

69TCA. DETERMINACIÓN DE SINERGISMO Y ANTAGONISMO EN MEZCLAS DE POLIFENOLES DE YERBA MATE UTILIZANDO SUPERFICIE DE RESPUESTA

VALERGA J. y LANARI MC

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA),
Universidad Nacional de La Plata (UNLP) 47 y 116 La Plata (1900), Buenos Aires,
Argentina TE /Fax (0221) 4254853/ 4249287 /4890741. e-mail: clanari@cidca.org.ar

Resumen: Se modeló la actividad antiradicalaria (AA), el poder reductor (PR) y la capacidad de inhibición de la oxidación del ácido linoleico (AI) de una mezcla de ácido cafeico (C), clorogénico (CL), kaempferol (K), quercetina (Q) y rutina (R) presentes en extractos polifenólicos de yerba mate utilizando diseño estadístico de mezclas y superficie de respuesta. Las concentraciones correspondientes a las mezclas con niveles óptimos de AA, AI y RP se determinaron mediante la optimización simultánea de los 3 modelos. Las mezclas con actividad óptima eran: Q (100%), R (100%), CL/R (81/19%), Q/R (94/6%) (50/50%); C/Q (79/21%) (50/50%); K/R (28/72%).

1. Introducción

La incorporación de antioxidantes a alimentos es una forma simple y efectiva de mejorar la calidad nutricional y sensorial y extender la vida útil de los mismos. El uso de extractos polifenólicos “mínimamente purificados” como fuente de antioxidantes es ventajoso ya que sus costos de producción son menores y los consumidores los consideran más saludables que los componentes puros.

La yerba mate (*Ilex paraguariensis*) contiene sustancias polifenólicas de excelente actividad antioxidante (AOA) tales como los ácidos cafeico (C), clorogénico (CL), rutina (R), quercetina (Q) y Kaempferol (K). Extractos ricos en estos compuestos podrían utilizarse para elaborar alimentos funcionales con buena estabilidad oxidativa y larga vida útil. La aplicación comercial de extractos con bajo nivel de purificación a alimentos requiere productos de composición y actividad consistentes y fáciles de aplicar, para lo cual es necesario establecer la relación entre la composición de polifenoles y AOA de los mismos.

Debido a la complejidad de los mecanismos de acción de los distintos antioxidantes no existe un método que permita determinar la actividad total de los mismos

2. Objetivos

Los objetivos de este trabajo son determinar

- (a) la relación entre la actividad antiradicalaria, el poder reductor y la capacidad de inhibición del ácido linoleico y la composición de una mezcla de cafeico, clorogénico, kaempferol, quercetina y rutina mediante el método de superficie de respuesta
- (b) La composición de las mezclas que permita maximizar en forma simultánea estos 3 parámetros.

3. Materiales y métodos

Para analizar la relación entre la actividad antioxidante y la composición de ácidos fenólicos comúnmente presentes en la yerba mate se utilizaron mezclas equimolares de C, Cl, R, Q y K. La concentración total de cada mezcla fue 25 μM y todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Debido a la gran complejidad de los mecanismos de acción de los antioxidantes y al elevado número de factores que afecta la determinación de la actividad antioxidante, no existe un método de evaluación único. En este estudio se determinó:

- Actividad antiradicalaria (AA) con la técnica del DPPH* (Brand-Williams y col., 1995). La desaparición del DPPH* se monitoreó durante 80 min.
- Poder reductor (PR) de la mezcla mediante el método de FRAP (Ferric reducing antioxidant power; Benzie y Strain, 1996) con un tiempo de reacción de 4 min
- Capacidad de inhibición de la oxidación del β -caroteno/ácido linoleico o Índice antioxidante (IA) mediante el protocolo descrito por Valerga y col., (2012).

Los resultados se expresaron en porcentaje (%) de: (a) DPPH*/ μmol de antioxidante (μmol AH); (b) β -caroteno / μmol AH y (c) Fe^{2+} formado/ μmol AH

Análisis Estadístico

El diseño experimental consistió en un diseño de tipo Simplex Reticular (Cornell, 1990), con 5 factores (C, CL, K, Q, R) de 4 niveles cada uno replicado 3 veces. La predicción de la actividad antioxidante (AOA) se realizó mediante el modelo canónico de Scheffé's (Cornell, 1990) (Eq. 1)

$$\text{AOA}_{\text{pred}} = \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i < j} \delta_{ij} x_i x_j (x_i - x_j) + \sum_{i < j < k} \beta_{ijk} x_i x_j x_k \quad (1)$$

AOA representa los valores de AA, RP y AI predichos por el modelo; β_i , β_{ij} y β_{ijk} son los coeficientes correspondientes a los términos lineales y a las interacciones de 2º y 3er grado respectivamente mientras que δ_{ij} es el coeficiente cúbico de la interacción binaria. Las concentraciones de los componentes de la mezcla (x_i , x_j , x_k) se expresaron en fracción molar. La determinación de los parámetros y la optimización del modelo se realizó con el programa Design Expert 7

4. Resultados y discusión

Actividad Antiradicalaria

Los términos cúbicos de las interacciones binarias y los efectos ternarios presentes en el modelo (1) no eran significativos por lo tanto el modelo AA/composición polifenólica de la mezcla se redujo a un polinomio de 2º grado con $R^2 = 0.90$ (Eq.2).

$$\text{AA}_{\text{pred}} = 4.16 x_C + 4.36 (x_{CL} + x_Q) + 4.07 x_K + 4.23 x_R - 0.83 (x_C x_{CL} - x_C x_R) + 0.73 x_C x_Q + 0.94 x_{CL} x_Q - 1.79 x_{CL} x_R \quad (2)$$

La correlación entre experimentales y predichos mostró un buen ajuste con $R^2 = 0.92$. Q y Cl fueron los mayores contribuyentes al término lineal seguidos por R y C mientras que K presentó los valores de actividad más bajos. CL es individualmente uno de los antioxidantes más potentes en esta mezcla, sin embargo su eficacia en la mezcla se ve disminuida por 2 efectos antagonistas, CL*R y CL*C, en contraposición, la actividad

individual de Q mejora en la mezcla debido al aporte de 2 sinergismos C*Q y CL*Q. El modelo detecto otro efecto antagónico entre cafeico y rutina.

El aporte de los efectos principales a AA_{pred} era mucho mayor que el de las interacciones. En un sistema de 5 componentes (C/CL/K/Q/R) con concentraciones son equimolares ($x_i = 0.2$) AA_{pred} es $4.16 \mu\text{mol}^{-1}$, los efectos principales equivalían a 103% de la actividad total mientras que las interacciones eran antagónicas y correspondían al 3% de AA_{pred} .

Para determinar la composición polifenolica de los sistemas de mayor y menor actividad utilizamos el modulo de optimización del Design Expert 7. Las mezclas más eficientes no contenían R o K por lo tanto en esas condiciones las variables significativas eran C, CL y Q. La ausencia de R permitió un aumento en las proporciones de antioxidantes más potentes como Q o CL así como la eliminación de 2 interacciones negativas: C *R y CL*R.

La figura 1 muestra la dependencia de AA_{pred} con la concentración en una mezcla C/CL/Q con x_R y $x_K = 0$.

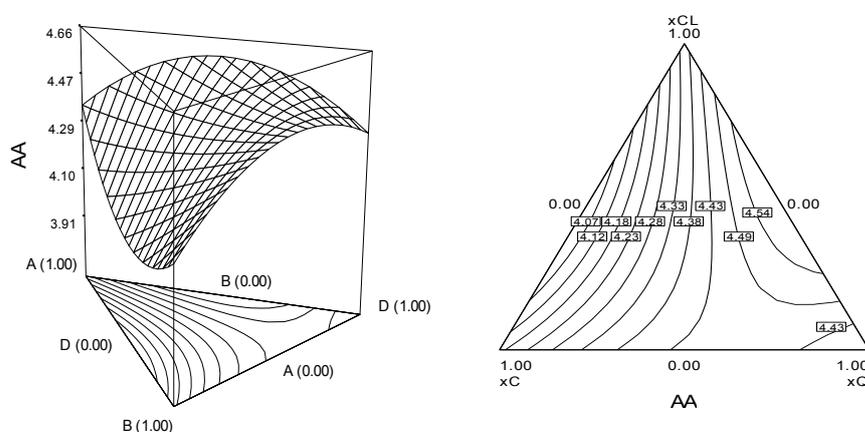


Fig. 1 Dependencia de AA_{pred} con la concentración de x_{CL} (A), x_C (B) y x_Q (D); $x_K = 0$

$x_R = 0$

La reducción de los niveles de cafeico, el componente de menor eficiencia, mejoro AA_{pred} 10%, debido a un aumento en las proporciones de los componentes más activos, CL o Q y a una reducción del efecto antagonista C*CL. Por otro lado, contenidos de CL o Q mayores de 78% redujeron la eficiencia antiradicalaria 4.4%. el contenido de polifenoles en los sistemas más eficientes ($AA_{pred} \geq 4.52 \mu\text{mol}^{-1}$) era: C = 0 – 11% y CL/Q = 22 – 78%.

Las mezclas menos activas no contenían Q o K. La exclusión de Q produjo una caída considerable del término lineal y la eliminación de los únicos efectos sinérgicos CL*Q y C*Q. La figura (2) muestra la influencia de las concentraciones relativas de C/CL/R en la actividad antiradicalaria predicha por la Eq. (1). Las composiciones de las mezclas de menor eficacia ($AA_{pred} \leq 3.86 \mu\text{mol}^{-1}$) eran: C = 0 – 33 %; CL = 27 – 56 % and R = 32 – 59%.

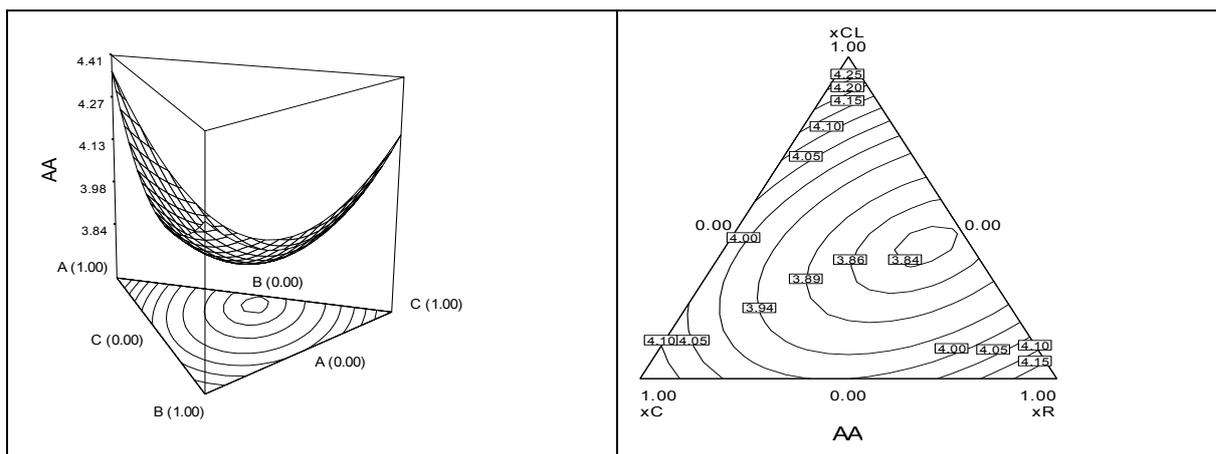


Fig.2 Dependencia de AA_{pred} con la concentración de xCL (A), xC (B) y xR (C); $xK = 0$

$$xQ = 0$$

Poder Reductor

La relación RP/composición se modela satisfactoriamente con la Eq. (3), con $R^2 = 0.901$.

$$RP_{pred} = 2.34 xC + 2.51 xCL + 3.05 xK + 4.96 xQ + 3.81 xR + 5.98 xCL xQ + 1.97 xCL xK + 6.21 xC xQ + 2.36 xC xK + 2.80 xQ xR + 4.68 (xK xR + xK xQ) + 7.22 (xC xCL xR + xCL xQ xR) + 10.28 xC xCL xQ + 15.11 xC xCL xK + 11.87 xCL xK xR + 8.18 xC xQ xR - 8.02 xK xQ xR + 5.99 (xCL xQ (xCL - xQ) + xC xQ (xC - xQ)) - 6.38 xCL xK (xCL - xK) + 2.68 xR xQ (xR - xQ) - 4.07 xQ xK (xQ - xK) \quad (3)$$

La correlación entre experimentales y predichos muestra un buen ajuste con $R^2 = 0.95$.

Q era el componente más efectivo seguido por R y K, mientras que CL y C eran los de menor actividad. Los valores positivos de β_{ij} y la ausencia de δ indicaron que K^*R y C^*K eran sinérgicas pero el comportamiento (sinergista/antagonista) de CL^*Q , CL^*K , C^*Q , Q^*R y Q^*K no podía deducirse directamente del modelo ya que también dependía de las concentraciones relativas de los componentes de la interacción. El modelo detectó 6 efectos sinergismos ternarios y 1 antagonístico (K^*Q^*R).

En una mezcla equimolar de $C/CL/K/Q/R$ ($x_i = 0.20$), los efectos binarios y terciarios eran sinérgicos y correspondían al 23 y 9% del RP total respectivamente.

Los sistemas más eficientes tenían $xQ = 0.43 \pm 0.02$ y ninguno contenía K. Estos resultados sugieren que la presencia de concentraciones relativamente altas de Q era un requerimiento importante para maximizar RP.

La Fig. 3 muestra el efecto de las concentraciones de $C/CL/Q$ con $xR = 0.15$. El aumento de Q de 0 a 40 – 50% produjo una fuerte mejoría en RP de 2.63 a 5.16 μmol^{-1} sin embargo, incrementos adicionales hasta 85% redujeron RP_{pred} 4.8%.

La influencia de los niveles de C y/o CL dependía del contenido de Q presente. En sistemas con $(Q) < 30\%$, cambios en los niveles de C y/o CL podrían afectar RP_{pred} hasta 90%; en cambio para $(Q) \geq 30\%$, las variaciones eran menores de 3%.

La minimización de la Eq. (2) indicó que mezclas con 82-93% CL y 18-7% K eran las menos activas con $RP_{pred} = 2.27 - 2.31 \mu\text{mol}^{-1}$, los efectos principales contribuían con 114% de la actividad total mientras que CL^*K era antagonista y correspondía al 14% de AA_{pred} .

La incorporación de R a una mezcla de C/CL aumentó en forma continua el poder reductor de 2.34 – 2.51 μmol^{-1} hasta 3.81 μmol^{-1} (datos no mostrados)

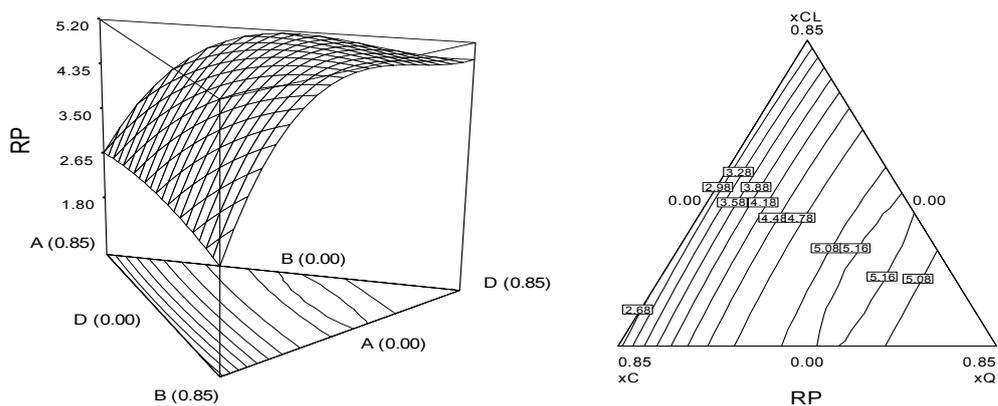


Fig.3 Dependencia de RP_{pred} con la concentración de xCL (A), xC (B) y xQ (D); $xK = 0$ $xR = 0.15$

Capacidad de inhibición del sistema β -caroteno/ácido linoleico

La relación AI/composición se redujo a la Eq. (4)

$$\begin{aligned}
 AI = & 4.56 xC + 4.47 xCL + 4.45 xK + 4.93 xQ + 4.31 xR - 1.29 xC xCL - 1.67 (xC xK + \\
 & xCL xK) - 4.37 xC xQ - 1.11 xC xR - 4.27 xCL xQ - 1.08 xK xQ - 0.88 xK xR - 3.46 \\
 & xQ xR - 14.73 xC xK xR - 7.64 xC xCL xK - 4.36 xC xCL xQ + 6.17 xCL xK xQ - \\
 & 9.91 xCL xK xR - 8.41 xCL xQ xR + 14.04 xK xQ xR \\
 & (4)
 \end{aligned}$$

La correlación entre predichos y experimentales demostró un buen ajuste con $R^2 = 0.95$. Q era el mejor inhibidor de la peroxidación seguido por C, CL y K mientras que R era el de menor eficiencia. Se detectaron 14 efectos antagonistas y solamente 2 sinergismos CL/Q/K and K/Q/R.

Si se considera una mezcla equimolar de C/CL/K/Q/R ($x_i = 0.20$), $AI_{pred} = 3.55 \mu\text{mol}^{-1}$, los efectos principales y las interacciones corresponden a 127.8 % y 27.8% de la actividad total respectivamente.

A partir de la optimización del modelo (4) se observó que la mayoría de los sistemas más activos ($AI_{pred} = 4.50 - 4.92 \mu\text{mol}^{-1}$) no contenían C o CL. Este comportamiento puede deberse a que a pesar de que C y CL individualmente son más activos que K o R son también parte de 11 efectos antagonistas por consiguiente su eliminación puede mejorar la actividad total del sistema.

Las mezclas C/CL o C/R con $(C) > 97\%$ también tenían una actividad de $4.50 \mu\text{mol}^{-1}$.

La figura (4) muestra la influencia de la concentración de polifenoles de una mezcla de K/Q/R en AI_{pred} con $xC = xCL = 0$. Las composiciones de los sistemas más activos eran: K (0-22 %), Q (77-100 %) and R (0 - 8 %).

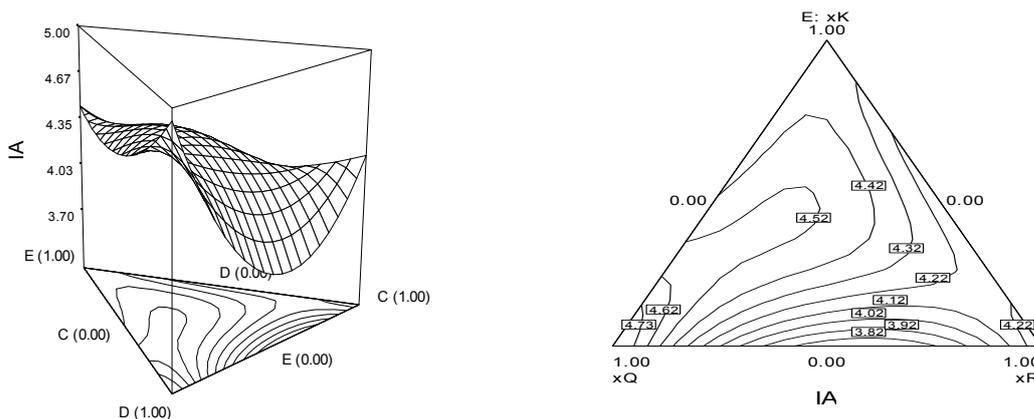


Fig.4 Dependencia de AI_{pred} con la concentración de xK (E), xQ (D) y xR (C); $x_C = 0$, $x_{CL} = 0$.

El agregado de 0-21% de K a una combinación de Q/R con Q = 25-55% produjo un brusco aumento de la actividad de $3.73 \mu\text{mol}^{-1}$ a $4.42 \mu\text{mol}^{-1}$ no obstante, incorporaciones adicionales hasta 32% lograron solamente una mejoría de 2.2%.

Las combinaciones polifenolicas de menor capacidad inhibitoria incluían C, CL, Q y R. A partir de la Eq (4) se observa que K formaba parte de todos los sinergismos por lo tanto su ausencia elimina la contribución de los mismos a la actividad total.

La figura (5) muestra la relación AI_{pred} /composición para el sistema C/CL/Q. La inclusión de Q a una mezcla C/CL produjo una brusca caída de AI_{pred} de $4.22-4.28 \mu\text{mol}^{-1}$ a un mínimo de $3.39 \mu\text{mol}^{-1}$ correspondiente un contenido de polifenoles (%) de C = 38 – 41%; CL = 23 – 39 % y Q = 34 – 45 %. Si bien Q es individualmente el más potente inhibidor del sistema, sus reacciones antagónicas con C, CL y/o R son importantes ya que en estas condiciones constituyen 28% de la actividad total. Aumentos adicionales de Q mejoraron AI_{pred} hasta alcanzar el máximo ($4.93 \mu\text{mol}^{-1}$) correspondiente a la quercetina pura.

Cuando analizamos la dependencia de AI_{pred} con la composición de la mezcla C/CL/R observamos que los niveles mínimos de actividad son 23% más altos que en el sistema C/CL/Q (datos no presentados). Esto se debe a que al reemplazar Q por R los efectos de las interacciones continúan siendo negativos ya que solo alcanzan a 7% de AI_{pred} comparado con 28% de C/CL/Q.

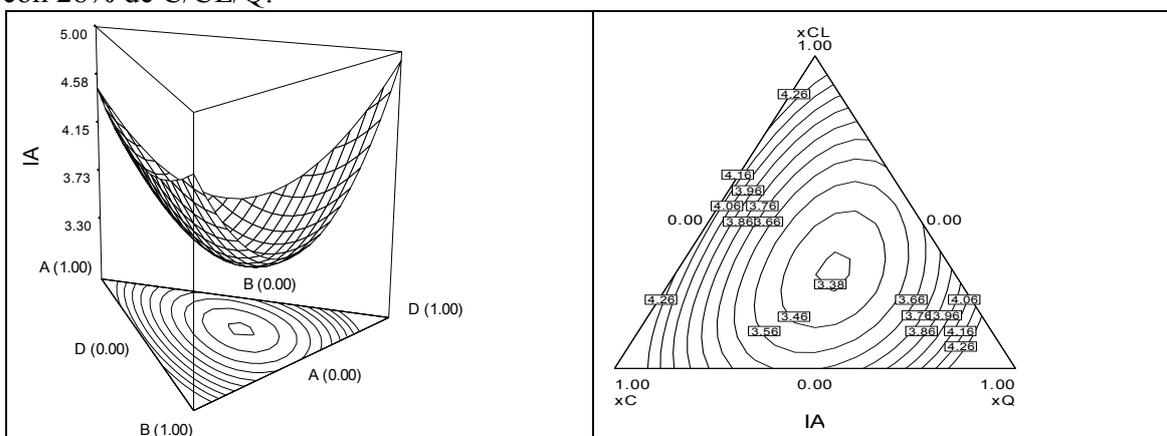


Fig.5 Dependencia de AI_{pred} con la concentración de xCL (A), xC (B) y xR (C); $x_Q = 0$, $x_K = 0$.

La maximización o minimización simultánea de las Eqs. (2), (3) y (4) permitió determinar las composiciones de las mezclas más y menos activas teniendo en cuenta AA, RP y AI (Tabla 1). Los sistemas más activos eran todos binarios, 6 contenían Q, 4 rutina, 2 cafeico mientras que CL y K aparecían solamente en una mezcla cada uno. La mayoría de las mezclas menos activas contenían distintos niveles de C, CL o R; K estaba presente en 3 soluciones y ningún caso contenía Q. Se determinaron las siguientes mezclas con actividad óptima: Q (100%), R (100%), CL/R (81/19%), Q/R (94/6%) (50/50%); C/Q (79/21%) (50/50%); K/R (28/72%).

5. Conclusiones

Los modelos obtenidos predijeron satisfactoriamente la relación entre la actividad antirradi calaria (AA), el poder reductor (RP) o la capacidad de inhibición del ácido linoleico (AI) con la composición de una mezcla de C/CL/K/Q/R.

Los modelos permitieron detectar sinergismos y antagonismos de 2º y 3er orden.

A partir de los 3 modelos se determinaron las composiciones de las mezclas con actividad óptima respecto de AA, RP y AI así como las correspondientes a los sistemas de actividad mínima.

Se determinaron las siguientes mezclas con actividad óptima: Q (100%), R (100%), CL/R (81/19%), Q/R (94/6%) (50/50%); C/Q (79/21%) (50/50%); K/R (28/72%).

6. Bibliografía

Benzie, I.F. y Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of the antioxidant power: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70-76.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens. Wiss. Technol.* 28(1), 25-30.

Cornell, J.A. (1990). Experiments with mixtures. Design, models and the analysis of mixture data. John Wiley & Sons, Inc., New York 2nd Ed