

ANÁLISIS DE LA BIODISPONIBILIDAD TISULAR DE POLIFENOLES TOTALES MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE FOLIN CIOCALTEU Y FAST BLUE BB EN ÓRGANOS DE RATONES BALB/C

ANALYSIS OF TISSUE BIOAVAILABILITY OF TOTAL POLYPHENOLS BY FOLIN CIOCALTEU AND FAST BLUE BB TECHNIQUES IN ORGANS OF BALB/C MICE

Miranda AR^{a;b}, Albrecht C^{a;b}, Soria EA^a.

Resumen

El potencial biosanitario de los polifenoles radica en su capacidad para modular el balance redox y los mecanismos implicados en el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue determinar la concentración de polifenoles totales en diferentes órganos murinos mediante el ensayo de las técnicas analíticas de Folin Ciocalteu (FC) y Fast Blue BB (FBBB).

Método: ratones Balb/c hembras (n≥3) recibieron durante 15 días 100 mg/Kg/d de extracto de *Lantana grisebachii* (LG), *Aspidosperma quebracho-blanco* (AQB) o *Ilex paraguariensis* (IP) y el grupo control (tratados con agua sin extracto). Las concentraciones de polifenoles se midieron en telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, tallo encefálico, cerebelo, bazo, timo y tejido cardiopulmonar. Los resultados fueron comparados por ANOVA seguido de la prueba de Tukey (p<0,05).

Resultados: El método FBBB proporcionó estimaciones más altas que FC (4,5 veces en telencéfalo, 8,4 en mesencéfalo, 5 en tallo encefálico, 7,2 en bazo, 68,5 en timo y 4 en tejido cardiopulmonar). Con respecto a los tratamientos, se halló con FBBB que el grupo tratado con AQB tenía un aumento del nivel de polifenoles en tallo encefálico (p<0,02). Con FBBB se detectó una disminución del contenido tímico de polifenoles tras el tratamiento con IP (p<0,005). Los cerebelos de los animales que recibieron IP y los telencéfalos de C mostraron diferencias significativas al ser analizados con FC (p<0,05, p<0,0035 respectivamente).

Conclusiones: El método FBBB dio como resultado estimaciones más elevadas que FC, lo que podría estar relacionado con mayor especificidad de la técnica para reaccionar con compuestos fenólicos.

Palabras clave: Polifenoles; Folin Ciocalteu; Fast Blue BB; Fitoquímicos; Biodisponibilidad.

a Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Córdoba, CONICET, FCM (Enrique Barros, Ciudad Universitaria, CP 5014), Córdoba, Argentina.

b Instituto Nacional del Cáncer, Ministerio de Salud de la Nación (Av. Julio A. Roca 781 10°, CABA), Buenos Aires, Argentina. Autor de correspondencia

Méd. Agustín Ramiro Miranda. E-mail: armiranda@fcm.unc.edu.ar. Dirección: INICSA, Enrique Barros, Ciudad Universitaria, Córdoba 5014, Argentina. Teléfono/fax: +5493514334020.

Abstract

Biomedical potential of polyphenols lies in their ability to modulate redox balance and the mechanisms involved in the development of chronic noncommunicable diseases.

Objective: The aim of this study was to determine the concentration of total polyphenols in different murine organs by assaying analytical techniques of Folin Ciocalteu (FC) and Fast Blue BB (FBBB).

Method: Balb/c female mice ($n \geq 3$) received for 15 days 100 mg/kg/d of extract of *Lantana grisebachii* (LG), *Aspidosperma quebracho-blanco* (AQB) or *Ilex paraguariensis* (IP) and control group (treated with water without extract). Polyphenolic concentrations were measured in telencephalon, diencephalon, midbrain, brainstem, cerebellum, spleen, thymus and cardiopulmonary tissue by FC and FBBB methods. Results were compared by ANOVA followed by Tukey test ($p < 0.05$).

Results: FBBB method reported higher detections than FC (4.5 fold in telencephalon, 8.4 in midbrain, 5 in brainstem, 7.2 in spleen, 68.5 in thymus and 4 in cardiopulmonary tissue). Regarding the treatments, the group that received AQB showed to have increased polyphenolic bioavailability in brainstem ($p < 0.02$). With FBBB, a decrease on thymic polyphenol content after treatment with IP was detected ($p < 0.005$). In cerebellum of the groups treated with IP and telencephalon of the control group showed significant differences when these were analyzed with FC ($p < 0.05$, $p < 0.0035$ respectively).

Conclusions: FBBB method showed higher estimations of polyphenolic bioavailability than FC, and this could be related to higher specificity of the technique to react with phenolic compounds.

Keywords: Polyphenols; Folin Ciocalteu; Fast Blue BB; Phytochemicals; Bioavailability.

Introducción

Los polifenoles constituyen el grupo de antioxidantes de mayor abundancia en la dieta¹. Estos compuestos podrían ser utilizados dados sus múltiples mecanismos de acción: antioxidación, disrupción de cascadas de señalización asociadas a estrés, regulación metabólica y modulación funcional². Los compuestos fenólicos de mayor importancia son los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos^{3,4}. Entre los métodos comúnmente empleados para determinar y cuantificar la biodisponibilidad de polifenoles totales en productos de origen vegetal, tejidos y fluidos animales se destaca la técnica de Folin Ciocalteu (FC)⁵. Este método se basa en la interacción de oxidación/reducción de los compuestos fenólicos al reaccionar con el reactivo de FC⁶. Este reactivo contiene wolframato y molibdato sódicos en ácido fosfórico capaces de reaccionar con los fenoles de la muestra⁷. En medio ácido, las dos sales se encuentran formando ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los

compuestos fenólicos da lugar a una coloración azul susceptible a ser determinada mediante técnicas espectrofotométricas, con un máximo de absorbancia a 765nm⁸. Sin embargo, esta técnica presenta como limitación que otros compuestos interfieren o tienen reacciones cruzadas con el reactivo de FC: antioxidantes de naturaleza no fenólica y sustancias reductoras, como por ejemplo ácido ascórbico, glucosa y proteínas^{9,10}. En este sentido surge la necesidad de utilizar métodos de mayor especificidad, como el método de Fast Blue BB (FBBB) optimizando el rendimiento técnico. El ensayo FBBB es un nuevo método diseñado para la detección de compuestos fenólicos en muestras de origen vegetal¹¹. Se basa en las interacciones directas de compuestos fenólicos con la sal hemi [zinc cloruro] de 4-benzoilamino-2,5-dimetoxibencendiazolio en pH alcalino (NaOH o Na₂CO₃), formando complejos azoicos¹². La absorbancia debe ser medida a 450 nm después incubarse durante 60 min a 37° C. Para ambos mé-

todos colorimétricos se utiliza ácido gálico (AG) como estándar para calcular y determinar la concentración fenólica de cada muestra¹².

El objetivo del presente trabajo fue analizar la biodisponibilidad tisular de polifenoles totales en órganos murinos tratados con diferentes plantas nativas de Argentina mediante las técnicas de FC y FBBB

Materiales y métodos

Equipamiento

Los reactivos de Fast Blue BB (hemi [zinc cloruro] de 4-benzoilamino-2,5-dimetoxibencendiazolio) y Folin Ciocalteu se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE.UU.). Los disolventes se obtuvieron de Cicarelli SA (Argentina). Las lecturas espectrofotométricas se realizaron con un multilector de microplacas GloMax® (Promega Corp., Madison, WI, EE.UU.).

Modelo experimental

Se utilizaron ratones Balb/c hembras de 30 días de edad, criados bajo condiciones estándar de bioterio (sala climatizada a 24°C con ritmo de 12hs luz/oscuridad. Con n≥3 por grupo experimental, los animales fueron tratados por vía oral durante 15 días con 100 mg/Kg/día de cada fitoextracto (*Ilex paraguariensis*, *Aspidosperma quebracho-blanco* y *Lantana grisebachii*), comparando luego los resultados contra control sin extracto (vehículo: agua). Posteriormente fueron sacrificados siguiendo las normas éticas para el manejo de animales experimentales, para extraer sus encéfalos, los cuales fueron divididos en las siguientes regiones: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, tallo encefálico y cerebelo. Además se extrajeron sus bazo, timos y bloque cardiopulmonar.

Cada muestra fue pesada y homogeneizada en csp 1,25 mL de metanol al 60% con 62,5 µL de ácido tricloroacético al 50% (solventes provistos por Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos). Se incubó durante 30 minutos a 50°C en oscuridad, para luego centrifugarla 5 minutos a 10000 rpm, recuperando el sobrenadante para realizar los estudios correspondientes. Este procedimiento permite la extracción de polifenoles y agentes oxidantes¹³.

Elaboración de fitoextractos

Se procedió a la recolección de las plantas ensayadas durante el periodo estival por geolocalización (coordenadas GPS: -31,28, -64,44), en la zona montañosa de la región fitogeográfica chaqueña del centro argentino. Las muestras recogidas fueron secadas y se realizó su extracción acuosa termoasistida (0,2 g/mL) con agua a 95 °C. Estas infusiones se enfriaron durante 1 hora hasta alcanzar una temperatura final de 35-40 °C (en oscuridad y bajo agitación constante). Los extractos fueron recuperados de cada sobrenadante por centrifugación, filtración y 24 horas de liofilización a < -50 °C al vacío¹⁴.

Determinación de la biodisponibilidad de polifenoles totales

Método Fast Blue BB: se empleó el método colorimétrico de Fast Blue BB (hemi [zinc cloruro] de 4-benzoilamino-2,5-dimetoxibencendiazolio), en las muestras animales procesadas para determinar polifenoles en los sobrenadantes¹². El ensayo consistió en tratar 100 µL de sobrenadante con 10 µL de reactivo al 0,1% y 10 µL de bicarbonato de sodio al 20%, durante 30 minutos a 37°C (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos). Los valores de absorbancia registrados a 450nm fueron convertidos a µg equivalentes de ácido gálico, utilizando una curva estándar del mismo (0,01-18,75 µg de ácido gálico; Anedra, Argentina). Estos resultados se estandarizaron por gramo de tejido y se expresaron como porcentajes respecto al control (%).
Método de Folin Ciocalteu: Las muestras se mezclaron con reactivo de Folin 2N, agua destilada y solución saturada de bicarbonato de sodio (1:1:6:2 v/v/v/v), luego se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a 37 °C. La absorbancia se registró a 750 nm, calculando los valores a partir de una curva estándar de ácido gálico (0,01-18,75 µg de ácido gálico; Anedra, Argentina)¹³. Estos resultados se estandarizaron por gramo de tejido y se expresaron como porcentajes respecto al control (%).

Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como media ± desvío estándar (DS) de tres experimentos. Modelos de ANOVA fueron utilizados para evaluar el

efecto de los tratamientos (Control, extractos de *Aspidosperma quebracho-blanco*, de *Lantana grisebachii* y de *Ilex paraguariensis*) sobre la concentración tisular de polifenoles totales. Para la comparación de las medias, se empleó el test de Tukey, considerando como significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Las concentraciones de polifenoles totales determinadas por las técnicas FC y FBBB se encuentran compiladas en la Tabla 1. La mayoría de las estimaciones por FBBB superaron a los valores detectados por FC. En tejido nervioso FBBB superó los resultados obtenidos por FC: 4,5 veces en telencéfalo, 8,4 en mesencéfalo y 5 en tallo encefálico. Con respecto a las estimaciones en los tejidos extranerviosos, FBBB midió concentraciones 7,2 veces más altas en bazo, 68,5 en timo y 4 en bloque cardiopulmonar. En las únicas regiones encefálicas donde FC mostró niveles más altos de polifenoles que FBBB fue en cerebelo (1,5 veces) y diencéfalo (26 veces). En las muestras que fueron tratadas mediante la técnica de FBBB presentaron concentraciones más eleva-

das de polifenoles totales, revelando diferencias significativas entre los tratamientos. En este sentido, al comparar los individuos del grupo control con los tratados con *A. quebracho-blanco*, estos últimos mostraron una concentración mayor de polifenoles en telencéfalo ($p=0,0062$). Se observó un descenso significativo del contenido tímico de polifenoles en individuos tratados con *I. Paraguariensis* ($p=0,005$) (Figura 1). En los otros órganos no hubo cambios estadísticamente significativos del contenido tisular de polifenoles totales.

Con respecto a las muestras analizadas con el método FC, los cerebelos tratados con *I. paraguariensis* y telencéfalos de los grupo control mostraron diferencias significativas ($p=0,05$, $p=0,0035$ respectivamente) (Figura 2). Para los tres tratamientos, la mayoría de los tejidos mostraron contener menor concentración de polifenoles al ser comparados con los grupos controles respectivos. Sin embargo los polifenoles de individuos tratados con *I. paraguariensis* eran elevados en diencéfalo, mesencéfalo y timo, pero la diferencia fue insignificante. Esto último también se presentó en diencéfalo y tejido cardiopulmonar de aquellos tratados con *A. quebracho blanco*.

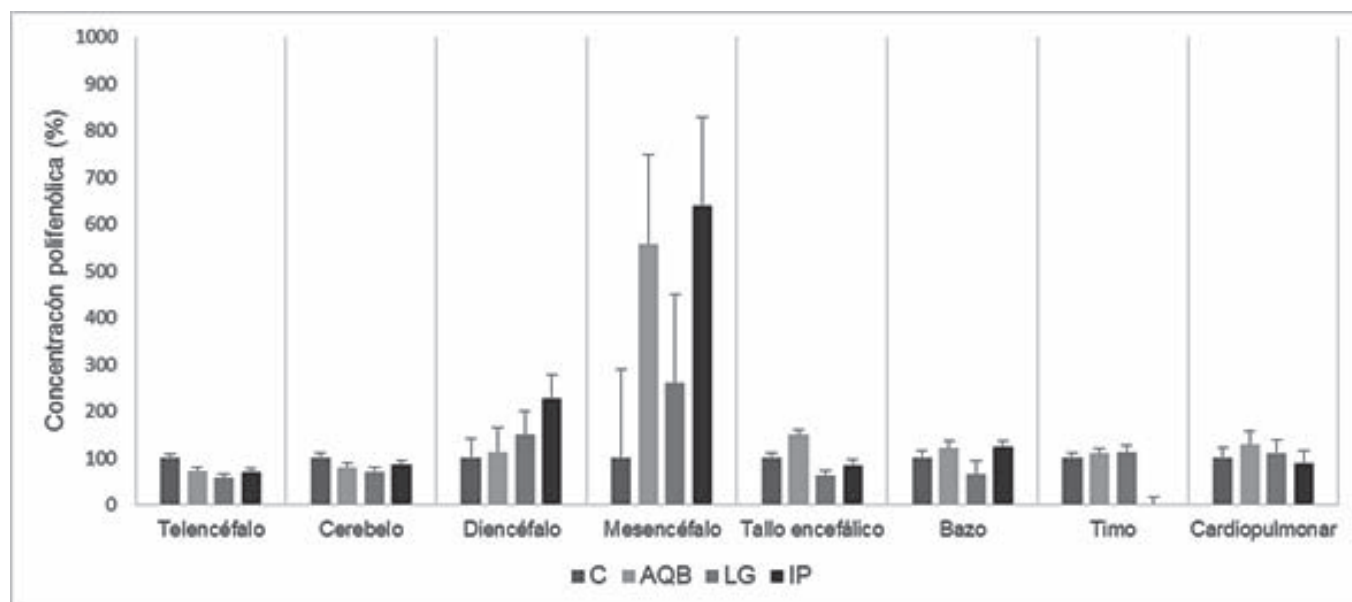


Figura 1: Polifenoles totales en órganos de ratones Balb/c tratados durante 15 días con 100mg/kg/día de cada fitoextracto vs control (sin tratamiento), determinados mediante la técnica de Fast Blue BB. Las medias \pm DS ($n \geq 3$) fueron expresadas como μg EAG/g de tejido. C: Control, AQB: *Aspidosperma quebracho-blanco*, LG: *Lantana grisebachii*, IP: *Ilex paraguariensis*.

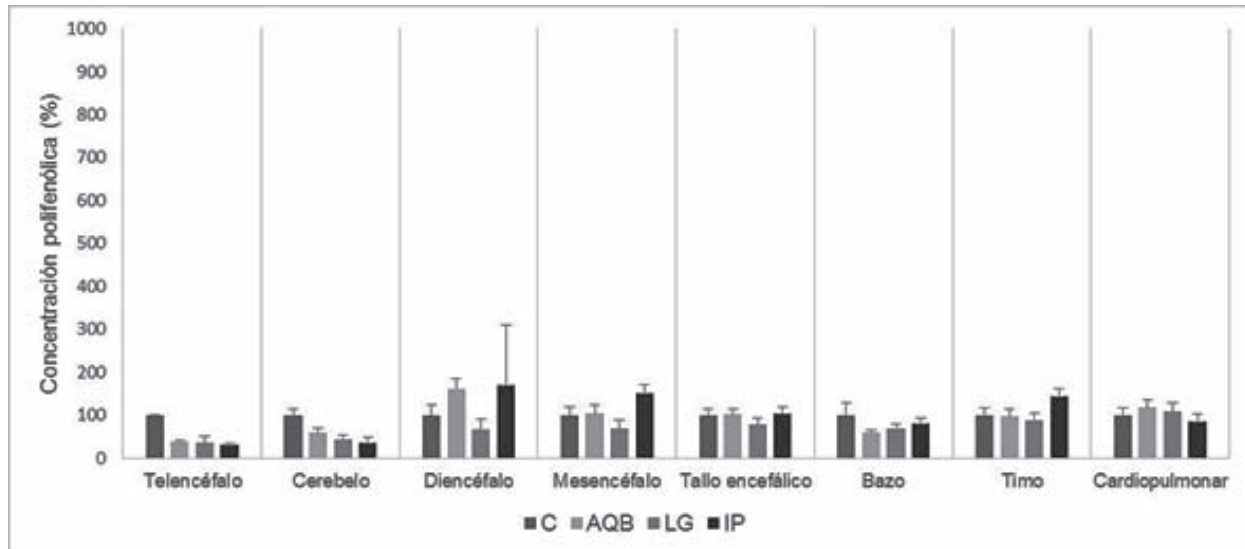


Figura 2: Polifenoles totales en órganos de ratones Balb/c tratados durante 15 días con 100mg/kg/día de cada fitoextracto vs control (sin tratamiento), determinados mediante la técnica de Folin Ciocalteu. Las medias \pm DS ($n \geq 3$) fueron expresadas como μg EAG/g de tejido. C: Control, AQB: *Aspidosperma quebracho-blanco*, LG: *Lantana grisebachii*, IP: *Ilex paraguariensis*.

Método de Folin-Ciocalteu

Tratamiento	Telencéfalo (μg EAG/g)	Cerebelo (μg EAG/g)	Diencéfalo (μg EAG/g)	Mesencéfalo (μg EAG/g)
C	159,08 \pm 4,74	1315,72 \pm 153,20	192,83 \pm 83,41	68,14 \pm 13,94
AQB	62,81 \pm 7,22	777,16 \pm 269,61	311,22 \pm 63,56	71,05 \pm 13,90
LG	55,68 \pm 45,29	555,66 \pm 154,33	126,26 \pm 86,87	46,72 \pm 18,78
IP	50,75 \pm 8,18	465,40 \pm 434,97	327,36 \pm 381,41	102,94 \pm 37,32
Tratamiento	Tallo encefálico (μg EAG/g)	Bazo (μg EAG/g)	Timo (μg EAG/g)	Corazón-pulmón (μg EAG/g)
C	62,08 \pm 20,82	18,47 \pm 9,16	9,80 \pm 3,18	4,73 \pm 1,86
AQB	62,58 \pm 15,00	11,09 \pm 1,84	9,48 \pm 1,59	3,72 \pm 3,83
LG	48,56 \pm 15,79	12,61 \pm 3,51	8,65 \pm 2,75	1,92 \pm 7,04
IP	64,91 \pm 6,95	14,87 \pm 4,30	14,18 \pm 3,97	1,30 \pm 4,18

Método de Fast Blue BB

Tratamiento	Telencéfalo (μg EAG/g)	Cerebelo (μg EAG/g)	Diencéfalo (μg EAG/g)	Mesencéfalo (μg EAG/g)
C	430,89 \pm 163,90	621,72 \pm 27,02	6,35 \pm 1,81	340,54 \pm 29,42
AQB	382,07 \pm 68,76	499,43 \pm 130,19	7,23 \pm 0,04	1899,38 \pm 40,30
LG	300,95 \pm 30,07	441,63 \pm 118,04	8,12 \pm 3,49	888,63 \pm 240,16
IP	367,94 \pm 60,58	538,86 \pm 45,72	14,43 \pm 9,42	2177,19 \pm 1817,10
Tratamiento	Tallo encefálico (μg EAG/g)	Bazo (μg EAG/g)	Timo (μg EAG/g)	Corazón-pulmón (μg EAG/g)
C	298,91 \pm 69,48	99,54 \pm 40,23	887,24 \pm 161,91	19,33 \pm 7,18
AQB	446,93 \pm 67,39	113,38 \pm 15,83	970,45 \pm 209,62	15,54 \pm 16,43
LG	185,93 \pm 55,16	90,22 \pm 42,35	1007,53 \pm 278,66	6,06 \pm 26,53
IP	252,18 \pm 64,00	107,18 \pm 27,29	18,61 \pm 13,81	7,62 \pm 19,21

Tabla 1: Biodisponibilidad de polifenoles totales en órganos de ratones Balb/c tratados durante 15 días con 100mg/kg/día de cada fitoextracto vs control (sin tratamiento). Las medias \pm DS ($n \geq 3$) fueron expresadas como μg EAG/g de tejido (* $p < 0.05$). C: Control, AQB: *Aspidosperma quebracho-blanco*, LG: *Lantana grisebachii*, IP: *Ilex paraguariensis*.

Discusión y conclusión

La biodisponibilidad de polifenoles totales mostró variaciones con respecto a los tratamientos fitoquímicos así como en tipo de técnica aplicada para conocer sus concentraciones tisulares. En este sentido, si se comparan los métodos, FBBB reveló mayores niveles de polifenoles que FC. Diversos estudios proponen que la técnica FBBB presenta mayor sensibilidad y especificidad para detectar los niveles de polifenoles^{13,15}. No obstante la mayoría de estas investigaciones han sido realizadas en granos, plantas y otros productos de origen vegetales. En general, el método de FC arrojó valores más bajo de polifenoles, posiblemente subestimando los niveles tisulares. Esto concuerda con hallazgos previos en donde se han ensayado ambos procedimientos dando como resultado una subestimación por parte de la técnica FC para la determinación de compuestos fenólicos en frutas¹⁶. El método además de ser más reaccionar específicamente sobre los fenoles se caracteriza por ser económico, rápido y de sencilla aplicación¹³. En general los hallazgos obtenidos indican que el método FBBB proporciona una estimación más alta y precisa de la biodisponibilidad de polifenoles totales en tejido animal. No obstante, mayores estudios son necesarios para optimizar la técnica y postular potenciales aplicaciones.

Financiación

ARM fue apoyado por el Programa de Mejoramiento de la Educación Médica (PROMED, Ministerio de Educación de la Nación, Argentina).

Este trabajo fue apoyado por la SECYT (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) bajo la subvención número 203/2014.

Conflictos de Interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Referencias

1. Garaguso I, Nardini M. Polyphenols content, phenolics profile and antioxidant activity of organic red wines produced without sulfur dioxide/sulfites addition in comparison to conventional red wines. *Food Chem* 2015;179: 336-42. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.01.144
2. Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Llorach R, et al. Differential effects of polyphenols and alcohol of red wine on the expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines related to atherosclerosis: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2012;95(2): 326-34. DOI: 10.3945/ajcn.111.022889
3. Spencer JP, El Mohsen MMA, Minihane AM, Mathers JC. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br J Nutr* 2008;99(1): 12-22. DOI: 10.1017/S0007114507798938
4. El Gharras H. Polyphenols: food sources, properties and applications—a review. *Int J Food Sci Tech* 2009;44(12): 2512-18. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x
5. Avella DMG, García CAO, Cisneros AM. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. In *Memorias del Simposio de Metrología 2008*. Universidad Autónoma de Querétaro, México.
6. Spizzirri UG, Restuccia D, Cirillo G, Puoci F, Parisi OI, Picci N. Antioxidative Effectiveness of Environment Friendly Functional Biopolymers for Food Applications. En *Pathways to Environmental Sustainability* (pp. 65-74), 2014. Springer International Publishing.
7. Agbor GA, Vinson JA, Donnelly PE. Folin-Ciocalteu reagent for polyphenolic assay. *Int J Food Sci Nutr Diet* 2014;3(8): 147-56. DOI: dx.doi.org/10.19070/2326-3350-1400028
8. Blainski A, Lopes GC, De Mello JCP. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* 2013;18(6): 6852-65. DOI: 10.3390/molecules18066852
9. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 2005;53(10): 4290-302. DOI: 10.1021/jf0502698
10. Berker KI, Ozdemir Olgun FA, Ozyurt D, Demirata B, Apak R. Modified Folin–Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. *J Agric Food Chem* 2013;61(20): 4783-91. DOI: 10.1021/jf400249k
11. Medina MB. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *J Funct Foods* 2011;3(2): 79-87.
12. Medina MB. Simple and rapid method for the

analysis of phenolic compounds in beverages and grains. *J Agric Food Chem* 2011;59(5): 1565-71. DOI: 10.1021/jf103711

13. Cittadini MC, Canalis AM, Albrecht C, Soria EA. Effects of oral phytoextract intake on phenolic concentration and redox homeostasis in murine encephalic regions. *Nutr Neurosci* 2014;18(7): 316-22. DOI: 10.1179/1476830514Y.0000000130

14. Canalis AM, Cittadini MC, Albrecht C, Soria EA. In vivo redox effects of *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl., *Lantana grisebachii* Stuck and *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. on blood, thymus and spleen of

mice, *Indian J Exp Biol.* 2014;52(9): 882-9.

15. Lim FPK, Bongosia LFG, Yao NBN, Santiago LA. Cytotoxic activity of the phenolic extract of virgin coconut oil on human hepatocarcinoma cells (HepG2). *IFRJ* 2014; 21(2).

16. Lester GE, Lewers KS, Medina MB, Saftner RA. Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *J Food Compost Anal* 2012;27(1): 102-7. DOI:10.1016/j.jfca.2012.05.003