

**CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES Y CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE DIFERENTE GRADO ALCOHÓLICO
DEL TUBÉRCULO DE *Solanum tuberosum* var. mano de oso**

**Quantification of total polyphenols and antioxidant capacity from different alcoholic
extracts of *Solanum tuberosum* var. mano de oso tubers**

Segundo Ruiz Reyes^{1*}, Edmundo Venegas Casanova¹, David Ruidias Romero¹, Kevin Cosavalente Burgos², Kenjo Vásquez Villacampa², Vilma Guardia Casas².

Recibido: 02 de agosto 2014; Aceptado: 18 de diciembre 2014

RESUMEN

Objetivo: Cuantificar los polifenoles totales presentes en los extractos de diferente grado alcohólico del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. mano de oso y valorar la capacidad antioxidante en función al porcentaje de captura del radical libre (DDPH'). **Material y Métodos:** Se prepararon los extractos hidroetanólicos al 5% utilizando etanol de (30, 50, 70 y 96°GL). El tubérculo previamente pelado, cortado y secado a temperatura ambiente por 24hs y a estufa a 40°C por 72h, se pulverizó y pesó en masa equivalente a 5g llevándolo posteriormente a reflujo y agitación magnética con 100 ml de menstruo. El extracto se filtró al vacío hasta dejarlo libre de sólidos en suspensión y finalmente se aforó a 100ml. El contenido de polifenoles totales se calculó por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu y el patrón ácido tánico. Para medir la capacidad antioxidante se utilizó el 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH'), cuyas lecturas espectrofotométricas se realizaron a 517 nm. **Resultados:** El porcentaje de polifenoles totales expresados en ácido tánico en los extractos (E1-E4) fue de 1,08; 1,48; 1,68 y 2,03 % y su porcentaje de captura de radicales libres de DPPH' fue de 11,25; 15,5; 18,75 y 20,25 % respectivamente. **Conclusión:** Se encontró correlación lineal entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante expresada en porcentaje de captura del radical libre DPPH'.

Palabras Clave: *Solanum tuberosum* var. mano de oso; capacidad antioxidante; polifenoles; DPPH'.

ABSTRACT

Objectives: To quantify total polyphenols present in extracts of different alcoholic degree from *Solanum tuberosum* var. mano de oso and assess the antioxidant capacity according to the rate of capture of free radical (DDPH*). **Material and Methods:** Hydroethanol extracts using 5% ethanol (30, 50, 70 and 96°GL) were prepared. The previously peeled tuber, cut and dried at room temperature for 24h and 40 ° C oven for 72 hours, was pulverized and weighed a 5g equivalent mass and subsequently bringing it to reflux with magnetic stirring 100 ml of menses. The extract was vacuum filtered until free of suspended solids and finally was completed to 100 ml. The total polyphenol content was estimated by spectrophotometry, based on a colorimetric oxidation-reduction reaction. The oxidizing agent used was the Folin-Ciocalteu reagent and tannic acid pattern. To measure the antioxidant capacity was used 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), the spectrophotometric readings were taken at 517 nm. **Results:** The percentage of total polyphenols expressed in tannic acid in the extracts (E1-E4) was 1.08;

¹ Docente Cátedra Farmacognosia.Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo – Perú.

² Alumno de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.Universidad Nacional de Trujillo – Perú.

*Autor para correspondencia: guille_ruiz2012@hotmail.com

1.48; 1.68 and 2.03% and the rate of capture of free radical DPPH• were 11.25; 15.5; 18.75 and 20.25% respectively. It was concluded that a linear correlation between total polyphenol content and antioxidant capacity in percent capture of free radical DPPH • was found.

Key words: *Solanum tuberosum* var. mano de oso, antioxidant capacity, polyphenol and DPPH•.

INTRODUCCIÓN

Las verduras son ricas en flavonoides y otros pigmentos. El aumento del consumo de hortalizas, tubérculos y legumbres ha sido ampliamente promovido por los beneficios de muchos fitoconstituyentes asociados con el mantenimiento de la salud y prevención de enfermedades crónicas y cáncer. Numerosos grupos de fitocompuestos en verduras como el beta-caroteno, ascorbato, alfa-tocoferol, flavonoles, y los polifenoles en general son reconocidos por su actividad antioxidante. Entre los diversos vegetales, los compuestos fenólicos son compuestos ubicuos que se encuentran en todas las plantas como sustancias provenientes del metabolismo secundario de las plantas. Algunas especies endémicas son de particular interés, ya que pueden ser utilizados para la producción de materias primas o de preparados que contengan la mayor cantidad de compuestos con propiedades antioxidantes y consecuentemente beneficiosas para la salud humana^{1,2}.

A medida que nuestra comprensión del papel de los radicales libres en las enfermedades humanas se ha profundizado, los antioxidantes han atraído mayor interés debido a su papel en la inhibición de las reacciones de radicales libres y su ayuda en la protección del cuerpo humano frente a los daños causados por las especies reactivas del oxígeno (ROS). Los principales tipos de antioxidantes naturales son flavonoides y dentro de este grupo las antocianinas, que se encuentran difundidas en los frutos de especies vegetales como *Vitis vinifera*, *Solanum melanogena*, *Zea maíz* L, *Myrcianthes oreophila*,³ y en órganos subterráneos, como los tubérculos de *Ipomoea batatas* y *Solanum tuberosum* var. **mano de oso**.

Es de sumo interés al momento de tratar de estandarizar una técnica de extracción de un metabolito secundario procedente de una fuente vegetal, crear las condiciones óptimas que garanticen su mayor porcentaje de extracción. Conociendo que los compuestos fenólicos y las antocianinas específicamente son solubles en solventes de mediana polaridad como el etanol es de relevancia experimental determinar el grado alcohólico que optimice el rendimiento y la obtención de un extracto con el mayor porcentaje de compuestos fenólicos ya que a partir de este, estos compuestos pueden finalmente ser precipitados y aislados con solventes de baja polaridad y destinados a un posterior proceso de purificación y utilización.

Por otro lado el interés actual por correlacionar los posibles preparados obtenibles de fuentes vegetales con su capacidad antioxidante *in vitro* recae en la factibilidad de extrapolar los datos obtenidos y de esta manera postular los posibles resultados *in vivo*.

Es así que el consumo de los diferentes preparados de estas especies vegetales puede presentarse como una excelente fuente de antioxidantes naturales y debido a su uso ampliamente difundido en nuestro país contribuir con la prevención y tratamiento de enfermedades de naturaleza crónica que sustenten su base fisiopatológica en el estrés oxidativo. Por lo que surge el interés por investigar: Cuál es el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos de diferente grado alcohólico del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. **mano de oso**? Siendo los objetivos: Cuantificar los polifenoles totales presentes en los extractos de diferente grado alcohólico del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. **mano de oso**.; valorar la capacidad antioxidante de los extractos de

diferente grado alcohólico del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. **mano de oso** en función al porcentaje de captura del radical libre (DDPH[•]) y determinar la relación entre el porcentaje de polifenoles totales presentes en los extractos de diferente grado alcohólico del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. **mano de oso** y el porcentaje de captura del radical libre (DDPH[•]).

MATERIAL Y MÉTODO

Material de estudio:

Se utilizaron 5 kg de tubérculos de *Solanum tuberosum* var. **mano de oso** provenientes del Distrito de Sarín, Provincia de Huamachuco ubicado a -7.90667 (latitud) y -77.9042 (longitud) a 2792 msnm.

Material y equipos de laboratorio:

Material:

- **Material de Laboratorio**
 - De uso común en el laboratorio de Farmacognosia
- **Equipos**
 - Espectrofotómetro Hewlett Packard de arreglo de diodos modelo 8452.
- **Reactivos y solventes**
 - 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH[•]) laboratorios Sigma-Aldrich-
 - Alcohol etílico 96°GL.
 - Ácido tánico patrón, de laboratorios Sigma-Aldrich.
 - Reactivo Folin-Ciocalteu laboratorio Merck.

Método:

Preparación de los extractos hidroetanólicos al 5%.

El tubérculo previamente pelado, cortado y secado a temperatura ambiente por 24h y a estufa a 40°C por 72h, se pulverizó y pesó en masa equivalente a 5g llevándolo posteriormente a reflujo y agitación magnética con 100 ml de menstuo (Etanol de 30; 50; 70; 96°GL) para los cuatro grupos respectivamente, por un periodo de 2h.

El extracto final se filtró al vacío hasta dejarlo libre de sólidos en suspensión y finalmente se aforó a 100ml.

• **Cuantificación de Polifenoles totales**

La concentración de polifenoles totales en los diferentes extractos fue medida por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se utilizó como referencia una solución patrón de ácido tánico de 1,2 mg/ml⁴.

• **Capacidad Antioxidante**⁵⁻⁹

Basado en la reducción de la concentración del radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]), la cual es obtenida en función a la disminución de su absorbancia espectrofotométrica a 517 nm, de la mezcla de reacción según la técnica modificada.

Las condiciones óptimas de la reacción de radicales libres para nuestro sistema fueron las siguientes:

Para obtener la curva de calibración se preparó una solución madre del reactivo DPPH[•] 0,1 mM, a partir del cual se realizaron diferentes diluciones y sus lecturas correspondientes en espectrofotómetro Hewlett Packard de arreglo de diodos modelo 8452 a 517nm.

Para la determinación de los porcentajes de captura del radical DPPH[•], se trabajó con un control 10 ml de solución de DPPH[•] 0,1 mM de la cual se obtuvo su absorbancia a 517 nm.

Para las muestras problema se usaron alícuotas de 10 µL de los diferentes extractos y se enfrentaron a 10 ml de solución de DPPH[•] 0,1mM, pasados 30 minutos se leyó la absorbancia a 517 nm.

La captura de radicales libres de DPPH[•] se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de captura de radicales libres de (DPPH}^\bullet) = \frac{\text{Abs. Control} - \text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. Control}}$$

Análisis estadístico:

Se realizaron 6 repeticiones por cada experimento.

Todos los datos fueron procesados mediante paquete estadístico SPSS.15.0 para Windows, con $p < 0,05$. Tanto para la determinación de la media y análisis de varianza (ANOVA).

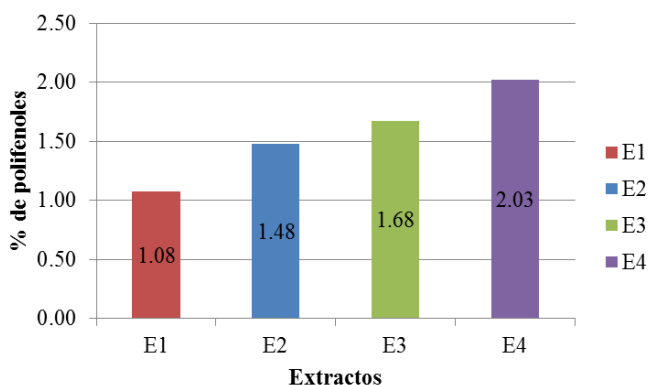
RESULTADOS

Tabla 1. Porcentaje promedio de Polifenoles totales expresados en Ácido tánico presentes en los diferentes extractos hidroetanólicos del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. mano de oso

EXTRACTOS	% de Polifenoles totales
E1	1,08
E2	1,48
E3	1,68
E4	2,03

Leyenda:

Grados etanólicos de Extracción: E1: 30°GL, E2: 50°GL, E3: 70°GL y E4: 96°GL



Leyenda:

Grados etanólicos de Extracción: E1: 30°GL, E2: 50°GL, E3: 70°GL y E4: 96°GL

Figura 1. Porcentaje promedio de polifenoles totales (ácido tánico) presentes en cuatro extractos hidroetanólicos del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. mano de oso

Tabla 2. Análisis de Varianza de un sólo factor para concentración de polifenoles totales expresados en Ácido tánico presentes en los diferentes extractos hidroetanólicos del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. mano de oso $\alpha=0,05$

P Experimental	P Teorico
0,000245673	0,05

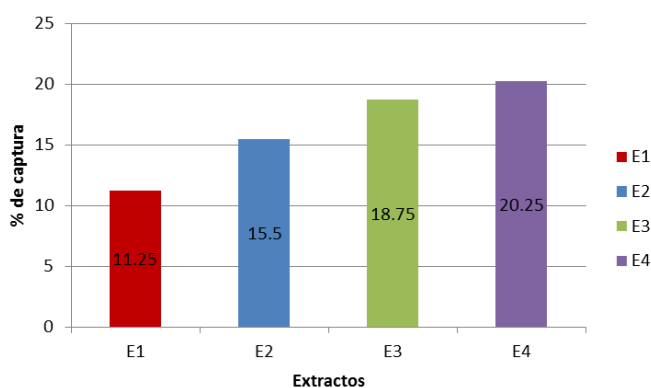
Se rechaza la Ho: Todas las medias son iguales.

Tabla 3. Porcentaje promedio de captura de radicales libres (DPPH^{*}) de los diferentes extractos hidroetanólicos del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. mano de oso.

EXTRACTOS	% Captura de radicales libres
E1	11,25
E2	15,5
E3	18,75
E4	20,25

Leyenda:

Grados etanólicos de Extracción-E1: 30°GL, E2: 50°GL, E3: 70°GL y E4: 96°GL



Leyenda:

Grados etanólicos de Extracción-E1: 30°GL, E2: 50°GL, E3: 70°GL y E4: 96°GL

Figura 2. Porcentaje de captura del radical libre (DPPH^{*}) por los cuatro extractos hidroetanólicos de *Solanum tuberosum* var. mano de oso.

Tabla 4. Análisis de Varianza de un solo factor para Porcentaje de captura del radical libre (DPPH^{*}) por los diferentes extractos hidroetanólicos de *Solanum tuberosum* var. mano de oso $\alpha=0,05$

P Experimental	P Teorico
0,00010742	0,05

Se rechaza la Ho: Todas las medias son iguales.

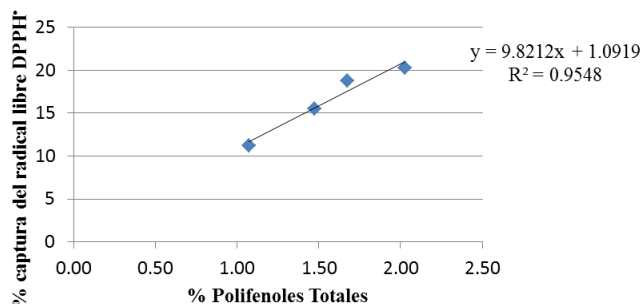


Figura 3. Relación del porcentaje de polifenoles totales expresados en ácido tánico con el porcentaje de captura del radical libre (DPPH*)

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se cuantificaron los polifenoles totales y se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. **mano de oso** elaborados con etanol de diferente grado alcohólico intentando relacionar este tipo de variables para una futura estandarización del proceso de extracción y la optimización del rendimiento en los casos que se requiera.

En la tabla 1 se evalúa el porcentaje promedio de polifenoles totales expresados como ácido tánico en cada uno de los cuatro extractos (E1-E4) elaborados con etanol de 30; 50; 70 y 96°GL respectivamente, en los cuales se encuentra una relación proporcional entre el grado alcohólico y la mayor concentración de polifenoles totales encontrándose valores de 1,08; 1,48; 1,68 y 2,03 % para los extractos E1-E4 respectivamente. Estos resultados se fundamentan en la elevada capacidad de extracción de compuestos fenólicos polihidroxilados, que poseen el arreglo C6-C3-C6, como los flavonoides y dentro de este grupo las antocianinas, que son compuestos de elevada polaridad y presencia mayoritaria en el tubérculo de *Solanum tuberosum* var. **mano de oso**. La extracción de flavonoides y de antocianinas específicamente se ve favorecida con el incremento del grado alcohólico y la acidificación del medio de extracción por ácido débiles como ácido

acético, ácido cítrico o fórmico. La formación del catión flavilo y la deslocalización de su carga (+) le brinda características de estabilidad y aromaticidad a la molécula. Por otro lado se apreció experimentalmente que los extractos del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. **mano de oso** mostraron coloraciones azul-moradas lo cual se puede atribuir a la presencia de dos tipos de antocinina; 2,3-diglucosido de malvidina y 3-glucosido de malvidina^{10,11-14}.

En la tabla 2 se muestran los porcentajes promedio de captura del radical libre DPPH*, 11,25; 15,5; 18,75 y 20,25 % los cuales aumentan en relación al grado alcohólico de los extractos E1-E4 respectivamente.

El poder de captura de radicales libres por los compuestos fenólicos de forma flavonoide es ampliamente estudiado en la actualidad y se atribuye al grupo radicalario hidroxilo de la posición 4' del anillo B, el cual pierde un hidrogeno radicalario, que en nuestro estudio es cedido a la estructura del 2,2-difinil-1-picril hidrazil (DPPH*) para lograr su estabilidad, mientras que la molécula de flavonoide lo logra por la conjugación de estructuras resonantes a través de sus 3 anillos (A,B y C). Moléculas de antocianinas en medio básico pierden parcialmente su capacidad captadora de radicales libres debido a que el anillo C se desestabiliza y tiende a la formación de un compuesto hemiacetalico que impide la resonancia del radical libre^{12,13}.

La capacidad antioxidante de estos compuestos se encuentra en relación a su concentración en sus extractos, es así que extractos que garanticen una mayor extracción de antocianinas (mayor grado alcohólico) ostentarán mayor capacidad de captura de radicales libres *in vitro*¹⁰.

En el presente estudio se observó una correlación lineal entre el porcentaje total de polifenoles expresados como ácido tánico y el porcentaje de captura de radicales libres de (DPPH*) con un valor R² de 0,9548. (Figura 3). Por otro lado se puede asociar también indirectamente el contenido de polifenoles con los diferentes grados alcohólicos utilizados para preparar los extractos del

tubérculo de *Solanum tuberosum* var. **mano de oso**.

En las tablas 2 y 4 se muestra el análisis de varianza de un sólo factor para el porcentaje de polifenoles totales y de captura de radicales libres (DPPH^{*}), demostrando que existe variabilidad entre los cuatro extractos (E1-E4) del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. **mano de oso** elaborados con etanol de diferentes grados alcohólicos; corroborados respectivamente por los valores p de 0,000245673 y 0,00010742 < 0,05.

CONCLUSIONES

1. Se cuantificaron los polifenoles totales presentes en los extractos de diferente grado alcohólico del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. **mano de oso**, (E1, E2, E3 y E4) encontrándose mayor porcentaje de polifenoles a mayor grado alcohólico utilizado para el extracto.
2. Se valoró la capacidad antioxidante de los extractos de diferente grado alcohólico del tubérculo de *Solanum tuberosum* var. **mano de oso** (E1, E2, E3 y E4) en función al porcentaje de captura del radical libre (DDPH^{*}), encontrándose mayor capacidad antioxidante a mayor grado alcohólico de los extractos.
3. Se encontró relación lineal entre el porcentaje de polifenoles totales presentes en los extractos (E1-E4) y el porcentaje de captura de radicales libres (DDPH^{*}) con un valor R² de 0,9548.

Conflicto de interés

No se presentan conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Li E. El Futuro de los Productos Andinos en la Región Alta y los Valles Centrales de los Andes/Plantas Medicinales [Online] Ministerio de Producción. [Citado el 13 de julio del 2014]. Disponible en: http://www.unido.org/fileadmin/import/69934_PERU_Informe_final_plantas_medicinales_2vf.pdf

2. Mostacero J. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. 1ª ed. Trujillo: Ed. Concytec. 2002. vol. I pp. 852 – 854
3. Chao P, Lin S, Lin K, *et al.* Antioxidant activity in extracts of 27 indigenous Taiwanese vegetables. *Nutrients*. 2014 May 23;6(5):2115-30. doi: 10.3390/nu6052115.
4. Gutiérrez Y, Miranda M, Varona N, Rodríguez T. Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajaba*, L. *Rev Cubana Farm [revista en la Internet]*. 2000 Abr [citado 2014 July 15] ; 34(1): 50-55. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152000000100007&lng=es.
5. Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O y Kondo K. Antioxidant ability of various flavonoides against DPPH radicals and LDL oxidation. *Internal Medicine I, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan. J Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)*, 2001; 47:357-362.
6. Sánchez C, Larrauri J, Saura F. Free radical scavenging capacity of selected red, rosé and white wines. *J. Science of Food and Agriculture*. 1999; 79: 1301-1304.
7. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Qwiss U, Technol*. 1995; 28, 25-30.
8. Sandoval M. Antioxidant Activity of the Cruciferous Vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry*. 2002a; v. 79, n. 2, p. 207 – 213.
9. Diaz H, Rodriguez I. Capacidad Antioxidante *in vitro* de las Isoflavonas Totales Obtenidas de Semillas de

- Glycine max* L. (Soya) Provenientes de la Provincia de Jaén-Cajamarca. Tesis para obtener el grado de bachiller en Farmacia y Bioquímica, Trujillo-Perú, Universidad Nacional de Trujillo. 2010. 07-15 pp.
10. Lock O. Investigación Fitoquímica. 2^a ed. Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. 1994.pp: 111-127.
 11. Cuellar A. Farmacognosia y Productos Naturales. 2^a ed. La Habana-Cuba: Feliz Valera. 2012.pp: 162-166;170-171; 261-280.
 12. Bartolo R, Chávez C. Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* del decocto de la coronta de *Zea mays* L. (variedad morado) del Distrito de Cajabamba, departamento de Cajamarca. Tesis para obtener el grado de bachiller en Farmacia y Bioquímica, Trujillo-Perú, Universidad Nacional de Trujillo. 2010. 12-16 pp.
 13. Coria L, Maihua R, Peralta F, Tereschuk M. *et al.* Análisis de antocianinas en arándanos del noa (*Vaccinium corymbosum* L.). Departamento de Ingeniería de Procesos y Gestión Industrial. Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología. Universidad Nacional de Tucumán.2013.
 14. Cuevas E, Antezana A, y Winterhalter P. Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (*Zea mays*) boliviano. 2008. Memorias del Encuentro Final Alfa Lagrotech, Cartagena,Colombia, 21-26 de septiembre.