

INFORME PRACTICA OPTATIVA

Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de fracciones obtenidas de extracto de vainas de *Mucuna pruriens*

Alumna: Verónica Noemí Valenzuela

Carrera: Bioquímica

Directora: Dra. Margarita de las Mercedes Vallejos

Agradecimientos

A mi directora la doctora Margarita Vallejos por su paciencia y dedicación, por su ayuda y apoyo constante durante el desarrollo de esta práctica

A la Licenciada Beatriz Avalos, mi amiga, que me acompaña desde el momento que decidí hacer mis prácticas con ella, contagiando siempre su buena energía.

A todo el grupo de profesionales que forman parte del Laboratorio de Tecnología Química de FaCENA, por su constante predisposición en ayudarme y enseñarme.

Finalmente, y no por ello menos importante, quiero agradecer a mi familia y amigos que fueron pilares fundamentales durante toda mi carrera.

Índice general

Resumen	Página 3
Introducción	Página 4
Objetivos	Página 5
Materiales y métodos	Página 6
Resultados y discusión	Página 13
Conclusiones..	Página 19
Referencias	Página 20

Resumen

Mucuna pruriens (Mp) es una legumbre cultivada en el Nordeste Argentino, cuyas semillas se utilizan en alimentos y ventas, mientras que las vainas suelen ser desechadas o empleadas como abono. Aunque las semillas contienen compuestos fenólicos beneficiosos para la salud, la composición de las vainas (vMP) ha sido poco investigada. Con el propósito de generar conocimientos que permitan aprovechar las vMP, para la obtención de compuestos bioactivos con alto valor agregado en este estudio se realizó extracción asistida por ultrasonido para obtener extractos de vMp. Luego, se fraccionó el extracto utilizando cromatografía en columna con Sephadex LH-20. Se determinó el contenido total de fenoles, flavonoides y *orto*-difenoles, y se evaluó la capacidad antioxidante (CA) con diversas técnicas *in vitro*. Además, se empleó cromatografía en placa delgada para identificar la presencia de *L*-Dopa y ácido cafeico en las fracciones. Los resultados muestran que la extracción asistida por ultrasonido ofrece mejores rendimientos, concentraciones de compuestos fenólicos y CA en comparación con métodos convencionales. La cromatografía en columna con Sephadex LH-20 permitió obtener fracciones con altas concentraciones de compuestos fenólicos. Los ensayos de la CA indicaron que algunas fracciones, especialmente F04 y F05, presentan una actividad superior a la del extracto crudo. La capacidad antioxidante mostró una buena correlación con el contenido total de fenoles y compuestos *orto*-difenoles. La cromatografía en placa delgada permitió identificar la presencia de *L*-Dopa y ácido cafeico en ciertas fracciones. Estos resultados, además de ampliar el conocimiento sobre la composición de las vMp, también establecen una base para futuras investigaciones.

Introducción

Según las Naciones Unidas, se generan 140 billones de toneladas de biomasa anualmente por la actividad agrícola. (Programme, 2009) Si no se manejan adecuadamente, estos residuos pueden causar problemas ambientales y, al mismo tiempo, desaprovechar compuestos biológicos valiosos. (Halliwell, 1999; Nguyen, 2017; Santana-Méridas, González-Coloma, & Sánchez-Vioque, 2012) Por ello, la valorización de los desechos generados es una estrategia para lograr los objetivos de desarrollo sostenible de las Naciones Unidas propuestos para el año 2030.

Numerosos compuestos bioactivos provenientes de residuos agrícolas han mostrado propiedades útiles para prevenir y tratar enfermedades como diabetes, obesidad, cáncer y enfermedades cardiovasculares, debido a sus propiedades antioxidantes y antirradiculares que protegen el ADN, las proteínas y los lípidos. (Xu et al., 2017)

En el Nordeste Argentino (NEA), la agricultura es una de las actividades económicas más importantes. En esta región, medianos y pequeños productores cultivan varias especies de legumbres como, por ejemplo, *Mucuna pruriens* (Mp) conocida como poroto terciopelo (Figura 1). Esta legumbre contiene compuestos bioactivos con propiedades fitomedicinales en semillas, tallos y raíces. (Amarowicz & Pegg, 2008, 2019) Se ha demostrado que extractos de sus semillas muestran capacidad antioxidante, influye en los niveles de colesterol y glucosa, y presenta actividad antimicrobiana y neutralizadora de venenos ofídicos. (Rayavarapu & Kaladhar, 2011; Tan et al., 2009) Además, las semillas contienen Levodopa (L-Dopa, 3-12%), precursor de la dopamina, popular en la medicina ayurvédica para tratar la enfermedad de Parkinson. (Aware et al., 2019; Rai et al., 2020)



Figura 1. Planta, vainas y semillas de *Mucuna pruriens* del NEA.

El procesamiento de las semillas de Mp para la producción de harinas o su uso en recetas alimentarias genera una importante cantidad de residuos en forma de vainas (vMp) y otros subproductos. Estas vainas representan alrededor del 40% del fruto entero (semillas ~ 60%) y son usadas como abono orgánico o combustible pero mayoritariamente son desechadas. Las vainas, una biomasa lignocelulósica no amilácea también contienen (CF), cuya concentración aumenta a medida que la planta alcanza la madurez, mientras que el contenido de taninos disminuye. (Chikagwa-Malunga et al., 2009)

En un estudio previo se ha investigado la extracción de CF con capacidad antioxidante (CA) de vMp y vainas de *Cajanus cajan* (vCc), otra legumbre también cultivada en el NEA, utilizando diferentes solventes y el método de decocción. (Avalos et al., 2023) Los resultados mostraron que el etanol al 50 % y el metanol al 100 % fueron los disolventes más eficaces para extraer CF con CA de vMp y vCc, respectivamente. Además, se encontró que el método de decocción también

es eficiente para extraer CF de vMp. Los principales CF detectados en los extractos de vMp fueron el ácido cafeico y el ácido clorogénico. Los resultados sugieren que tanto las vMp como las vCc son fuentes viables de antioxidantes naturales con potenciales beneficios para la salud.

El rendimiento de los extractos y las concentraciones de CF totales de vMP fueron similares a los reportados para semillas empleando extracción convencional, pero fueron ligeramente menores a los obtenidos por extracción asistida por ultrasonido y por microondas. (Dhanani et al., 2015)

Con el propósito de generar conocimientos que permitan aprovechar las vainas de *Mucuna pruriens* para la obtención de compuestos bioactivos, en este trabajo se realizó la extracción asistida por ultrasonido para mejorar los rendimientos. Asimismo, con el objetivo de obtener fracciones con elevadas concentraciones de CF y CA, se procedió a la separación del extracto de vMp empleando cromatografía en columna. Se utilizó Sephadex LH-20 como relleno, ampliamente reconocido por su eficacia en la separación y aislamiento de fracciones antioxidantes en extractos vegetales. (Larrauri et al., 2016) Se espera que este trabajo siente las bases para la identificación y purificación de los compuestos antioxidantes presentes en el extracto de vMp.

Objetivo General

Generar conocimientos que permitan aprovechar las vainas de *Mucuna pruriens*, un subproducto de la agricultura, para la obtención de compuestos bioactivos con alto valor agregado.

Objetivos Específicos

- Obtener extractos de vainas de *Mucuna pruriens* utilizando extracción asistida por ultrasonido.
- Separar el extracto obtenido en fracciones, empleando cromatografía en columna LH-20
- Determinar el contenido de compuestos fenólicos, *orto*-difenoles y flavonoides totales, empleando técnicas espectrofotométricas, en el extracto y las fracciones obtenidas.
- Evaluar la capacidad antioxidante de las fracciones, utilizando diferentes ensayos *in vitro*.
- Comparar los resultados obtenidos en las fracciones y en el extracto optimizado.

Materiales y métodos

Material vegetal: Se trabajó con vainas de *Mucuna pruriens var. utilis* provistas por la Estación Experimental Agropecuaria El Sombrero, Corrientes (INTA).

Las vainas se limpiaron y secaron y luego se molieron mediante molinillo eléctrico (KSM2 Braun, Naucalpan de Juárez, México). Las muestras se tamizaron con una malla ASTM N° 100 (140 mm) y retenida en una malla ASTM N° 18 (1000 mm). Luego se guardaron en recipientes herméticos, refrigeradas hasta su uso.

Obtención de extracto

Se realizó extracción asistida por ultrasonido (EAU). El ultrasonido es una onda sonora con una frecuencia superior a 20 kHz y vibraciones mecánicas en sólido, líquido y gas. Tiene las mismas propiedades que las ondas sonoras regulares y se propaga a través de un medio mediante ciclos de expansión y contracción. En el procesamiento de matrices vegetales, en general, se emplean ondas de alta intensidad con frecuencias que oscilan entre 20 y 100 kHz. El ultrasonido funciona a través del fenómeno de cavitación, que implica la implosión de microburbujas de aire generadas por las ondas sonoras al pasar por el medio de tratamiento. Estas microburbujas se forman durante los ciclos de compresión y expansión de las ondas, crecen hasta colapsar y explotan, liberando energía y provocando diversos cambios físicos, químicos y bioquímicos en las células de los productos procesados (Figura 2a). El mecanismo de EAU incluye dos fenómenos físicos principales: la difusión a través de la pared celular y la expulsión del contenido de los orgánulos celulares al espacio intercelular tras la ruptura de sus paredes. (Bui et al., 2020)

La EAU permite obtener mayores rendimientos con tiempos de extracción más cortos en comparación con la extracción convencional, ahorrando costos y tiempo. Los parámetros de EAU, como el tiempo, la temperatura y la frecuencia, influyen significativamente en la actividad antioxidante de los extractos. (Traffano-Schiffo et al., 2020) Además, la EAU causa menos degradación de compuestos fenólicos, produciendo extractos de alta calidad utilizados en alimentos, suplementos y productos farmacéuticos. (Nguyen, 2017)

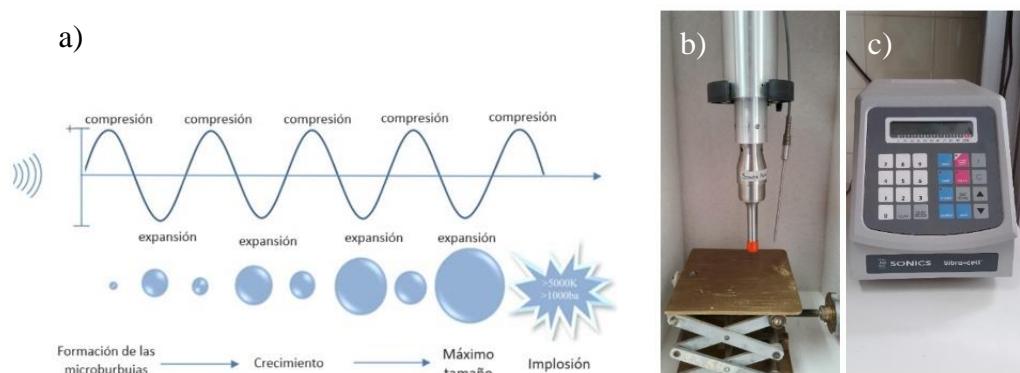


Figura 2. a) Crecimiento y colapso de burbujas en el proceso de cavitación acústica, modificado de Bui et al. (2020). b) Sonda ultrasónica y c) Fuente del equipo de ultrasonido VCX500, Sonics

La EAU de vMp, se realizó bajo las condiciones previamente optimizadas mediante método de superficie-respuesta (MSR) en nuestro grupo. Se pesó 10 gramos de la muestra y se agregó 100

mL de etanol al 30% (relación 1:10). Se homogeneizó en un vaso de precipitado, mediante agitador magnético durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se aplicó ultrasonido de alta intensidad utilizando una sonda (modelo 220-B, CV334, Sonics, USA) con un diámetro de punta de 13 mm conectada a un procesador ultrasónico de alta intensidad con control de temperatura (VCX500, Sonics, USA) (Figura 2b y c). La sonda se sumergió en la solución a una frecuencia de 20 kHz y una potencia máxima de 400 W (80% amplitud), durante 10 min. El sobrecalentamiento de la muestra se evitó sumergiendo el vaso de precipitados en baño hielo. Después del tratamiento con ultrasonido, la solución se centrifugó a 4500 rpm durante 15 minutos. Luego, se filtró a través de papel de filtro en un embudo de Büchner en condiciones de vacío. El solvente se redujo empleando rotavapor (RE100-PRO DragonLab) y luego se liofilizó (Liofilizador CHRIST Alpha 1-4 LO). El extracto obtenido se almacenó en frasco cerrado a 4 °C.

Fraccionamiento del extracto

El fraccionamiento del extracto crudo de vMp se realizó mediante cromatografía en columna empacada con Sephadex LH-20 (Figura 3). Este material consiste en dextrano reticulado con grupos hidroxipropilo, lo cual le confiere propiedades mejoradas de interacción hidrofóbica. El Sephadex LH-20 fue desarrollado especialmente para la filtración de productos naturales y para su uso en cromatografía en columna para la separación por tamaño y purificación. (Mottaghpisheh & Iriti, 2020; Murphy & D'Aux, 1975; Park et al., 2011)

La obtención de fracciones de extracto crudo de vMp se realizó siguiendo la metodología propuesta por Pizzolitto et al. (2013), con modificaciones. Se suspendió una porción de 100 mg del extracto crudo en 2 mL de etanol al 30% y se sembró ~1,4 mL (~70 mg de extracto) en una columna (2.5 cm × 18 cm) empacada con Sephadex LH-20 y equilibrada con etanol absoluto. Luego, se eluyó sucesivamente con etanol acuoso 96%, 90%, 80%, 60% (100 mL), 40%, 20% (50 mL) y agua bidestilada (50 mL). Se recogieron aproximadamente 5 mL de eluyente en tubos de Khan, con un flujo de 1 mL/min. Se realizó barrido espectral dentro del rango UV-vis (200-800 nm) y se evaluó el contenido de fenoles totales (CFT) con Folin-Ciocalteu (ver abajo), de la mezcla de cada tubo. En base a los resultados de estas dos determinaciones, las mezclas de los tubos fueron combinadas en fracciones. Luego, las soluciones se concentraron mediante evaporación rotatoria, se liofilizaron, se pesaron y finalmente se almacenaron a -20°C.



Figura 3. Columna empacada con Sephadex LH-20

Determinación de compuestos fenólicos

Contenido total de fenoles (CTF). Para esta determinación, se utiliza un reactivo fosfotungstico-fosfomolibídico, llamado reactivo de Folin-Ciocalteu, junto con una solución saturada de carbonato de sodio para alcalinizar el medio de reacción ($\text{pH} \sim 10-12$), generando el anión fenolato (Figura 4). Posteriormente, ocurre una reacción redox entre el anión fenolato y el reactivo de Folin-Ciocalteu (amarillo) en la que el molibdeno se reduce y el color de la solución cambia de amarillo a azul después de un período de aproximadamente 30 minutos a 40°C (en oscuridad). Este cambio de color se debe a la generación de un complejo metálico azul y está asociado con el contenido total de fenoles de la muestra. La absorbancia máxima del complejo azul se encuentra entre 620 y 765 nm.

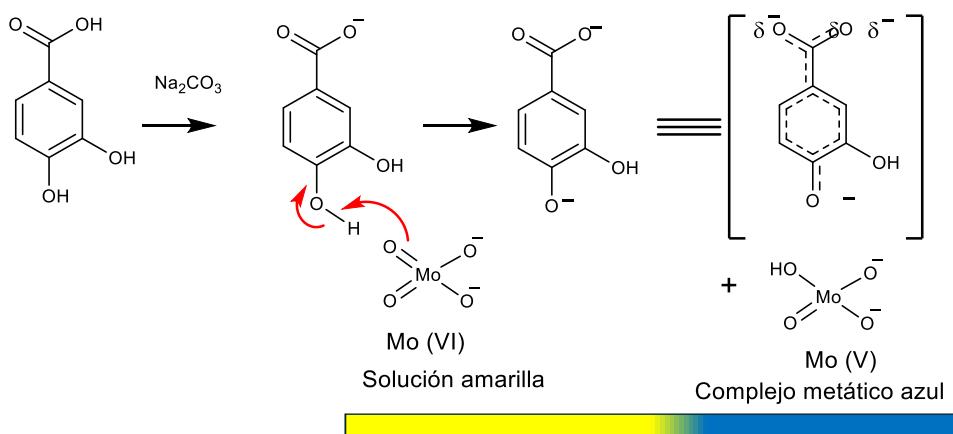


Figura 4. Mecanismo de reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu.

Para este ensayo se siguió la metodológica descripta por Siddhuraju & Becker (2003) con ligeras modificaciones. Las muestras se llevaron a una concentración aproximada de 200 mg/mL. En una microplaca de 96 pocillos se colocó 20 μL de muestra y se adicionó 100 μL de reactivo diluido. Se agitó durante 1 minuto y se dejó en reposo 2 minutos. A continuación, se agregó 75 μL de solución de carbonato de sodio al 10%. Se homogeneizó y se llevó a estufa durante 30 minutos a 40°C . La absorbancia de la solución se midió a 750 nm. Se construyó una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar. El CFT se expresa como mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por gramo de extracto crudo o fracción (EAG/g).

Contenido total de *orto*-difenoles (CTOD). Los *orto*-difenoles son moléculas que poseen en su estructura uno o más grupos bencénicos sustituidos por al menos dos funciones hidroxílicas en posición *orto*. El interés en estimar el contenido de los compuesto *orto*-difenoles se debe a su fuerte actividad antioxidante frente a especies reactivas y a su potencial para quelar metales de transición, como Cu^{2+} y Fe^{3+} , que están asociados con un mayor daño oxidativo a diferentes células *in vivo*.

El CTOD se determinó según lo descrito en Granato et al. (2016). En este método se utiliza el molibdato de sodio, el cual reacciona con los grupos hidroxilo de los *orto*-fenoles produciendo un complejo metálico de color ligeramente amarillo-naranja (Figura 5), cuya absorción máxima ocurre a 370 nm. Este método es de bajo costo, rápido y con alta reproducibilidad. Sin embargo, los fenoles mono, di y trihidroxilados también pueden reaccionar con molibdato de sodio en un medio acuoso, lo que reduce la especificidad del ensayo.

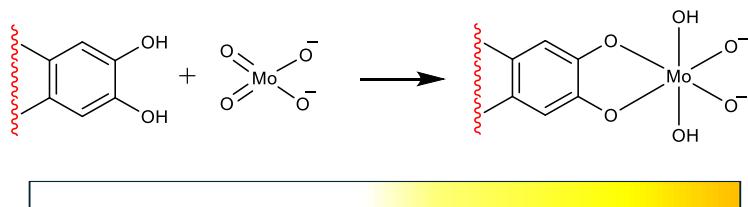


Figura 5. Reacción general propuesta entre un compuesto *orto*-difenol y molibdato de sodio.

Adaptado de Granato et al. (2016)

Para la determinación se utilizó una solución de molibdato de sodio al 5 % en etanol al 50% como reactivo. Se tomó una alícuota de 50 μ L de las muestras en una concentración aproximada de 1mg/mL y se agregó 200 μ L del reactivo. Se dejó reaccionar por 25 minutos a temperatura ambiente. Luego, se midió la absorbancia a 370 nm. Se construyó una curva de calibración con ácido cafeico como estándar. El CTOD se expresa como mg de equivalente de ácido cafeico (CAFE) por gramo de extracto crudo o fracción (CAFE/g).

Contenido total de flavonoides (CTFla). El contenido total de flavonoides en las plantas se puede determinar mediante métodos colorimétricos donde los compuestos fenólicos forman complejos con Al(III). Este método ha sido ampliamente utilizado para determinar el CTFla en extractos de plantas. (Kammerer et al., 2014; Naczk & Shahidi, 2006). Con el tiempo, el método original ha evolucionado con diversas modificaciones, incluida la incorporación de nitrito de sodio (NaNO_2) antes de la adición de AlCl_3 . El nitrito de sodio actúa como un agente nitrante selectivo para dióles aromáticos vecinales, lo que resulta en la formación de derivados flavonoides-nitroxilo (Figura 6). La determinación se basa en el cambio de color del anillo aromático (B) que lleva un grupo catecol con Al(III), formando un complejo naranja que se vuelve rosa-rojo al agregar NaOH. Los derivados se caracterizan por la aparición de una nueva banda de absorción alrededor de 500 nm en el espectro de absorción UV-visible. (Shraim et al, 2021)

Es importante considerar que el reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona con todas las sustancias fenólicas (flavonoides, ácidos fenólicos, etc.), mientras que el aluminio reacciona exclusivamente con el grupo hidroxilo de una unidad catecolica en el anillo B. Esta especificidad del aluminio hace que la técnica sea más adecuada para la detección de flavonoides en lugar de otros compuestos fenólicos. De esta manera, se puede determinar con mayor precisión la cantidad de flavonoides presentes en una matriz vegetal, evitando la interferencia de otros compuestos fenólicos, especialmente de algunos ácidos fenólicos que acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales. (Granato et al., 2016)

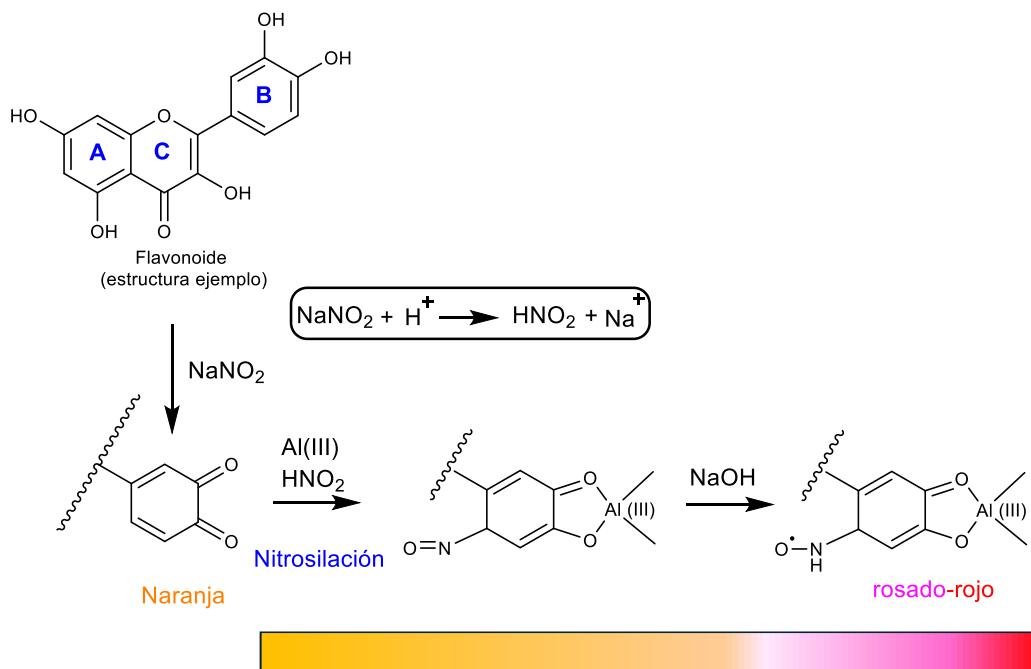


Figura 6. Formación de complejo Al(III)-flavonoide en presencia de NaNO₂. Adaptado de Shraim et al. (2021)

El CTFla se determinó siguiendo el método propuesto por Herald, et al.(2012). En una placa de microtitulación con 96 pocillo se añadió 100 μ L de agua destilada, 10 μ L de una solución de NaNO₂ al 5% (p/v) y 25 μ L de muestra. Luego de 5 minutos, se añadió 25 μ L de solución etanólica de AlCl₃.6H₂O al 10% (p/v) y se dejó reaccionar durante 5 minutos. Luego, se añadió 50 μ L de NaOH al 1 mol/L en cada pocillo y se dejó reaccionar durante 5 minutos con agitación continua. La lectura de la placa se realizó a 510 nm frente al blanco. Se construyó una curva de calibración utilizando (+)-catequina como estándar. El CTFla se expresa como mg de equivalente de (+)-catequina (CAE) por gramo de extracto crudo o fracción (CAE/g).

Estimación de la capacidad antioxidante

Capacidad estabilizadora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). El ensayo de DPPH es un método para evaluar la actividad de captura de radicales libres. (Brand-Williams et al. 1995) El radical DPPH[•] presenta una notable estabilidad debido a la deslocalización del radical en los anillos aromáticos. En los ensayos, el radical DPPH[•] se neutraliza al aceptar un átomo de hidrógeno o un electrón de una especie antioxidante (o agentes reductores), convirtiéndose en una forma reducida (DPPH o DPPH-H) al final del proceso (Figura 7). (Bibi Sadeer et al., 2020) El electrón desapareado del radical DPPH[•] absorbe fuertemente a 517 nm, lo que da lugar a un color púrpura intenso. Sin embargo, cuando el electrón desapareado se empareja con otro electrón, el color inicial se decolora gradualmente hasta volverse amarillo pálido.

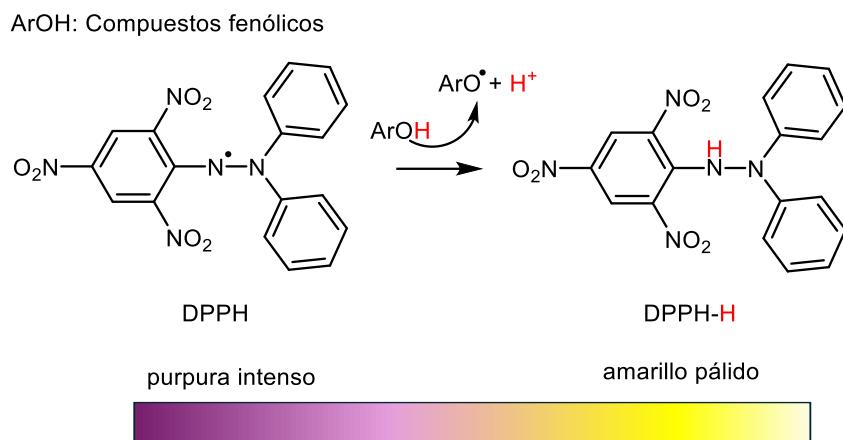


Figura 7. Mecanismos de reacción del radical DPPH[•]. Adaptado de Bibi Sadeer et al., (2020)

Para la determinación se empleó el método propuesto por Brand-Williams et al. (1995) con ligeras modificaciones. Se trabajó con concentraciones aproximadas de 0,20 mg/mL para las muestras. En una placa de 96 pocillos se añadió 12 µL del extracto a 288 µL de una solución metanólica de DPPH a 0,1 mM. Luego, la mezcla se agitó y se dejó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. La absorbancia de la solución se midió a 517 nm. La capacidad antioxidante total de la muestra se determinó mediante la generación de una curva de calibración de soluciones estándar de Trolox disuelto en metanol. Los resultados se expresan como milímoles de equivalente de Trolox (TEAC) por gramo de extracto seco o fracciones (mmolesET/g)

Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP). El ensayo FRAP, desarrollado por Benzie & Strain en 1996, es un método ampliamente reconocido para medir la capacidad antioxidante a través de la transferencia de electrones. El principio del FRAP se basa en la reducción del complejo férrico-tris(2-piridil)-triazina $[\text{FeIII}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$, formando un complejo ferroso $[\text{FeII}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ de color azul intenso bajo condiciones ácidas (pH 3,6) (Figura 8). (Shi, Zhao et al. 2022).

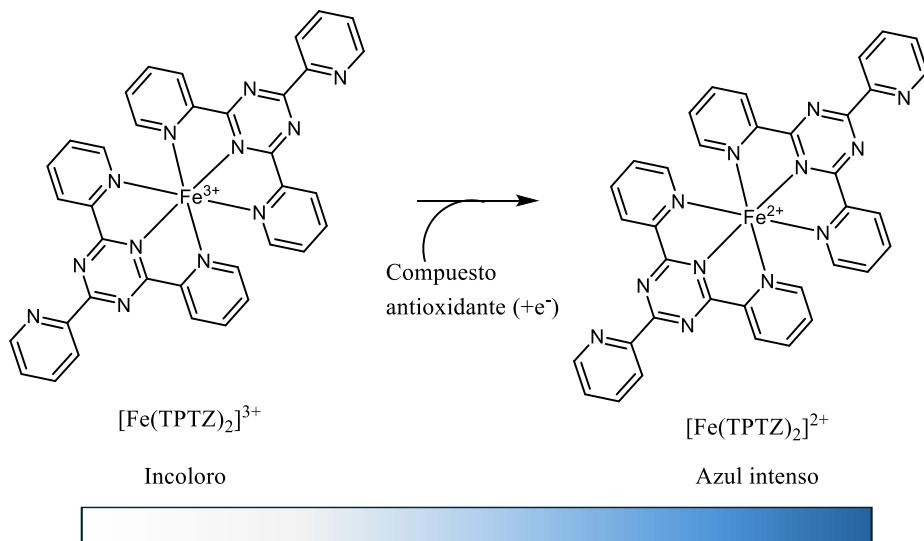


Figura 8. Mecanismo de reacción del poder antioxidante reductor férrico (FRAP). Adaptado de Bibi Sadeer et al. (2020)

Para la determinación es importante que al preparar el reactivo FRAP, se añadan los reactivos en un orden específico. Primero se añade el tampón de acetato, luego se añade FeCl_3 , y finalmente el TPTZ. Este orden es vital para prevenir la reducción del FeCl_3 por el TPTZ. Las muestras se llevaron a una concentración aproximada de 0.20 mg/mL, de allí se tomó un alícuota de 20 μL al cual se le agrega 280 μL del reactivo recién preparado. Se homogenizó y se dejó en estufa a 37°C durante 30 minutos. La absorbancia se mide a 593 nm, reflejando la capacidad antioxidante de la muestra. La CA de la muestra se determinó mediante una curva de calibración de soluciones estándar de Trolox. Los resultados se expresan como milímoles de equivalente de Trolox (TE) por gramo de extracto seco o fracciones (mmoles ET/g)

Cromatografía en Capa Fina (CCD)

La CCD es técnica empleada para la separación de los componentes presentes en mezclas complejas. Comúnmente se utiliza en la identificación de compuestos presentes en los extractos, fracciones o tinturas. Para la fase estacionaria se utiliza una placa de vidrio delgada o de aluminio cubierta con óxido de aluminio o gel de sílice como absorbente y la fase móvil está compuesta por el disolvente elegido de acuerdo con las propiedades de los componentes de la mezcla. La separación de los componentes de la muestra se produce por la interacción del analito con la fase estacionaria y la fase móvil, la elución del compuesto depende de las propiedades de su estructura molecular, es decir, si el analito es menos polar será más afín con la fase móvil, pero si es más polar tenderá a quedarse retenido en la fase estacionaria

El extracto crudo y las fracciones fueron sometidas a un análisis por CCD. Para ello, el extracto y fracciones fueron reconstituidos en un solvente adecuado. Se utilizó como fase estacionaria placas de sílice gel 60 Merk de 0.25 mm de espesor. El cromatograma se eluyó con una mezcla de acetato de etilo, metanol y agua (2:1:1) (fase móvil). Las placas se secaron al aire y; luego se aplicó revelador y se colocó a 100°C en estufa durante 5 minutos. Los reveladores utilizados fueron, solución de *p*-anisaldehído y solución etanólica de ninhidrina 10%. (Rahmani-Nezhad et al., 2028)

Finalmente, las manchas fueron analizadas con la luz de día. Algunos compuestos fueron identificados por comparación con estándares. Para cada mancha detectada se evaluó sus características en cuanto a color y factores de retención relativos ($R_f \times 100$).

Análisis estadístico

Las determinaciones se realizarán por triplicado. Los resultados se evaluarán a través de análisis de varianza (ANOVA) utilizando el ensayo de diferencias significativas LSD Fisher ($\alpha = 0,05$). Para ello se utilizará el Programa Infostat. (Balzarini et al., 2017)

Resultados y discusión

Rendimiento de la extracción asistida por ultrasonido

Con la aplicación de la EAU se obtuvo un rendimiento del 13,8% de extracto de vMp, superando los obtenidos mediante el método convencional (6,1%) y decocción (12,5%). (Avalos et al. ,2023). Esto demuestra la eficiencia de la EAU, logrando buenos rendimientos en tiempos cortos de extracción.

Obtención y análisis de las fracciones del extracto de vMp

En la Tabla 1 se presenta la distribución de tubos recolectados según el sistema de solventes empleado en la separación cromatográfica del extracto de vMP. Por cada columna se recogieron 96 tubos.

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos de cada tubo, en la Figura 9a, el barrido espectral en el rango UV-visible (200-800 nm), y en la Figura 9b, la absorbancia medida a 750 nm después de aplicar la determinación CFT. En base a las similitudes observadas en los barridos espectrales y al comparar con los resultados del CTF, que se reflejan en la absorbancia medida a 750 nm, se combinó los tubos en 12 fracciones (F1-F12), como se muestra en la Figura 9b.

Tabla 1. Distribución de los tubos para cada concentración de etanol utilizada

Tubos	[ETOH]	Volumen
1-17	96%	100 mL
18-36	90%	100 mL
37-55	80%	100 mL
56-73	60%	100 mL
74-84	40%	50 mL
85-96	20%	50 mL
Fracción acuosa/cola	0	50 mL

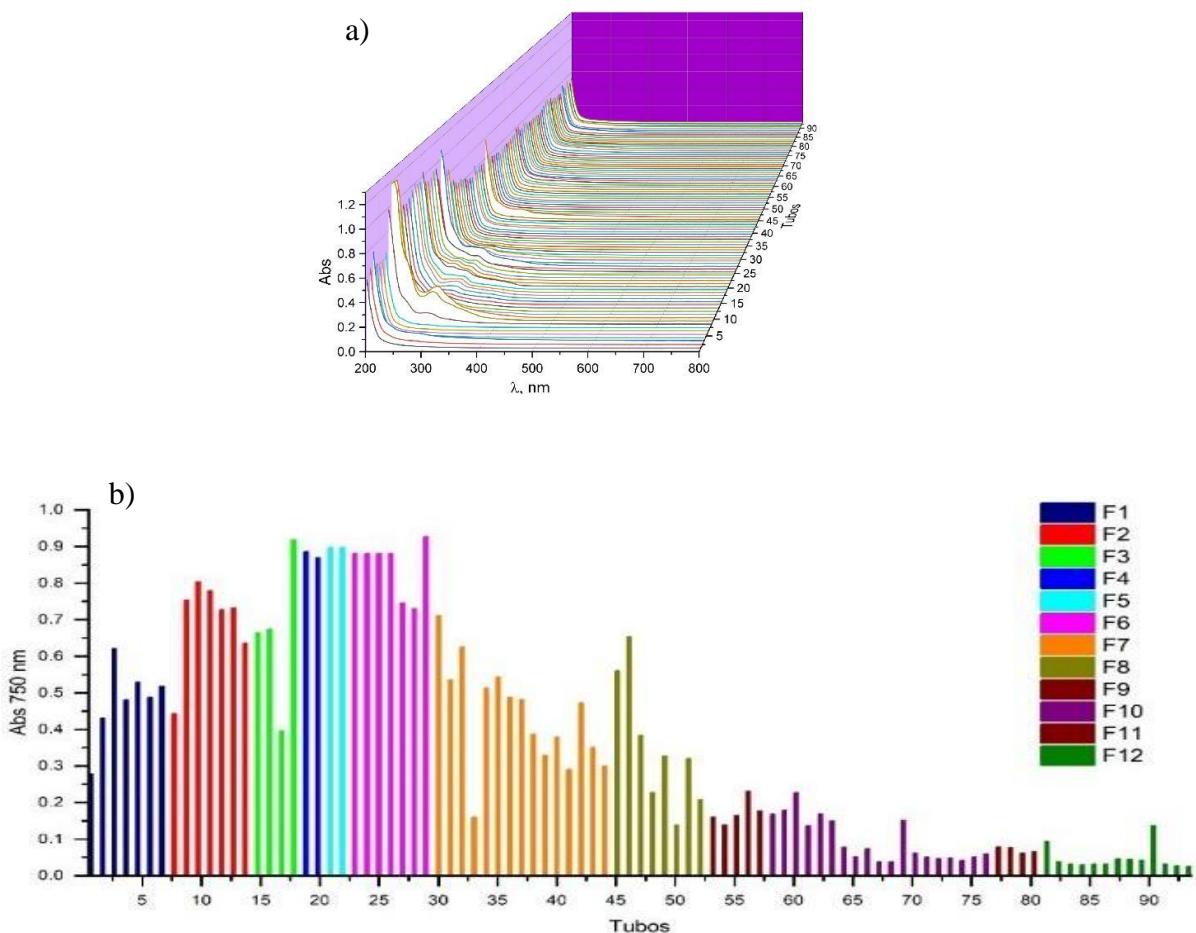


Figura 9. a) Espectros de absorbancia UV-Visible y b) absorbancia medida a 750 nm luego de ensayo de Contenido total de fenoles de las soluciones en los tubos obtenidos mediante cromatografía con Sephadex LH-20

Rendimiento de las fracciones

En la Tabla 2 se muestran los rendimientos y los contenidos de los CF en el extracto vMp y sus fracciones.

El cálculo del rendimiento (R) de las fracciones se realizó con la siguiente fórmula:

$$R = \frac{m_f}{mT} \times 100$$

Donde m_f es la masa final del liofilizado de la fracción correspondiente y mT es la masa total sembrada en 7 columnas (407,30 mg). En el caso del extracto se aplicó la misma fórmula, pero mT es la masa de harina de vainas inicialmente pesadas en la extracción.

Tabla 2. Rendimiento y contenido de compuestos fenólicos en el extracto de vMp y sus fracciones.

Muestras	Rendimiento (%)	CTF (mg GAE/g)	CTOD (mg CAFE/g)	CTFla (mg CAE/g)
Ext	13.8	285.96 ± 1.30d	58.27 ± 0.07b	54.22 ± 1.79efg
F01	7.9	27.17 ± 1.20i	5.31 ± 0.14i	24.28 ± 1.28g
F02	23.7	33.23 ± 1.07i	4.11 ± 0.16i	24.50 ± 1.64g
F03	6.6	161.07 ± 3.76ef	24.39 ± 0.45e	88.25 ± 2.47d
F04	3.1	1470.08 ± 37.51a	62.40 ± 0.56 a	866.37 ± 33.00a
F05	4.0	523.83 ± 25.10b	52.05 ± 1.67c	237.09 ± 10.81b
F06	10.2	375.83 ± 7.08c	25.10 ± 1.09ef	130.19 ± 5.52c
F07	6.8	138.35 ± 1.14f	19.10 ± 0.07g	80.25 ± 4.02de
F08	7.8	173.47 ± 3.13e	22.18 ± 0.07f	51.81 ± 1.99efg
F09	4.5	94.56 ± 1.88gh	19.90 ± 0.04g	26.85 ± 1.11fg
F10	3.5	75.84 ± 7.26h	14.06 ± 0.06h	55.18 ± 2.30ef
F11	2.3	108.55 ± 7.29g	21.97 ± 0.85f	59.89 ± 2.58de
F12	1.2	8.30 ± 0.39i	35.52 ± 1.10 d	69.13 ± 3.00de

Ext: extracto crudo de vMp. CTF: Contenido total de fenoles, CTOD: Contenido total de *orto*-difenoles, CTFla: Contenido total de flavonoides. El rendimiento de las fracciones se basó en 407.30 mg de extracto crudo sembrados en 7 columnas. Los datos se expresaron como media ± desviación estándar (n = 3). Medias con las mismas letras dentro de una columna no difieren significativamente ($p > 0.05$) para cada muestra.

De la Tabla 2 se desprende que una cantidad significativa del Ext se recolecta en las primeras tres fracciones (primeros 18 tubos), alcanzando un total del 38.2%. La fracción F02 destaca con un rendimiento del 23.7%, correspondiente a 7 tubos recolectados, lo que indica que esta fracción retuvo la mayor cantidad de material en términos de masa durante el proceso de separación. Para estas fracciones se empleó etanol en altas concentraciones (96%). La fracción F04 presentó un bajo rendimiento (3.1%), lo que puede explicarse por el hecho de que solo se consideraron 2 tubos. La F06 también mostro un rendimiento significativo basado en la recolección de 7 tubos. A partir de la fracción F09 se observa una disminución notable en los rendimientos.

La suma total de los rendimientos de las fracciones consideradas es del 81.6%, lo que sugiere que el material restante puede haberse retenido en la columna y ser eliminado durante el lavado.

Contenido Total de Fenoles

El Ext presenta elevado CTF (285.96 ± 1.30 mg GAE/g), lo que indica una abundancia significativa de CF en la muestra vMp. Asimismo, este valor es superior al informado por Avalos et al. (2023) en sus extracciones por maceración y decocción. Comparando con un solvente común, el CTF del Ext es ligeramente mayor que el del extracto obtenido por maceración con etanol al 50%, el cual registró 251.21 ± 6.17 mg GAE/g, y significativamente más alto que el obtenido por maceración con etanol al 100%, que fue de 70.99 ± 3.49 mg GAE/g.

Las fracciones obtenidas muestran una amplia variación en valores de CTF, desde fracción F04 con el valor más alto (1470.08 ± 37.51 mg GAE/g) hasta la fracción F12 con el valor más bajo (8.30 ± 0.39 mg GAE/g). Las fracciones F04, F05 y F06 presentan un valor de CTF mayor al del extracto crudo. Las fracciones F07-F12 muestran una disminución significativa de CFT al igual que F01 y F02. Los resultados sugieren que el proceso de fraccionamiento resulta adecuado para obtener fracciones con elevado CTF.

Contenido Total de *Orto*-Difenoles

El CTOD en el Ext fue de 58.27 ± 0.07 mg CAFE/g, indicando una presencia significativa de estos compuestos. No obstante, este valor fue más bajo que el informado para el extracto de vMp obtenido por maceración con etanol al 50% (132.85 ± 6.64 mg CAFE/g), lo cual puede atribuirse a los diferentes métodos de determinación utilizados (Avalos et al., 2023).

Las fracciones muestran variaciones considerables en el CTOD, siendo la fracción F04 la que presenta el valor más elevado (62.40 ± 0.56 mg CAFE/g) y la fracción F02 el más bajo (4.11 ± 0.16 mg CAFE/g). Las fracciones F05 y F12 también presentan valores significativos de CTOD, pero no superan al determinado en el Ext.

Contenido Total de Flavonoides

El CTFla en el Ext fue de 54.22 ± 1.79 mg CAE/g. Comparado con los valores obtenidos en la maceración etanólica reportados por Avalos et al. (2023), este valor es mayor que los obtenidos con ambas concentraciones de etanol utilizadas (etanol al 50% = 43.07 ± 0.50 mg CAE/g; etanol al 100% = 27.71 ± 0.52 mg CAE/g).

El CTFla en las fracciones varían desde 24.28 ± 1.28 mg CAE/g en F01 hasta un notable 866.37 ± 33.00 mg CAE/g en F04. Las fracciones F03 a F07 presentan valores de CTFla que superan al del Ext.

Análisis de la capacidad antioxidante

En la Figura 10 se presentan de manera comparativa los valores obtenidos en la determinación de la CA a través de las reacciones DPPH y FRAP. En la primera posición, se representa los resultados para el Ext y, posteriormente, para las diferentes fracciones.

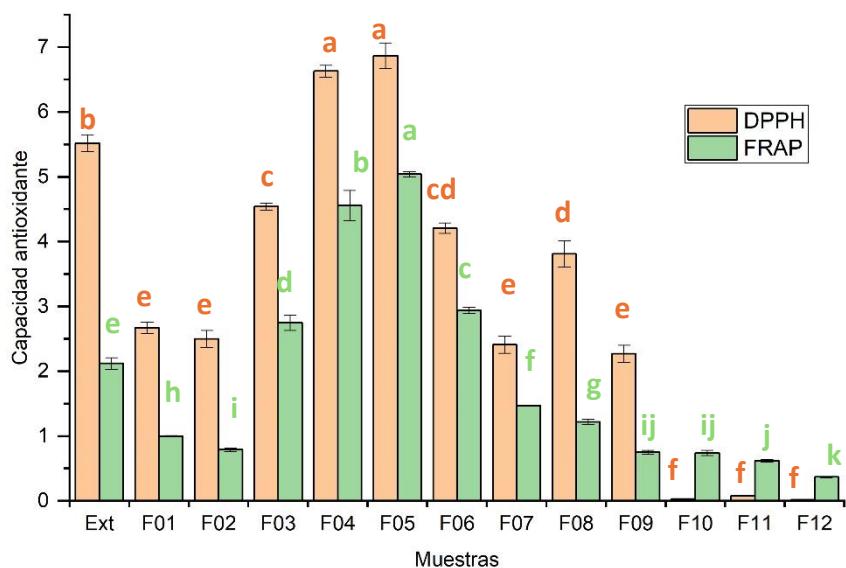


Figura 10. Resultados de CA del Ext y las fracciones. Barras del mismo ensayo con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Los resultados del ensayo DPPH muestran que el Ext presenta una CA de 5.52 ± 0.13 mmol ET/g. Las fracciones F04 (6.63 ± 0.09 mmol ET/g) y F05 (6.87 ± 0.20 mmol ET/g) exhiben una CA superior a la del Ext, sugiriendo que estas fracciones contienen compuestos antioxidantes con alta

actividad antiradicalaria. Las fracciones F03 (4.54 ± 0.05 mmol ET/g) y F06 (4.21 ± 0.08 mmol ET/g) también mostraron una CA considerable, aunque inferior a la del Ext.

El ensayo FRAP mostró que la CA del Ext fue de 2.12 ± 0.09 mmol ET/g. La fracción F05 presentó la mayor CA con un valor de 5.04 ± 0.04 mmol ET/g, seguido por la fracción F04 con 4.56 ± 0.23 mmol ET/g. Estos valores son significativamente superiores al del Ext, sugiriendo que estas fracciones concentran compuestos con alta eficacia en la reducción de iones férricos. Las fracciones F03 (2.75 ± 0.12 mmol ET/g) y F06 (2.94 ± 0.05 mmol ET/g) también mostraron una CA mayor a la del Ext. Las CA evaluadas para las fracciones F01, F02 y F07-F12 fueron bastante bajas.

Correlación entre componentes fenólicos y las capacidad antioxidante

En la literatura, algunos autores han encontrado correlación entre los componentes fitoquímicos y su CA, mientras que otros no. (Sulaiman, Sajak, Ooi, Supriatno, & Seow, 2011). Para evaluar la relación entre los componentes fitoquímicos a través de CTF, CTOD y CTFla con la CA del extracto y sus fracciones, se realizó una prueba de correlación de Pearson. Los valores de r se presentan en el mapa de calor (Figura 11).

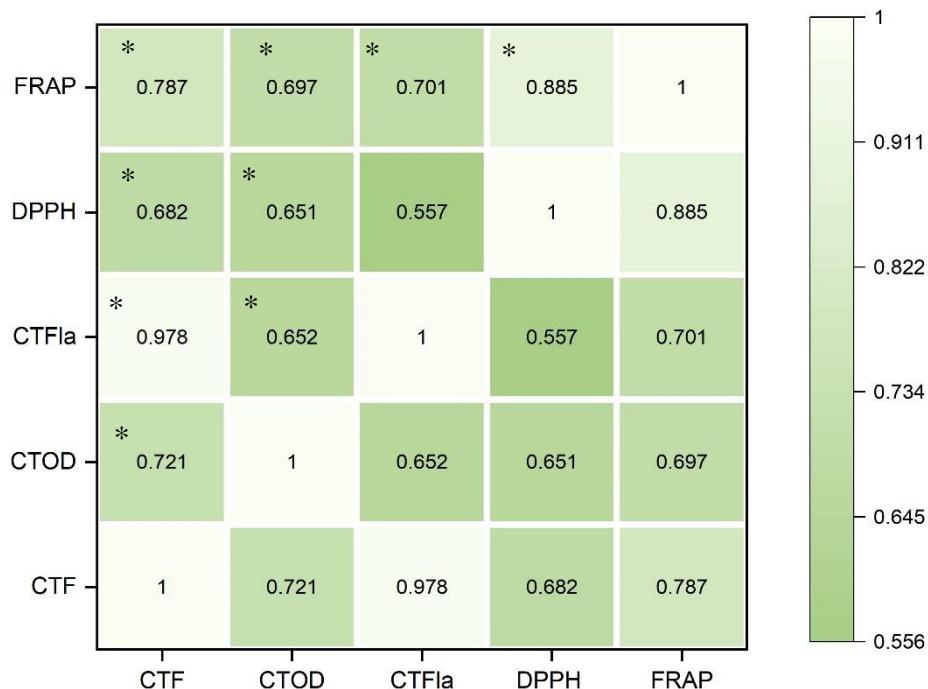


Figura 11. Mapa de calor de la prueba de correlación de Pearson (valores de r) de los componentes fenólicos y actividades antioxidantes para el extracto crudo sus fracciones. Con asterisco se indica que la correlación es significativa ($p < 0.05$).

Correlación entre compuestos fenólicos

Las correlaciones entre el CTF, CTOD y CTFla, sugieren que estos grupos de CF son los mayores contribuyentes al CTF ($r > 0.7$ y $p < 0.05$). La alta correlación observada entre CTF y CTFla ($r = 0.978$) sugiere que una parte significativa de los CF presentes en el extracto está compuesta por flavonoides. Esto es consistente con estudios previos que han demostrado que los flavonoides son una clase importante de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes significativas en muchas plantas. (Brunetti et al., 2013) Además, la correlación significativa entre el CTF y CTOD ($r = 0.721$) indica una importante presencia de compuestos *ortho*-difenoles que contribuyen al CTF.

Correlación entre compuestos fenólicos y actividad antioxidante

El CTF muestra una correlación moderada a fuerte con DPPH ($r = 0.682$) y FRAP ($r = 0.787$), sugiriendo que los CF contribuyen significativamente a ambas actividades antioxidantes, pero con mayor influencia en la capacidad reductora de hierro.

En el caso de CTFla, se observa una correlación moderada con FRAP ($r = 0.701$) y no se evidencia una clara relación con DPPH, con $r = 0.557$ que no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$). Esto puede indicar que, aunque los flavonoides contribuyen significativamente al CTF, no son los únicos responsables de la CA.

La correlación moderada entre el CTOD y DPPH (0.651) y FRAP (0.697) sugiere que los compuestos *ortho*-difenoles también contribuyen a la capacidad antioxidante del extracto, aunque no tan predominante como CTF.

Es importante destacar que la CA es el resultado de la acción sinérgica de una mezcla compleja de compuestos fenólicos y otros antioxidantes presentes en las muestras. Aunque los análisis de correlación sugieren que los CF son los principales contribuyentes, otros compuestos no fenólicos y otros factores podrían desempeñar un papel complementario en la CA general.

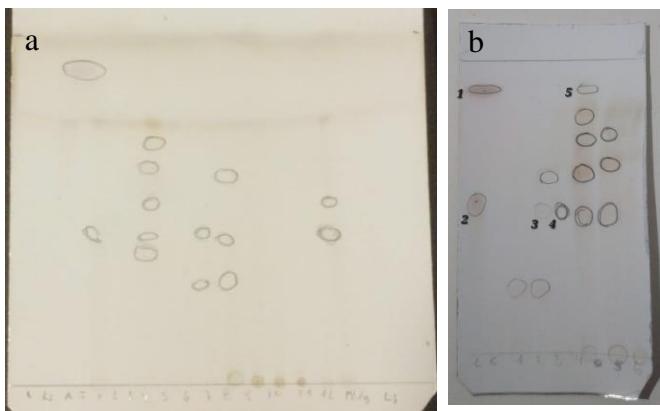
Relación entre las actividades antioxidantes

En la prueba de correlación de Pearson se obtuvo una alta correlación ($r = 0.885$) entre los valores de DPPH y FRAP para las muestras evaluadas. Esto se podría interpretar que los antioxidantes presentes en las muestras son efectivos tanto para eliminar radicales libres como para reducir especies oxidantes, lo que se traduce en una alta CA global.

Cromatografía en capa delgada

La Figura 12 muestra la separación y la distribución de los compuestos presentes en el extracto crudo, así como de las fracciones aisladas a través de CCD.

En la Figura 12a se muestra la placa de silice revelada con *p*-anisaldehído luego de realizar la corrida cromatográfica de todas las fracciones del extracto crudo. También se realizó la corrida utilizando patrones *L*-Dopa y ácido cafeico para su comparación. Se puede observar que para el Ext se diferencian al menos tres manchas. La fracción F04 presenta al menos cinco manchas diferentes, mientras que en la fracción F07 se revelaron dos manchas y en la fracción F08 se observan tres manchas. El ácido cafeico, que es un compuesto fenólico, reaccionó con el *p*-anisaldehído, resultando en una mancha marrón visible cerca del final del frente de corrida. Sin embargo, no fue posible detectar la mancha de *L*-Dopa con este revelador, lo cual sugiere que este compuesto no reacciona de manera visible con el *p*-anisaldehído bajo las condiciones empleadas. En la Figura 12b se observa la placa de sílice revelada con solución etanólica de ninhidrina en la cual se sembraron las fracciones de F01-F06, seleccionadas en base a su CA. Se utilizó ninhidrina ya que reacciona con los grupos aminos, produciendo un color púrpura característico. Esta propiedad hace que la ninhidrina sea especialmente adecuada para la detección de aminoácidos y compuestos que contienen grupos aminos libres, como la *L*-Dopa. Se identificaron las manchas que tienen Rf comparable, observándose que en las fracciones F02 y F03 hay coincidencia con el patrón de *L*-dopa, mientras que en la fracción F04 se observa coincidencia con el patrón de ácido cafeico.



- 1 Patrón Acido cafeico Rf: 90%
- 2 Patrón L-Dopa Rf: 52%
- 3 Mancha rosa F 02: Rf:51%
- 4 Mancha rosa F 03: Rf: 51%
- 5 Mancha marrón F04: Rf:89%

Figura 12. a): CCD revelada con *p*-anisaldehído, b) CCD revelada con solución etanolica de ninhidrina

Los resultados obtenidos a través de CCD resultan útiles para la caracterización de los extractos y fracciones, y pueden guiar futuros experimentos en la identificación y cuantificación de compuestos bioactivos presentes en las muestras.

Conclusiones

El presente estudio ha proporcionado información sobre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de las vMp, un subproducto agrícola a menudo subutilizado.

La extracción asistida por ultrasonido demostró ser una técnica eficiente para obtener extractos de vMP, logrando mayor rendimiento, concentración de CF y elevada CA en comparación con métodos convencionales y de decocción. Esta técnica reduce significativamente el tiempo del proceso.

La separación por cromatografía en columna con Sephadex LH-20 permitió una separación eficaz de las fracciones del Ext. Las primeras fracciones obtenidas con alta concentración de etanol mostraron altos rendimientos y concentraciones elevadas de CF, evidenciando la efectividad del fraccionamiento en la obtención de concentrados específicos.

La evaluación de la capacidad antioxidante a través de los ensayos DPPH y FRAP reveló que algunas fracciones, presentan una CA superior a la del Ext. En particular, las fracciones F04 y F05 mostraron los mejores resultados en cuanto a la concentración de CF y CA.

La buena correlación entre CTF, CTOD y CTFla con la CA sugiere que estos fenoles son los principales contribuyentes a la capacidad antioxidante observada en el extracto y sus fracciones.

Los resultados de la cromatografía en placa delgada indican la presencia de *L*-Dopa y ácido cafeico en determinadas fracciones, siendo este resultado orientativo para futuros estudios.

Este estudio no solo amplía el conocimiento sobre la composición de las vMp, sino que también establece una base para futuras investigaciones. Las investigaciones futuras se enfocarán en identificar, purificar y cuantificar los compuestos fenólicos específicos responsables de la actividad antioxidante observada. La aplicación de técnicas avanzadas como la espectrometría de masas permitirá una caracterización más detallada de los compuestos presentes.

Referencias

- Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2008). Legumes as a source of natural antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 110, 865-878.
- Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2019). Chapter One - Natural antioxidants of plant origin. In I. C. F. R. Ferreira & L. Barros (Eds.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 90, pp. 1-81): Academic Press.
- Avalos, B. I., Ojeda, G. A., Spinnenhirn, E. D., Acevedo, B. A., & Vallejos, M. M. (2023). Evaluation of phenolic compounds and antioxidant capacity in Mucuna pruriens and Cajanus cajan pods extracts. *Food Chem. Adv.*, 3, 100503.
- Aware, C., Patil, R., Vyawahare, G., Gurav, R., Bapat, V., & Jadhav, J. (2019). Processing Effect on L-DOPA, In Vitro Protein and Starch Digestibility, Proximate Composition, and Biological Activities of Promising Legume: Mucuna macrocarpa. *J. Am. Coll. Nutr.*, 38, 447-456.
- Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J. A., & Robledo, C. W. (2017). InfoStat.
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants*, 9, 709.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.*, 28, 25-30.
- Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Fini, A., Pollastri, S., & Tattini, M. (2013). Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 3540-3555.
- Bui, A. H., Cozzolino, D., Zisu, B., & Chandrapala, J. (2020). Effects of high and low frequency ultrasound on the production of volatile compounds in milk and milk products – a review. *J. Dairy Res.*, 87, 501-512.
- Chikagwa-Malunga, S. K., Adesogan, A. T., Sollenberger, L. E., Badinga, L. K., Szabo, N. J., & Littell, R. C. (2009). Nutritional characterization of Mucuna pruriens: 1. Effect of maturity on the nutritional quality of botanical fractions and the whole plant. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 148, 34-50.
- Dhanani, T., Singh, R., Shah, S., Kumari, P., & Kumar, S. (2015). Comparison of green extraction methods with conventional extraction method for extract yield, L-DOPA concentration and antioxidant activity of Mucuna pruriens seed. *Green Chem. Lett. Rev.*, 8, 43-48.
- Granato, D., Santos, J. S., Maciel, L. G., & Nunes, D. S. (2016). Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 80, 266-279.
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.*, 31, 261-272.
- Herald, T. J., Gadgil, P., & Tilley, M. (2012). High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *J. Sci. Food Agric.*, 92, 2326-2331.
- Kammerer, D. R., Kammerer, J., Valet, R., & Carle, R. (2014). Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients. *Food Res. Int.*, 65, 2-12.
- Larrauri, M., Zunino, M. P., Zygadlo, J. A., Grosso, N. R., & Nepote, V. (2016). Chemical characterization and antioxidant properties of fractions separated from extract of peanut skin derived from different industrial processes. *Ind Crops Prod.*, 94, 964-971.

- Mottaghpisheh, J., & Iriti, M. (2020). Sephadex® LH-20, Isolation, and Purification of Flavonoids from Plant Species: A Comprehensive Review. *Molecules*, 25, 4146.
- Murphy, B. E. P., & D'Aux, R. C. D. (1975). The use of sephadex LH-20 column chromatography to separate unconjugated steroids. *J. Steroid Biochem.*, 6, 233-237.
- Naczk, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 1523-1542.
- Nguyen, V. T. (2017). *Recovering Bioactive Compounds from Agricultural Wastes*. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Park, Y. S., Jeon, M. H., Hwang, H. J., Park, M. R., Lee, S.-H., Kim, S. G., & Kim, M. (2011). Antioxidant activity and analysis of proanthocyanidins from pine (*Pinus densiflora*) needles. *Nutr Res Pract*, 5, 281-287.
- Pizzolitto, R. P., Dambolena, J. S., Zunino, M. P., Larrauri, M., Grosso, N. R., Nepote, V., . . . Zygaldo, J. A. (2013). Activity of natural compounds from peanut skins on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. *Industrial Crops and Products*, 47, 286-290.
- Programme, U. N. E. (2009). *Converting Waste Agricultural Biomass into a Resource, Compendium of Technologies*. Osaka/Shiga, Japan,.
- Rahmani-Nezhad, S., Dianat, S., Saeedi, M., Tehrani, M. B., Ghadirid, A., & Hadjiakhoondi, A. (2028). Evaluating the accumulation trend of L-Dopa in dark-germinated seeds and suspension culture of *Phaseolus vulgaris* L. by an efficient UV-spectrophotometric method. *Quím. Nova*, 41, 386-393.
- Rai, S. N., Chaturvedi, V. K., Singh, P., Singh, B. K., & Singh, M. P. (2020). *Mucuna pruriens* in Parkinson's and in some other diseases: recent advancement and future prospective. *3 Biotech*, 10, 522.
- Rayavarapu, A. K., & Kaladhar, D. S. (2011). Evaluation of antimicrobial activity of *Mucuna pruriens* on plant pathogens. *Asian J. Biochem. Pharm. Res.*, 2, 593-600.
- Santana-Méridas, O., González-Coloma, A., & Sánchez-Vioque, R. (2012). Agricultural residues as a source of bioactive natural products. *Phytochemistry Reviews*, 11, 447-466.
- Shi, L., Zhao, W., Yang, Z., Subbiah, V., & Suleria, H. A. R. (2022). Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environ Sci Pollut Res*, 29, 81112-81129.
- Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., & Hijji, Y. M. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT*, 150, 111932.
- Siddhuraju, P., & Becker, K. (2003). Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 51(8), 2144-2155.
- Sulaiman, S. F., Sajak, A. A. B., Ooi, K. L., Supriatno, & Seow, E. M. (2011). Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *J. Food Compos. Anal.*, 24, 506-515.
- Tan, N. H., Fung, S. Y., Sim, S. M., Marinello, E., Guerranti, R., & Aguiyi, J. C. (2009). The protective effect of *Mucuna pruriens* seeds against snake venom poisoning. *J. Ethnopharmacol*, 123, 356-358.
- Traffano-Schiffo, M. V., Aguirre Calvo, T. R., Avanza, M. V., & Santagapita, P. R. (2020). High-intensity ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from cowpea pods and its encapsulation in hydrogels. *Heliyon*, 6(7).
- Xu, D.-P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Li, H.-B. (2017). Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int. J. Mol. Sci.*, 18, 96.