



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Química

Trabajo de Fin de Grado

**ENSAYOS ESPECTROSCÓPICOS *IN VITRO* PARA LA EVALUACIÓN DEL
POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE
EXTRACTOS VEGETALES**

Alumno: Juan Diego García Rodríguez

Julio, 2019



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Química

Trabajo Fin de Grado

ENSAYOS ESPECTROSCÓPICOS IN VITRO PARA LA EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS VEGETALES

Juan Diego García Rodríguez

Julio, 2019

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. <i>Celtis australis</i>	3
1.2. Antioxidantes	6
1.3. Compuestos fenólicos	7
1.3.1. <i>Flavonoides</i>	9
1.4. Medida de la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos	10
1.4.1. <i>Métodos estáticos: digestión in vitro</i>	11
1.4.2. <i>Condiciones de la digestión in vitro</i>	11
1.4.3. <i>Métodos in vitro vs métodos in vivo</i>	14
1.5. Métodos para la determinación de la actividad antioxidante	15
1.5.1. <i>Método DPPH</i>	15
1.5.2. <i>Método ABTS</i>	16
1.6. Métodos para la determinación del contenido total en polifenoles y flavonoides	17
1.6.1. <i>Ensayo de Folin-Ciocalteu</i>	17
1.6.2. <i>Ensayo de tricloruro de Aluminio</i>	18
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Reactivos, aparatos e instrumentación	20
3.2. Muestras de <i>Celtis australis</i>	22
3.3. Extracción de la fracción fenólica de <i>Celtis australis</i>	22
3.3.1. <i>Extracción en metanol</i>	22
3.3.2. <i>Extracción en agua a 100°C durante 30 min</i>	23
3.3.3. <i>Extracción en agua a 100°C durante 5 min (infusión)</i>	23

3.4.	Determinación de la actividad antioxidante de los extractos	24
3.4.1.	<i>Actividad antioxidante frente a DPPH.....</i>	24
3.4.2.	<i>Actividad antioxidante frente a ABTS</i>	25
3.5.	Determinación del contenido total en polifenoles y flavonoides de los extractos	26
3.5.1.	<i>Contenido total en Polifenoles</i>	26
3.5.2.	<i>Contenido total en Flavonoides</i>	27
3.6.	Digestión <i>in vitro</i> de los extractos acuosos (infusión).....	28
3.7.	Determinación de la actividad antioxidante y contenido total en polifenoles y flavonoides de los extractos acuosos tras digestión <i>in vitro</i>	30
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1.	Actividad antioxidante antes de la digestión <i>in vitro</i>	31
4.2.	Contenido total en polifenoles y flavonoides antes de la digestión <i>in vitro</i>	33
4.3.	Actividad antioxidante después de la digestión <i>in vitro</i>	35
4.4.	Contenido total en polifenoles y flavonoides después de la digestión <i>in vitro</i>	37
4.5.	Comparación de los resultados en la infusión antes y después de la digestión <i>in vitro</i>	38
5.	CONCLUSIONES	42
6.	BIBLIOGRAFÍA	43

RESUMEN

En este trabajo de fin de grado se ha llevado a cabo el estudio de diferentes extractos vegetales del árbol *Celtis Australis*, conocido vulgarmente como Almez. Esta especie abunda en el Sur y Este de la Península Ibérica y sus hojas y frutos han sido utilizadas desde la antigüedad en medicina tradicional para preparar tónicos antidiarreicos, astringentes, digestivos y antihemorrágicos, así como remedio contra la disentería.

Se han obtenido extractos fenólicos de hojas de *Celtis Australis* utilizando como disolventes agua y metanol y se ha determinado espectrofotométricamente, en cada caso, el contenido total en polifenoles y flavonoides mediante los métodos de *Folin-Ciocalteu* y tricloruro de aluminio, respectivamente. Se ha estudiado además la actividad antioxidante de los extractos a través de su actividad antiradicalaria frente a los reactivos 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y 2,2'-azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS).

Por otra parte, en la extracción con agua se ha simulado la preparación de una infusión en la forma tradicional y se han llevado a cabo las determinaciones anteriormente citadas antes y después de una digestión *in vitro* del extracto acuoso. Esto ha permitido conocer en una primera aproximación la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos ingeridos en las infusiones de hojas de esta planta tras la digestión, lo que no había sido estudiado hasta la fecha. Los resultados obtenidos demuestran que las hojas de *Celtis Australis* son una fuente valiosa de compuestos fenólicos, y en concreto de flavonoides, a pesar de que tras la digestión hay una reducción significativa de éstos.

ABSTRACT

In this end-of-degree project, the study of different plant extracts of *Celtis Australis* tree, commonly known as Almez, has been carried out. This species abounds in the South and East of the Iberian Peninsula and its leaves and fruits have been used since ancient times in traditional medicine to prepare antidiarrheal, astringent, digestive and anti-hemorrhagic tonics, as well as a remedy against dysentery.

Phenolic extracts of *Celtis Australis* leaves were obtained using water and methanol as solvents and the total content of polyphenols and flavonoids was

determined spectrophotometrically by *Folin-Ciocalteu* and aluminum trichloride methods, respectively. The antioxidant activity of the extracts has also been studied through its antiradical activity against the reagents 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis-3-ethyl-benzo-thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS).

On the other hand, in the extraction with water the preparation of an infusion in the traditional manner has been simulated and the aforementioned determinations have been carried out before and after an *in vitro* digestion of the aqueous extract. This has allowed knowing in a first approximation the bioavailability of phenolic compounds ingested in the infusions of the leaves of this plant after digestion, which had not been studied to date. The results obtained show that the leaves of *Celtis Australis* are a valuable source of phenolic compounds, and in particular of flavonoids, although after digestion there is a significant reduction of these latter.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Celtis australis*

El árbol *Celtis australis* se ha considerado durante muchos años que pertenecía a la familia *Ulmaceae*, aunque en la actualidad se incluye dentro de las *Cannabáceas*, una familia cercana. Se encuentra ubicado en la vertiente mediterránea y suroeste de Asia, aunque es originario de Norteamérica. Es un árbol de hoja caduca, de tamaño mediano, que puede llegar a medir de 20 a 25 m de altura (El-Alfy et al. 2011). De tronco recto y corteza gris y lisa, semejante a la del ficus o el haya, sin estrías o hendiduras marcadas, posee una copa redonda y ancha. Sus hojas, de 5 a 15 cm de largo, son alternas, pecioladas, de forma ovo lanceoladas y delicadamente aserradas; el haz es de color verde oscuro y el envés de color más claro (Ilustración 1). Tienen estípulas caducas. Generalmente es conocido como mora del mediterráneo o árbol de ortiga europeo además del nombre con el que comúnmente lo denominamos en España, Almez (Demir et al. 2002).



Ilustración 1. Dibujo de la planta *Celtis australis*.

Las flores son poco visibles ya que no tienen pétalos y únicamente están constituidas por 5 sépalos caducos (flor monoclamídea), los cuales son de color amarillo verdoso (Ilustración 2). Florece entre marzo y abril, y sus frutos maduran

a finales de verano y en otoño, por lo que las propiedades antioxidantes pueden variar durante estas fechas. Tradicionalmente ha sido más utilizado en la ganadería que en el ser humano, y es que los pastores ya conocían sus beneficiosas aplicaciones para el ganado, para fracturas, contusiones, esguinces y dolores en articulaciones (Badoni, Semwal, and Rawat 2010). Tiene la virtud de corregir determinadas afecciones o hemorragias y problemas del aparato reproductor, en definitiva, es una planta de carácter emenagogo, es decir, que provoca o favorece la menstruación además de emplearla para facilitar el parto en el ganado.

Actualmente, se usan las hojas como astringente, antidiarreico y antihemorrágico. La infusión de sus frutos verdes y de sus hojas se utiliza también como remedio de la disentería. Se recolectan en junio cuando los frutos están todavía inmaduros.



Ilustración 2. Flores de la planta *Celtis Australis*.

Las plantas constituyen una fuente rica de compuestos naturales consecuentes, todos ellos, de abundantes efectos biológicos multifuncionales. En los últimos años se está llevando a cabo una investigación exhaustiva para obtener nuevas materias primas de plantas para su posterior desarrollo de productos con características saludables que ayudan a mantener o mejorar la salud y que protegen frente a enfermedades crónicas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las plantas medicinales serían la mejor fuente para obtener una variedad de medicamentos. Alrededor del 80% de la población de los países desarrollados usa medicamentos tradicionales que tienen compuestos derivados de plantas medicinales. Por lo tanto, estas plantas deben investigarse para comprender mejor sus propiedades, seguridad y eficiencia (Molina-García et al. 2018). Estudios previos acerca de los compuestos fenólicos foliares de la planta *Celtis Australis* (Spitaler et al., 2009; Somnavilla et al., 2012) revelaron la presencia de 2''-O- α -L-ramnopiranosilvitexina, isovitexina, 2''-O- α -L-ramnopiranosil-7-O-metilvitexina, citisósido y acetina 7-O-glucósido (Ilustración 3).

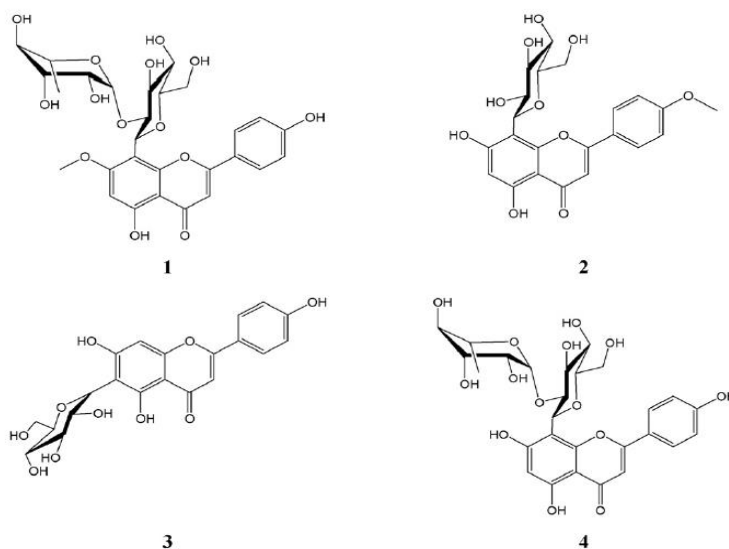


Ilustración 3. Estructuras de compuestos fenólicos encontrados en hojas de *Celtis australis*. (Zehrmann, Zidorn, and Ganzera 2010).

1: 2''-O- α -L-ramnopiranosil-7-O-metilvitexina; 2: citisósido; 3: isovitexina; 4: 2''-O- α -L-ramnopiranosilvitexina

Se ha identificado también un compuesto fenólico sulfonado con la ayuda de métodos espectroscópicos, que recibió el nombre de celtisanina (Ilustración 4).

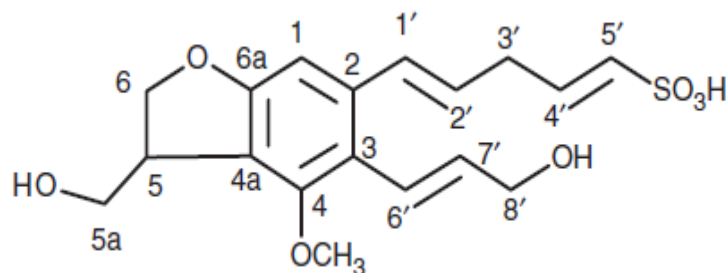


Ilustración 4. Estructura de la Celtisanina. (Badoni, Semwal, and Rawat 2010).

1.2. Antioxidantes

Un antioxidante es una sustancia capaz de ralentizar o prevenir la modificación no deseada de otras moléculas causadas por la oxidación. Los antioxidantes inhiben las reacciones de oxidación al oxidarse ellos mismos. Por tanto, son a menudo agentes reductores. El término antioxidante hace referencia a la actividad que numerosas vitaminas, minerales y otras sustancias fitoquímicas tienen sobre sustancias consideradas como nocivas, llamadas radicales libres. Los radicales libres pueden reaccionar químicamente con otros componentes de las células oxidándolos y como consecuencia, alterando su estabilidad y funcionalidad. Existe una considerable cantidad de estudios científicos a nivel químico, de cultivos celulares y en animales que indican que los antioxidantes pueden ralentizar o posiblemente prevenir el desarrollo de algunas enfermedades, como el cáncer o las enfermedades cardiovasculares, y otras degenerativas, como el Alzheimer, el cáncer o el propio envejecimiento. (Amirnowdijeh et al. 2019).

El avance de los estudios científicos está poniendo de manifiesto de forma cada vez más clara la relación existente entre el binomio salud y alimentación. Hasta hace poco, los principales estudios se centraban en los efectos de los nutrientes, es decir, hidratos de carbono, grasas, proteínas, vitaminas y minerales. Sin embargo, los alimentos se caracterizan por ser mezclas complejas, no sólo de nutrientes, sino también de otros componentes que se engloban en un grupo heterogéneo llamado 'no nutrientes' que están siendo estudiados en la actualidad, como muchos fitoquímicos con supuesta actividad antioxidante.

El propósito de este trabajo es resaltar las propiedades de un grupo particular de compuestos, los compuestos fenólicos. Los extractos de hojas pueden representar una fuente valiosa de antioxidantes naturales para multitud de aplicaciones.

1.3. Compuestos fenólicos

Bajo estrés oxidativo, el cuerpo humano produce más especies de oxígeno reactivo que los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Este desequilibrio conduce al daño celular y facilita el desarrollo de enfermedades degenerativas como enfermedades cardiovasculares, cáncer o Alzheimer, (Spínola et al. 2014). Los compuestos fenólicos de las plantas se caracterizan como metabolitos aromáticos que poseen uno o más grupos hidroxilo fenólicos "ácidos". Las principales clases de compuestos fenólicos son los ácidos hidroxicinámicos (HCA), flavonoides, antocianinas y taninos. Los compuestos fenólicos son una clase de metabolitos secundarios de importancia ecológica (Grace 2005). Son estructuras químicas formadas por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, incluyéndose también derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, entre otros. Estos compuestos están distribuidos en todo el reino vegetal, siendo la forma más frecuente de encontrarlos en la naturaleza conjugados con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilo, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre un azúcar y un carbono aromático. (Bravo and Saura-Calixto 1998). Su actividad antioxidante se atribuye a su facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre y a la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático. Poseen además una estructura química ideal para captar iones metálicos e inhibir la formación de radicales libres.

Se han llegado a identificar más de 8.000 compuestos fenólicos con una estructura muy variada. Una de las maneras de organizarlos es según la enunciada por Harborne (Tabla 1) (Harborne 1989).

Tabla 1. Clasificación de los compuestos fenólicos en función de la estructura química básica (Harborne 1989).

NÚMERO DE ÁTOMOS DE CARBONO		
6	C ₆	Fenoles simples, Benzoquinonas
7	C ₆ -C ₁	Ácidos Fenólicos
8	C ₆ -C ₂	Acetofenona, Ácido Fenilacético
9	C ₆ -C ₃	Ácido hidroxicinámico, Cromonas, Cumarinas, Isocumarinas, Polipropenos
10	C ₆ -C ₄	Naftoquinonas
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos, Antraquinonas
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides, Isoflavonoides
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanós, Neolignanós
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides
N	(C ₆ -C ₃) _n	Lignanós
	(C ₆) _n	Catecolmelanina
	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos condensados

Así, los compuestos fenólicos comprenden desde moléculas simples como los ácidos benzoicos hasta polímeros complejos como los taninos condensados. Los compuestos fenólicos de alto peso molecular, como los taninos condensados e hidrolizables, actúan como antioxidantes fuertes. Muchos estudios han definido el potencial antioxidante de los compuestos fenólicos vegetales en términos de su capacidad para retardar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) actuando como antioxidantes que rompen cadenas.

La principal razón que ha hecho que el estudio de los compuestos fenólicos haya sido objeto de numerosas investigaciones en los últimos 15 años ha sido su contribución a la mejora de la salud. Se han dado evidencias de que los compuestos fenólicos ingeridos con la dieta habitual pueden tener implicaciones en la salud humana, concretamente en la reducción de la incidencia de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer. De hecho, desde 1990, varias organizaciones internacionales del ámbito de la nutrición como la OMS, la recomiendan un consumo diario de antioxidantes, principalmente a través de frutas y verduras, con el fin de prevenir o atenuar patologías asociadas al estrés oxidativo celular. Dentro de este grupo de antioxidantes se encontrarían carotenoides, licopenos, vitamina C, zinc, selenio, etc., además de los compuestos fenólicos. (Manach et al. 2004).

En el desarrollo de alimentos funcionales una de las áreas más prometedoras se fundamenta en la posibilidad de modular los sistemas redox y antioxidantes del organismo. Por ello, muchos de los alimentos funcionales que se desarrollan en la actualidad tienen la finalidad de incrementar el aporte de antioxidantes naturales a la dieta. Para ello, una interesante estrategia es la adición de extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos. Es posible, por tanto, aislar este tipo de compuestos bioactivos de las plantas y utilizarlos para el desarrollo de alimentos funcionales, suplementos o nutraceuticos.

1.3.1. Flavonoides

Los flavonoides son altamente efectivos en la prevención de la peroxidación de lípidos y la oxidación de las LDL, ambas implicadas en la etiología de la cardiopatía coronaria. Los flavonoides son potentes eliminadores de radicales de alquilo peroxilo y generalmente muestran una mayor actividad antioxidante en una base de mol a mol que el antioxidante "clásico" en la fase lipídica -tocoferol en modelos de membrana de la peroxidación lipídica. Se ha sugerido que las agliconas de flavonoides ubicadas cerca de la superficie de las membranas pueden proteger los lípidos de la membrana al eliminar los radicales de oxígeno generados en la fase acuosa. (Spitaler et al. 2009).

Entre los flavonoides, la actividad antioxidante se ve reforzada por la presencia de un doble enlace 2,3 en el anillo C, un grupo hidroxilo libre en la posición 3 en el anillo C y la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5.

Aunque los flavonoides han sido el foco de la mayoría de los estudios de antioxidantes en la dieta, las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos no flavonoides también se han investigado en varios ensayos de eliminación de radicales. El ácido gálico y sus ésteres metílicos muestran una actividad antioxidante significativa contra el catión ABTS, mientras que los ácidos monohidroxibenzoicos simples, como el ácido salicílico, no muestran una actividad de eliminación de radicales apreciable (Grace 2005). Sus hojas contienen C-glicósidos de flavonoides poco usuales. La isovitexina es el compuesto principal, pero también están presentes al menos otros siete flavonoides (Zehrmann et al. 2010). En la Ilustración 5 se muestra la estructura base de los flavonoides encontrados en esta especie.

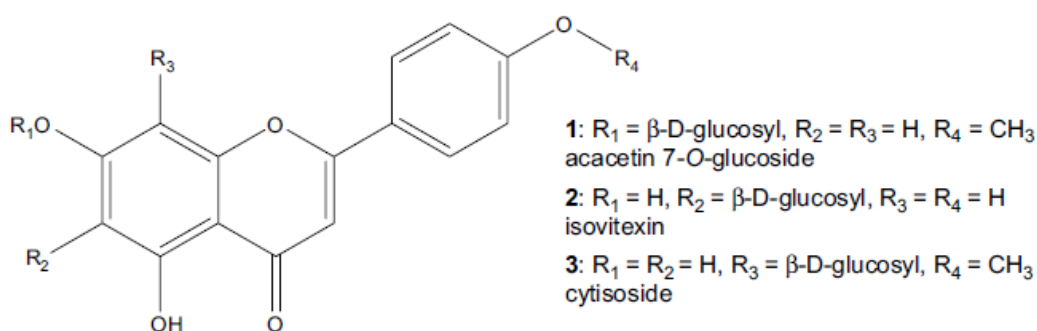


Ilustración 5. Estructura de los flavonoides encontrados en *Celtis Australis*.
(Spitaler et al. 2009).

1.4. Medida de la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos

Varios modelos *in vitro* han estado desarrollados para simular las condiciones de la digestión gastrointestinal humana, los más simples son los métodos estáticos. La biodisponibilidad puede ser definida como la fracción de componentes ingeridos disponibles en el sitio de acción para la utilización en las funciones fisiológicas normales y es determinada a través de ensayo *in vivo*. Cantidad de sustancia que se absorbe y alcanza la circulación sistémica, momento en el cual puede distribuirse por los tejidos y alcanzar los lugares donde ejercer su efecto fisiológico (Parada and Aguilera 2007).

Debido a esto, es fundamental que los compuestos sean biodisponibles para que las propiedades beneficiosas que se les otorgan tengan realmente lugar en el consumidor, independientemente de la cantidad en la que aparezcan en la dieta.

Por tanto, hay que conocer el grado de biodisponibilidad de los compuestos para caracterizar su potencial saludable real. La biodisponibilidad es el resultado de tres principales pasos:

- Digestibilidad y solubilidad de los alimentos en tracto gastrointestinal.
- Absorción de los elementos por parte de las células gastrointestinales.
- Transporte mediante la circulación e incorporación a la circulación.

La biodisponibilidad, además, incluye dos condiciones adicionales, la bioaccesibilidad y la bioactividad.

1.4.1. Métodos estáticos: digestión *in vitro*

En el pasado, se han desarrollado varios métodos *in vitro* para simular las condiciones fisiológicas y la secuencia de eventos que ocurren durante la digestión en el tracto gastrointestinal humano. Los métodos estáticos constituyen las técnicas más simples al respecto e incluyen dos o tres etapas de la digestión cuyos productos permanecen inmóviles en un único biorreactor estático. Estos métodos simulan un número limitado de parámetros de la digestión fisiológica y no imitan los procesos físicos tales como la hidratación, la mezcla, los cambios en las condiciones a lo largo del tiempo o la peristalsis.

En un primer paso, la digestión gastrointestinal simulada se aplica a alimentos homogeneizados o compuestos aislados en un sistema cerrado. La cantidad de componente solubilizado se puede usar como medida de la biodisponibilidad de un componente, o nutriente o bioactivo (Minekus et al. 2014).

1.4.2. Condiciones de la digestión *in vitro*

Es necesario tener en cuenta las condiciones de la digestión *in vivo* cuando aplicamos los métodos de la digestión *in vitro*, a fin de obtener la máxima reproducibilidad.

El proceso de masticación en la boca puede llevar desde unos pocos segundos a unos minutos y el pH de la saliva es cercano al pH neutro. En esa etapa no se espera una disolución significativa de compuestos a partir de la muestra. A esto se debe que la mayoría de métodos solamente incluyen las fases gástrica e intestinal de la digestión, y es, quizás, el más difícil de simular para comidas sólidas. En lugar de tal procesamiento, los métodos emplean una etapa de homogenización.

La fase gástrica es realizada con HCl o HCl-pepsina bajo condiciones fijas de pH y temperatura para un periodo de tiempo determinado. La comida es homogenizada en una disolución acuosa y, normalmente, la pepsina es añadida siguiendo un ajuste del pH a 1-2. La muestra se incuba a una temperatura de 37 °C durante 1 a 3 h, manteniendo en todo momento el pH constante. Algunos autores añaden mucina en los pasos de la digestión a fin de mejorar la simulación de las secreciones fisiológicas.

La digestión intestinal necesita subsecuentes neutralizaciones, usualmente mediante la adición de NaOH o NaHCO₃ y la incubación con enzimas pancreáticos como lipasa, amilasa, ribonucleasa y proteasa con o sin sales biliares como emulsionantes. Ya que la mayoría de los nutrientes se absorben en el yeyuno y en el íleon, la mayoría de los estudios de digestión gastrointestinal ajustan el pH en torno a 6,5-7,5 a 37 °C durante 1 a 5 h.

Una serie de desventajas, como las limitaciones en el diseño experimental, las dificultades en la interpretación de los datos, el alto costo del equipo y la mano de obra, las restricciones éticas, las variaciones interindividuales y la falta de estándares de referencia certificados para comparar datos entre estudios limitan la utilidad de los métodos *in vivo* en contraste, los modelos *in vitro* son reproducibles, ya que permiten un mejor control de las variables experimentales que los estudios en animales o humanos, siempre que estén validados y estandarizados adecuadamente, con el uso de material de referencia si es necesario. En general, son métodos rápidos y simples ya que solo necesitan materiales que están disponibles de forma rutinaria en el laboratorio y, por lo tanto, son relativamente económicos y rentables.

Sin atender a su potencial y amplia aplicabilidad, ninguno de los modelos estáticos reproduce el entorno dinámico del intestino. No pueden evaluar la captación o absorción, ni la cinética de transporte, ni medir la competencia de los componentes alimenticios o nutrientes en el sitio de absorción como ocurre *in vivo*. Carecen de los cambios continuos en el pH y las tasas de flujo de secreción, la participación del sistema inmunológico local, etc. A pesar de sus limitaciones, los resultados obtenidos por los modelos *in vitro* se pueden correlacionar con los estudios en humanos.

En condiciones gastrointestinales, los compuestos fenólicos están expuestos a cambios fisicoquímicos. Por lo tanto, es importante comprobar la estabilidad y

absorción de estos compuestos en el aparato digestivo para comprender y evaluar de manera óptima sus propiedades biológicas. Los modelos de digestión *in vitro* se usan de forma copiosa para determinar la estabilidad de las sustancias fitoquímicas en condiciones gastrointestinales. A pesar de que los sistemas *in vitro* se ven dificultados por su incapacidad para reproducir la complejidad del sistema gastrointestinal, estos modelos se han utilizado cada vez con mayor frecuencia para estudiar los cambios en los componentes de la dieta durante la digestión.

Los polifenoles procedentes de la dieta en un primer lugar, se ven sometidos a todo el proceso de digestión, en el cual factores como el pH gástrico e intestinal, las fermentaciones intestinales, la secreción biliar, el tiempo de tránsito en el tubo digestivo, etc., pueden afectar a la biodisponibilidad en general y a la absorción de los polifenoles en particular (Ilustración 6). La mayoría de los compuestos fenólicos se encuentran en los alimentos en forma de ésteres, glicósidos o polímeros. Generalmente, los glicósidos resisten a la hidrólisis ácida del estómago y llegan intactos al duodeno. Una vez alcanzan el intestino delgado, se desarrolla el proceso de absorción. Los compuestos fenólicos pueden sufrir metabolismo de fase I, donde serán hidrolizados y/o deconjugados, o metabolismo de fase II, dentro del enterocito, donde pueden ser conjugados mediante reacciones principalmente de metilación, glucuronidación, sulfatación o sus combinaciones. Estas reacciones de fase II son más frecuentes en el hígado ya que su finalidad es aumentar la polaridad de las sustancias exógenas, para facilitar al organismo su excreción. La absorción y metabolización se ve influenciada por factores tales como la liposolubilidad o hidrosolubilidad de la molécula, la unión a azúcares o ácidos grasos o el grado de polimerización.

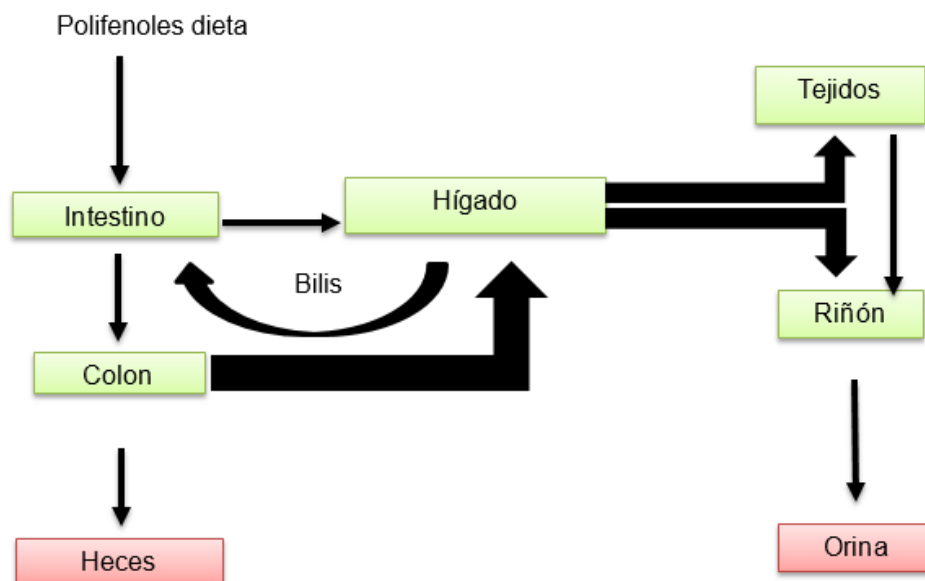


Ilustración 6. Procesamiento de los polifenoles en la digestión.
(Bokkenheuser et al. 1987).

El grado de polimerización de los compuestos fenólicos determina la facilidad con la que son absorbidos en el intestino. Las formas diméricas o poliméricas de los compuestos fenólicos, en general, no son hidrolizadas a nivel gástrico, por lo que llegan intactos al intestino delgado (Gee et al. 1998). Se especula con la posibilidad de que exista una inhibición competitiva entre polifenoles y compuestos xenobióticos en el intestino. Por lo general, en el intestino delgado solamente se absorben las agliconas y algunos glucósidos (Crespy, V. et al. 2002).

1.4.3. Métodos *in vitro* vs métodos *in vivo*

En conclusión, los investigadores que utilicen métodos estáticos deben considerar cómo adaptar las condiciones estáticas de digestión de acuerdo con la composición de la muestra y a los componentes alimentarios en estudio y buscar un equilibrio entre la simplificación técnica y la exactitud, y mantener siempre la situación *in vivo* como referencia con el fin de reproducir al máximo la situación fisiológica a través del modelo estático.

Además, es necesario conocer y evaluar las ventajas y desventajas de los modelos estáticos de digestión *in vitro* para diferentes muestras de alimentos. Por consiguiente, es urgente uniformar y normalizar las técnicas *in vitro*, en particular los métodos estáticos, para permitirse mejores diseños de estudio. En

este contexto, aunque tales métodos no puedan reproducir todas las condiciones encontradas en el entorno *in vivo*, su validación al menos permitirá la comparación de los resultados preliminares entre laboratorios, antes de la realización de estudios más avanzados (estudios *in vitro* dinámicos, el uso de cultivos celulares o experimentación *in vivo*) (Soler 2009).

1.5. Métodos para la determinación de la actividad antioxidante

1.5.1. Método DPPH

Hay un interés creciente en los antioxidantes, particularmente en aquellos destinados a prevenir los presuntos efectos nocivos de los radicales libres en el cuerpo humano. El ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) consiste en un ensayo simple, rápido y económico. Está basado en la medición de la capacidad de los antioxidantes de captar el radical DPPH[•], observándose un descenso de la absorbancia medida a 515 nm (coloración violeta) (Ilustración 7).

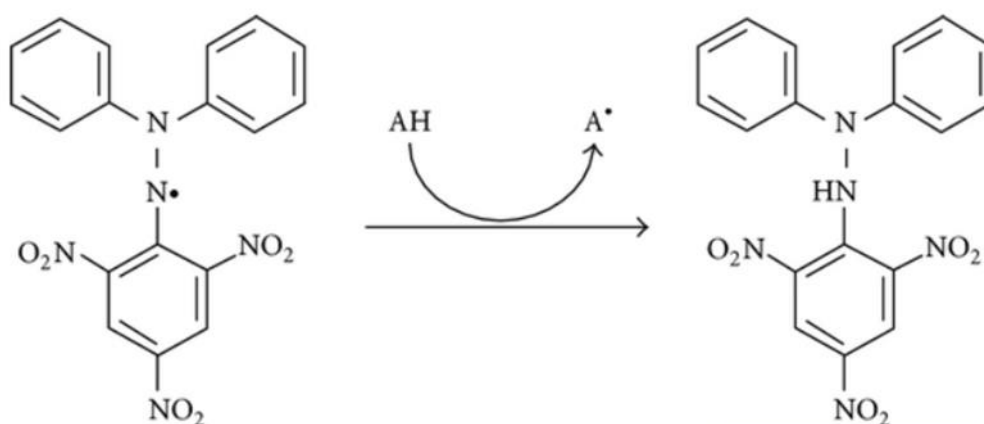


Ilustración 7. Reacción del radical DPPH[•] captando un átomo de H a una molécula de antioxidante.

Se caracteriza por ser un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón de reserva sobre la molécula en su conjunto, de modo que las moléculas no se dimerizan, como sería el caso con la mayoría de los otros radicales libres. La deslocalización también da lugar al color violeta profundo, caracterizado por una banda de absorción en solución de etanol centrada a aproximadamente 515 nm.

Cuando una solución de DPPH se mezcla con la de una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, entonces esto da lugar a la forma reducida con la pérdida de este color violeta. Este radical contiene nitrógeno en su estructura y es de los pocos disponibles de forma comercial, debido a su gran estabilidad en estado sólido y sólo es soluble en disolventes orgánicos, siendo su estabilidad dependiente del disolvente usado en este caso metanol, que no cambia las condiciones de absorbancia de forma significativamente durante unas dos horas y media, aproximadamente. Se usa habitualmente Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como estándar para construir la recta de calibrado (Teixeira et al. 2013).

1.5.2. Método ABTS

El ensayo ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-ácido sulfónico) (Ilustración 8) es un método simple pero eficaz para determinar la capacidad antioxidante. En este ensayo se mide la capacidad de captación de radicales libres catiónicos $ABTS^{•+}$, que se generan a partir de ABTS por reacción con persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$).

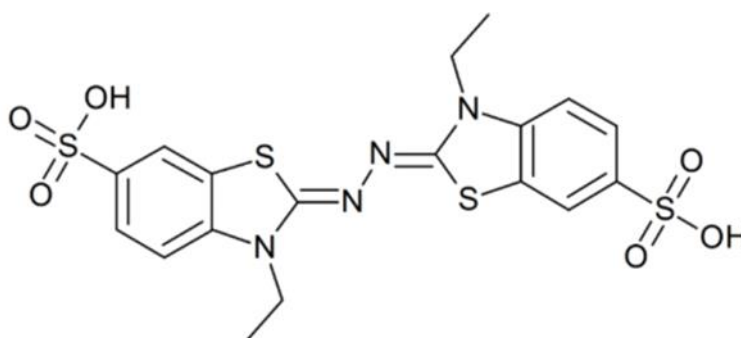


Ilustración 8. Estructura del ABTS.

El ensayo consiste en cuantificar el decrecimiento en la intensidad de la coloración del radical formado $ABTS^{•+}$, de color azul intenso, con un máximo de absorbancia a los 734 nm. La recta de calibrados se construye con disoluciones de Trolox como estándar (Ilustración 9). En este ensayo, al igual que ocurre en el test DPPH, la señal va disminuyendo a medida que aumenta la concentración de Trolox en la recta patrón (Scotti et al. 2007).

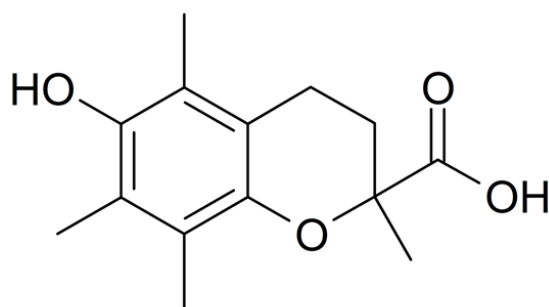


Ilustración 9. Estructura química del Trolox.

1.6. Métodos para la determinación del contenido total en polifenoles y flavonoides

1.6.1. Ensayo de Folin-Ciocalteu

Se emplea para la determinación del contenido total en polifenoles basándose en la reacción entre los compuestos fenólicos y este reactivo, dando lugar a una intensa coloración azul a simple vista que permite su determinación espectrofotométrica a 765 nm.

El reactivo de Folin-Ciocalteu se compone de fosfomolibdato y fosfotungstato, mezcla capaz de reaccionar con cualquier sustancia reductora (además de los polifenoles) en condiciones básicas (pH próximo a 10) para así generar iones fenolato tras la disociación de los polifenoles. Se utiliza una recta patrón de ácido gálico (Ilustración 10) en metanol para obtener el contenido total de polifenoles.

Es reseñable que algunos compuestos reductores naturalmente presentes como el ácido ascórbico (Vitamina C), azúcares reductores (fructosa y glucosa) y ciertos aminoácidos pueden interferir en los resultados del método. Aun así, es un ensayo que se sigue realizando a día de hoy puesto que, al haberse utilizado en la inmensa mayoría de los trabajos de investigación en plantas o productos derivados de las mismas, permite una comparación aproximada del contenido en polifenoles. En este ensayo la señal va aumentando conforme lo hace la concentración de ácido gálico.

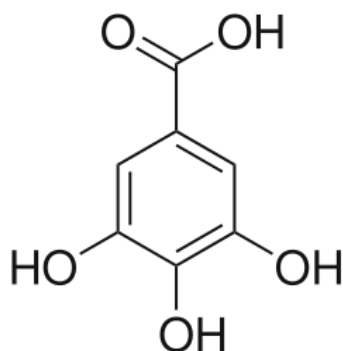


Ilustración 10. Estructura del ácido gálico.

1.6.2. Ensayo de tricloruro de Aluminio

Se emplea para la determinación del contenido total en flavonoides debido a su gran capacidad de formación de complejos con los flavonoides. Así, en el ensayo se lleva a cabo la medición de esta capacidad de producir quelatos con un color amarillo muy característico, con el máximo de absorbancia a 415 nm usando una recta patrón de quercetina (Ilustración 11) para estandarizar el método y obtener el contenido en flavonoides de la muestra. En este ensayo la señal de la absorbancia aumenta conforme lo hace la concentración de quercetina.

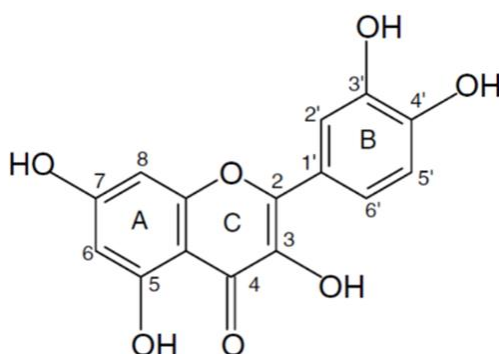


Ilustración 11. Estructura química de la quercetina.

2. OBJETIVOS

El propósito de este trabajo de fin de grado es la caracterización química de extractos fenólicos de hojas de la planta *Celtis Australis* a fin de obtener información útil sobre la posible presencia en ellos de compuestos bioactivos con propiedades terapéuticas. Los objetivos específicos del presente trabajo son:

- 1- Estudiar el contenido en polifenoles y flavonoides de extractos acuosos y metanólicos de hojas de *Celtis Australis*.
- 2- Estudiar la actividad antioxidante de extractos acuosos y metanólicos de hojas de *Celtis Australis*.
- 3- Estudiar el efecto de una digestión simulada *in vitro* en el contenido en polifenoles y flavonoides de extractos acuosos de hojas de *Celtis Australis*, preparados en forma de infusión.
- 4- Estudiar el efecto de una digestión simulada *in vitro* en la actividad antioxidante de extractos acuosos de hojas de *Celtis Australis*, preparados en forma de infusión.

Este estudio puede servir de punto de partida para la aplicación comercial de estos extractos vegetales como suplementos dietarios o preparación de fitofármacos. Con la técnica de digestión *in vitro*, que simula una digestión humana tipo, se pretende poner de manifiesto qué cantidad de compuestos bioactivos van a ser absorbibles (biodisponibles) en nuestro cuerpo, es decir, cuantificar aquellos que realmente van a poder ejercer un efecto beneficioso en el organismo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos, aparatos e instrumentación

Para llevar a cabo el procedimiento experimental se han utilizado diferente material, aparatos e instrumentos de laboratorio, entre los que encontramos:

- Sonda de ultrasonidos “Qsonica Sonicators”, de 55 W y a 20 kHz de frecuencia
- Rotavapor Hei-Vap Precision (Heidolf; Schawabach; Germany)
- Liofilizador Telstar Lyoquest -55 ECO. (Ilustración 12).
- pH-metro Crison
- Espectrofotómetro UV-Vis Cary 50 Bio (Varian; Agilent, Madrid, Spain)
- Balanza analítica Sartorius
- Baño de agua (Julabo SW22, Seelbach, Germany) a 37 °C
- Liofilizador (ModulyoD/23 ThermoSavant, Waltham, MA, USA)
- Congeladores de -20°C y -80°C
- Matraces aforados de 25 mL, 50 mL y de 100 mL
- Vasos de precipitado 100 mL
- Pipetas automáticas
- Cubetas de plástico
- Tubos de ensayo
- Tubos Eppendorf de 1 y 2 mL
- Embudos
- Matraces de fondo redondo de 25 mL
- Molinillo de café
- Viales de 2 mL



Ilustración 12. Liofilizador empleado.

En cuanto a los reactivos:

- KCl (>99%), urea, CaCl_2 (>98%), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (>99%), NH_4Cl y KH_2PO_4) fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Germany).

El resto de reactivos fueron obtenidos de “Sigma-Aldrich”, siendo los siguientes en función del ensayo:

- Digestión *in vitro*: mucina (de estómago de cerdo), pepsina (de mucosa gástrica de cerdo), pancreatina y lipasa (de páncreas de cerdo), extracto biliar de cerdo, MgCl_2 (>99%).
- Ensayo ABTS: trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (97%), persulfato potásico, etanol (96%) y ABTS (sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (98%).
- Ensayo DPPH: trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (97%), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (>99%).
- Ensayo TPC: ácido gálico (98%), reactivo de Folin-Cioaltea, carbonato sódico (99%).
- Ensayo TFC: acetato de potasio (99%), tricloruro de aluminio hexahidratado (99%), quercetina (95%).
- Además de los reactivos utilizados en específico en cada ensayo, también se usaron algunos comunes: metanol (>99%) y agua ultrapura (obtenida

por el sistema de purificación de agua Milli-Q ultra pura de Millipore (Milford, EEUU)).

3.2. Muestras de *Celtis australis*

Las hojas de almez fueron recolectadas en el mes de noviembre en el jardín botánico de la Universidad de Jaén, situado a unos 573 m sobre el nivel del mar. Se lavaron, secaron y se liofilizaron. Se trituraron después en un molinillo eléctrico y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

3.3. Extracción de la fracción fenólica de *Celtis australis*

La extracción se llevó a cabo en dos disolventes diferentes, en metanol y en agua a 100°C. En el caso de la extracción con agua se ensayaron dos tiempos diferentes, 5 y 30 min.

3.3.1. Extracción en metanol

Se pesaron alrededor de 2,5 g de la muestra liofilizada y triturada y se añadieron a un matraz de fondo redondo previamente pesado. Se añadieron 50 mL de metanol dejando el matraz durante 30 min en un baño ultrasonidos en el que se controla la temperatura evitando que esta no supere los 30°C en ningún momento durante el tiempo que se encuentra dentro el matraz. En el caso de que llegase a ocurrir, se paliaría añadiendo hielo al baño. Seguidamente la muestra fue filtrada. Se eliminó luego el disolvente en un rotavapor. Finalmente, se pesó el matraz de fondo redondo para determinar el peso de extracto metanólico. Se prepararon dos réplicas. (Ilustración 13).



Ilustración 13. Extracto en metanol.

3.3.2. Extracción en agua a 100°C durante 30 min

Se pesaron alrededor de 2,5 g de la muestra liofilizada y triturada. Se añadieron 150 mL de H₂O a un matraz Erlenmeyer y se calentó hasta 100 °C. Una vez alcanzada dicha temperatura, se añadió la muestra y se dejó infusionando durante 30 min. Una vez alcanzado dicho tiempo, se dejó enfriar la infusión y se filtró sobre una duquesita previamente pesada. El extracto obtenido se liofilizó y, finalmente se pesó la duquesita para determinar de manera cuantitativa el peso de extracto acuoso.

3.3.3. Extracción en agua a 100°C durante 5 min (infusión)

Se procedió de la misma manera que en la extracción en agua a 100°C durante 30 min (subapartado anterior), con la única diferencia de que esta infusión se realizó durante 5 min en lugar de 30 min. Se prepararon dos réplicas. (Ilustración 14).

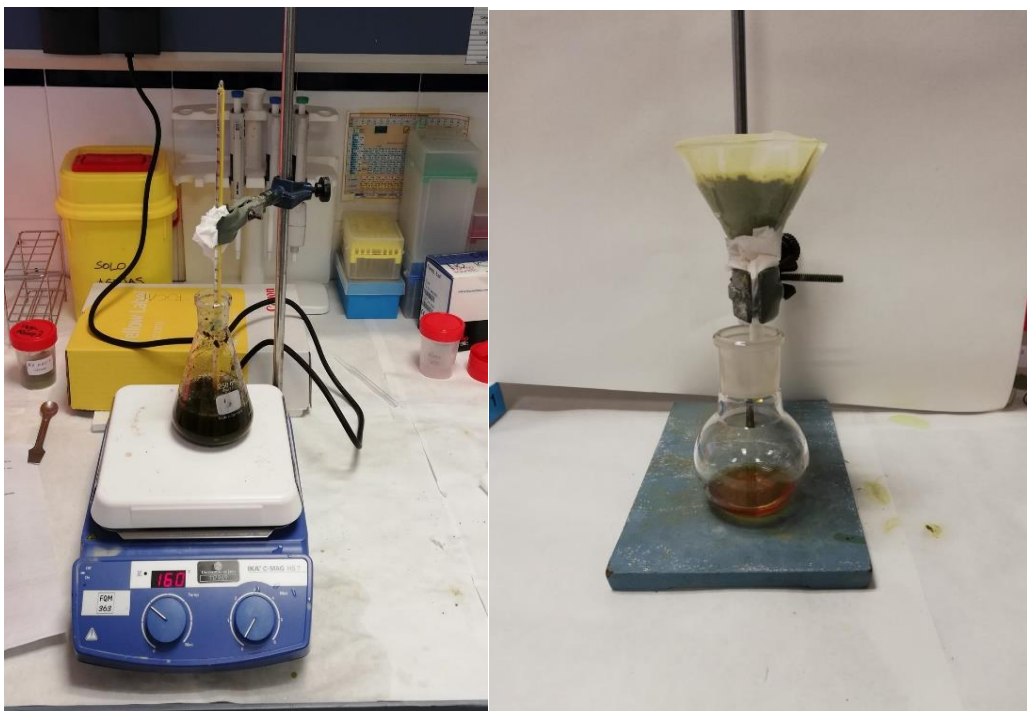


Ilustración 14. Montajes de la infusión.

3.4. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos

Las determinaciones que se detallan a continuación se llevaron a cabo sobre los tres extractos preparados anteriormente (metanol, agua a 100 °C 30 min y agua a 100 °C 5 min):

3.4.1. Actividad antioxidante frente a DPPH

Se procedió de la siguiente manera:

1. **Disolución 1:** Preparamos una disolución del extracto a medir en MeOH a una concentración adecuada para poder interpolar su señal en la recta de calibrado.
2. **Disolución 2:** Preparamos una disolución de DPPH 0,06 mM en MeOH.
3. **Disoluciones patrón:** Preparamos la recta de calibrado mostrada a continuación de concentraciones de 0,025-0,8 mM de trolox en MeOH.
4. A continuación, añadimos todas las disoluciones anteriores en tubos de ensayo, etiquetados cada uno como corresponde, tanto los de la recta de calibrado como los de las muestras a analizar. Las cantidades que se añadieron fueron las siguientes:
 - Disolución 1: 100 µL.
 - Disolución 2: 3,5 mL

Seguidamente, tras añadir las cantidades que corresponden a cada tubo de ensayo, se agitaron y se guardaron en una gradilla en oscuridad durante 30 min. Finalmente se midió la absorbancia a 516 nm. Los resultados obtenidos se expresaron en μmol de trolox por cada 100 g de extracto seco.

3.4.2. Actividad antioxidante frente a ABTS

Se procedió de la siguiente manera:

1. **Disolución 1:** En primer lugar, se procedió a la generación del radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$. Para ello, se preparó una **disolución A**: 54.8 mg ABTS en 50 mL H_2O , obteniéndose una concentración 2 mM. Se preparó una **disolución B**: 189.2 mg $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ en 10 mL de H_2O , obteniéndose una concentración 70 mM. Se añadieron luego a la disolución A 200 μL de la disolución B, se agitó y se cubrió con aluminio durante 12-16 h a temperatura ambiente. Se diluyó luego la disolución obtenida con etanol hasta obtener una absorbancia inicial de 0.7 ± 0.02 a 734 nm.
2. **Disolución 2:** Llevamos a cabo la preparación del extracto que se iba a medir en MeOH a una concentración adecuada para poder interpolar su señal en la recta de calibrado.
3. **Disoluciones patrón:** Preparamos la recta de calibrado con concentraciones de 0,01-0,4 mM de trolox en MeOH. (Ilustración 15).
4. A continuación, añadimos las disoluciones anteriores en tubos de ensayo, etiquetados cada uno como corresponde, tanto los de la recta de calibrado como los de las muestras a analizar. Las cantidades que se añadieron fueron las siguientes:
 - Disolución 1: 1,8 mL
 - Disolución 2: 100 μL

Seguidamente, tras añadir las cantidades que corresponden a cada tubo de ensayo, se agitaron y se guardaron en una gradilla en oscuridad durante 10 min. Finalmente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 734 nm.

Los resultados se expresaron en μmol de trolox por cada 100 g de extracto seco.



Ilustración 15. Recta de calibrado del método ABTS.

3.5. Determinación del contenido total en polifenoles y flavonoides de los extractos

Las determinaciones de los contenidos totales en polifenoles y flavonoides (TPC Y TFC) fueron realizados usando el método de *Folin-Ciocalteu* y tricloruro de aluminio, respectivamente.

3.5.1. Contenido total en Polifenoles

Para llevar a cabo la determinación del contenido total en polifenoles (TPC) se procedió de la siguiente manera:

1. **Disolución 1:** Llevamos a cabo la preparación del extracto que se iba a medir en MeOH a una concentración adecuada para poder interpolar su señal en la recta de calibrado.
2. **Disolución 2:** Preparamos una disolución de reactivo de *Folin-Ciocalteu* en agua MilliQ (diluido 1:10).
3. **Disolución 3:** Preparamos una disolución de Na_2CO_3 en agua MilliQ (7,5% p/v).
4. **Disoluciones patrón:** Preparamos la recta de calibrado con concentraciones de 25-400 ppm de ácido gálico en MeOH. (Ilustración 16).

5. A continuación, añadimos todas las cantidades de las disoluciones anteriores en tubos de ensayo, etiquetados cada uno como corresponde, tanto los de la recta de calibrado como los de las muestras que se iban a analizar. Las cantidades que se añaden son las siguientes:

- **Disolución 1:** 50 μ L.
- **Disolución 2:** 1,25 mL
- **Disolución 3:** 1 mL
- **Disoluciones patrón:** 50 μ L

Seguidamente, tras añadir las cantidades que corresponden a cada tubo de ensayo, se agitaron y se guardaron en una gradilla en oscuridad durante 30 min. Finalmente medimos la absorbancia a 765 nm.

Los resultados obtenidos fueron expresados en mg de ácido gálico por 100 g de extracto seco.



Ilustración 16. Recta de calibrado TPC.

3.5.2. Contenido total en Flavonoides

Para llevar a cabo la determinación del contenido total en flavonoides (TFC) se procedió de la siguiente manera:

1. **Disolución 1:** Preparamos una disolución del extracto que se iba a medir en MeOH a una concentración adecuada para poder interpolar su señal en la recta de calibrado.

2. **Disolución 2:** Preparamos una disolución de CH_3COOK de concentración 1M en MeOH.
3. **Disolución 3:** preparamos una disolución de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 10% p/v en MeOH.
4. **Disoluciones patrón:** Preparamos la recta de calibrado con concentraciones de 5-150 ppm de quercetina en MeOH.
5. A continuación, añadimos todas las cantidades de las disoluciones anteriores en tubos de ensayo, etiquetados cada uno como corresponde, tanto los de la recta de calibrado como los de las muestras que se iban a analizar. Las cantidades que se añaden son las siguientes:
 - Disolución 1: 0,5 mL
 - Disolución 2: 0,1 mL
 - Disolución 3: 0,1 mL
 - También añadimos 1,5 mL de MeOH HPLC y 2,8 mL de agua MilliQ.

Seguidamente, tras añadir las cantidades que corresponden a cada tubo de ensayo, se agitaron y se guardaron en una gradilla en oscuridad durante 30 min. Finalmente medimos la absorbancia a 415 nm.

Los resultados obtenidos se expresaron en mg de quercetina por cada 100 g de extracto seco.

3.6. Digestión *in vitro* de los extractos acuosos (infusión)

En primer lugar, se prepararon las disoluciones que simulan los diferentes jugos que se irán añadiendo en cada etapa.

- **Jugo gástrico:** 100 mL de agua destilada; 0.55 g de NaCl; 0.164 g de KCl; 0.08 g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0.0532 g de NaH_2PO_4 ; 0.0612 g de NH_4Cl ; 0.018 g de urea; 1.3 mL de HCl concentrado. Ajustar el pH a 1.30 ± 0.02 con NaOH o HCl 1M según convenga. Una vez ajustado el pH se añade 0.5 g de pepsina y 0.6 g de mucina.

- **Jugo duodenal:** 100 mL de agua destilada; 1.406 g de NaCl; 0.114 g de KCl; 0.678 g de NaHCO_3 ; 16.06 mg de KH_2PO_4 ; 10,08 mg de MgCl_2 ; 0.02 g de urea; 0.03 mL de HCl concentrado. Ajustar el pH a 8.1 ± 0.2 con NaOH o NaOH 1M según convenga. Una vez ajustado el pH se añade 1.804 g de pancreatina y 0.3 g de lipasa.

- **Jugo biliar:** 100 mL de agua destilada; 1.054 g de NaCl; 0.076 g de KCl; 1.158 g de NaHCO₃; 0.052 g de urea; 0.03 mL de HCl concentrado. Ajustar el pH a 8.2 ± 0.2 con NaOH o NaOH 1M según convenga. Una vez ajustado el pH se añade 2.402 g sal biliar. La vida útil de estas disoluciones es de 1 semana. Una vez preparadas las disoluciones, se lleva a cabo el ensayo.

El modelo que seguimos para llevar a cabo el proceso de digestión de nuestros extractos fue el siguiente (Pinto et al. 2017), que consiste en dos etapas secuenciales:

- 1) Se añaden 200 mg del extracto acuoso liofilizado obtenido en el apartado 3.3.3. y 10 mL de jugo gástrico a un tubo Falcon de 50 mL. Se agita y se incuba en baño de agua a 37 °C, en oscuridad y con agitación constante durante 2 h.
- 2) A continuación, se añaden 10 mL de jugo duodenal y 4 mL de jugo biliar al contenido del punto 1. Igualmente, se agita y se incuba en baño de agua a 37 °C, en oscuridad y con agitación constante durante 2 h.
- 3) Una vez finalizado el proceso (2h + 2h), la mezcla se congela a -80 °C para detener el proceso de digestión. Al día siguiente, se descongela, se centrifuga y se filtra. El sólido y el líquido se liofilizan para análisis posteriores.

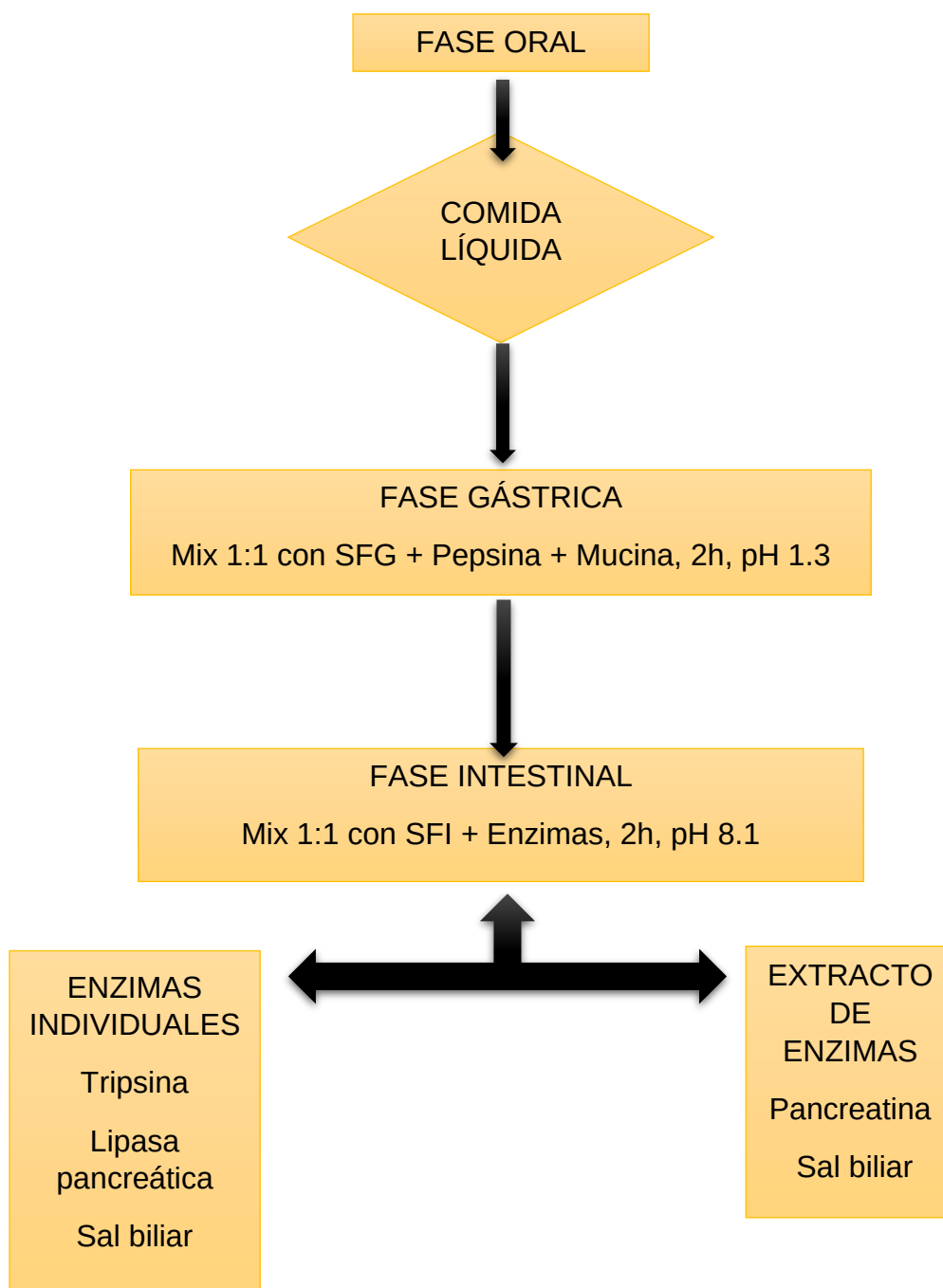


Ilustración 17. Diagrama de una simulación de digestión *in vitro*. SGF: Simulación de Fluidos Gástricos; SIF: Simulación de Fluidos Intestinales.

3.7. Determinación de la actividad antioxidante y contenido total en polifenoles y flavonoides de los extractos acuosos tras digestión *in vitro*

Tras la digestión *in vitro* de la infusión, se llevaron a cabo las mismas determinaciones desarrolladas en los apartados 3.4.1, 3.4.2, 3.5.1 y 3.5.2.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actualmente existe poca información acerca del contenido en sustancias antioxidantes de la planta *Celtis Australis* debido a que a lo largo de los años se ha puesto más énfasis en la obtención de madera a partir de dicha planta. En otros estudios se han empleado como disolventes de extracción: agua a 80 °C, metanol y metanol:agua (80:20). Por lo tanto, está claro que no existe un protocolo estándar para llevar a cabo la extracción de compuestos fenólicos, ya que tienen polaridades muy diferentes.

En este trabajo, se ha seleccionado como disolvente metanol y agua, uno de los extractantes más comunes para polifenoles. También se ha utilizado agua, ya que es común el uso de las hojas de almez para la preparación de infusiones. En este caso se han ensayado dos tiempos diferentes de extracción: (a) 5 min, que es el tiempo de extracción usual cuando se prepara una infusión, y (b) 30 min, a fin de estudiar si un aumento en el tiempo de extracción favorece la extracción. Se realiza una extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos, cuyos principales beneficios son su simplicidad y rapidez.

4.1. Actividad antioxidante antes de la digestión *in vitro*

Se determinó la actividad antioxidante (ABTS y DPPH) de los extractos en MeOH y agua a 100 °C (5 y 30 min) utilizando los procedimientos informados en el apartado 3.4. Las rectas de calibrado correspondientes se muestran en las Ilustraciones 18 y 19. Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 2 y 3, expresados en $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$ de extracto.

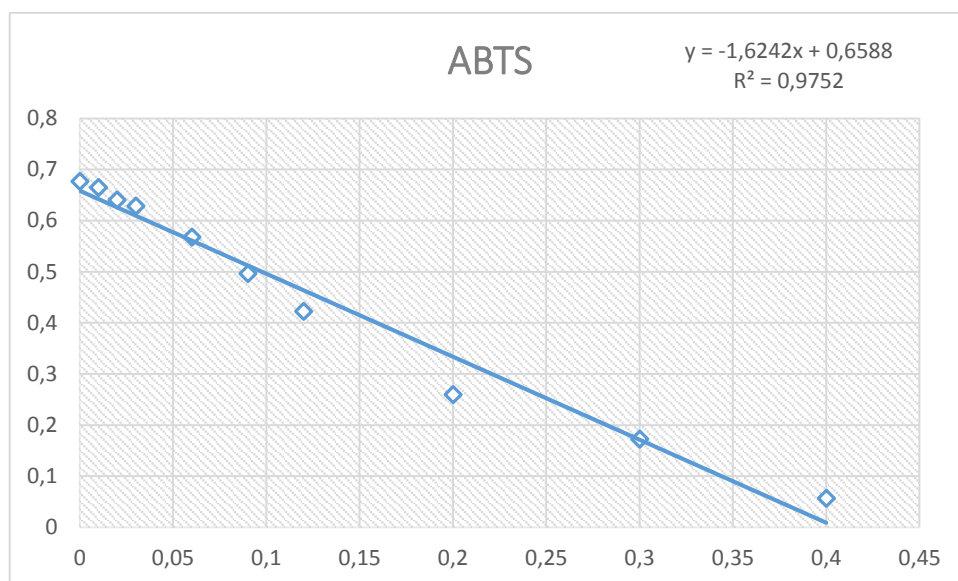


Ilustración 18. Recta de calibrado (método ABTS) antes de la digestión.

Tabla 2. Actividad antioxidante (método ABTS) antes de la digestión.

EXTRACTANTE	Actividad antioxidante ($\mu\text{mol trolox}/100 \text{ g DE}$)
Metanol 1	124000
Metanol 2	138800
Agua 30'	20250
1 Agua 5'	20565
2 Agua 5'	30400

DE: extracto seco.

La actividad antioxidante de los extractos en metanol (131.400 $\mu\text{mol trolox}/100 \text{ g DE}$), determinada por el método ABTS, es alrededor de 5 veces superior a la de los extractos acuosos (25.482 $\mu\text{mol trolox}/100 \text{ g DE}$). No hay diferencia significativa en el caso de la extracción en agua dependiendo del tiempo empleado.

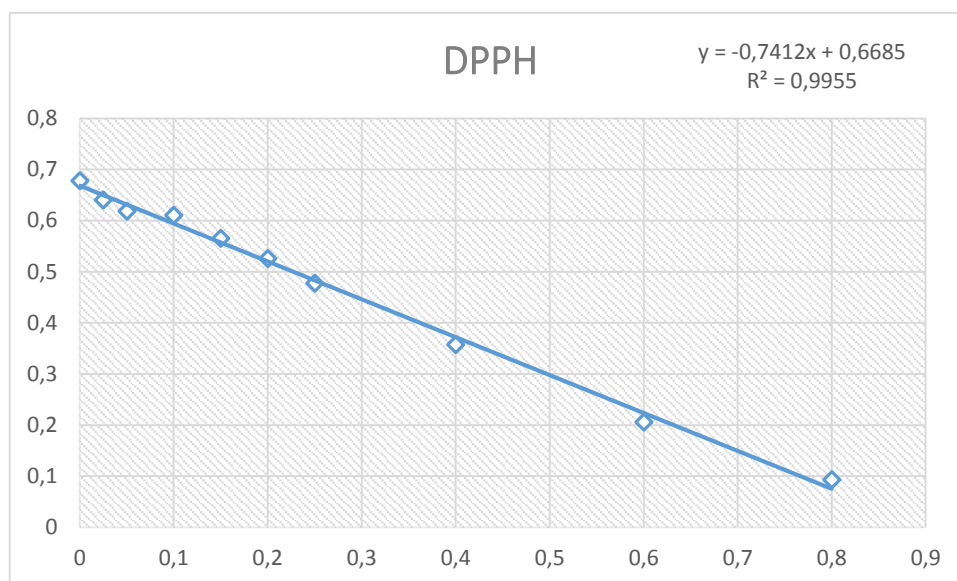


Ilustración 19. Recta de calibrado (método DPPH) antes de la digestión.

Tabla 3. Actividad antioxidante (método DPPH) antes de la digestión.

EXTRACTANTE	Actividad antioxidante ($\mu\text{mol trolox}/100 \text{ g DE}$)
Metanol 1	107500
Metanol 2	124500
Agua 30'	8200
1 Agua 5'	12000
2 Agua 5'	11400

DE: extracto seco.

La actividad antioxidante de los extractos en metanol ($116.000 \mu\text{mol trolox}/100 \text{ g DE}$), determinada por el método DPPH, es alrededor de 10 veces superior a la de los extractos acuosos ($11.700 \mu\text{mol trolox}/100 \text{ g DE}$). En el caso de la extracción con agua, parece que un aumento en el tiempo de extracción ocasiona una reducción en la actividad antioxidante. Por otra parte, en todos los casos, la actividad antioxidante frente al DPPH es inferior a la obtenida frente al radical ABTS.

4.2. Contenido total en polifenoles y flavonoides antes de la digestión *in vitro*

Se determinó el contenido total en polifenoles y flavonoides haciendo uso de los procedimientos descritos en el apartado 3.5. Las rectas de calibrado

correspondientes se muestran en las Ilustraciones 20 y 21. Los resultados se resumen en las Tablas 4 y 5, expresado en mg ácido gálico/100 g DE.

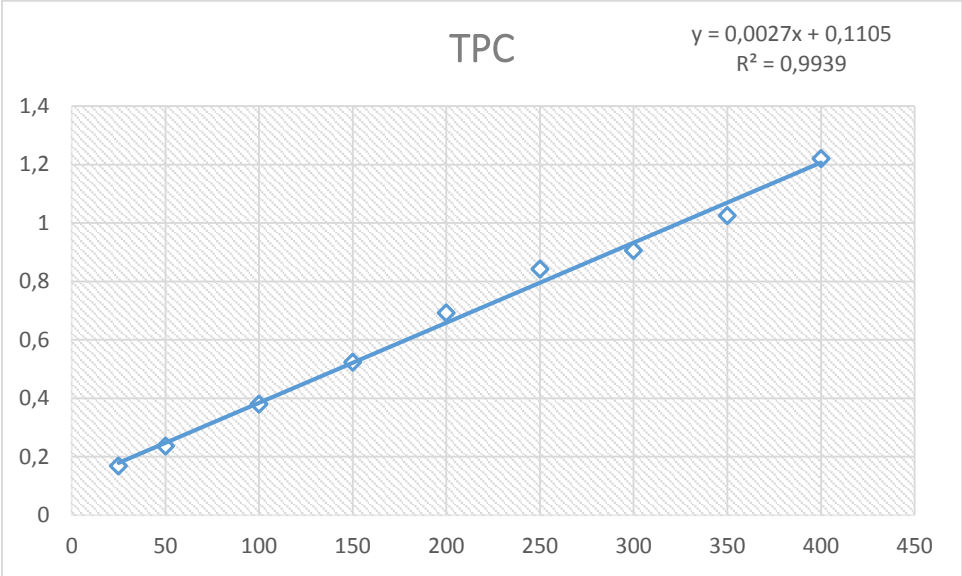


Ilustración 20. Recta de calibrado (método *Folin-Ciocalteu*) antes de la digestión.

Tabla 4. Contenido total en polifenoles antes de la digestión.

EXTRACTANTE	Actividad antioxidante (mg ácido gálico/100 g DE)
Metanol 1	13800
Metanol 2	14620
Agua 30'	10900
1 Agua 5'	5300
2 Agua 5'	5500

DE: extracto seco.

El contenido total en polifenoles obtenido con metanol como extractante (14.210 mg ácido gálico/100 g DE) fue superior al obtenido en agua, independientemente del tiempo de extracción. Por otra parte, un aumento en el tiempo de extracción con agua produce un aumento significativo en el contenido en polifenoles (10.900 mg ácido gálico/100 g DE para 30 min y 5.400 mg ácido gálico/100 g DE para 5 min).

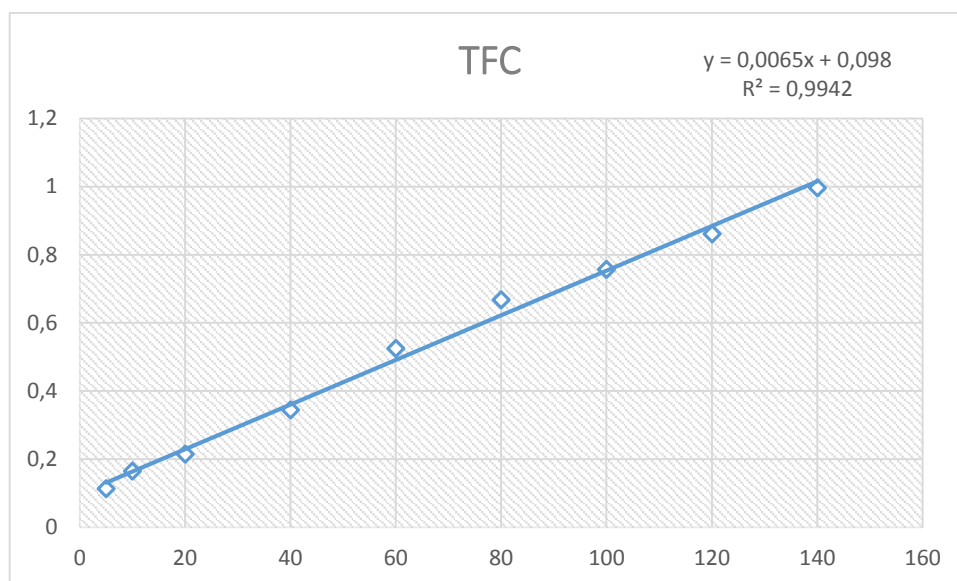


Ilustración 21. Recta de calibrado (método AlCl_3) antes de la digestión.

Tabla 5. Contenido total en flavonoides antes de la digestión.

EXTRACTANTE	Actividad antioxidante (mg QE/100 g DE)
Metanol 1	4046
Metanol 2	3877
Agua 30'	1760
1 Agua 5'	1120
2 Agua 5'	1530

QE: Quercetina; DE: extracto seco.

El contenido total en flavonoides obtenido con metanol como extractante (3.962 mg quercetina/100 g DE) fue superior al obtenido en agua, independientemente del tiempo de extracción. Por otra parte, un aumento en el tiempo de extracción con agua produjo un pequeño aumento en el contenido en flavonoides (1.760 mg quercetina /100 g DE para 30 min y 1.325 mg quercetina /100 g DE para 5 min).

4.3. Actividad antioxidante después de la digestión *in vitro*

Se determinó la actividad antioxidante (ABTS y DPPH) de la infusión (agua a 100 °C, 5 min) utilizando los procedimientos informados en el apartado 3.4. Las rectas de calibrado correspondientes se muestran en las Ilustraciones 22 y 23. Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 6 y 7, expresados en μmol Trolox/100 g de extracto.

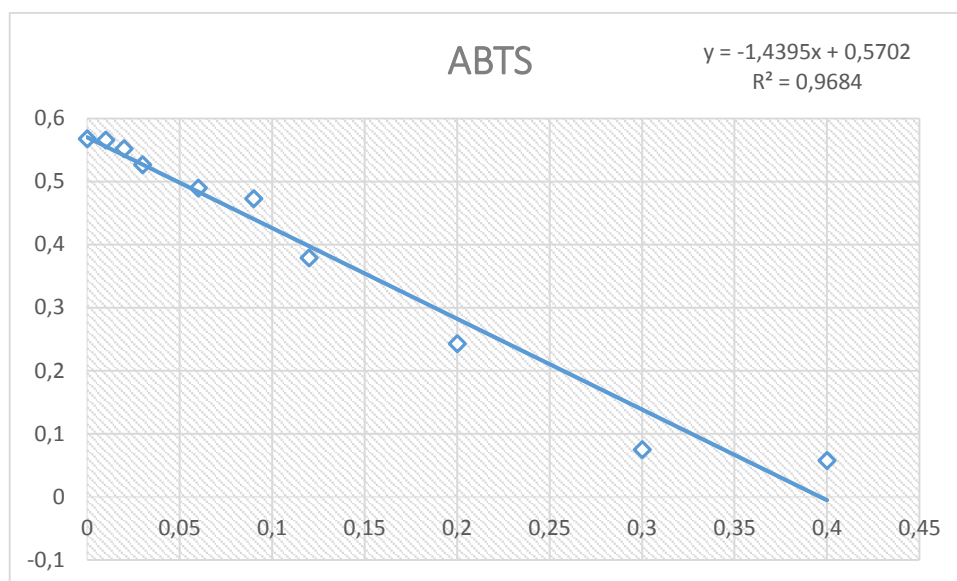


Ilustración 22. Recta de calibrado (método ABTS) tras el proceso de digestión.

Tabla 6. Actividad antioxidante (método ABTS) de la infusión tras la digestión.

Extractante	Actividad antioxidante ($\mu\text{mol trolox}/100\text{ g DE}$)
1 Agua 5'	12400
2 Agua 5'	14200

DE: extracto seco.

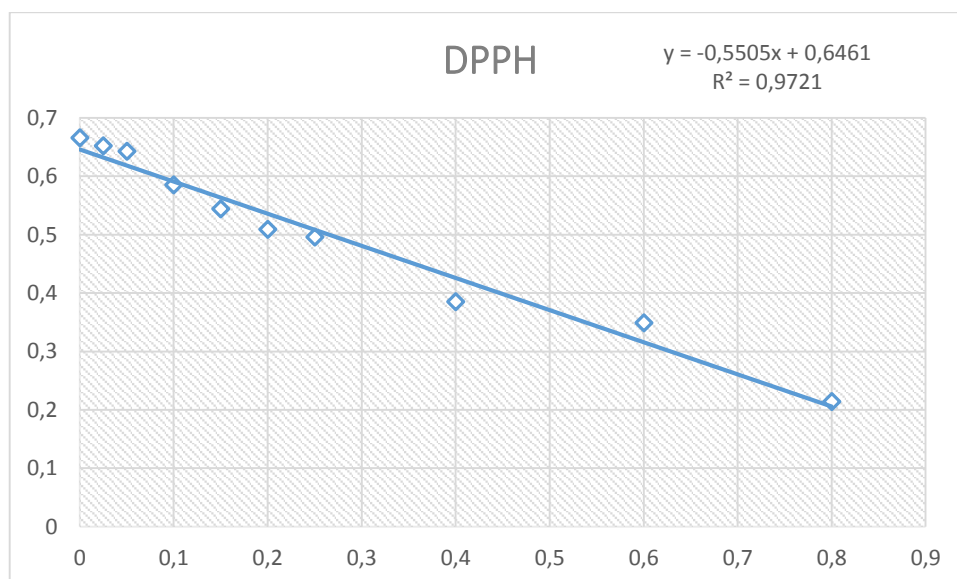


Ilustración 23. Recta de calibrado (método DPPH) tras el proceso de digestión.

Tabla 7. Actividad antioxidante (método DPPH) de la infusión tras la digestión.

Extractante	Actividad antioxidante ($\mu\text{mol trolox}/100\text{ g DE}$)
1 Agua 5'	3140
2 Agua 5'	3580

DE: extracto seco.

4.4. Contenido total en polifenoles y flavonoides después de la digestión *in vitro*

Se determinó el contenido total en polifenoles y flavonoides haciendo uso de los procedimientos descritos en el apartado 3.5. Las rectas de calibrado correspondientes se muestran en las Ilustraciones 24 y 25. Los resultados se resumen en las Tablas 8 y 9, expresado en mg ácido gálico/100 g DE.

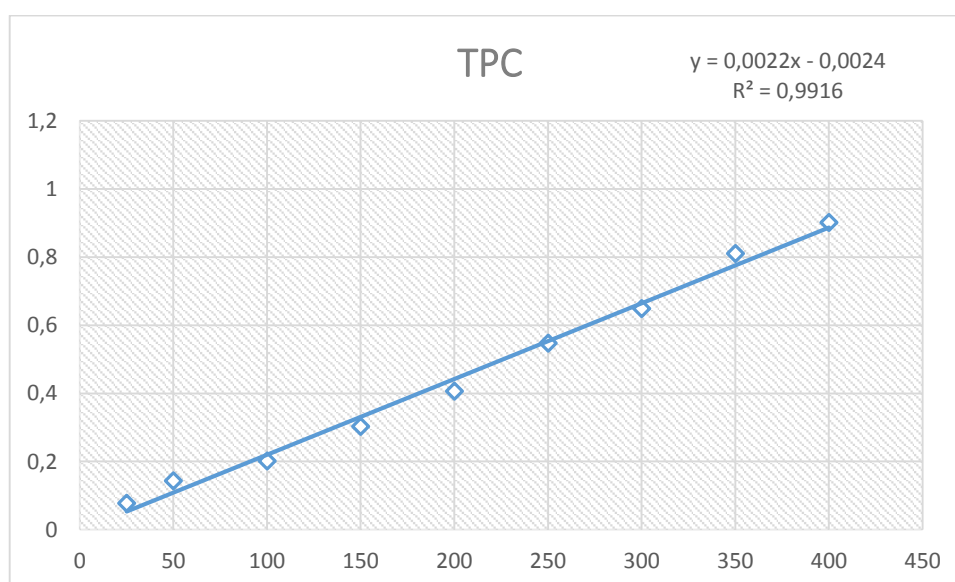


Ilustración 24. Recta de calibrado (método Folin-Ciocalteu) tras la digestión.

Tabla 8. Contenido total en polifenoles de la infusión tras la digestión.

Extractante	Actividad antioxidante (mg ácido gálico/100 g DE)
1 Agua 5'	1948
2 Agua 5'	1846

DE: extracto seco.

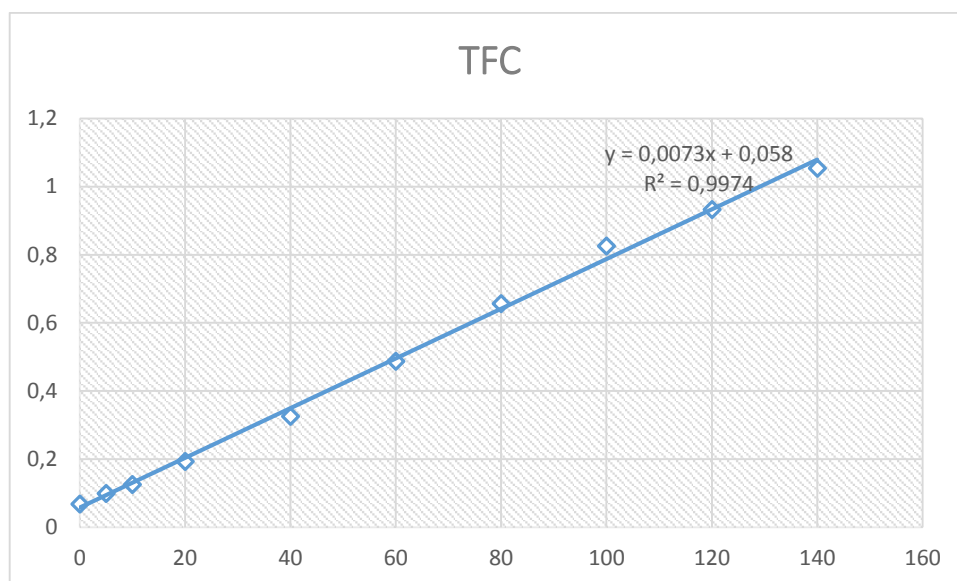


Ilustración 25. Recta de calibrado (método AlCl_3) tras la digestión.

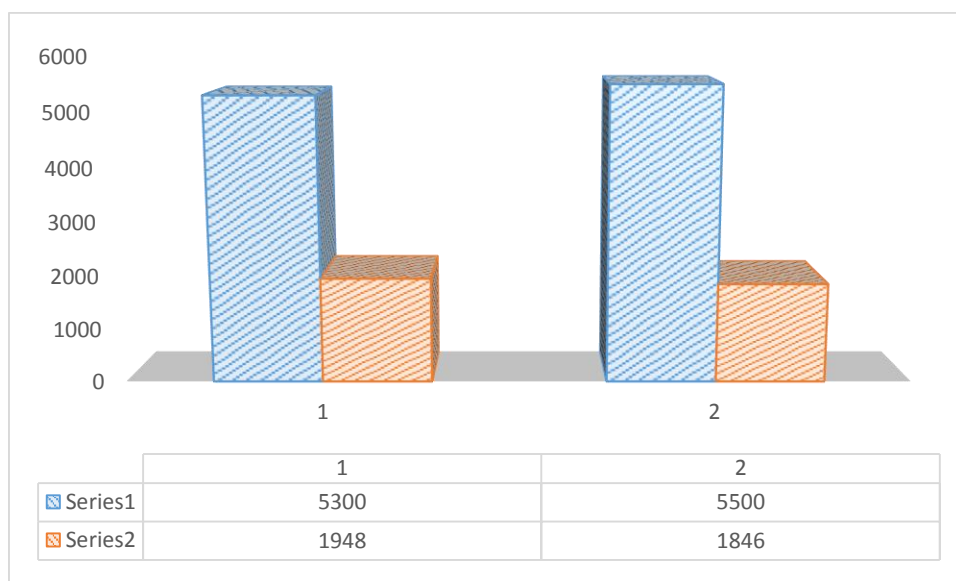
Tabla 9. Contenido total en flavonoides de la infusión tras la digestión.

Extractante	Actividad antioxidante (mg QE/100g DE)
1 Agua 5'	584
2 Agua 5'	587,7

QE: Quercetina; DE: extracto seco.

4.5. Comparación de los resultados en la infusión antes y después de la digestión *in vitro*

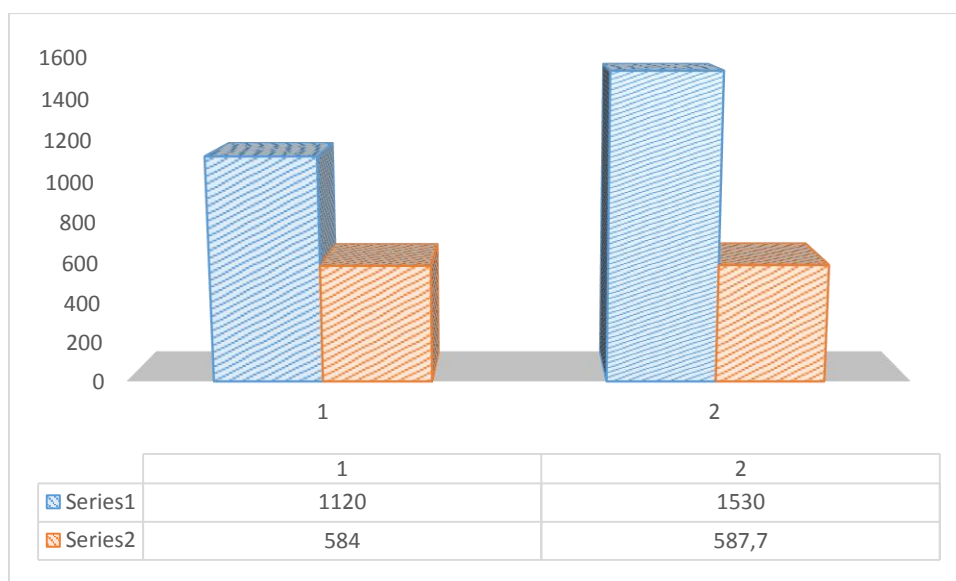
Se muestra a continuación en las Ilustraciones 21-24 los resultados comparados de la actividad antioxidante, contenido total en polifenoles y contenido total en flavonoides de la infusión antes y después de la digestión *in vitro*:



Series 1: Contenido total en polifenoles antes de la digestión.

Series 2: contenido total en polifenoles tras la digestión.

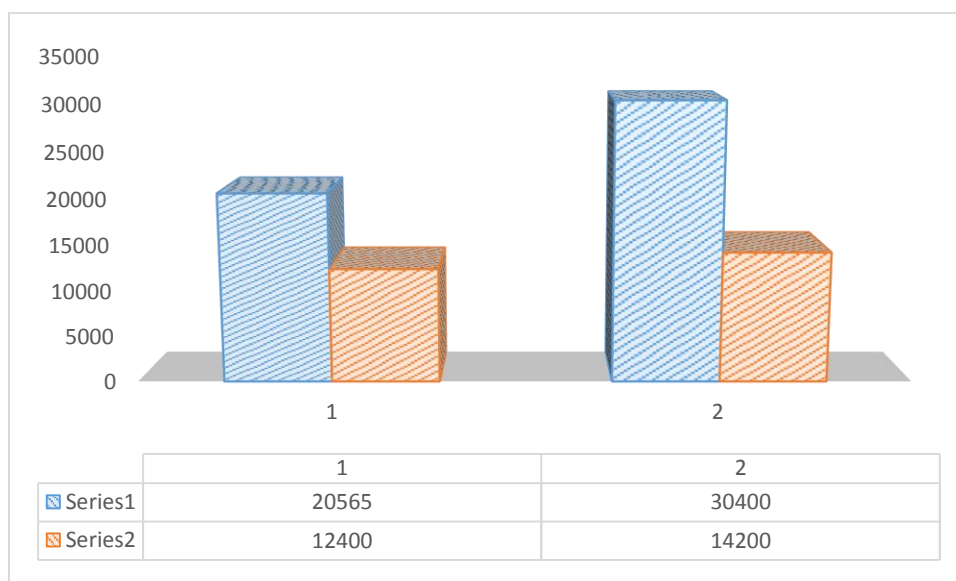
Ilustración 26. Contenido total en polifenoles antes y después de la digestión.



Series 1: Contenido total en flavonoides antes de la digestión.

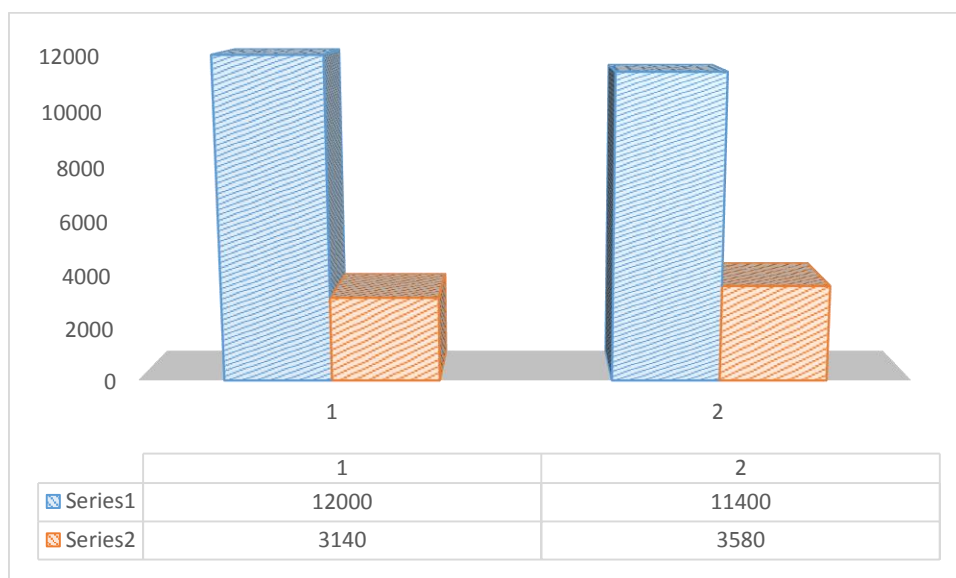
Series 2: contenido total en flavonoides tras la digestión.

Ilustración 27. Contenido total en flavonoides antes y después de la digestión.



Series 1: Actividad antioxidante antes de la digestión.
 Series 2: Actividad antioxidante tras la digestión.

Ilustración 28. Actividad antioxidante (método ABTS) antes y después de la digestión.



Series 1: Actividad antioxidante antes de la digestión.
 Series 2: Actividad antioxidante tras la digestión.

Ilustración 29. Actividad antioxidante (método DPPH) antes y después de la digestión.

Los resultados obtenidos muestran que la actividad antioxidante de la infusión, frente al radical ABTS, sufre una reducción de alrededor de un 53% tras la

digestión *in vitro*. En cuanto a su actividad antioxidante frente al radical DPPH sufre una reducción mucho mayor, de alrededor del 74%.

Por otra parte, el contenido total en polifenoles de la infusión sufre una reducción de alrededor de un 65% tras la digestión *in vitro*. En cuanto a su contenido en flavonoides, también se reduce tras la digestión en alrededor de un 56%.

Podemos concluir que, como era de esperar, la digestión *in vitro* afecta significativamente a la cantidad de compuestos bioactivos disponibles en la infusión.

5. CONCLUSIONES

- Los extractos metanólicos y acuosos de hojas de *Celtis Australis* muestran una significativa actividad antioxidante y son una fuente apreciable de compuestos fenólicos.
- La actividad antioxidante (ABTS, DPPH) y el contenido total en polifenoles y flavonoides obtenidos con metanol como extractante resultaron ser mayores en todos los casos que los obtenidos con agua a 100 °C. Por tanto, el metanol es más apropiado que el agua para preparar extractos fenólicos de hojas de la especie *Celtis Australis*.
- En todos los casos, existe una correlación entre la actividad antioxidante que muestran los extractos y su contenido en polifenoles y flavonoides, antes y después de la digestión *in vitro*. Es decir, a mayor contenido en compuestos fenólicos mayor actividad antioxidante.
- La digestión *in vitro* produce una pérdida considerable de compuestos fenólicos y por tanto una reducción en su actividad antioxidante. Estos resultados eran de esperar puesto que es conocido que los compuestos fenólicos son inestables en la digestión gastrointestinal debido a las variaciones de pH e interacciones con otros constituyentes de la dieta como proteínas, fibra o hierro y las enzimas digestivas.

Este trabajo puede resultar una fuente valiosa de información acerca del poder antioxidante de las hojas de almez para la industria alimentaria o farmacológica. Es necesario señalar, que las muestras estudiadas fueron recogidas en noviembre y en un solo año (2018), por lo que los resultados son representativos dentro de esta área de estudio, pero podrían variar en diferentes épocas del año o dependiendo de la zona de muestreo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Amiri-nowdijeh, A., Moosavi, M.A., Hosseinzadeh, S., Soleimani, M., Sabooni, F., Hosseini-Mazinani, M. (2019), "Anti-oxidant and selective anti-proliferative effects of the total cornicabra olive polyphenols on human gastric MKN45 cells". *Iran Journal Biotechnology*, 17, pp. 37-44.
- Badoni, R., Semwal, D. K., Rawat, U. (2010), "Fatty acid composition and antimicrobial activity of *Celtis australis* L. Fruits", *Journal of Scientific Research*, 2, pp. 397-402.
- Bokkenheuser, V. D., Shackleton, C. H. L. and Winter, J. (1987), "Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans", *Biochemical Journal*, 248, pp. 953-956.
- Bravo, L. and Saura-Calixto, F. (1998), "Characterization of dietary fiber and the *in vitro* indigestible fraction of grape pomace", *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, pp. 135-141.
- Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., et al, (2002), "Quercetin, but not Its Glycosides, Is Absorbed from the Rat Stomach", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp. 618-621.
- Demir, F., Dogan, H., Özcan, M., Haciseferogullari, H. (2002), "Nutritional and physical properties of hackberry (*Celtis australis* L.)", *Journal of Food Engineering*, 54, pp. 241-247.
- El-Alfy, T. S., El-Gohary, H. M. A., Sokkar, N. M., Hosny, M., Al-Mahdy, D. A. (2011), "A new flavonoid C-glycoside from *Celtis australis* L. and *Celtis occidentalis* L. leaves and potential antioxidant and cytotoxic activities", *Scientia Pharmaceutica*. 79, pp. 963.
- Gee, J. M., DuPont, M. S., Rhodes, M. J. C. and Johnson, I. T. (1998), "Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway", *Free Radical Biology and Medicine*, 25, pp. 19-25.
- Grace, S. C. (2005), "Phenolics as Antioxidants", In: *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, pp. 141-168. Ed. Blackwell Publishing, India. ISBN: 9781405125291.

Harborne, J. B., Editor (1989), "Methods in Plant Biochemistry", In: Plant Phenolics, 1, pp 552. Academic Press Ltd., Great Yarmouth, UK, ISBN: 978-0-12-461011-8.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jiménez L. (2004), "Polyphenols: Food sources and bioavailability", American Journal of Clinical Nutrition, 79, pp. 727-747.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., et al. (2014), "A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus", Food and Function, 5, pp. 1113-1124.

Molina-García, L., Martínez-Expósito, R., Fernández-de Córdova, M. L., Llorent-Martínez, E.J. (2018), "Determination of the Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Leaves and Fruits of Spanish *Quercus coccifera*", Journal of Chemistry, 2018, Article ID 2573270, pp. 1-9.

Parada, J. and Aguilera, J.M. (2007), "Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients", Journal of Food Science, 72, pp. 21-32.

Pinto, J., Spínola, V., Llorent-Martínez, E. J., Fernández-de Córdova, M.L., Molina-García, L., Castilho, P. C. (2017), "Polyphenolic profile and antioxidant activities of Madeiran elderberry (*Sambucus lanceolata*) as affected by simulated *in vitro* digestion", Food Research International, 100, pp. 404-410.

Scotti, L., Scotti, M.T., Cardoso, C., Pauletti, P., Castro-Gamboa, I., Bolzani, V. da S., et al. (2007), "Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético", Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 43.

Soler, A. (2009), "Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva", Tesis Doctoral Universidad de Lleida.

Sommavilla, V., Haidacher-Gasser, D., Sgarbossa, M., Zidorn, C. (2012), "Seasonal variation in phenolics in leaves of *Celtis australis* (Cannabaceae)", Biochemical Systematics and Ecology, 41, pp. 110-114.

Spitaler, R., Gurschler, S., Ellmerer, E., Schubert, B., Sgarbossa, M., Zidorn, C. (2009), "Flavonoids from *Celtis australis* (Cannabaceae)", *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, pp. 120-121.

Spínola, V., Llorent-Martínez, E. J., Gouveia, S., Castilho, P. C. (2014), "Myrica faya: A new source of antioxidant phytochemicals", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, pp. 9722-35.

Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., Borges, F. (2013), "Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview", *BioMed Research International*, 2013, pp. 1–11.

Zehrmann, N., Zidorn, C., Ganzera, M. (2010), "Analysis of rare flavonoid C-glycosides in *Celtis australis* L. by micellar electrokinetic chromatography", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, pp. 1165–1168.