su inhibición por los antioxidantes. La mayoría de los estudios publicados evalúan el efecto protector de las frutas (9), frutos secos (10) y otros tipos de alimentos individuales (vino tinto, aceite de oliva, chocolate, té), sobre la susceptibilidad a la oxidación *in vitro* de las LDL.

En cambio, en la literatura consultada son pocos los artículos que abordan la inhibición de la peroxidación lipídica por compuestos fenólicos presentes en hortalizas (11, 12), lo cual evidencia que son escasos los conocimientos que aún se poseen sobre el papel protector de este tipo de alimentos.

Por tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el poder de inhibición de la peroxidación lipídica de un sistema biológico complejo (yema de huevo) por compuestos fenólicos presentes en las hortalizas quimbombó, acelga, cebolla blanca, lechuga y berenjena.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las hortalizas quimbombó (*Abelmoschus esculentus* L.), acelga (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*), cebolla blanca (*Allium cepa* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.) y berenjena (*Solanum melongena* L.), fueron adquiridas en mercados agropecuarios de las provincias Mayabeque y La Habana.

La porción comestible fue homogeneizada entre 5 000 y 10 000 min⁻¹ durante 5 a 10 s, según la consistencia de cada vegetal. De cada muestra se pesaron 5 g y se mezclaron con 25 mL de etanol 50 %. Se realizó la extracción mecánica de los compuestos fenólicos a temperatura ambiente durante 90 s a 10 000 min⁻¹ con un homogeneizador de alta velocidad Ultra-Turrax T25. Los extractos alcohólicos, cada uno realizado por duplicado, se centrifugaron a 3 000 min⁻¹ por 10 min. Se tomó una alícuota del sobrenadante para la determinación del contenido de fenoles según el método de Folin-Ciocalteu (13) con ligeras modificaciones: a 50 µL de cada extracto se adicionaron 2,5 mL de solución diluida de Folin-Ciocalteu (1+9 H₂O) y luego de 5 min se añadieron 2 mL de Na₂CO₃ 7,5 %. Se dejó en reposo durante 2 h y se leyó la absorbancia a 765 nm. Previamente se realizó la curva de calibración con ácido gálico en un intervalo de concentraciones de 100 a 500 mg/L.

La determinación de la inhibición de la oxidación lipídica *in vitro* de la yema de huevo por compuestos fenólicos se realizó según metodología propuesta con ligeras modificaciones (12).

Las yemas de tres huevos frescos se mezclaron usando el homogeneizador de alta velocidad y se preparó una dispersión de yema en agua al 10 % (m/v), como sistema modelo complejo para realizar la peroxidación lipídica. Para los ensayos, se tomó una alícuota de 200 µL de la dispersión de yema y se le añadieron concentraciones crecientes de los extractos fenólicos de las hortalizas (20, 40 y 60 µM). El volumen final del sistema de reacción fue 1 mL, completando con agua desionizada. La oxidación fue iniciada por el AAPH [2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidrocloruro] (100 µL, 3 mM). Paralelamente se realizó la oxidación del sistema con yema de huevo, pero sin la adición de extracto fenólico, como referencia para estimar la inhibición. Todos los recipientes se taparon y pusieron en baño de agua a 37 °C por 4 h.

Los productos de la oxidación se determinaron por el método del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) con ligeras modificaciones (14). A cada tubo de centrifuga se añadió 1 mL de ácido tricloroacético 10 % (m/v) y 1 mL de TBA 0,28 % (m/v), se calentaron a 95 °C durante 30 min. Se enfriaron a 10 °C por 10 min, se adicionaron 5 mL de 1-butanol y agitaron durante 5 min para

lograr el paso de los productos de oxidación hacia la fase de butanol. Se centrifugaron a 4 000 min⁻¹ por 5 min y se midió la absorbancia a 532 nm de la fase orgánica.

La inhibición para cada concentración de fenoles ensayada se determinó por la fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 - (\text{Abs}_2/\text{Abs}_1 \times 100)$$

Donde: Abs₁ es la absorbancia del control (yema sin adición de extracto) y Abs₂ es la absorbancia de la yema con la adición de extracto.

Con dichos datos se realizó el análisis de regresión lineal para obtener el modelo inhibición vs. concentración de fenoles y se estimó la concentración de fenoles que inhibe el 50 % de la oxidación (CI₅₀). Este índice constituye un indicador de la calidad antioxidante de los fenoles en las hortalizas. Para los cálculos se empleó el programa Statistica ver. 8 (StatSoft, Inc. 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 presenta los contenidos de fenoles totales de cada hortaliza analizada. Los resultados muestran que el quimbombó y la lechuga son aquellas con mayor concentración de fenoles, seguidas de la acelga, y con concentraciones similares aunque menores, están la cebolla blanca y berenjena.

La principal dificultad para la comparación de los resultados es que la mayor parte de los artículos informan los contenidos de fenoles en equivalentes de catequina, ácido cafeico, ácido tánico, etc.; en lugar de equivalentes de ácido gálico recomendado como estándar de referencia (15).

En un estudio sobre la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica de alimentos de amplio consumo en los EE.UU. se informó el contenido de fenoles de tres de

las hortalizas analizadas: lechuga, cebolla y berenjena. Respecto a la lechuga se informó como intervalo de concentración 50 a 131 mg/100 g, que incluye el valor hallado en esta investigación (106,9 mg/100 g). En cuanto a la cebolla y la berenjena, los valores hallados fueron inferiores a los reportados por este estudio: 36,7 vs. 74 mg/100 g y 33,7 vs. 252 mg/100 g, respectivamente. Estas diferencias pueden ser interpretadas en función de la polaridad de los compuestos fenólicos. En esta investigación se empleó como disolvente de extracción la mezcla etanol-agua (1:1) que favorece la disolución de la fracción más polar, en cambio, el sistema utilizado por el estudio fue la combinación de la mezcla hexano/diclorometano (1:1), que propicia la extracción de fenoles de baja polaridad y la mezcla acetona/agua/ácido acético (70,0:29,5:0,5), que extrae aquellos de mayor polaridad (16).

Por otra parte, en un estudio comparativo de las propiedades antioxidantes de diferentes vegetales se informó para la berenjena un contenido promedio de 102,9 mg/100 g, valor superior al hallado en esta investigación, probablemente por el empleo de la mezcla acetona/agua/ácido fórmico (80,0:19,8:0,2) como disolvente (17).

Para la acelga se ha informado un contenido de fenoles de 830 mg/100 g, valor muy superior al hallado (63,7 mg/100 g). Este valor es controvertido pues está muy distante del determinado por cromatografía líquida (101,5 mg/100 g) por dichos autores e igualmente ocurre si se compara con otras fuentes reconocidas de fenoles como las frutas (18).

En resumen, se observa una gran variabilidad entre los resultados publicados. Esto se debe a diversos factores que incluyen desde los biológicos (variedad, grado de madurez) y ambientales (condiciones de cultivo, época del año, manipulación), hasta la carencia de un método analítico estandarizado, pues la metodología

Tabla 1. Contenido de fenoles totales de las hortalizas analizadas

Hortaliza	Concentración de fenoles ^a (mg/100 g)
Quimbombó	119,5 (8,7)
Lechuga	106,9 (6,8)
Acelga	63,7 (3,3)
Cebolla blanca	36,7 (2,1)
Berenjena	33,7 (1,8)

^a expresada en ácido gálico base fresca

de Folin-Ciocalteu varía de un estudio a otro en cuanto a las condiciones de reacción (empleo de temperatura, concentración de carbonato de sodio, patrón de referencia, tiempo de reacción) (19).

Algunos autores plantean que la comparación de la calidad antioxidante a una concentración fija de fenoles no es confiable y proponen el empleo del parámetro CI_{50} (14). Serán mejores aquellos que tienen un CI_{50} menor, pues se requerirá una concentración menor de fenoles para lograr el 50 % de la inhibición de la oxidación (11).

La Fig. 1 muestra los valores de CI_{50} de las hortalizas estudiadas. Se observa que estas se dividen en dos grupos: lechuga y berenjena como las hortalizas de mejor calidad antioxidante por tener los CI_{50} menores, y cebolla blanca, quimbombó y acelga, de inferior calidad de fenoles frente a la inhibición de la oxidación.

La mayoría de los artículos publicados acerca de la inhibición de la oxidación de matrices lipídicas por compuestos fenólicos utilizan el parámetro CI_{50} , pero no es válido comparar estos valores entre sí por las razones siguientes:

a) La multiplicidad de sustratos empleados que van desde sistemas simples constituidos por ácidos grasos insaturados puros (20), matrices de complejidad media como las LDL aisladas del plasma (21), hasta los de mayor complejidad como la yema de huevo (12), tienen una influencia importante en los resultados obtenidos.

b) Con un mismo sustrato, las concentraciones empleadas varían de un estudio a otro; y el efecto inhibitor es dependiente de la concentración de sustrato oxidable. Por ejemplo, las LDL han sido empleadas a distintas concentraciones: 50 $\mu\text{g/mL}$ (12), 70 $\mu\text{g/mL}$ (14) y 150 $\mu\text{g/mL}$ (21).

De acuerdo con la bibliografía se han reportado valores de CI_{50} en diferentes sustratos lipídicos para las hortalizas cebolla blanca, lechuga (11), berenjena y quimbombó (12), pero no se encontraron datos acerca de la acelga.

La posible explicación de los resultados del presente trabajo en cuanto a la calidad antioxidante de los fenoles de las hortalizas, debe estar vinculada con la composición cualitativa y cuantitativa de los fenoles presentes en estas, pero la información consultada sobre el perfil fenólico de estos vegetales en las bases de datos Phenol-Explorer (22) y flavonoides (23) fue insuficiente.

CONCLUSIONES

De las cinco hortalizas estudiadas, el quimbombó y la lechuga fueron las de mayor concentración de fenoles, con valores de dos a tres veces superiores respecto a las restantes hortalizas analizadas. Todos los extractos de las hortalizas presentaron un poder de inhibición frente a la peroxidación lipídica en el sistema modelo seleccionado, siendo la berenjena y la lechuga las que exhibieron la mejor calidad antioxidante de las cinco estudiadas.

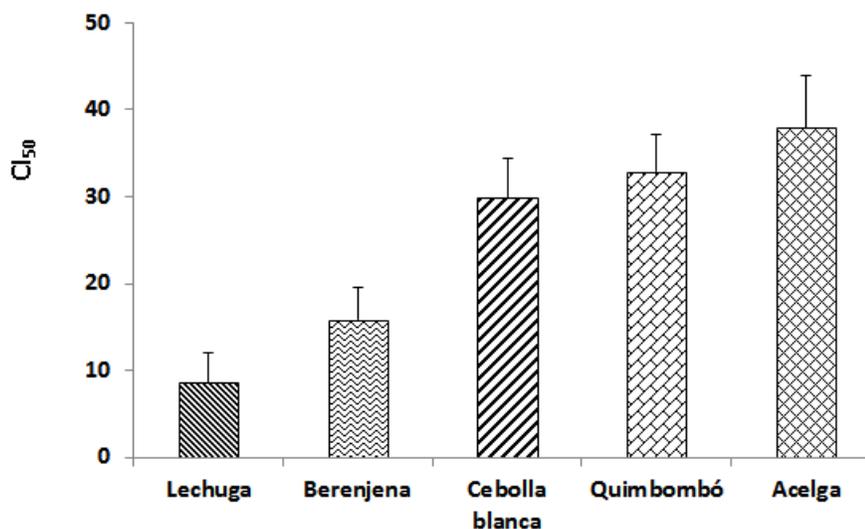


Fig. 1. Comparación *in vitro* de la efectividad antioxidante de los compuestos fenólicos de las hortalizas estudiadas.

REFERENCIAS

1. Sies, H. Oxidative stress: Introduction. En: *Oxidative stress. Oxidant and antioxidants*, H. Sies (Ed.). San Diego, CA., Academic Press, 1991, pp. 15-22.
2. Slater, T. F. *Biochem. Soc. Trans.* 10:70-75, 1982.
3. Gutteridge, J. M. *Clin. Chem.* 41:1819-1828, 1995.
4. Soma, M. R.; Batuta, R. y Crosignani, P. *Curr. Opin. Lipidology* 8:229-235, 1997.
5. Orduñez, P. O.; Cooper, R. S.; Espinosa, A. D.; Iraola, M. D.; Bernal, J. L. y La Rosa, Y. *Rev. Cub. Salud Pública* 31:1-22, 2005.
6. Tibble, D. L. *Am. J. Clin. Nutr.* 68:521-522, 1998.
7. Lampe, J. W. *Am. J. Clin. Nutr.* 70:475S-490S, 1999.
8. OMS. *Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas: informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2003.
9. Aviram, M.; Volkova, N.; Coleman, R.; Dreher, M.; Kesava, M.; Ferreira, D. y Rosenblat, M. J. *Agric. Food Chem.* 56:1148-1157, 2008.
10. Vinson, J. A.; Zubik, L.; Bose, P.; Samman, N. y Proch, J. J. *Am. Coll. Nutr.* 24:44-50, 2005.
11. Vinson, J. A.; Hao, Y.; Su, X. y Zubik, L. J. *Agric. Food Chem.* 46:3630-3634, 1998.
12. Salawu, S. O.; Akindahunsi, A. A.; Ibukun, E. O. y Duodu, K. G. *Int. J. Med. Plants Res.* 2:190-197, 2013.
13. Slinkard, K. y Singleton, V. L. *Am. J. Enol. Vitic.* 28:49-55, 1977.
14. Vinson, J. A.; Proch, J. y Bose, P. *Methods Enzymol.* 335:103-114, 2001.
15. Prior, R. L.; Wu, X. y Schaich, K. J. *Agric. Food Chem.* 53:4290-4302, 2005.
16. Wu, X.; Beecher, G. R.; Holden, J. M.; Haytowitz, D. B.; Gebhardt, S. E. y Prior, R. L. *J. Agric. Food Chem.* 52:4026-4037, 2004.
17. Éíz, M.; Éízová, H.; Denev, P.; Kratchanovab, M.; Slavov, A. y Lojek, A. *Food Control* 21:518-523, 2010.
18. Pyo, Y-H.; Lee, T-C.; Logendra, L. y Rosen, R. T. *Food Chem.* 85:19-26, 2004.
19. Singleton, V. L.; Orthofer, R. y Lamuela-Raventós, R. M. *Methods Enzymol.* 299:152-178, 1999.
20. Kaur, C. y Kapoor, H. C. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37:153-161, 2002.
21. Ahmadvand, H.; Khosrowbeygi, A. y Ghasemi, M. J. *Medicinal Plants Res.* 5:1012-1017, 2011.
22. Neveu, V.; Pérez-Jiménez, J.; Vos, F.; Crespy, V.; Du Chaffaut, L.; Mennen, L.; Knox, C.; Eisner, R.; Cruz, J.; Wishart, D. y Scalbert, A. *Phenol-explorer: an on line comprehensive database on polyphenol contents in foods* [en línea]. Consultado 18 junio 2016 en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2860900/>
23. Bhagwat, S.; Haytowitz, D. B. y Holden, J. M. *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. Release 3.1. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory* [en línea]. Consultado 14 mayo 2015 en <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/ flav>