

Determinación de la Actividad Antioxidante de la Vainillina y compuestos derivados

Paula COLOMBERO⁽²⁾, Micaela PERALTA⁽²⁾, Melisa A. RACCA⁽²⁾, Denis FLORES⁽²⁾, Vanina A. GUNTERO^(1,2), Cristián A. FERRETTI⁽¹⁾, Pedro M. MANCINI⁽¹⁾, María N. KNEETEMAN⁽¹⁾

(1) IQAL (UNL-CONICET), Laboratorio Fester – Química Orgánica, Universidad Nacional del Litoral - Facultad de Ingeniería Química, Santiago del Estero 2829, Santa Fe, Argentina

(2) Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional San Francisco, Av. de la Universidad 501, Córdoba, Argentina

E-mail de contacto: mkneeteman@fiq.unl.edu.ar

Resumen

En el presente trabajo se estudiaron las actividades antioxidantes de los compuestos vainillina, *bis*-vainillina y *bis*-vainillina soportada en SBA-15. A partir de la vainillina, el bisfenol se sintetizó mediante la dimerización de vainillina. La encapsulación de *bis*-vainillina en la sílice mesoporosa se llevó a cabo mediante un proceso asistido por microondas. Previamente, la sílice mesoporosa SBA-15 se preparó por síntesis hidrotermal usando el copolímero de tribloque Pluronic P123 como agente tensioactivo. La actividad antioxidante se determinó mediante el ensayo de fosfomolibdeno. Entre estos materiales, se encontró actividad antioxidante en la *bis*-vainilla/SBA-15. Los resultados sugieren la posibilidad de aplicar este sistema como un antioxidante activo en el futuro.

Palabras Claves: vainillina; *bis*-vainillina; SBA-15; actividad antioxidante

Abstract

In the present work comparative antioxidant capacities of the vanillin, *bis*-vanillin and *bis*-vanillin supported in SBA-15 were investigated. From the vanillin, the *bis*-phenol was synthesized by the dimerization of vanillin. The encapsulation of *bis*-vanillin on the mesoporous silica was carried out by a microwave assisted process. Previously, mesoporous silica SBA-15 was prepared by hydrothermal synthesis using Pluronic P123 triblock copolymer as a surfactant. The antioxidative activity was examined by phosphomolybdenum assay. Among these materials, a remarkably high antioxidant activity was found in *bis*-vanillin/SBA-15. These results suggest the possibility of applying this system as an antioxidant active packaging in the future.

Keywords: vanillin; *bis*-vanillin; SBA-15; antioxidant activity

1. Introducción y Objetivos

La vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) es el principal componente del extracto de vainilla natural (Buldini and Sharma, 1993; Tai *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2013; Fache, Boutevin and Caillol, 2015). Es un importante agente aromatizante y saborizante utilizado en productos

alimenticios (postres, lácteos, helados, pudines, gelatinas, entre otros), perfumes, bebidas (alcohólicas y no alcohólicas), cigarrillos y en preparaciones farmacéuticas (Tai *et al.*, 2011; De Guzman and Zara, 2012; Charles, 2013; Sun *et al.*, 2013; Abo-youssef, 2016). Presenta, además, actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, E.coli, S. aureus y B. subtilis, levaduras y mohos en purés de frutas y medios de cultivo de laboratorio, lo que conlleva un uso potencial como conservante de alimentos (Buldini and Sharma, 1993; De Guzman and Zara, 2012; Charles, 2013; Sun *et al.*, 2013). Es considerada uno de los compuestos de sabor más apreciados, con la característica única de que, incluso en dosis altas, el sabor sigue siendo agradable (Sun *et al.*, 2013). También tiene propiedades antimutagénicas y antioxidantes, ofreciendo protección contra los rayos X y el cambio cromosómico inducido por la radiación UV. Es de hacer notar su uso en formular atrayentes de insectos y repelentes (Tai *et al.*, 2011; Charles, 2013; Sun *et al.*, 2013; Wexler, 2014).

El *bis*-fenol correspondiente de la vainillina (V), *bis*-vainillina (BVA), se puede preparar a partir del compuesto monomérico (Costero *et al.*, 2015).

Varios estudios han demostrado recientemente que la encapsulación se ha convertido en una técnica de creciente interés ya que ofrece numerosos beneficios, incluida la facilidad de manejo, mejor estabilidad, protección contra la oxidación, retención de ingredientes volátiles, sabor enmascarado, liberación controlada, entrega consecutiva de múltiples ingredientes activos, cambio en el carácter del sabor, percepción sensorial duradera, reducidos efectos secundarios tóxicos, mayor solubilidad en agua mejorada con ingredientes hidrofóbicos, mejor biodisponibilidad y eficacia (Guntero *et al.*, 2018).

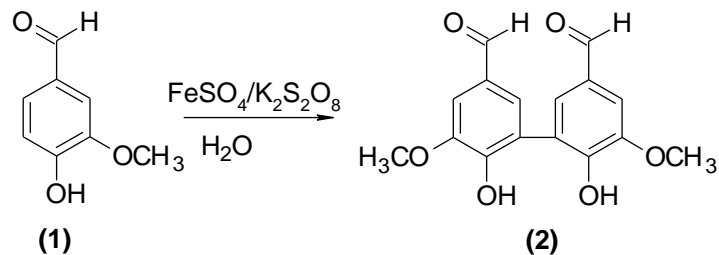
La sílice mesoporosa es un desarrollo reciente en nanotecnología (Katiyar *et al.*, 2006). La SBA-15 se caracteriza por tener un área de superficie alta, gran volumen de poro, tamaño de poro con una distribución estrecha y buena estabilidad térmica. Los materiales de sílice son potencialmente adecuados para varias aplicaciones biológicas importantes, tales como la administración de fármacos, formación de imágenes, y la liberación controlada (Trewyn *et al.*, 2008). Además son inofensivos y de bajo costo (Nandiyanto *et al.*, 2009).

Este trabajo se centró en la evaluación de la actividad antioxidante del sistema *bis*-vainillina/SBA-15 comparado con el de la BVA, vainillina y BHT (butilhidroxitolueno). El BHT es un antioxidante sintético usado en la industria alimenticia y farmacéutica (Gaviria Montoya *et al.*, 2009).

2. Metodología

2.1. Síntesis de *bis*-vainillina

El Esquema 1 muestra la vía sintética utilizada para la preparación de BVA (2) mediante acoplamiento radicalario, utilizando FeSO_4 y $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ a una solución acuosa de vainillina (1) siguiendo la bibliografía (Bedos-belval and Duran, 2008).



Esquema 1. Vía sintética utilizada para la preparación de BVA.

2.2. Síntesis de SBA-15

La sílice mesoporosa SBA-15 se preparó mediante hidrólisis y condensación de un tensioactivonoiónico de acuerdo a la bibliografía (Wang *et al.*, 2016). Se disolvió el copolímero de tribloque 123 Pluronic (4 g) a temperatura ambiente en una solución acuosa de HCl 3,1 M (350 ml). La mezcla se agitó a 35 °C hasta que el surfactante se disolvió completamente. Se añadió en el siguiente orden a la solución: Polietilenglicol 400 (10 g), tetraetilortosilicato (TEOS, 22,5 ml) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente a 40 °C durante 24 h. La mezcla de reacción obtenida se transfirió a un horno de microondas y se mantuvo a 100 °C durante 12 h en condiciones estáticas. El producto resultante se filtró, se lavó con agua y se secó a 80 °C durante la noche. El surfactante se eliminó por calcinación a 550 °C durante 5 h en aire.

2.3. Encapsulación de BVA en SBA-15

La molécula BVA se ancló a SBA-15 por un proceso asistido por microondas, en un microondas AntonPaarMonowave 300. Para tal propósito, se colocó BVA (0,15 g) en un vial de 30 ml de capacidad y se agregó SBA-15 (1,5 g). Luego se añadió una solución de etanol:agua (50:50 v/v) (18 ml). La reacción se realizó a 70 °C, 1200 rpm, durante 20 min. Posteriormente, se dejó enfriar, y el material resultante se secó a 80 °C durante 5 h.

2.4. Método del fosfomolibdeno

El análisis de la actividad antioxidante es un método espectroscópico para la determinación cuantitativa de la misma, a través de la formación del complejo de fosfomolibdeno. El ensayo se basó en la reducción de Mo(VI) a Mo(V) por el analito de muestra y la posterior formación de un complejo Mo(V)-fosfato verde a pH ácido (Alam and Bristi, 2013).

Se combinan 0,1 ml de solución de muestra (vainillina, BVA, BVA/SBA-15 y BHT) con 9 ml de solución reactiva (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sodio 28 mM y molibdato de amonio 4 mM). El tubo se tapa, para evitar evaporación de las soluciones y se incuba en un baño de agua hirviendo a 95°C por 90 min.

Después de enfriar la muestra, a temperatura ambiente, la absorbancia de la solución acuosa se mide a 695 nm contra un blanco en el espectrofotómetro UV, donde el blanco típico contenía 1 ml de solución reactiva y el volumen apropiado del mismo disolvente utilizado para la muestra y se incuba en las mismas condiciones que el resto de la muestra (Alam and Bristi, 2013).

3. Resultados y Discusión

3.1. Evaluación de la actividad antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante de las muestras utilizando el método de fosfomolibdeno a cuatro niveles de concentración molar: 2mM, 4mM, 6mM, 8mM y por duplicado. La actividad antioxidante de las muestras se comparó con la de BHT. Los ensayos se realizaron por duplicado mostrando los resultados de los mismos en la Tabla 1 y Figura 1.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición de la oxidación en función de la concentración de las muestra

Muestra	Concentraciones	2mM	Varianza	4mM	Varianza	6mM	Varianza	8mM	Varianza
BHT		28.53	0.01	48.70	0.02	64.24	0.01	43.79	0.02
Vainillina		16.22	0.01	18.09	0.04	34.17	0.03	36.42	0.03
Bis-Vainillina		26.39	0.02	29.69	0.03	34.30	0.02	34.13	0.01
BVA-SBA 15		31.05	0.01	48.83	0.05	94.80	0.02	50.72	0.00

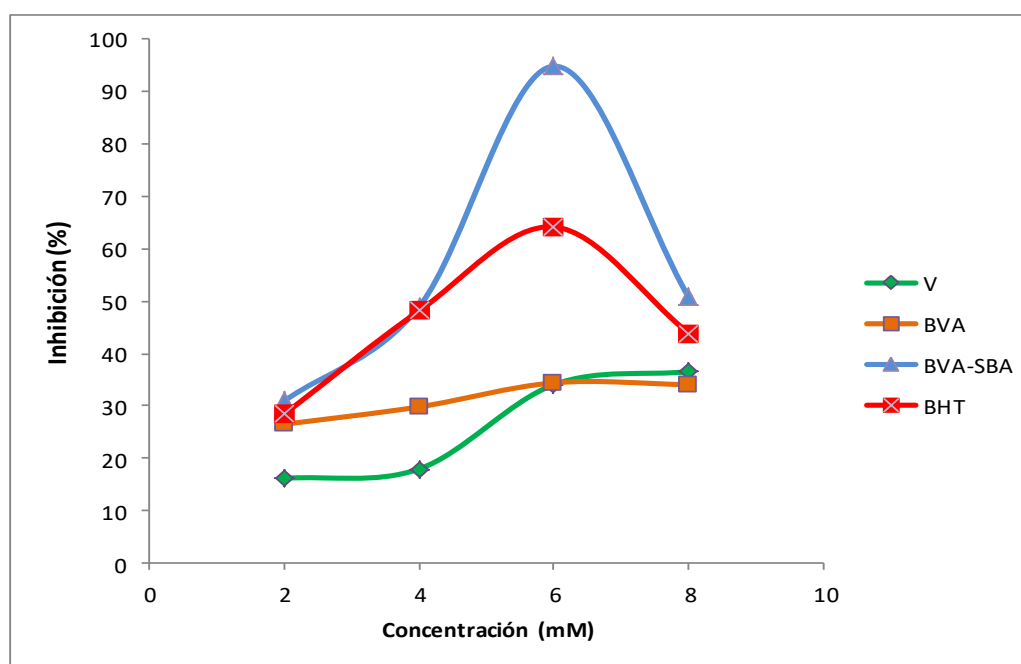


Figura 1. Porcentaje de inhibición de la oxidación en función de la concentración de las muestras.

A excepción de los datos obtenidos a una concentración de 8mM para la vainillina y bis-vainillina, la actividad antioxidante disminuyó en el siguiente orden: BVA-SBA>BHT>BVA>V. El efecto inhibitorio de la vainillina dimerizada es mayor que la vainillina monomérica. Estos resultados sugieren que los sustituyentes voluminosos son necesarios en la posición cercana del grupo hidroxilo en la vainillina (Rahman *et al.*, 1997).

Al mismo nivel de concentración, BVA encapsulada en SBA-15 presentó una mayor actividad antioxidante que la de BVA libre. Esto se atribuyó al aumento de la solubilidad de BVA en el sistema BVA/SBA-15, como resultado de su interacción con la sílice mesoporosa (Jirovetz *et al.*, 2006).

4. Conclusiones

La determinación de actividad antioxidante del fenol y sus compuestos relacionados se realizó de manera efectiva aplicando la técnica del fosfomolibdeno. Una destacada característica del sistema BVA/SBA-15 es que el mismo presenta mayor actividad antioxidante que la vainillina libre a concentraciones de 2, 4, 6 y 8mM, por lo que es promisorio la generación del dímero y su posterior anclaje en un material mesoporo permitiendo futuras aplicaciones.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología (ANCyT) PICT 2014 N° 1587, a la Universidad Nacional del Litoral CAI+D, 2016-2020, PE N° 50420150100056LI, y a la Universidad Tecnológica Nacional por financiar este trabajo de investigación.

Referencias

- Abo-youssef, A. M. (2016) Possible antidepressant effects of vanillin against experimentally induced chronic mild stress in rats, *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. Elsevier B.V., 5(2), 187–192.
- Alam, N. and Bristi, N. J. (2013) Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143–152.
- Bedos-belval, F. and Duran, H. (2008) Development of Novel Antiatherogenic Biaryls: Design, Synthesis, and Reactivity, *J. Med. Chem.*, 51, 3171–3181.
- Buldini, P. L. and Sharma, J. La (1993) Determination of total phosphorus by ion chromatography in soaps/detergents, 654, 129–134.
- Charles, D. J. (2013) Antioxidant properties of spices, herbs and other sources, Springer 4.
- Costero, A. M. et al. (2015) 5,5'-Bis-vanillin derivatives as discriminating sensors for trivalent cations, *Tetrahedron Letters*. Elsevier Ltd, 56(26), 3988–3991.
- Fache, M., Boutevin, B. and Caillol, S. (2015) Vanillin, a key-intermediate of biobased polymers, *European Polymer Journal*. Elsevier Ltd, 68, 488–502.
- Gaviria Montoya, C. et al. (2009) Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW), *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6), 519–528.
- Guntero, V. A. et al. (2018) Synthesis and Encapsulation of bis-eugenol in a Mesoporous Solid Material: Enhancement of the Antioxidant Activity of a Natural Compound from Clove Oil, *Chemical Science International Journal*, 22(4), 1–10.
- De Guzman, C. C. and Zara, R. R. (2012) Vanilla, *Handbook of Herbs and Spices: Second Edition*, 1, 547–589.

Jirovetz, L. et al.(2006) Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17),6303–6307.

Katihar, A. et al.(2006) Synthesis of ordered large pore SBA-15 spherical particles for adsorption of biomolecules, *Journal of Chromatography A*, 1122(1-2), 13–20.

Nandiyanto, A. B. D. et al.(2009) Synthesis of spherical mesoporous silica nanoparticles with nanometer-size controllable pores and outer diameters, *Microporous and Mesoporous Materials*. Elsevier Inc., 120(3), 447–453.

Rahman, S. et al.(1997) NII-Electronic Library Service, *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 45(9), 1527–1529.

Sun, J. et al. (2013) Synthesis, molecular modeling and structural characterization of vanillin derivatives as antimicrobial agents, *Journal of Molecular Structure*. Elsevier B.V., 1039, 214–218.

Tai, A. et al. (2011) Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier B.V., 1810(2), 170–177.

Trewyn, B. G. et al.(2008) Biocompatible mesoporous silica nanoparticles with different morphologies for animal cell membrane penetration, *Chemical Engineering Journal*, 137(1), 23–29.

Wang, A. et al.(2016) Synthesis of different-sized SBA-15 nanoparticles and their fluoride release performances from poly(methyl methacrylate) dental restorative resin, *New Journal of Chemistry*, 40, 9781–9787.

Wexler, P. (2014) Chlorothalonil, *Encyclopedia of Toxicology*.