

Evaluación del poder antioxidante de una microemulsión conteniendo quercetina y aceites esenciales mediante un método optimizado de análisis

Evaluation of the antioxidant ability of a microemulsion containing quercetin and essential oils through an optimized method of analysis

Rodríguez, Jimmy *, Salager, Jean-Louis y Forgiarini, Ana
Laboratorio de Formulación, Interfases, Reología y Procesos (FIRP).
Universidad de Los Andes
Mérida 5101, Venezuela
jwrodl@gmail.com*

Resumen

*En este estudio se ha determinado el poder antioxidante de una microemulsión que contiene quercetina al 0,45% p/p combinada con aceites esenciales de romero y cidrón (*Rosmarinus officinalis* y *Lippia alba*, respectivamente), usando el método del radical libre estable 2,2-difenil-1-picrylhidrazil (DPPH). Además, se evaluó la influencia de diferentes alcoholes como medio de reacción siguiendo esta metodología, a través de un monitoreo de la estabilidad del radical en el solvente, la cinética de reacción, porcentaje de inhibición (%I) del DPPH por el antioxidante y el IC50, mediante espectrofotometría UV-visible a una longitud de onda de 517 nm. El método utilizado se optimizó teniendo en cuenta la solubilidad del vehículo (microemulsión) y de los principios activos (quercetina y aceites esenciales).*

Palabras clave: Quercetina, aceites esenciales, método DPPH, difenilpicrilhidracil, actividad antioxidante

Abstract

*This study has determined the antioxidant ability of a microemulsion containing quercetin 0.45 wt% combined with essential oils of rosemary and cidrón (*Rosmarinus officinalis* and *Lippia alba*, respectively), using the method of stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Moreover we assessed the influence of various alcohols as a reaction medium when this method is employed, monitoring the stability of the radical in the solvent, the kinetics of the reaction, percent of inhibition (% I) of DPPH by antioxidant and the IC50, using spectrophotometry UV-Visible at a wavelength of 517 nm. The method is optimized taking into account the solubility of the vehicle (microemulsion) and the active ingredients (quercetin and essential oils).*

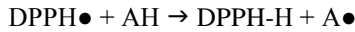
Key words: Quercetin, essential oils, DPPH method, diphenylpicrylhydrazyl, antioxidant activity.

1 Introducción

Los flavonoides y aceites esenciales poseen propiedades antioxidantes de gran interés en el campo farmacéutico y dermatocósmico, por lo que recientemente están siendo evaluados e incorporados en formulaciones de aplicación tópica dirigidas al tratamiento y prevención de enfermedades de la piel mediadas por estrés oxidativo (Venkat y col., 2006; Bakkali y col., 2008; Casagrande y col., 2006, 2007). El auge de las investigaciones y desarrollo de productos que

contienen este tipo de sustancias, trae consigo la necesidad de caracterizarlos en base a su capacidad antioxidante, lo cual implica la selección y optimización del método más adecuado para este fin. En este sentido, para evaluar el potencial oxidativo de una sustancia, sea en estado puro, o combinada en una matriz determinada, existen diferentes metodologías analíticas que difieren entre sí en sus principios físico-químicos (Kuskoski y col., 2005). Para este trabajo se seleccionó un método acelerado de análisis que consiste en la reacción del agente antioxidante con el radical

libre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH●) en solución alcohólica (Brand-Williams y col. 1994; Molyneux, 2004). Este radical posee un electrón desapareado en el átomo de nitrógeno, y puede ser reducido por acción de un átomo de hidrógeno donado por el antioxidante. La reacción es la siguiente:



AH: Antioxidante

Esta prueba permite medir el poder reductor y calcular el IC50 (concentración a la cual se observa 50% del efecto esperado, es decir, inhibición del 50% del radical libre en solución) de sustancias antioxidantes contenidas en diferentes tipos de matrices y extractos vegetales. La reducción del DPPH● es seguido por el monitoreo del decrecimiento en su absorbancia a una longitud de onda que puede variar entre 515 y 520 nm dependiendo de las condiciones de trabajo (Kedare SB y col., 2011). La técnica involucra una serie de ensayos dirigidos al estudio de la cinética de reacción entre los agentes antioxidantes y el DPPH● a diferentes concentraciones, donde el medio de reacción debe garantizar la solubilización total del reactivo y las muestras, debido a que éste puede afectar de manera significativa los resultados (Sharma OP y col., 2009). La literatura reporta el empleo de metanol y etanol principalmente; sin embargo, en diversos ensayos experimentales se ha demostrado que podrían ser utilizados otros alcoholes haciéndose más práctico o exacto el método para el análisis de muestras complejas. El presente trabajo está dirigido a la determinación del poder antioxidante de la quercetina y aceites esenciales vehiculados en una microemulsión, que contiene surfactantes no-iónicos, a través del método DPPH optimizado en base al efecto del solvente.

2 Experimental

2.1 Materiales y equipos

Los solventes utilizados son de grado analítico. El metanol es de Merck; el etanol está suministrado por Riedel-deHaen; el isopropanol y el 2-butanol son de Baker. El reactivo DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) es de Sigma-Aldrich. Los químicos estándares: ácido gálico y quercetina, fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Los aceites esenciales utilizados, romero y cidrón, fueron obtenidos en el laboratorio empleando destilación por arrastre de vapor.

Se utilizó un Espectrofotómetro UV-Visible de Shimadzu, modelo: UVMINI1240 para seguir la reacción del agente oxidante.

2.2 Método

El método empleado es una adaptación optimizada del propuesto por Brand-Williams y col. (1994), en el que se

usa metanol como solvente. Se evaluó la solubilidad y estabilidad del DPPH y las muestras en diferentes alcoholes, y posteriormente el poder antioxidante. Para ello, se prepararon curvas de calibración para el DPPH en solución alcohólica a concentraciones que varían entre 12,5 y 100 μM , intervalo en el cual se cumple la ley de Beer-Lambert. Estas determinaciones se realizaron en tiempo cero y después de dos horas. Se hizo un seguimiento de la cinética de reacción entre el radical libre y los agentes antioxidantes – estándar (ácido gálico) y muestras (quercetina, aceites esenciales y microemulsión), a fin de calcular la capacidad anti-radicalaria de los mismos, expresada como porcentaje de inhibición de DPPH, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% I = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100 \quad (1)$$

Donde A_0 y A_t son los valores de absorbancia del blanco (solución de DPPH en alcohol) y la muestra (solución de DPPH más antioxidante disueltos en alcohol), respectivamente. La cinética se estudió empleando una solución de DPPH a una concentración de 75 μM . Se prepararon soluciones de cada uno de los agentes antioxidantes (estándar y muestras) a concentraciones variables, y se hizo un seguimiento de la reacción DPPH-AH durante 60 minutos. El IC50 se calcula graficando el % I en función de la relación molar DPPH/AH o concentración final del AH.

3 Resultados y Discusión de Resultados

Los perfiles de absorbancia de DPPH disuelto en diferentes alcoholes y en mezcla de éstos, se muestran en la Fig. 1. El radical libre presenta buena estabilidad química durante un período aproximado de 2 horas, tiempo adecuado para realizar el estudio de actividad antioxidante.

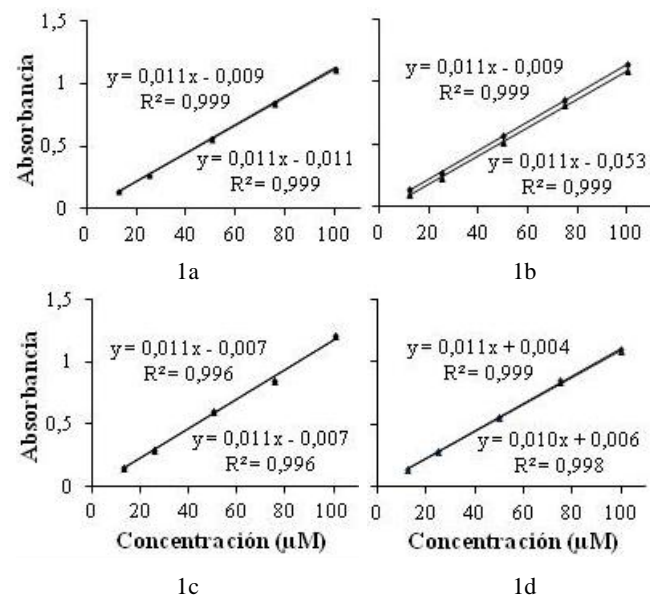


Fig. 1. Perfiles de absorbancia de DPPH en diferentes alcoholes: metanol

(1a), etanol (1b), 2-propanol (1c) y mezcla metanol/2-butanol R=1:4 (1d).

Sólo en solución etanólica el DPPH sufrió un ligero cambio, reflejado en la disminución de los valores de absorbancia, lo cual indica una reducción indeseada del mismo, que debe ser considerada al momento de llevar a cabo un análisis. Estos ensayos permiten explorar la posibilidad de emplear alcoholes diferentes a los reportados en la literatura (metanol y etanol), que no siempre resultan adecuados para solubilizar muestras complejas, como el caso de emulsiones y microemulsiones, con las que se produce turbidez (ver Fig. 2) o separación de fases, impidiendo así el análisis por espectro-fotometría UV-Visible. Debido a que las microemulsiones poseen tres componentes, a saber: agua, aceite y surfactante, es importante estudiar la solubilización del sistema en función del tipo de alcohol.



Fig. 2. Microemulsión con quercetina y aceites esenciales disuelta en metanol puro (2a) y en la mezcla metanol/2-butanol (2b), a una concentración de 0,1 % p/v.

Se utilizó una mezcla metanol/2-butanol a una relación 1:4 para solubilizar tanto el radical libre como las muestras de microemulsión conteniendo o no los principios activos de quercetina y aceites esenciales, y se observó una disolución completa en todos los casos, lo cual se ve reflejado en el análisis por UV-Visible, que transcurrió siempre de manera regular, sin interferencias o afectación en la absorbancia, debidas a opacidad o presencia de materia insoluble. Por otro lado, la manipulación de esta mezcla de solventes mejora las condiciones de trabajo; el 2-butanol, al poseer una presión de vapor más baja que el resto de los alcoholes ensayados (tabla 1), hace que la evaporación de la mezcla sea más lenta, y por ende se reduce el error que esto lleva consigo al analizar por UV las muestras en función del tiempo.

Tabla 1. Propiedades de los alcoholes

Alcohol	Presión de vapor (mmHg, 20 °C)
Metanol	92,0
Etanol	44,3
2-propanol	33,0
2-butanol	12,9

El estudio de la cinética de reacción también se ve favorecido al emplear la mezcla de alcoholes, gracias a que se obtiene una completa solubilización de las muestras, y se evita cualquier tipo de turbidez en las soluciones.

La Fig. 3 muestra las gráficas obtenidas para la cinética de reacción DPPH-AH en metanol, etanol y mezcla metanol/2-butanol. En éstas se observa que la quercetina en microemulsión sigue un comportamiento similar al del estándar en todos los alcoholes probados. Esto quiere decir que el análisis de la actividad antioxidante de la quercetina a través del método basado en el empleo del radical libre DPPH, se puede llevar a cabo usando diferentes alcoholes como medios de reacción, y mejorar el procesamiento de las muestras en cuanto a solubilidad de los analitos y estabilidad de la solución final (mínima evaporación del solvente, por ejemplo). La mezcla de alcoholes metanol/2-butanol favorece la solubilización de matrices complejas, como aquellas constituidas por surfactantes-aceite-agua (microemulsiones, cristales líquidos, emulsiones), permitiendo así el estudio en conjunto de todos los componentes presentes, sin necesidad de hacer extracciones de los activos. Además, se pudo observar que la reacción quercetina-DPPH en etanol sigue una cinética más lenta en comparación con la obtenida empleando metanol o la mezcla de alcoholes, como se aprecia en la figura 4. En el caso de la quercetina vehiculada en microemulsión, el porcentaje de inhibición de DPPH es ligeramente mayor que en los otros casos, probablemente por sinergismo entre sus componentes, ya que esta muestra lleva incorporados los aceites esenciales.

Las mismas condiciones de trabajo se emplearon para determinar la actividad antioxidante de los aceites esenciales de romero y cidrón en estado puro, los cuales no se disuelven completamente en metanol o etanol. Cuando se hace reaccionar DPPH con el aceite esencial puro, en metanol como medio de reacción, los valores de absorbancia se ven alterados debido a la turbidez de la muestra. Esto afecta el grado de inhibición del agente antioxidante sobre el radical libre haciendo más lenta la cinética. En este estudio se pudo observar que al emplear la mezcla metanol/2-butanol se evita esta alteración debido a la transparencia de la solución, con lo cual la absorbancia no se ve afectada por propiedades diferentes a las intrínsecas de las moléculas que se analizan. Los valores de IC50 también se ven influenciados por las condiciones de trabajo antes descritas, los resultados se presentan en la tabla 2, para el estándar (ácido gálico) y las muestras (quercetina y aceites esenciales, puros y en microemulsión). Comparando el IC50 del estándar y la quercetina pura, disueltos en los diferentes alcoholes, se puede observar que este valor disminuye cuando se emplea la mezcla metanol/2-butanol a una relación 1:4, lo que indica que se requieren menores concentraciones del agente antioxidante para inhibir el radical libre. La quercetina en microemulsión arrojó un IC50 (relación molar de 0,06 nquercetina/nDPPH) más bajo que la quercetina pura (0,075) para el mismo solvente; lo cual se logra gracias a la

disolución total de los componentes del sistema microemulsionado. En el caso de los aceites esenciales, los valores de IC50 expresados en porcentaje p/v, fueron de 0,83 y 0,75 %, para romero y cidrón, respectivamente.

Los valores de IC50 encontrados en la literatura para

el ácido gálico y la quercetina, empleando el método DPPH, son variables, debido a que dependen de las condiciones de trabajo. En el caso de los aceites esenciales de romero y cidrón, no se reporta un valor específico de IC50, basado en esta metodología de análisis.

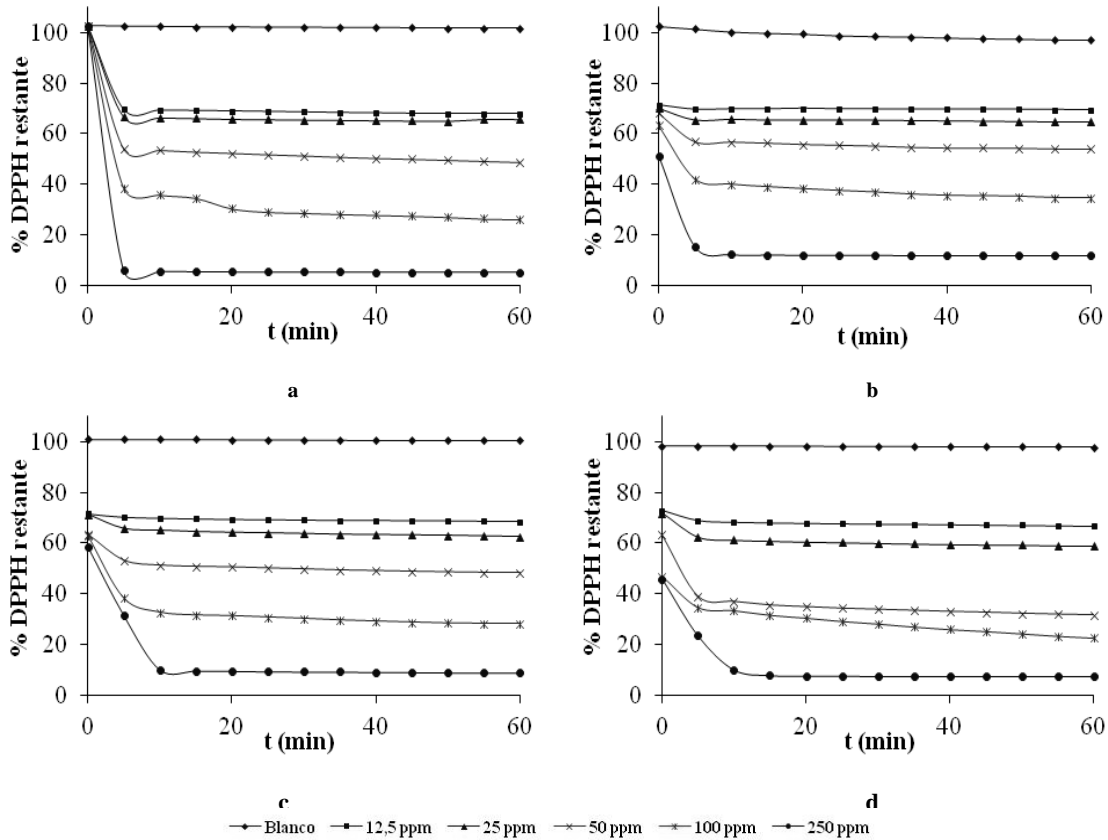


Fig. 3. Cinética de reacción de DPPH con quercetina. Quercetina-estándar en metanol (3a); Quercetina-estándar en etanol (3b); Quercetina-estándar en mezcla metanol/2-butanol (3c); Quercetina en microemulsión disuelta en la mezcla metanol/2-butanol (3d).

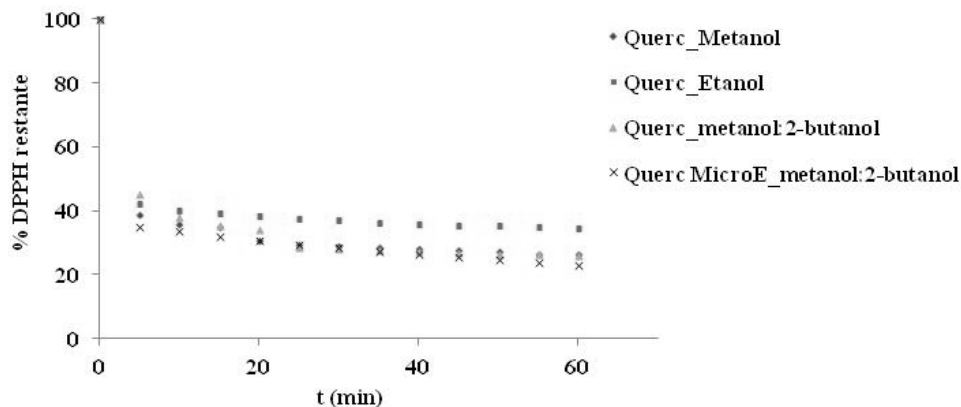


Fig. 4. Superposición de curvas de la cinética de reacción del DPPH con quercetina (100 ppm) en diferentes alcoholes

Tabla 2. Valores de IC50 obtenidos para estándar y muestras estudiadas

		Ac. Gálico estándar *	Quercetina estándar *	Quercetina en micro-emulsión *	Aceite esencial de romero	Aceite esencial de cidrón
IC50	Metanol	0,062	0,08	-	-	-
	Etanol	0,080	0,095	-	-	-
	Mezcla metanol/2-butanol	0,058	0,075	0,06	0,83 % p/v	0,75 % p/v

* Relación molar: nro de moles del activo (ácido gálico, quercetina)/nro de moles de DPPH

4 Conclusiones

Se logró optimizar un método de análisis con DPPH basado en el efecto que tiene el medio de reacción, y se determinó la capacidad antioxidante de diferentes sustancias. Una mezcla metanol/2-butanol a una relación 1:4 resultó eficiente para solubilizar tanto el radical libre como las muestras, dando valores de IC50 inferiores a los obtenidos con otros alcoholes. Además, es importante resaltar que la literatura hace una caracterización de este tipo sólo para el estándar – ácido gálico – y la quercetina en estados puros, o bien a partir de una matriz determinada luego de aislar el activo. De igual manera, es la primera vez que se reporta el IC50 para los aceites esenciales estudiados empleando este método; sólo se encontró un trabajo relacionado donde se da a conocer el IC50 para el aceite esencial de romero (2,25% p/v) basado en una prueba con β -caroteno (Wang W y col., 2008).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado con el apoyo recibido del Lab. FIRP de la Universidad de Los Andes, y del programa-franco-venezolano PCP-Formulación de sistemas multifásicos: Aplicaciones biológicas, farmacéuticas y cosméticas.

Referencias

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M, 2008, Biological effects of essential oils – A review, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 46, pp. 446-475.
 Brand-Williams W, Cuvelier M, and Berset C, 1995, Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Science and Technology*, Vol. 28, No. 1, pp. 25-30.
 Casagrande R, Georgetti SR, Verri Jr WA, Dorta DJ, Dos Santos AC, Fonseca JV, 2006, Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Vol. 84, pp. 21-27.
 Casagrande R, Georgetti SR, Verri Jr WA, Borin MF, Lopez FV, Fonseca JV, 2007, In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity, *International*

Journal of Pharmaceutics, Vol. 328, pp. 183-190.

Kedare SB, Singh RP, 2011, Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *Journal of Food Science and Technology*, Vol. 48, No. 4, pp. 412-422.

Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R, 2005, Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos, *Ciencia e Tecnología de Alimentos*, Campinas, Vol. 25, No. 4, pp. 726-732.

Molyneux P, 2004, The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, Vol. 26, No. 2, pp. 211-219.

Scherer R, Teixeira GH, 2009, Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method, *Food Chemistry*, Vol. 112, pp. 654-658.

Sharma OP, Bhat TK, DPPH antioxidant assay revisited, *Food Chemistry*, Vol. 113, pp. 1202-1205.

Venkat RD, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Ravi KMNV, 2006, Role of antioxidant in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective, *Journal of Controlled Release*, Vol. 113, pp. 189-207.

Wang W, Wu N, Zu YG, Fu YJ, 2008, Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components, *Food Chemistry*, Vol. 108, pp. 1019-1022.

Recibido: 10 de abril de 2012

Revisado: 20 de noviembre 2012

Rodríguez, Jimmy: *Farmacéutico, Universidad de Los Andes, estudiante del programa de Doctorado en Ciencias Aplicadas de la Facultad de Ingeniería – ULA.*

Salager, Jean-Louis: *Profesor Emérito de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Los Andes. Director fundador de la Escuela de Ingeniería Química y fundador del Laboratorio FIRP de la Universidad de Los Andes, editor-en-jefe del Journal of Surfactant and Detergent. Experto en fenómenos interfaciales con más de 35 años de experiencia. Correo electrónico: salager@ula.ve*

Forgiarini, Ana: Profesora de la Universidad de Los Andes y Directora Adjunta del Laboratorio FIRP, investigadora y experta en el área de nano-emulsiones. Correo electrónico: anafor@ula.ve.

