



Efecto comparativo de la actividad antioxidante del Ácido Gálico y diferentes Alquilgalatos

Comparative effect of the antioxidant activity of Gallic Acid and different Alkygallates

LYNG MEI RODRÍGUEZ^{1,a}, NATALIA RUIZ FLORES^{2,a}, DIANA SANGOI FERREIRA^a, ANA MILENA GUERRERO^{3,a}, CARLOS CIANGHEROTTI^{4,b}, JAIRO BERMÚDEZ^{5,c}, MARY LORENA ARAUJO^{6,d}, ANITA ISRAEL^{7,b}, MARISABEL BOR^{8,a}

Resumen

Los compuestos polifenólicos poseen actividad antioxidante, por lo que son sustancias con la capacidad de proteger a las células del estrés oxidativo. En este trabajo se evaluó el efecto antioxidante de ácido gálico (AG) y los alquilgalatos: metil galato (MG) y etilgalato (EG) por 3 métodos diferentes, a saber: óxido nítrico, DPPH• y peróxido de hidrógeno. Con el radical de óxido nítrico se obtuvo que AG mostró mayor efecto antioxidante, seguido por el MG y EG, con valores de IC₅₀ 31,303 μM, 38,846 μM, 58,308 μM, respectivamente. Con una diferencia estadísticamente significativa entre el AG y EG, con valor de p<0,05. Con DPPH• se observó que EG obtuvo mayor actividad antioxidante seguido MG, PG y AG, con valores de IC₅₀ 7,687μM, 14,963 μM, 16,529 μM, 20,698 μM, respectivamente. Se observó una diferencia significativa entre MG y AG con p< 0,05 y entre EG y AG con un p<0,001. Con el peróxido de hidrógeno se encontró que el compuesto EG presenta menor actividad antioxidante seguido por AG y MG, con valores de IC₅₀ 218,67 μM, 108,53 μM y 86,01 μM, respectivamente. Presentando una diferencia significativa entre el EG y AG, con p< 0,05. Los resultados sugieren que AG y sus derivados podrían funcionar como una fuente de antioxidantes para fines terapéuticos y nutricionales.

Palabras clave: ATBS, antioxidante, ácido gálico, alquil galatos, DPPH•, etil galato, Folin - Ciocalteau, IC₅₀, óxido nítrico, óxido nítrico sintasa, propil galato, PBS, peróxido de hidrógeno, ROS, RNS

Abstract

Polyphenolic compounds have an antioxidant effect, being substances with the ability to protect cells from free radicals. In this work we assessed the antioxidant effect of gallic acid (AG) and the alkyl gallates methyl gallate (MG) and ethyl gallate (EG) by 3 different methods, these were: nitric oxide, DPPH•, and hydrogen peroxide. With the nitric oxide radical it was obtained that AG showed the greatest antioxidant effect, followed by MG and EG, with IC₅₀ values of 31.303 μM, 38.846 μM, and 58.308 μM, respectively. With a statistically significant difference between AG and EG, with a value of p<0.05. With DPPH• it was observed that EG obtained higher antioxidant activity followed by MG, PG, and AG with a IC₅₀ values of 7.687μM, 14.963 μM, 16.529 μM, 20.698 μM, respectively. A significant difference was observed between MG and AG with p< 0.05 and between EG and AG, with a value of p<0.001. With hydrogen peroxide, it was found that the compound EG presents less antioxidant activity followed by AG and MG, with IC₅₀ values of 218.67 μM, 108.53 μM, and 86.01 μM, respectively. Presenting a significant difference between the EG and AG, with p< 0.05. The results suggest that AG and its derivatives could function as a source of antioxidants for therapeutic and nutritional purposes.

Keywords: ATBS, antioxidant, gallic acid, alkyl gallates, DPPH•, ethyl gallate, Folin - Ciocalteau, IC₅₀, nitric oxide, nitric oxide synthase, propyl gallate, PBS, hydrogen peroxide, ROS, RNS

^aLaboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

^bLaboratorio de Neuropeptidos. Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela, ^cLaboratorio de Productos Naturales, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. ^dCentro de Equilibrios en Solución, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. *Correspondencia: marisabel.bor@gmail.com y carlosciangherotti@yahoo.com

Orcid: ¹ [0009-0006-5418-0256](https://orcid.org/0009-0006-5418-0256)

⁵ [0009-0004-6041-6443](https://orcid.org/0009-0004-6041-6443)

² [0009-0009-8143-0128](https://orcid.org/0009-0009-8143-0128)

⁶ [0000-0002-4755-7186](https://orcid.org/0000-0002-4755-7186)

³ [0009-0006-5441-7276](https://orcid.org/0009-0006-5441-7276)

⁷ [0000-0003-1812-0759](https://orcid.org/0000-0003-1812-0759)

⁴ [0000-0003-3760-8645](https://orcid.org/0000-0003-3760-8645)

⁸ [0009-0009-4422-9054](https://orcid.org/0009-0009-4422-9054)

Introducción

Las especies químicas que se consideran radicales libres son moléculas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo que les da una configuración espacial generadora de gran inestabilidad, y por lo tanto se caracterizan por su alta reactividad química. Desde el punto de vista celular se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran, la cadena de transporte de electrones, la NADPH oxidasa y otras reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo) al interactuar con las principales biomoléculas del organismo (Venereo Gutiérrez, 2002). A nivel biológico, las especies reactivas de oxígeno (ERO) importantes son los radicales anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), óxido nítrico (NO^{\cdot}) radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y moléculas no radicalarias como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), las cuales pueden oxidar biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y como consecuencia inducir daño celular bajo una condición conocida como estrés oxidativo (Burton y Jauniaux, 2011). En la Figura 1 se muestran las principales EROs y su metabolismo celular.

Los antioxidantes son sustancias químicas capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones, los que son captados por los radicales libres. El estudio de este tipo de reacciones ha permitido conocer cómo el uso de los antioxidantes protege a las células, impidiendo su deterioro por el efecto de los radicales libres. Entre los antioxidantes más comunes se encuentran los polifenoles, tales como resveratrol, rutina, quercetina y ácidos fenólicos como el ácido gálico (AG). Los compuestos polifenólicos (CPF) son metabolitos secundarios de las plantas

que poseen en su estructura al menos un anillo aromático al que está unido uno o más grupos hidroxilo. Los CPF se clasifican como ácidos fenólicos (AF), flavonoides (FLA) y taninos (TAN). La actividad antioxidante de los polifenoles se debe a su facilidad para reducir la producción de radicales libres, bien por inhibición de las enzimas que intervienen, bien por quelación con los metales de transición responsables de la generación de los radicales libres. Además, los flavonoides por su bajo potencial son capaces de reducir las especies de oxígeno reactivo (ERO), altamente oxidadas. En general los compuestos polifenólicos como antioxidantes, son multifuncionales y actúan según la mayoría de los mecanismos mencionados (Quiñones y col., 2012).

El AG, también conocido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, es el antioxidante objeto de este trabajo, junto a sus ésteres de alquilo: metil galato (MG) y etilgalato (EG) y propilgalato (PG). El AG es un producto natural, perteneciente al grupo de taninos hidrolizables, que se encuentra en diversas plantas. Este polifenol ha sido ampliamente utilizado en investigación analítica como estándar, para determinar el contenido de fenoles en diversas muestras. Tanto él como sus ésteres han sido utilizados en la industria de alimentos y de cosméticos, así como también sus propiedades medicinales como fármacos han sido ampliamente estudiados, en donde lo más promisorio es la actividad antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria (Lu y col., 2006; Khaledi y col., 2011; Liu y col., 2014; Badhani y col., 2015; Kosuru y col., 2018).

Aunque la actividad antioxidante de estos galatos ha sido demostrada, existen pocos estudios que comparen estas moléculas en varios modelos experimentales. Por ello, se realizó un estudio para comparar

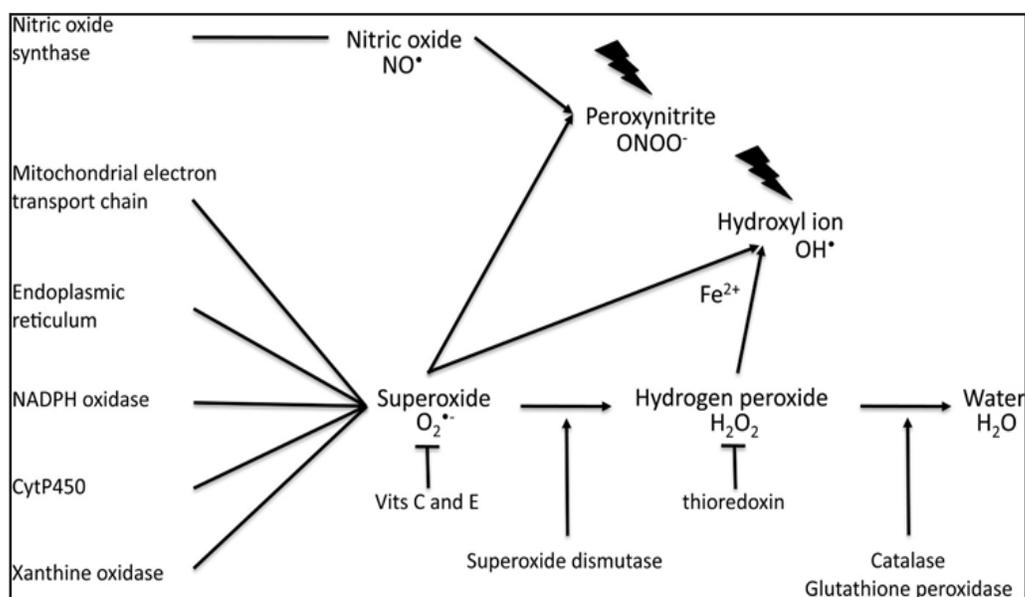


Figura 1. Principales especies reactivas de oxígeno. Fuentes y vías de metabolismo (Tomado de Burton y Jauniaux, 2011)

el AG, MG, ET en ensayos en medio acuoso de captación de NO^\bullet y de H_2O_2 , basada principalmente en la determinación de la capacidad captadora de NO y H_2O_2 , dos de las especies más involucradas en el estrés nitrosativo y oxidativo, respectivamente. La evaluación antioxidante de AG, MG, ET y PG, se realizó mediante el ensayo de captación de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH• en medio alcohólico, que permite evaluar su capacidad antioxidante mediante métodos espectrofotométricos. Con este trabajo se pretendió discriminar las características captadoras de especies reactivas y sentar las bases para la selección de el o los compuestos con mejor perfil de potencia antioxidante para futuros estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*. El conocimiento de las potencias antioxidantes de estos compuestos permitirá la elección del mejor candidato antioxidante no solo a nivel biológico sino a nivel de las preparaciones cosméticas, de alimentos, entre otros.

La información acerca de los múltiples comportamientos antioxidantes que pueden tener estos diferentes compuestos podría estar relacionado a los posibles beneficios en el tratamiento o prevención de enfermedades que cursen con el incremento de las ERO, de manera que podría tener impacto en la actividad terapéutica de estos potenciales fármacos. Es importante mencionar que las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo son precisamente las de mayor impacto en la salud pública, tales como el cáncer, la diabetes mellitus y la hipertensión arterial.

El presente estudio tiene por objetivo evaluar la actividad antioxidante del ácido gálico y alquil galatos y así determinar y comparar el desempeño de estos compuestos. Para ello se determinó la actividad captadora de óxido nítrico, la actividad captadora del radical DPPH• y la actividad captadora de peróxido de hidrógeno del ácido gálico y alquil galatos,

y comparar los resultados obtenidos (curvas e IC_{50}) de actividad antioxidante del ácido gálico en relación con los alquil galatos.

Métodos

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ÁCIDO GÁLICO Y ALQUIL GALATOS POR EL MÉTODO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Para la evaluación de la capacidad atrapadora de óxido nítrico ($NO\cdot$) del ácido gálico y los galatos, se utilizó el método de Griess modificado (Alam y col., 2013). Para ello, se utilizó un sistema *in vitro* de producción de NO inducido por nitroprusiato de sodio. Se sabe que el compuesto nitroprusiato de sodio se descompone en solución acuosa a un pH fisiológico (7,2) y produce un punto radical NO. En condiciones aeróbicas, el punto radical NO reacciona con el oxígeno para producir productos estables (nitrato y nitrito), cuyas cantidades pueden determinarse utilizando el reactivo de Griess (1,0 mL de reactivo de ácido sulfanílico, 0,33% en ácido acético glacial al 20% a temperatura ambiente; solución A) durante 5 min con 1 mL de dicloruro de naftilendiamina (0,1% p/v; solución B) añadiendo 200 μ L en 100 μ L de amortiguador de fosfatos pH 7,4, siendo este considerado como el punto de concentración 0 μ M de las sustancias de análisis, mientras los tubos de muestra eran tubos Eppendorf a los que se les adicionaron 100 μ L de concentraciones crecientes tanto del ácido gálico como de los galatos. El nivel de $NO\cdot$ se cuantificó indirectamente mediante la conversión en nitritos (NO_2^-), principal producto de la degradación de $NO\cdot$. Se añadió a las muestras 100 μ L de "Solución A" y se esperó durante 10 minutos para la formación de la respectiva sal de

diazonio. Se añadieron 100 μ L de "Solución B" y se esperaron 10 min para realizar la reacción de acoplamiento.

Para la preparación de las muestras se preparó una solución Madre de 19200 μ M de ácido gálico y los alquil galatos, se diluyó con PBS (*Phosphate Buffer Saline*) hasta obtener soluciones de concentraciones diferentes (1920; 960; 480; 240; 120; 60; 30; 15; 7,5; 3,75; 1,875 μ M).

Se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de máxima absorción de 595 nm de las concentraciones finales (640; 320; 160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 μ M).

Los resultados fueron expresados como el porcentaje de $NO\cdot$ atrapado o % de inhibición, a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

donde A_0 es la absorbancia antes de la reacción (0 μ M de los galatos) y A_1 (la absorbancia de la muestra) es la absorbancia después de que haya tenido lugar la reacción con el reactivo de Griess.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ÁCIDO GÁLICO, ALQUIL GALATOS CON EL MÉTODO DE DPPH•

La actividad antioxidante se determinó mediante el ensayo de 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH•), con algunas modificaciones (Villaño y col., 2007). Se preparó una solución Madre de 19200 μ M de ácido gálico e igualmente con los alquil galatos, se diluyó con metanol hasta obtener soluciones patrones de concentraciones diferentes (1920; 960; 480; 240; 120; 60; 30; 15; 7,5; 3,75; 1,875 μ M). Para realizar el

ensayo se agregaron 100 μL de cada una de las soluciones madre en distintos tubos de capacidad de 1000 μL , se agregaron 50 μL de la solución de DPPH• a cada uno de los tubos, se esperaron 30 minutos para que ocurra la reacción entre el DPPH• y el ácido gálico o los alquil galatos, durante este período se protegió el tubo de la luz. Luego se procedió a leer en el espectrofotómetro de ELISA usando 517 nm como longitud de onda máxima absorción. Siendo el control para la absorbancia de la solución DPPH• 100%.

La capacidad de la muestra para eliminar el radical DPPH• se determinó con la misma fórmula de % de inhibición usada en el método de óxido nítrico. Donde A_0 es la absorbancia del punto de concentración 0 μM de los galatos (control) y A_1 la absorbancia de la muestra.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ÁCIDO GÁLICO Y ALQUIL GALATOS CON EL MÉTODO DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Antes de iniciar el ensayo se preparó una solución 30 mM de H_2O_2 en PBS pH, 7,4. Esta solución fue estandarizada.

Se prepararon las soluciones de ácido gálico y los alquil galatos a concentraciones finales de 640; 320; 160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078 y 0 μM , las cuales se prepararon mezclando 100 μL de la solución de trabajo y 700 μL de la solución de trabajo de H_2O_2 en PBS. Posteriormente se esperaron 10 minutos para garantizar que la sustancia antioxidante hiciera el atrapamiento del H_2O_2 en la solución y se realizaron las lecturas correspondientes en el espectrofotómetro UV/VIS a $\lambda=230$ nm.

Se cálculo el valor de los IC_{50} de las sustancias estudiadas usando la fórmula de % de inhibición usada en los métodos anteriores. Donde A_0 es la absorbancia del punto de concentración 0 μM de los galatos (control) y A_1 la absorbancia de la muestra.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media ($X \pm \text{E.E.M}$). Los datos fueron analizados con el programa Prism 8, mediante la prueba de T de Student. Los resultados con valores de $p < 0.05$ y $p < 0.001$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

Resultados y Discusión

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ÁCIDO GÁLICO Y ALQUIL GALATOS POR EL MÉTODO DE ÓXIDO NÍTRICO

En la determinación de captación de óxido nítrico, hubo un aumento del % de inhibición a medida que se incrementa la concentración del analito de interés representado mediante una hipérbola (Figura 2). El efecto fue dependiente de la concentración hasta llegar a una etapa estacionaria de saturación" en el que se agota el radical libre.

El IC_{50} o concentración inhibitoria 50%, es definida como la concentración a la que una molécula es capaz de inhibir un proceso biológico concreto en un 50%. Se puede observar en la Figura 3 que hubo una diferencia estadísticamente significativa de EG ($p < 0,05$) en comparación con el AG, obteniéndose mayor actividad antioxidante con el ácido gálico.

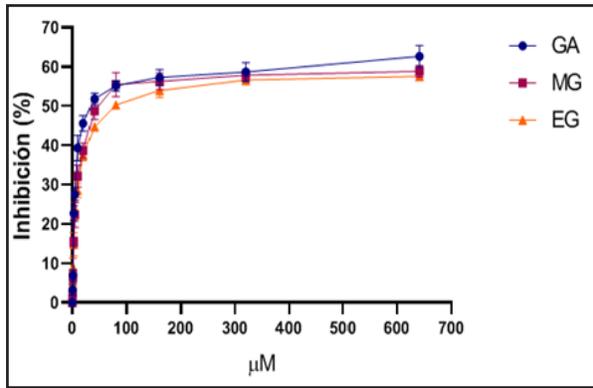


Figura 2. Captación de óxido nítrico comparativa entre GA, MG y EG

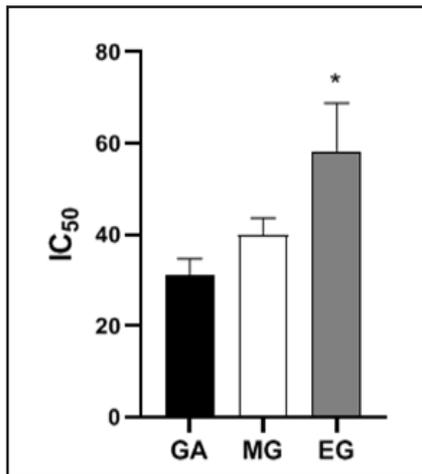


Figura 3. Comparación de la potencia antioxidante en términos de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) en el ensayo de captación de óxido nítrico. GA: ácido gálico, MG: galato de metilo, EG: etil galato. n=5, *p<0,05 EG vs. GA

En la Tabla I se observa que la IC₅₀ obtenida para el AG fue de 31,3 μM, mientras que el IC₅₀ de EG fue de 58,30 μM, es decir que se requiere una concentración menor de AG para poder obtener el 50% de inhibición comparado con EG. El IC₅₀ del AG fue menor, estadísticamente significativo, comparado con el del EG. Este resultado podría deberse a los carbonos del etilo que está en el grupo éster de la molécula del EG, ya que estos átomos logran una disminución de la solubilidad de la molécula en medios polares. Mientras que el AG posee un ácido carboxílico de sustituyente, el cual puede establecer puentes de hidrógeno

Tabla I.

Comparación de los IC₅₀ obtenidos por el método de óxido nítrico

	Ácido gálico	Metil galato	Etil galato
Media IC ₅₀	31,3	39,8	58,3
Desviación Estándar	9,5	8,5	23,5
Error estándar	3,4	3,8	10,5

con solventes polares, aumentando sus fuerzas intermoleculares, las cuales no puede ejercer con tanta facilidad el EG por el éster de etilo, en conclusión, a mayor prolongación en la cadena de hidrocarburos, menor es la solubilidad de la molécula en agua (Wade, 2011).

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ÁCIDO GÁLICO Y ALQUIL GALATOS POR EL MÉTODO DE DPPH•

En las Figuras 4 y 5 se observa que usando el método de DPPH•, entre todos los compuestos, el etil galato tiene una mayor actividad antioxidante en comparación con el ácido gálico y los diferentes alquil galatos en el estudio (metil y propil galato).

En la Tabla II se observa los diferentes valores de IC₅₀ de cada uno de los compuestos, obteniendo el menor valor correspondiente a 7,7 para el EG por lo que se considera que tiene mayor actividad antioxidante que los demás derivados alquílicos y que el AG por el método de DPPH•.

Se puede observar que en los resultados del análisis de DPPH• se obtuvo un efecto concentración dependiente tanto con el AG como con sus derivados MG, EG y PG, encontrándose, que al aumentar la concentración del antioxidante de interés se obtiene un mayor porcentaje de inhibición

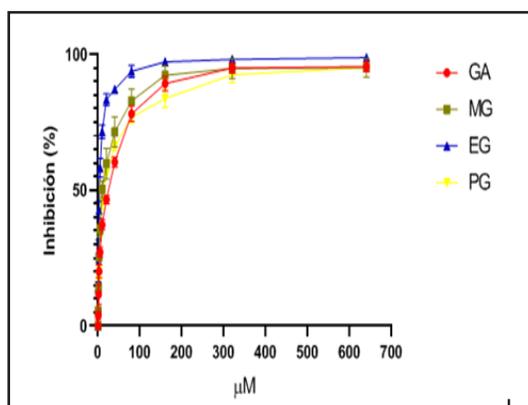


Figura 4. Captación de DPPH• comparativa entre GA, MG y EG

hasta llegar a un estado de saturación en el que se consume por completo el radical libre que está en estudio, en este caso, el DPPH• (Figura 4).

A diferencia del ensayo realizado con óxido nítrico, se puede observar mediante el análisis de la actividad antioxidante con DPPH•, que el EG mostró poseer mayor actividad antioxidante que el AG, teniendo un IC_{50} de $7,68 \mu M$, mientras que el AG presentó un IC_{50} de $20,69 \mu M$ (Tabla II). Esta diferencia en los resultados podría ser parcialmente debido al método usado, donde el solvente usado es el metanol, sustancia que a pesar de que presenta cierta polaridad por el momento dipolar que tiene el enlace C-O y el enlace C-H, es una polaridad más baja que la experimentada en el método de óxido nítrico. El ensayo de óxido nítrico usa como solvente un solvente polar como el agua y sustancias iónicas (KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 que estaban en el PBS) que aumentan la polaridad del medio.

Mientras que el AG posee un ácido carboxílico de sustituyente, quien puede establecer puentes de hidrógeno con solventes polares, aumentando sus fuerzas intermoleculares, el EG no puede establecer con tanta facilidad estas fuerzas intermoleculares por el éster de etilo que presenta como sustituyente.

Al disminuir la polaridad del medio, la molécula de EG puede establecer fuerzas intermoleculares de tipo dipolo-dipolo con el metanol del medio pudiendo esto facilitar la reacción entre el galato y el DPPH•.

El metanol posee una estructura con enlaces de tipo C-H que presentan un momento dipolar de 0,3 Debye y enlaces de tipo C-O con un momento dipolar de 0,86 Debye, presentando un lado de la molécula con un delta negativo (carga parcialmente negativa) que puede establecer puentes de hidrógeno con las moléculas que se encuentren en el medio y un lado de la molécula con un delta positivo (carga parcialmente positiva) con los que se pueden establecer fuerzas intermoleculares de menor intensidad que los puentes de hidrógeno como lo son las fuerzas de dipolo - dipolo (Wade, 2011).

EG es una estructura que posee 2 carbonos en el éster que se encuentra de sustituyente en la molécula, esto le confiere la propiedad de establecer fuerzas intermoleculares de tipo dipolo - dipolo con el metanol que se encuentra en el medio de reacción permitiendo un aumento en la velocidad de reacción. No obstante, estas fuerzas van a depender del área superficial de contacto, los dipolos son temporales y duran una fracción de segundo cambiando constantemente. Durante este proceso

Tabla II.

Comparación de los IC_{50} obtenidos por el método de DPPH•

	Ácido gálico	Metil galato	Etil galato	Propil galato
Media IC_{50}	20,7	14,9	7,7	16,5
Desviación estándar	2,9	3,6	0,9	1,4
Error estándar	1,5	1,8	0,5	0,8

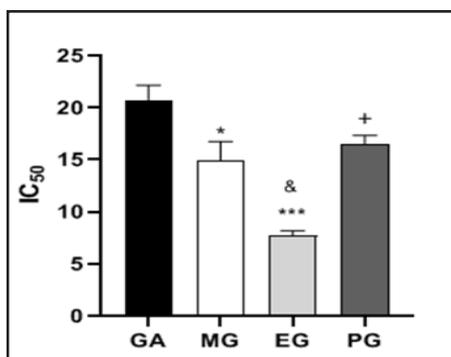


Figura 5. Comparación de la potencia antioxidante en términos de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) en el ensayo de captación de DPPH•. GA: ácido gálico, MG: galato de metilo, EG: etil galato. (AG) n=4, (MG) n= 4, (EG) n= 4, (PG) n=3. *p< 0,05 comparando el metil galato con el ácido gálico y una ***p<0,001 comparando el etil galato con el ácido gálico. & representa p<0,001 comparado el etil galato con el metil galato y +p<0,001 comparado con el propil galato con el etil galato

las moléculas se acercan tanto que violan sus radios de van der Waals. Cuando esto ocurre, la pequeña fuerza de atracción se convierte rápidamente en una gran fuerza de repulsión (Wade, 2011).

Esta podría ser la razón del aumento del IC₅₀ del PG, ya que al aumentar la superficie de contacto de la molécula por tener un número superior de carbonos (3 carbonos) aumentan las fuerzas de repulsión en el medio de reacción de DPPH•, en consecuencia, se obtiene una potencia menor que la potencia del EG, ya que se obtuvo un IC₅₀ de 16,52 μ M con PG, es decir, una potencia más baja que la potencia del EG, por lo que se requiere más concentración de PG para obtener el mismo efecto del EG (Figura 5).

Uno de los factores más importantes que determina la actividad antioxidante de los polifenoles es su grado de hidroxilación y la posición de los hidroxilos en la molécula. Los flavonoideos debido a su heterociclo oxigenado muestran mayor actividad que los no flavonoideos. A su vez la solubilidad

y los efectos estéricos de cada molécula pueden verse afectados por el tipo de estructura de dicha molécula, como es el caso de los derivados glicosilados y otros aductos, lo que puede aumentar o disminuir la actividad antioxidante (Cartaya y Reynaldo, 2001). Los compuestos flavonoideos se suelen encontrar en los vegetales en forma de glicósidos, pero la acción de enzimas o de algunos procesos puede liberar la correspondiente aglicona. La actividad de los ácidos fenólicos está también en función de los grupos hidroxilo del anillo aromático y de la unión de estos compuestos a ácidos orgánicos y/o a azúcares para formar ésteres. Los mecanismos por los que actúan todos estos compuestos varían dependiendo de su concentración y tipos de compuestos presentes en los alimentos (Martínez-Flórez y col., 2002)

RESULTADOS DE AG Y ALQUIL GALATOS POR EL MÉTODO DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

En las curvas de concentración - inhibición se observa que el AG tiene un mayor poder antioxidante que el MG y EG en este ensayo y que el mismo va incrementando de manera proporcional a su concentración. Hasta llegar a un estado de saturación en el que se agota el peróxido de hidrógeno (Figura 6).

Entre los resultados del estudio de actividad antioxidante se puede notar una diferencia estadísticamente significativa con p<0,05 del IC₅₀ de EG en comparación al AG. El EG obtuvo un IC₅₀ de 218,67 μ M y el AG obtuvo un valor de IC₅₀ de 108,53 μ M (Figura 7). Esta diferencia puede deberse al número de carbonos que posee cada una de estas moléculas mientras que el AG posee un ácido carboxílico de sustituyente, quien puede establecer puentes de hidrógeno

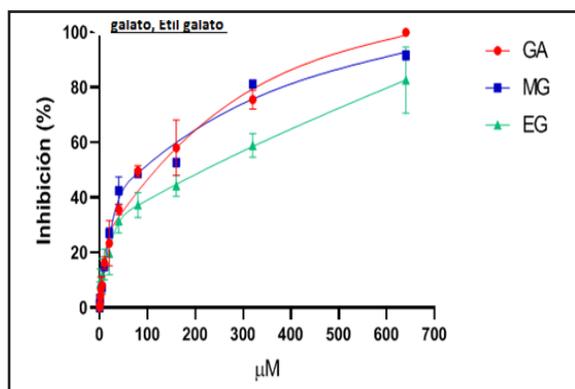


Figura 6. Captación de H_2O_2 comparativa entre GA, MG y EG

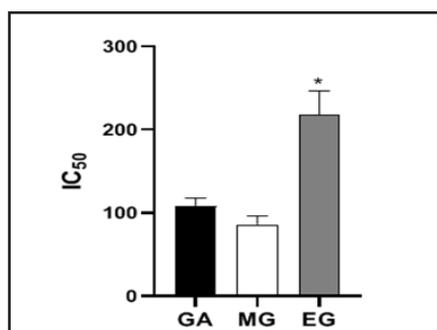


Figura 7. Comparación de la potencia antioxidante en términos de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) en el ensayo de captación de H_2O_2 . GA: ácido gálico, MG: galato de metilo, EG: etil galato. $n=2-3$, * $p<0,05$ comparado con EG y MG.

con solventes polares, aumentando sus fuerzas intermoleculares, el EG no puede establecer con tanta facilidad estas fuerzas intermoleculares por el éster de etilo que presenta como sustituyente, lo que ratifica que a mayor prolongación en la cadena de hidrocarburos, menor es la solubilidad de la molécula en agua (Wade, 2011).

Se observa una diferencia numérica en los valores de AG y MG, sin embargo, la diferencia entre ambos valores no fue estadísticamente significativa. Posiblemente ello se debe al bajo número de ensayos (para AG el número de $n=3$ y para MG el número de $n=2$).

Conclusiones

El AG y sus derivados MG y EG son antioxidantes que actúan inhibiendo los radicales libres como DPPH•, NO y peróxido de hidrógeno, de manera directamente proporcional a la concentración de los galatos, ya que aumenta el % de inhibición al aumentar la cantidad de galatos hasta llegar a un estado de saturación en el que se agota el radical libre de interés.

El PG es antioxidante como captador de DPPH•, el cual fue el único ensayo probado para este derivado.

El AG presentó la mayor actividad antioxidante de las moléculas analizadas por el método de óxido nítrico al observar el valor de IC_{50} que fue de $31,30 \mu M$. Este resultado fue obtenido en un medio polar con solventes acuosos.

El EG presentó la mayor actividad antioxidante de las moléculas analizadas por el método del DPPH• al observar el valor de IC_{50} que fue de $7,68 \mu M$; demostrando que inhibió el radical del DPPH• en concentraciones más bajas.

El MG presentó la mayor actividad antioxidante entre las moléculas analizadas por el método de peróxido de hidrógeno al observar el valor de IC_{50} que fue de $86,01 \mu M$.

En el ensayo de óxido nítrico se demostró que el AG presentó una mayor actividad antioxidante que el EG, con una diferencia estadísticamente significativa y un valor de $p<0,05$.

Los hallazgos demuestran que el AG y sus derivados MG, EG y PG, presentan diferentes

efectos antioxidantes frente a los diferentes radicales ensayados DPPH•, óxido nítrico y la molécula de peróxido de hidrógeno, y sugieren que el AG y sus derivados podrían constituir una fuente de antioxidantes para fines terapéuticos y nutricionales. El estrés oxidativo y la peroxidación lipídica son los causantes de un gran número de enfermedades crónicas que incluyen cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y demencia. Así, el consumo de AG y sus derivados MG, EG y PG podría reducir la incidencia y mortalidad de estas enfermedades y, este efecto protector está determinado por la presencia de estos agentes antioxidantes en estos alimentos, principalmente los polifenoles. Estos últimos como antioxidantes previenen el daño oxidativo inhibiendo la generación de especies reactivas, capturando los radicales libres o aumentando el nivel de antioxidantes endógenos protectores. Así el ácido gálico y el resveratrol (RVT) como compuestos polifenólicos, han sido ampliamente estudiados debido a su actividad anticancerígena, antimicrobiana, antioxidante y antiviral y se les ha conferido un potencial para ser empleados como terapias alternativas contra distintas patologías. Igualmente se ha descrito la acción de estos compuestos sobre microorganismos de la microbiota intestinal, demostrándose que tanto el AG como el RVT poseen actividad antimicrobiana contra una cepa enteropatógena de *Escherichia coli*, lo cual apoya el uso de compuestos fenólicos con potencial aplicaciones terapéuticas futura (Niño Herreran y col., 2020).

Agradecimientos

A la Fundación María Paula Alonso de Ruiz Martínez y al Laboratorio de Productos

Naturales de la Facultad de Ciencias UCV por todo el apoyo y colaboración.

Referencias Bibliográficas

- Alam M, Bristi N, Rafiquzzaman M. 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical J 21:143-152.
- Badhani B, Sharma N, Kakkar R. 2015. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. RSC Advances 35: 27540-27557.
- Burton GJ, Jauniaux E. 2011. Oxidative stress. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology 25:287-299.
- Cartaya O, Reynaldo I. 2001. Flavonoides: Características Químicas Y Aplicaciones. Cultivos Tropicales 22(2):5-14.
- Khaledi H, Alhadi AA, Yehye WA, Ali HM, Abdulla MA, Hassan Darvish P. 2011. Antioxidant, cytotoxic activities, and structure-activity relationship of gallic acid-based indole derivatives. Archiv Der Pharmazie, 344(11);703-709.
- Kosuru RY, Aashique Md, Fathima A, Roy A, Bera S. 2018. Revealing the dual role of gallic acid in modulating ampicillin sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Future Microbiol 10.2217/fmb-2017-0132.
- Liu C, Chen C, Ma H, Yuan E, Li Q. 2014. Characterization and DPPH• radical scavenging activity of Gallic acid-lecithin complex. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 13(8):1333.
- Lu Z, Nie G, Belton PS, Tang H, Zhao B. 2006. Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. Neurochemistry International 48(4):263-274.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr Hosp 17:271-278
- Niño Herreran SA, Iliná A, Chávez González ML, Martínez Hernández JL, Aguilar González CN, Rodríguez Herrera R, Flores García M, Govea Salas M. 2020. Efecto del ácido gálico y resveratrol sobre el crecimiento de microorganismos probióticos y bacterias patógenas. CienciaCierta. 63:82:92.
- Quiñones M, Miguel M, Alexandre A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural

- con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp* 27(1):76-89
- Venereo Gutiérrez JR. 2002. Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit* 31(2):126-33.
- Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH• free radical. *Talanta* 71(1):230-235.
- Wade L. 2011. *Química orgánica. Volumen 1. Séptima edición.* Pearson Educación, México. ISBN: 978-607-32-0790-4.