

Actividad antioxidante de compuestos fenólicos en semillas de ajonjolí y su efecto sobre el crecimiento bacteriano

Jesús M. Castro-Montoya¹, Jesús G. Rangel-Peraza², Claribel J. Piña-Hernández¹, Saraid Mora-Rochín³, Jesús J. Rochín-Medina¹

Depto. de Ingeniería Bioquímica¹, Depto. de Estudios de Posgrado e Investigación², Fac. de Ciencias Químico-Biológicas³
Instituto Tecnológico de Culiacán^{1,2}, Universidad Autónoma de Sinaloa³
Culiacán, Sin.; México
rochintec@gmail.com

Abstract- The aim of this investigation was to determine the antioxidant and antimicrobial activity of free and bound phenolic compounds of sesame seeds. Two sesame seeds (clear and black) were milled to obtain free and bound extracts, to which were used to analyze for total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity. Bound extracts in both sesame seeds presented higher content of total phenolics, antioxidant activity, also showed a greater ability to inhibit the *Salmonella* growth, very similar to gentamicin control at 6 h of incubation. Sesame seeds represent a good consumption alternative of naturally occurring antioxidants compounds with antimicrobial potential.

Keyword- *Sesame seed, antioxidant, antimicrobial*

Resumen- El objetivo de la presente investigación fue determinar la actividad antioxidante y antimicrobiana de compuestos fenólicos libres y ligados de semillas de ajonjolí. Se utilizaron dos semillas de ajonjolí (claras y negras) las cuales fueron molidas para la obtención de extractos libres y ligados, a los que se les determinó el contenido de fenólicos totales, actividad antioxidante y antimicrobiana. Los extractos ligados en ambas semillas de ajonjolí fueron los que presentaron mayor contenido de compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante, además, presentaron una mayor capacidad de inhibición del crecimiento de *Salmonella*, muy similar al control gentamicina a las 6 horas de incubación. Las semillas de ajonjolí representan una buena alternativa de consumo para obtención de compuestos antioxidantes de origen natural con potencial antimicrobiano.

Palabras claves- *Ajonjolí, antioxidante, antimicrobiano*

I. INTRODUCCIÓN

La semilla de ajonjolí (*Sesamum indicum L*), es una oleaginosa que pertenece a la familia de pedaliáceas. El cultivo de esta semilla es de gran importancia alrededor del mundo debido a su alto contenido de aceite (45-50%). Alrededor del 70% de su producción mundial se utiliza en la extracción de aceite para diferentes usos, como producto alimenticio, y en la formulación de múltiples productos cosméticos y farmacéuticos. Además el aceite de ajonjolí se caracteriza la presencia de lignanos, principalmente sesamina, sesamolina, y sesamol, a los cuales se les han atribuido efectos benéficos a la salud humana, incluyendo la capacidad de disminuir los niveles de colesterol y presión sanguínea, antioxidante y anticarcinogénico [1-2].

Por otro lado, los componentes antioxidantes contenidos en harinas de ajonjolí desgrasado, obtenido como subproducto después de la extracción de aceite han atraído poco interés. Más allá de su actividad antioxidante, los compuestos fenólicos poseen propiedades antimicrobianas. Aunque existen estudios sobre la capacidad antioxidante en semillas como el ajonjolí [3], sus propiedades antimicrobianas son escasamente examinadas. La capacidad antimicrobiana de semillas (o sus extractos) es de suma importancia, porque a pesar de la gran cantidad de técnicas de conservación disponibles hoy en día, la

putrefacción y el deterioro de los alimentos por microorganismos sigue siendo un problema que no ha sido todavía completamente controlado.

Los cuadros de patología digestiva transmitidas por agua y alimentos, siguen siendo una causa importante de morbilidad e incluso mortalidad tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. El Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC) estima que en el 2011, cuarenta y ocho millones de personas en EUA se enfermaron debido al consumo de alimentos contaminados, de los cuales 128,000 fueron hospitalizados y 3000 murieron como resultado de enfermedades alimentarias. Por otro lado en México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), reporta anualmente poco más de 4.7 millones de casos nuevos de infecciones intestinales [4-5]. Las preocupaciones y los riesgos potenciales sobre el uso de antimicrobianos y antioxidantes químicos sintéticos, han renovado el interés de los consumidores en utilizar alternativas naturales y seguras. Debido a esto es importante la búsqueda de compuestos de origen natural capaces de contrarrestar el desarrollo bacteriano, así como crear un ambiente antioxidante al momento de su consumo.

El objetivo de la presente investigación es determinar la actividad antioxidante y antimicrobiana de compuestos fenólicos libres y ligados a la pared celular de semillas de ajonjolí.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Materiales

Como materiales se utilizaron semillas de ajonjolí (*Sesamum indicum* L) claras y negras, adquiridas en un mercado de la localidad. También se utilizó una cepa de *Salmonella* (ATCC 13311).

B. Obtención de extractos de fitoquímicos libres y ligados de harinas de ajonjolí

Para la obtención de extractos de fitoquímicos libres y ligados de harinas de ajonjolí de ajonjolí, se siguió la metodología propuesta por Mora-Rochín y col [6]. Semillas de ajonjolí (100 g) fueron previamente molturadas en un molino de martillos hasta obtener fragmentos de las semillas que pasara por una malla 40-US (0.425 mm).

Se pesó $1 \text{ g} \pm 0.5$ de harina de ajonjolí y se homogenizó con 10 mL de una solución fría de etanol-agua (80:20 v/v) durante 1 h a temperatura ambiente, utilizando un rotator a 50 rpm. Posteriormente la mezcla fue centrifugada (3000 xg/10°C/10min) y el sobrenadante se recolectó y evaporó hasta sequedad en un rotavapor a 35°C. Los residuos de fenólicos fueron reconstituidos en metanol al 50% y almacenados a -20°C hasta su posterior utilización. Las muestras fueron reconocidas como extractos de fenólicos libres.

Los residuos resultantes de la centrifugación durante la obtención de fenólicos libres, fueron hidrolizados por 30 y 60 min con 10 mL de NaOH 2M a 95 y 25°C, respectivamente en un baño con agitación (60 rpm). La muestra hidrolizada fue acidificada con HCl concentrado antes de su remoción de lípidos con hexano. La solución final fue extraída cinco veces con 10 mL acetato de etilo, y la mezcla de esas extracciones fue evaporada hasta sequedad. Los residuos de los extractos fueron reconstituidos con metanol al 50% y almacenados a -20°C. Las muestras fueron reconocidas como extractos de fenólicos ligados.

C. Determinación de compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos de los extractos libres y ligados se determinó utilizando el método colorimétrico descrito por Singleton y col [7]. 20 μL de cada extracto se oxidaron con 180 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.). Después de 20 min, la absorbancia del color azul resultante se midió a 750 nm utilizando un lector de microplacas (Synergy™

de detección múltiple, BioTek, Inc., Winooski, VT, EE.UU.). Se preparó una curva de calibración usando ácido gálico (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE.UU.) como estándar y los fenólicos totales se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de muestra (bs, base seca). El contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) se calculó mediante la suma de compuestos fenólicos presentes en extractos de fenólicos libres y ligados. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

D. Determinación de actividad antioxidante por el método ORAC y ABTS

La actividad antioxidante utilizando el ensayo de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) fue determinada a los extractos hidrófilicos libres y ligados. El ensayo ORAC determina el grado de inhibición antioxidante del radical peroxilo por la transferencia de átomos H [6, 8]. Este ensayo incluye tanto el tiempo de inhibición, así como el grado de inhibición de la oxidación. Este método está basado en el grado de inhibición de la fluoresceína (FL) como sustrato de oxidación y como agente oxidante el generador de radicales libres peroxilo inducido por descomposición térmica del compuesto 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) dihidroclorado (AAPH). La intensidad de FL disminuye a medida que avanza la degeneración oxidativa. Esta intensidad se registra durante 35 minutos después de la adición del azoderivado (AAPH). La descomposición de FL se mide en función del retardo en el decaimiento de fluorescencia, respecto a la presencia o no del antioxidante. Las curvas de caída (la intensidad de fluorescencia respecto al tiempo) se registran y el área entre las dos curvas de caída (con o sin antioxidante) se calcula. Posteriormente, el grado de protección antioxidante mediada se cuantifica utilizando el antioxidante Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico, un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E) como estándar, para lo cual se construye una curva estándar con diferentes concentraciones de Trolox. La solución de FL (1.2mM) se preparó pesando 39.87 mg de FL, disueltos en 100 mL de buffer de fosfato (PBS)(75 mM, pH 7.4), posteriormente se almacenó en condiciones de refrigeración en ausencia de luz. A partir de la muestra de FL se preparó una solución diluida (10 μ M). La solución utilizada en este ensayo (0.1 μ M) se preparó diariamente, para lo cual se tomaron 0.25 mL de la solución diluida y se le agregaron 25 mL de PBS. La solución de AAPH (200mM) se preparó tomando 0.207 mg de AAPH mezclándolos con 5 mL de PBS. El estándar utilizado fue 1mM de solución Trolox, la cual se preparó en PBS. Se tomaron 25 μ L de muestra del extracto fenólico las cuales se diluyeron en buffer de fosfato 75 mM, fueron transferidas a las celdas del espectrofotómetro (lector de microplacas SynergyTM), donde se les adicionó 150 μ L de FL y 25 μ L de AAPH se mezclaron e incubaron a 37°C durante 30 min, la determinación de la fluorescencia se realizó en intervalos de 2 min durante 60 min (485 nm para absorción y 538 nm para emisión). Los valores obtenidos tanto para la muestras como para el control se determinaron obteniendo el área bajo la curva. Los valores se expresaron en μ mol equivalentes de Trolox (ET)/100 g de muestra seca. Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

Para la determinación de actividad antioxidante por el método de ABTS se utilizaron los extractos de compuestos fenólicos libres y ligados. El ensayo del ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico) (ABTS) está basado en la captación por los antioxidantes del radical catión ABTS \cdot^+ generado en el medio de reacción. El radical catión del ABTS posee una coloración verde-azulada con un máximo de absorción a 415 nm y una serie de máximos secundarios de absorción a 645, 660, 734, 815 y 820 nm. Dependiendo de la variante del método ABTS utilizada se emplean distintas longitudes de onda, aunque las más frecuentes son 415 y 734 nm; en este trabajo se empleó una longitud de onda de 734 nm. Para el desarrollo del método se suelen emplear dos estrategias; inhibición y decoloración. En la primera los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical ABTS \cdot^+ y lo que se determina es la inhibición de la formación del radical, que se traduce en un retraso en la aparición de la

coloración verde-azulada. En la segunda estrategia, los antioxidantes se añaden una vez el ABTS^{•+} se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir la decoloración de este. En este trabajo, para el desarrollo del método se empleó la estrategia de decoloración. Finalmente, el grado de protección antioxidante mediada se cuantifica utilizando el antioxidante Trolox como estándar. Según la metodología, el radical ABTS^{•+} se obtuvo tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2.45 mM) incubados a temperatura ambiente (25°C) y oscuridad durante 12-16 h. Después la solución de ABTS^{•+} fue diluida con agua desionizada para obtener una solución de trabajo de ABTS^{•+}. La reacción entre la solución de trabajo de ABTS^{•+} y muestras con diferentes concentraciones fueron iniciadas y almacenadas a temperatura ambiente (25°C) hasta que la reacción fue completada. El radical ABTS^{•+} sufrió decoloración debido a la reacción con los antioxidantes. La disminución de coloración se monitoreó en un lector de microplacas (Synergy™) a 734 nm y fue expresada como porcentaje de inhibición de ABTS, la cual fue comparada con una curva estándar de Trolox. Los datos se expresaron como μmol equivalentes de Trolox (ET)/100 g de muestra seca. Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

E. Determinación de la actividad antimicrobiana

La determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de compuestos fenólicos (libres y ligados) en semillas de ajonjolí, se llevó a cabo espectrofotométricamente. Se inoculó una cepa de *Salmonella* en medio RVBA y se incubó a 35°C durante 24 h. Posteriormente se prepararon tubos de cultivo con 9 mL de infusión cerebro corazón a los cuales se les agregó 1 mL de inóculo preparado anteriormente y 10 μL de extracto de fenólicos libres y ligados y se midió su densidad óptica (DO) a diferentes tiempos de incubación (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h) utilizando un espectrofotómetro de celdas (Genesys 10vis, Thermo Scientific) a 600 nm. Se agregó un control positivo (+) el cual contenía el inóculo en el medio de cultivo, un control negativo (-) el cual contenía el antibiótico gentamicina y un blanco (medio de cultivo sin inóculo y sin extracto).

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A. Determinación de compuestos fenólicos, y actividad antioxidante en harinas de ajonjolí

Según lo reportado por Yeo y Shahidi [9], la mayoría de los compuestos fenólicos se sintetizan en el espacio intracelular, especialmente en el retículo endoplásmico y son almacenados en las vacuolas como compuestos fenólicos libres. Por otro lado, algunos otros compuestos fenólicos son transportados desde el espacio intracelular y son localizados en las paredes celulares formando enlaces covalentes con macromoléculas insolubles como celulosa, arabinoglicano, algunas proteínas y por auto-polimerización.

Las harinas desgrasadas de ajonjolí claro y negro, utilizadas en el presente estudio, presentaron valores de 192 mg EAG/100 g (bs) a 209 mg EAG/100 g (bs), respectivamente. En ambas harinas de esta semilla, la fracción ligada fue la mayor (Fig. 1). Tanto en la fracción libre como en la ligada, la harina de ajonjolí negro presentó el mayor contenido de fenólicos totales.

En el caso de cereales, se ha demostrado que en su pericarpio contiene la mayor concentración de compuestos fenólicos, mientras que en endospermo la concentración de estos compuestos es menor [6]. De la misma manera, en las semillas de ajonjolí claras y negras, el contenido de compuestos fenólicos en su forma ligada (unidos a la pared celular y luego liberados mediante hidrólisis alcalina y ácida) fue mayor que la fracción libre (69 % harina de ajonjolí claro; 74% harina de ajonjolí negro). Shahidi y col [10], reportaron que en semillas de ajonjolí blanco y negro, la concentración de compuestos fenólicos en la cascarrilla fue mayor que en la semilla entera. Los autores atribuyen a que en el grano entero pudiese existir un fenómeno de dilución que disminuyera la concentración de

fenólicos con respecto a la cascarilla. En nuestro estudio, los fenólicos ligados a la pared fueron liberados mediante hidrólisis alcalina y luego ácida, de esa manera nos fue posible cuantificarlos.

La Fig. 2. Muestra la actividad antioxidante de las harinas de ajonjolí mediante los métodos ORAC y ABTS. En ambos métodos de actividad antioxidante, los extractos de harina de ajonjolí negro fue mayor (ORAC: 8,601 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g, bs}$; ABTS: 8,038 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g, bs}$) que en la harina de ajonjolí claro (ORAC: 5,641 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g, bs}$; ABTS: (4,178 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g, bs}$). Así mismo la fracción ligada en ambos materiales y métodos fue mayor (ORAC: 63-65% en harinas de ajonjolí negro y claro, respectivamente; ABTS: 63-65% en harinas de ajonjolí negro y claro, respectivamente).

B. Evaluación de la inhibición de crecimiento bacteriano

En la Fig. 3. Se presentan los gráficos del efecto de los extractos obtenidos de semillas de ajonjolí blanco (Fig.3A) y negro (Fig.3B) sobre la evaluación *in vitro* de la inhibición del crecimiento de *Salmonella*. 10 μL de extractos de fenólicos presentes en semillas de ajonjolí (**claro**: extracto libre= 49.83 mg EAG/100 g, bs; extracto ligado= 141.67 mg EAG/100 g, bs; **negro**: extracto libre= 64.72 mg EAG/100 g, bs; extracto ligado=144.31 mg EAG/100 g, bs) provocaron una disminución en el crecimiento de *Salmonella* a los diferentes tiempos de incubación con respecto al control positivo, el cual consistió en el inóculo con el medio de crecimiento sin extracto ni inhibidor comercial.

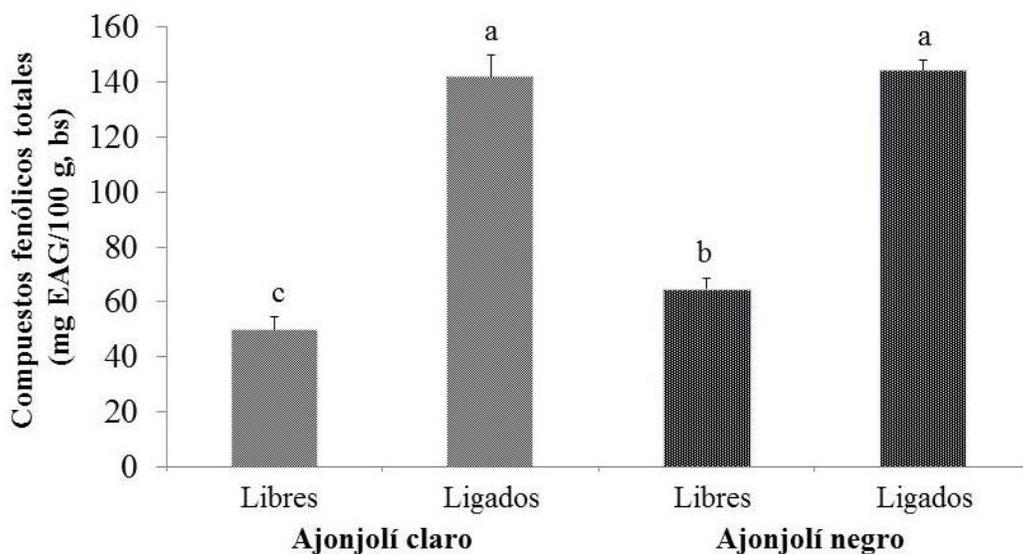


Fig. 1. Contenido de compuestos fenólicos totales en semillas de ajonjolí.

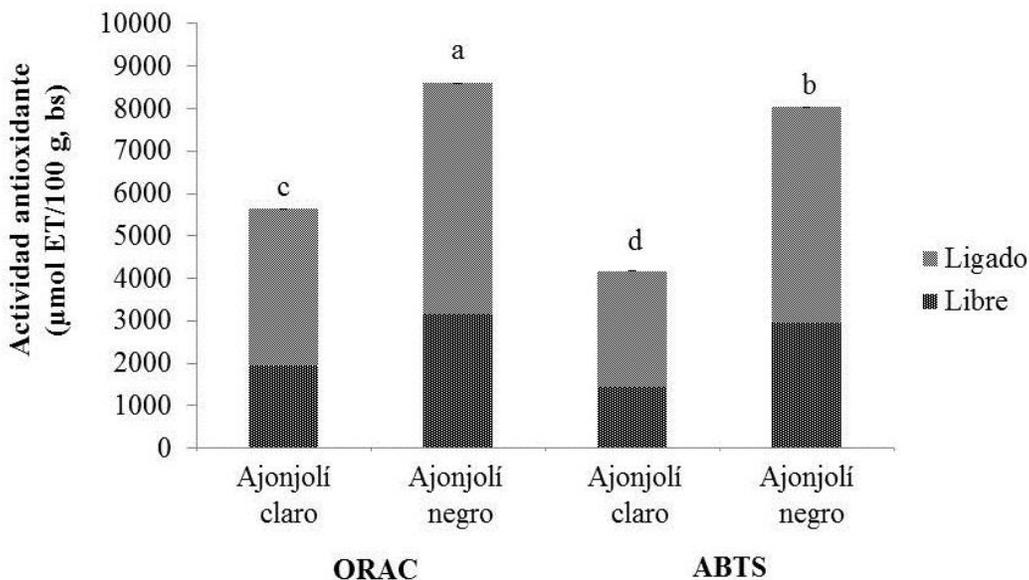


Fig. 2. Actividad antioxidante en semillas de ajonjolí por diferentes métodos.

En los extractos obtenidos de ambas semillas de ajonjolí, los extractos de fenólicos ligados presentaron la mayor inhibición del crecimiento bacteriano, además, al llegar a las 6 horas de incubación, los extractos ligados tuvieron un efecto inhibitorio muy similar a lo observado utilizando el control gentamicina (Fig. 3). Existen diferentes investigaciones en donde se reporta el efecto antimicrobiano de compuestos fenólicos de diferentes materiales de origen vegetal como hojas de *Lepechinia bullata* [11] y *Murraya paniculata* [12], productos derivados de frutas [13]. Sin embargo son pocos los reportes en donde se evalúa el efecto antimicrobiano de compuestos fenólicos presentes en granos o semillas como el ajonjolí.

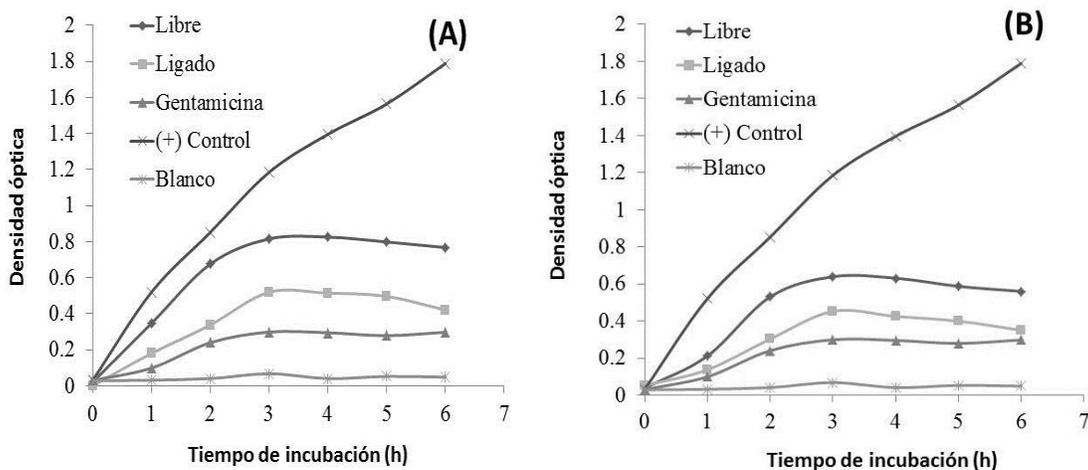


Fig. 3. Efecto de fenólicos de ajonjolí claro (A) y negro (B) sobre crecimiento de *Salmonella*.

Uno de los posibles mecanismos propuestos del efecto antimicrobiano de los compuestos fenólicos está relacionado con la inactivación de enzimas celulares, la cual depende de la relación de la penetración de estos compuestos a la célula del microorganismo o por cambios en la permeabilidad de la membrana, esto es el principal factor en el mecanismo de la acción antimicrobiana, en donde los compuestos fenólicos pueden romper la integridad de dicha membrana y causar la pérdida de la integridad celular y una eventual muerte celular [14].

IV. CONCLUSIONES

Los extractos de compuestos fenólicos hidrofílicos presentes en semillas de ajonjolí en sus dos fracciones (libres y ligados), presentaron actividad antioxidante, así como un efecto antimicrobiano frente a una cepa de *Salmonella*. Así mismo, las fracciones ligadas fueron las mayoritarias en las semillas y presentaron mayor capacidad antioxidante y efecto antimicrobiano que las fracciones libres.

Este es un primer acercamiento a evaluar el efecto antioxidante y antimicrobiano de compuestos fenólicos libres y ligados en semillas de ajonjolí. Debido a la escasa información existente sobre el efecto antimicrobiano de compuestos fenólicos presentes en semillas de ajonjolí, es necesario realizar más estudios en donde se identifiquen los compuestos presentes en estas semillas y correlacionarlos con el efecto antimicrobiano.

REFERENCIAS

- [1] Kansoula Z, Liakopoulou-Kyriakides M (2010) Effect of endogenous antioxidants of sesame seeds and sesame oil to the thermal stability of edible vegetable oils. *LWT – Food Sci Technol* 43: 1379–1386.
- [2] Hamada N, Tanaka A, Fujita Y, Itoh T, Ono Y, Kitagawa Y, Tomimori N, Kiso Y, Akao Y, Nzawa Y, Ito M (2011) Involvement of heme-oxygenase-1 induction via Nrf2/ARE activation in protection against H₂O₂-induced PC12 cell death by a metabolite of sesamin contained in sesame seeds. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 1959–1965.
- [3] Othman SB, Katsuno N, Kanamaru Y, Yabe T (2015) Water-soluble extracts from defatted sesame seed flour show antioxidant activity *in vitro*. *Food Chem* 175: 306-314.
- [4] Sánchez-García E (2012) Efecto de compuestos fitoquímicos sobre microorganismos de importancia en alimentos. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León
- [5] Šiler B, Zivkovic S, Banjanac T, Cvetkovic J, Zivkovic JN, Ciric A, Soković M, Mišić D (2014) Centauries as underestimated food additives: Antioxidant and antimicrobial potential. *Food Chem* 147: 367–376.
- [6] Mora-Rochín S, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO, Sánchez-Peña P, Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J (2010) Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *J Cereal Sci* 52:502-508.
- [7] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Method Enzymol* 299: 152–178.
- [8] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
- [9] Yeo J, Shahidi F (2015) Critical Evaluation of Changes in the ratio of Insoluble Bound to Soluble Phenolics on Antioxidant Activity of lentils during Germination. *J Agric Food Chem* 63: 379-381.
- [10] Shahidi F, Liyana-Pathirana CM, Wall DS (2006) Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chem* 99: 478-483.
- [11] Pérez-Colmenares A, Vivas-Guerrero K, Rojas-Fermín L, Usubillaga A, Chataing B (2014) Phytochemical study and antibacterial activity evaluation of *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling leaves. *Rev Fac Farm* 56: 40-45.

- [12] Gautam MK, Gangwar M, Nath G, Rao CV, Goel RK (2012) In vitro antibacterial activity on human pathogens and total phenolic, flavonoid content of *Murraya paniculata* Linn. leaves. Asian Pac J Trop Biomed S1660-S1663.
- [13] Lantzouraki DZ, Sinanoglou VJ, Zoumpoulakis PG, Glamoclija J, Ciric A, Sokovic M, Heropoulos G, Proestos C (2015) Antiradical-antimicrobial activity and phenolic profile of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices from different cultivars: a comparative study. RSC Adv 5: 2602- 2614.
- [14] Moreno S, Scheyer T, Romano C, Vojnov A (2006) Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. Free Radic Res 40: 223-231.