

Nota corta

Ensayo rápido, sencillo y directo para evaluar la actividad antioxidante en hojas

Rapid, simple, and direct assay to evaluate antioxidant activity in leaf

Diego Gallegos-Cerda, Cristian García-Noriega, Valeria Félix-Patiño, Ezequiel Viveros-Valdez*

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Química. San Nicolás de los Garza, Nuevo León 64460, México; diego.gallegoscrd@uanl.edu.mx (DGC); cristian.garcianrg@uanl.edu.mx (CGN); montserrat.felixptn@uanl.edu.mx (VFP); jose.viverosvld@uanl.edu.mx (EJV).

*Autor para correspondencia: jose.viverosvld@uanl.edu.mx, <https://orcid.org/0000-0001-5944-7972>

Resumen: La búsqueda sistemática de especies vegetales que aporten antioxidantes a la dieta ha sido una constante en las últimas décadas. Para el tamizaje se han propuesto diferentes ensayos que permitan distinguir a los mejores candidatos, tomando lo anterior como base, en este trabajo proponemos un ensayo sencillo, rápido y directo que se basa en el secuestro del radical libre DPPH, utilizando discos de hojas que facilitarían dicha tarea. Se analizó la actividad antioxidante de distintas especies: guayaba (*Psidium guajava*), encino roble (*Quercus polymorpha*), cenizo (*Leucophyllum frutescens*), nogal (*Juglans regia*), albahaca (*Ocimum basilicum*), ancuá (*Ehretia anacua*), anacahuita (*Cordia boissieri*) y ebano (*Ebenopsis ébano*). Se demostró que las especies de guayabo, nogal y encino tienen un interesante contenido de compuestos antioxidantes, el ensayo propuesto permite realizar un tamizaje eficaz con un ahorro considerable de recursos, lo que lo hace ideal en estudios encaminados a la bioprospección sistemática de especies vegetales.

Palabras claves: ensayo; antioxidantes; DPPH; especies vegetales

Abstract: The systematic search for plant species that provide antioxidants to the diet has been a constant in recent decades. For screening, different tests have been proposed to distinguish the best candidates. Taking the above, in this work we propose a simple, rapid and direct test that is based on the free radical scavenger DPPH, using leaf discs that would facilitate said task. The antioxidant activity of different species was analyzed: guava (*Psidium guajava*), oak (*Quercus polymorpha*), cenizo (*Leucophyllum frutescens*), walnut (*Juglans regia*), basil (*Ocimum basilicum*), ancuá (*Ehretia anacua*), anacahuita (*Cordia boissieri*) and ebony (*Ebenopsis ébano*). It was demonstrated that guava, walnut, and oak species have an interesting content of antioxidant compounds. The proposed test allows effective screening with considerable savings in resources, which makes it ideal in studies aimed at systematic bioprospecting of plant species.

Keywords: assay; antioxidants; DPPH; vegetable species

1. Introducción

Durante los últimos años se ha producido un enorme interés en el área biomédica las investigaciones encaminadas al estudio de radicales libres y antioxidantes, esto en buena medida a que se ha demostrado que el equilibrio de estos juega un papel clave en numerosas patologías, lo que incluye la iniciación y propagación del cáncer, enfermedades autoinmunes, hasta complicaciones por enfermedades metabólicas y crónico degenerativas (Checker et al, 2021). Este equilibrio se ve severamente afectado por el aumento constante a la exposición de radicales libres, entre los que se encuentran radiaciones ionizantes, luz ultravioleta, contaminantes atmosféricos como: ozono, monóxido de carbono, dióxido de azufre, etc (Jakubczyk et al., 2020). Con lo anterior queda de manifiesto la importancia de la búsqueda sistemática de nuevas y/o mejores formas de incorporar antioxidantes en la dieta, siendo el estudio de productos naturales una de las áreas de mayor crecimiento para tal fin, dada la posibilidad real de incorporar extractos, bebidas, alimentos, y/o aditivos que contribuyan a tal fin (Xu et al., 2017).

Existen numerosas metodologías para evaluar la actividad antirradical/antioxidante, siendo los que se basan en el secuestro/donación de protones los más populares, esto en buena medida dada su reproducibilidad y practicidad, siendo el secuestro del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) uno de los ensayos más populares y de uso rutinario en los proyectos que se aborda el estudio de antioxidantes naturales (Munteanu I.G. y Apetrei C., 2021; Viveros-Valdez E et al., 2015). A pesar de la practicidad del ensayo, una de las áreas que ha mostrado mayor complejidad, es la preparación de la muestra, ya que es habitual primero recurrir a una proceso de extracción, siendo los más rutinarios la maceración y soxhlet, aunque con la desventaja del tiempo y cantidad de muestra requeridas para su procesamiento, además, algunos trabajos han mencionado que precisamente durante la extracción se podría modificar/alterar la actividad antioxidante de las muestras, y verse disminuida ya que algunos principios activos son termolábiles y/o inestables (Zhang et al., 2018), por lo que, recientemente se han propuesto ensayos novedosos que permitan determinar de manera *in situ* la actividad antioxidante, destacando la propuesta por Kasote et al (2019) en donde se hacen uso de discos obtenidos de hojas de hortalizas, esta técnica permite evaluar una cantidad considerable de muestras en un corto tiempo, partiendo de esa premisa, en este trabajo planteamos una adecuación de dicha técnica para evaluar de manera rápida y sencilla la actividad antioxidante de hojas obtenidas de plantas ornamentales, medicinales y/o comestibles en un ensayo que, en condiciones ideales, no excedería los 30 minutos desde el procesamiento hasta el análisis de datos, esta técnica podría ser utilizada en tamizajes extensos encaminados a la búsqueda de especies con potencial antioxidante y/o una metodología rutinaria en laboratorios de docencia, esto dada su practicidad y viabilidad económica.

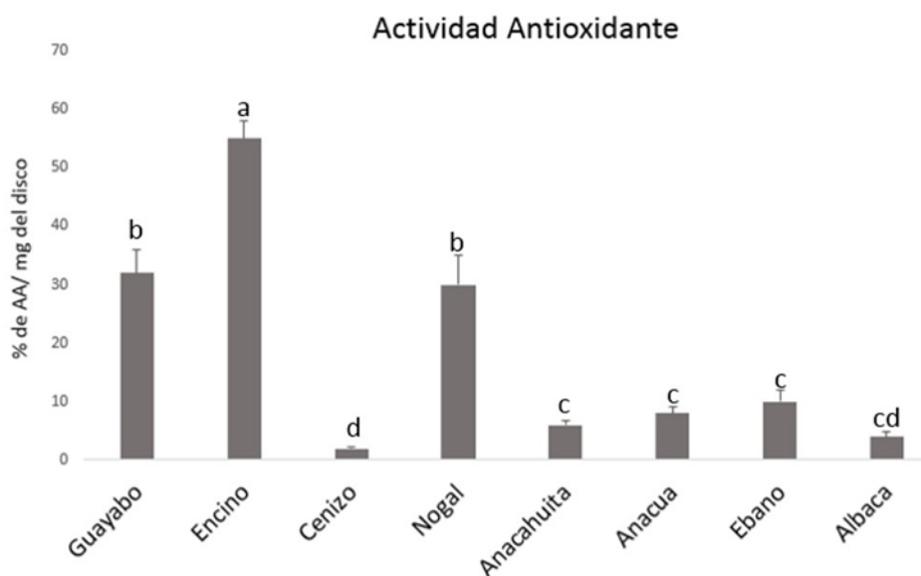
2. Materiales y Métodos

Se utilizaron muestras colectadas durante el mes de julio de 2024 en ciudad universitaria de la UANL localizada en el municipio de San Nicolás de los Garza, Nuevo León (25°43'38"N 100°18'37"O / 25.727222, -100.310278), se seleccionaron tres hojas por especie y se analizó que estuvieran libres de patógenos, insectos y/o materiales extraños de manera visible; fueron identificados por especialistas del departamento de botánica de la FCB-UANL. Las especies analizadas son: guayaba (*Psidium guajava*), encino (*Quercus polymorpha*), cenizo (*Leucophyllum frutescens*), nogal (*Juglans regia*), albahaca (*Ocimum basilicum*), ancuá (*Ehretia anacua*), anacahuita (*Cordia boissieri*) y Ebano (*Ebenopsis ébano*). Se utilizó agua destilada y metanol grado analítico, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) marca sigma-aldrich (D9132) y microplacas de 24 pozos de poliestireno marca Costar®.

Para determinar la actividad antioxidante se siguió la técnica sugerida por Kasote et al (2019) con modificaciones, las cuales se describen a continuación: una vez colectadas las hojas, estas se perforaron de manera manual utilizando una perforadora de papel circular para orificios de 6 mm de marca Noguez®, de manera individual cada disco obtenido se colocó en cada uno de los pozos de una microplaca de 24 pozos, posteriormente en cada pozo se agregó 500 µL de una solución metanólica al 80 % de DPPH [0.13 mg/mL] en cada uno de los pozos, la reacción se dejó incubar a temperatura ambiente y oscuridad por un periodo de 5 minutos, después de transcurrido el tiempo se retiraron los discos y leyó en un lector de microplacas (BioTek Epoch) a 515 nm. La actividad antioxidante (AA) se calculó mediante la siguiente ecuación: % de AA/ mg del disco en PF = [(AC-AM/AC) × (100/PF del disco (mg))]. En donde PF se refiere al peso fresco, AC a la absorbancia del control negativo (C-), para tal fin se consideró la solución de DPPH sin tratamiento, y AM a la absorbancia de la muestra. Se realizaron cuatro repeticiones (discos) por hoja, y a su vez se utilizaron tres hojas de cada especie, los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), y se consideró una significancia de $p < 0.5$.

3. Resultados

En la Gráfica 1 se muestra la actividad antirradical/antioxidante de diferentes especies ornamentales y/o medicinales abundantes en el noreste mexicano, se observó que el mejor porcentaje de actividad antioxidante (AA) lo mostraron las hojas del encino (55±4), seguido por la guayaba (32±4) y el nogal (30±5), mientras que las especies que mostraron la menor actividad fue la albahaca (4.3±0.7) y el cenizo (3±0.2), es importante mencionar que para poder discernir entre el potencial de las distintas especies estudiadas se utilizó un ensayo rápido y sencillo que de manera *in situ* nos permitió distinguir aquellas especies con potencial para estudios bioprospectivos (Imagen 1).



Grafica 1. Actividad antioxidante de distintas especies analizado directamente sobre discos de hojas.

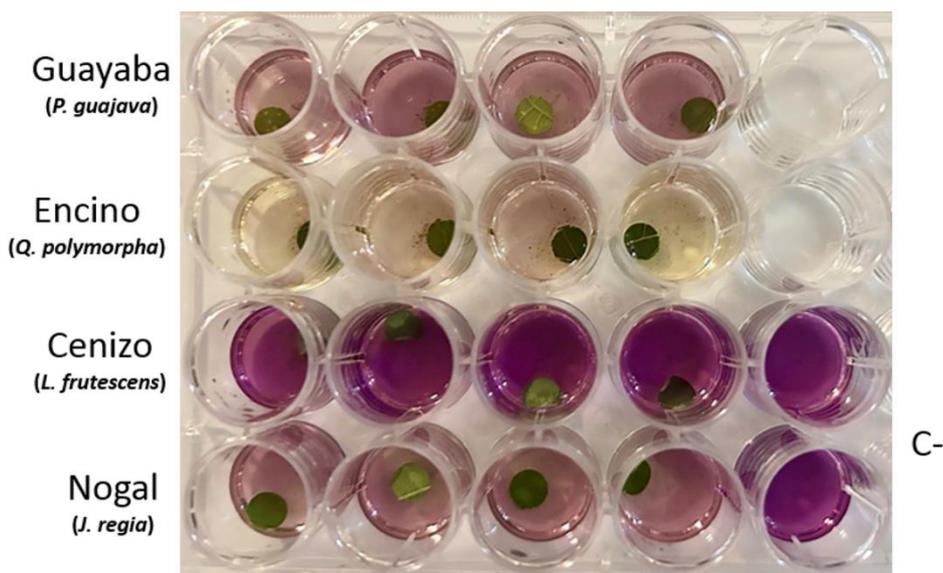


Imagen 1. Ensayo de la actividad antirradical/antioxidante de diferentes muestras utilizando el ensayo de DPPH sobre discos de hojas.

4. Discusión

Un radical libre es una especie química que se caracteriza por poseer uno o más electrones desapareados, son extremadamente inestables y poseen un gran poder reactivo, a nivel fisiológico tienden a unirse a biomoléculas, esto se ha relacionado con el desarrollo de estrés oxidativo, condición implicada en numerosas patologías (Zaric et al., 2023). Para evitar lo anterior, es fundamental el aporte de antioxidantes exógenos, los cuales pueden ser consumidos en la dieta y/o como suplementos (Prasad et al., 2016). Una de las fuentes tradicionales para la búsqueda sistemática de compuestos con actividad antioxidante es el estudio de plantas medicinales y comestibles (Aune D, 2019; Monroy-García et al., 2021), ya que estas tienden a ser ricas en fenoles y flavonoides compuestos que dada su estructura química tienen la cualidad de ser donadores de protones y por lo tanto fungir como secuestradores de radicales libres y ser considerados como antioxidantes (Losada-Barreiro S y Bravo-Díaz C., 2017), sin embargo, dada la enorme abundancia de especies vegetales, es complicado y costoso poder distinguir las mejores candidatas, con miras a perfeccionar la tarea antes mencionada, desde hace años se utilizan técnicas analíticas amigables, sencillas y reproducibles que permiten localizarlas,

destacando el uso del ensayo del secuestro del radical DPPH (Munteanu I.G. y Apetrei C., 2021), radical que cuando se encuentra de forma libre presenta una coloración morada con máximos de absorción en el rango de entre 515-517 nm, la cual disminuye en presencia de compuestos que estabilicen su estereoquímica observándose visualmente un cambio gradual de coloración de morado a amarillo (imagen 1). Este ensayo se ha convertido en el más popular para el estudio de antioxidantes de origen natural, sin embargo, existen algunos inconvenientes (Gulcin İ. y Alwasel S.H., 2023), la mayoría de ellos relacionados a la necesidad de primero extraer los compuestos, algunas de las cuales son invasivas ya que requieren calor y/o tiempos prolongados de extracción, lo que aumenta la posibilidad de alguna degradación química (Enaru et al., 2021), aunado a lo anterior, las cantidades de material vegetal requeridas para el proceso de extracción complica el manejo, transporte y proceso de las muestras, lo cual a su vez aumenta el costo e impacto ambiental, por lo que últimamente se ha propuesto técnicas menos invasivas, que requieren poca cantidad de muestra y una cantidad mínima de solventes y reactivos, de entre ellas destaca la propuesta por Kasote et al (2019) quienes consiguieron analizar la actividad antioxidante en discos obtenidos a partir de hojas de hortalizas, sin embargo, se presentan algunas limitaciones para su extrapolación a hojas con menor contenido de agua, mayor contenido celular y material ligninolítico como es el caso de hojas de plantas aromáticas, ornamentales y/o medicinales, partiendo de lo anterior, en este trabajo se modificó la solución de trabajo, concentración del reactivo y tiempos de incubación, lo que permitió un análisis más adecuado de este tipo de tejidos, esto en buena medida a que se logró una rápida y correcta difusión de los compuestos polares extraíbles del disco a la solución reactiva, esto se sugiere es debido al uso de la solución metanol:agua al 80%, ya se ha demostrado que las mezclas hidrometanólica son mejores para la extracción de compuestos fenólicos (Anwar et al., 2010), además de aumentar el punto de evaporación de la solución de trabajo, lo que da mayor estabilidad al trabajar con volúmenes pequeños, lo anterior permitió que el ensayo se corriera en un rango estable de absorbancias entre 1.1 a 0.95 a 515 nm, esto a los 5 minutos de iniciada la reacción, lo cual era complicado a la concentración sugerida originalmente. Se encontró que las muestras con mayor contenido de antioxidantes es el encino (*Quercus polymorpha*), ya se ha demostrado que varias especies del género *Quercus* tienen un alto contenido de compuestos antioxidantes (Rivas-Areola et al., 2010; Othón-Díaz), sin embargo, este es el primer reporte en donde se hace mención del potente efecto mostrado por el encino roble, por otra parte las hojas de guayabo (*Psidium guajava*) y del nogal (*Juglans regia*), también mostraron una cantidad considerable de compuestos antirradicales, previamente ya se ha demostrado que el efecto antioxidante en las hojas de guayaba es debido a la presencia de quercetina (Naseer et al., 2018), mientras que en las hojas de *J. regia*, algunos ácidos fenólicos como el cafeico y flavonoles derivados del kaempferol, quercetina y miricetina son los responsables de esta actividad (Bourais et al., 2022). El resto de las especies: albahaca (*Ocimum basilicum*), ancuá (*Ehretia anacua*), ebano (*Ebenopsis ébano*), anacahuita (*Cordia boissieri*) y cenizo (*Leucophyllum frutescens*) no mostraron actividad antioxidante significativa (gráfica 1), sin embargo, es importante mencionar que dada la naturaleza del ensayo, se ve pobremente reflejada la actividad de compuestos de naturaleza no polar, lo cual podría en parte justificar los resultados mostrados en estas especies, en este sentido, ya se ha demostrado la actividad antioxidante del aceite esencial de *O. basilicum*, siendo el citral y estragol los compuestos más abundantes (Mahendran G. y Vimolmangkang S., 2023), así mismo y dada la practicidad del ensayo se podría rastrear cual es la mejor época para la colecta del material vegetal, ya que previamente se reportó que el extracto y particiones polares del cenizo (*L. frutescens*) poseen una interesante actividad antioxidante (Ahmad et al., 2022), sin embargo, el estudio se realizó durante la época de floración (octubre) lo cual dista de lo realizado en este proyecto, del resto de las especies (ancuá, ebano y anacahuita) no existen reportes de la actividad antioxidante en hojas, lo cual confirmaría que dichas especies son pobres candidatas para el rastreo sistemático de compuestos antirradicales/antioxidantes.

5. Conclusiones

Mediante un ensayo sencillo, rápido y directo realizado sobre discos de hojas se demostró que las especies de guayabo, nogal y encino tienen un interesante contenido de compuestos antioxidantes, siendo este el primer reporte del potente efecto mostrado por el encino roble (*Quercus polymorpha*), el ensayo propuesto permite realizar un tamizaje eficaz con un ahorro considerable de recursos, lo que lo hace ideal en estudios encaminados a la bioprospección sistemática de especies vegetales, así mismo se propone su posible uso en docencia, esto dada la practicidad del ensayo.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen al XXVI Verano de Investigación Científica y Tecnológica de la UANL (PROVERICYT-UANL) por los recursos asignados.

7. Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

1. Ahmad I., Ahmed S., Akkol E.K., Rao H., Shahzad M.N., Shaukat U., Basit A., Fatima M. (2022). GC–MS profiling, phytochemical and biological investigation of aerial parts of *Leucophyllum frutescens* (Berl.) I.M. Johnston. (Cenizo). S. Afr. J. Bot.;148:200–209. doi: 10.1016/j.sajb.2022.04.038
2. Anwar, F., Abdul Qayyum, H. M., Ijaz Hussain, A., & Iqbal, S. (2010). Antioxidant activity of 100% and 80% methanol extracts from barley seeds (*Hordeum vulgare* L.): stabilization of sunflower oil. *Grasas Y Aceites*, 61(3), 237–243. <https://doi.org/10.3989/gya.087409>
3. Aune D. (2019). Plant Foods, Antioxidant Biomarkers, and the Risk of Cardiovascular Disease, Cancer, and Mortality: A Review of the Evidence. *Adv Nutr*. Nov 1;10(Suppl_4):S404–S421. doi: 10.1093/advances/nmz042.
4. Bourais I, Elmarrkechy S, Taha D, Badaoui B, Mourabit Y, Salhi N, Alshahrani MM, Al Awadh AA, Bouyahya A, Goh KW, Tan CS, El Hajjaji S, Dakka N, Iba N. (2022). Comparative Investigation of Chemical Constituents of Kernels, Leaves, Husk, and Bark of *Juglans regia* L., Using HPLC-DAD-ESI-MS/MS Analysis and Evaluation of Their Antioxidant, Antidiabetic, and Anti-Inflammatory Activities. *Molecules*. Dec 16;27(24):8989. doi: 10.3390/molecules27248989..
5. Checker R, Sharma D, Sandur SK, Toyokuni S. (2021). Role and management of oxidative stress in human disease. *Free Radic Res*. Aug;55(8):755–757. doi: 10.1080/10715762.2021.1991083.
6. Enaru B, Drețcanu G, Pop TD, Stănilă A, Diaconeasa Z. (2021). Anthocyanins: Factors Affecting Their Stability and Degradation. *Antioxidants (Basel)*. Dec 9;10(12):1967. doi: 10.3390/antiox10121967.
7. Gulcin, İ.; Alwasel, S.H. (2023). DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes*, 11, 2248. <https://doi.org/10.3390/pr11082248>
8. Jakubczyk K, Dec K, Kałduńska J, Kawczuga D, Kochman J, Janda K. (2020). Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Pol Merkur Lekarski*. Apr 22;48(284):124–127.
9. Kasote DM, Jayaprakasha GK, Patil BS. (2019). Leaf Disc Assays for Rapid Measurement of Antioxidant Activity. *Sci Rep*. Feb 13;9(1):1884. doi: 10.1038/s41598-018-38036-x.
10. Losada-Barreiro S, Bravo-Díaz C. (2017). Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *Eur J Med Chem*. Jun 16;133:379–402. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.03.061.
11. Mahendran G, Vimolmangkang S. (2023). Chemical compositions, antioxidant, antimicrobial, and mosquito larvicidal activity of *Ocimum americanum* L. and *Ocimum basilicum* L. leaf essential oils. *BMC Complement Med Ther*. Oct 28;23(1):390. doi: 10.1186/s12906-023-04214-2.
12. Monroy-García IN, Carranza-Torres IE, Carranza-Rosales P, Oyón-Ardoiz M, García-Estévez I, Ayala-Zavala JF, Morán-Martínez J, Viveros-Valdez E. (2021). Phenolic Profiles and Biological Activities of Extracts from Edible Wild Fruits *Ehretia tinifolia* and *Sideroxylon lanuginosum*. *Foods*. Nov 5;10(11):2710. doi: 10.3390/foods10112710.
13. Munteanu IG, Apetrei C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci*. 1 Mar 25;22(7):3380. doi: 10.3390/ijms22073380.
14. Naseer S, Hussain S, Naeem N, Pervaiz M, Rahman M. (2018). The phytochemistry and medicinal value of *Psidium guajava* (guava). *Clin Phytosci* 4, 32 <https://doi.org/10.1186/s40816-018-0093-8>.
15. Othón-Díaz ED, Fimbres-García JO, Flores-Sauceda M, Silva-Espinoza BA, López-Martínez LX, Bernal-Mercado AT, Ayala-Zavala JF. (2023). Antioxidants in Oak (*Quercus* sp.): Potential Application to Reduce Oxidative Rancidity in Foods. *Antioxidants (Basel)*. Apr 2;12(4):861. doi: 10.3390/antiox12040861.
16. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett*. 2017 Feb 28;387:95–105. doi: 10.1016/j.canlet.2016.03.042.
17. Rivas-Arreola MJ, Rocha-Guzmán NE, Gallegos-Infante JA, González-Laredo RF, Rosales-Castro M, Bacon JR, Cao R, Proulx A, Intriago-Ortega P. (2010). Antioxidant activity of oak (*Quercus*) leaves infusions against free radicals and their cardioprotective potential. *Pak J Biol Sci*. Jun 1;13(11):537–45. doi: 10.3923/pjbs.2010.537.545.
18. Viveros-Valdez E, Oranday-Cárdenas A, Rivas-Morales C, Verde-Star MJ, Carranza-Rosales P. (2015). Biological activities of *Morus celtidifolia* leaf extracts. *Pak J Pharm Sci*. Jul;28(4):1177–80.
19. Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, Zhang JJ, Li HB. (2017). Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int J Mol Sci*. Jan 5;18(1):96. doi: 10.3390/ijms18010096.
20. Zaric BL, Macvanin MT, Isenovic ER. (2023). Free radicals: Relationship to Human Diseases and Potential Therapeutic applications. *Int J Biochem Cell Biol*. Jan;154:106346. doi: 10.1016/j.biocel.2022.106346.
21. Zhang QW, Lin LG, Ye WC. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med*. Apr 17;13:20. doi: 10.1186/s13020-018-0177-x.

Cita: Gallegos-Cerda, D., García-Noriega, C., Félix-Patiño, V. y Viveros Valdez, E. (2024) «Ensayo rápido, sencillo y directo para evaluar la actividad antioxidante en hojas», *Scientia Agricolis Vita*, 1(3), pp. 1-6

Editor Académico: Iosvany López-Sandin

Recibido: 08-08-2024

Revisado: 13-08-2024

Aceptado: 12-09-2024

Publicado: 12-09-2024



Copyright: © 2023 por los autores. Presentado para su posible publicación en acceso abierto bajo los terminos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).