

Evaluation of Antioxidant Capacity and Optimization of Chromatographic Fingerprints by HPLC-DAD-FLD of Extracts from Medicinal Plants.

Evaluación de la Capacidad Antioxidante y Optimización de sus Perfiles Cromatográficos por HPLC-DAD-FLD de Extractos de Plantas de Uso Medicinal.

Karol Pérez-Reales¹, Yissed Giraldo-Naranjo¹, Dilia Mejía Rodríguez², Aracelys Rodríguez Palmera², Gabriel Medina², Darío Méndez-Cuadro^{1*}, Erika Rodríguez-Cavallo^{1*}

¹Grupo de Química Analítica y Biomedicina, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia

²Centro Tutorial San Juan Nepomuceno, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia

* erodriguezc1@unicartagena.edu.co; dmendezc@unicartagena.edu.co

Ponencia Poster 45

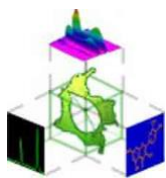
ABSTRACT

Oxidative stress is a physiological state resulting from the imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the capacity of the antioxidant system to neutralize them. This accumulation of ROS can lead to the oxidation of proteins. Carbonylation is a post-translational modification that occurs as a result of oxidative stress, adding carbonyl groups to specific amino acids. This alteration affects protein functionality, deteriorates cellular systems, and triggers neurodegenerative, inflammatory, cardiovascular diseases, and cancer, among others [1,2,3].

In this context, there has been a promotion of the search for promising plants as sources of antioxidants, such as flavonoids and polyphenols, which provide both therapeutic and preventive benefits [4,5].

The objective of this study was to evaluate the antioxidant capacity of extracts obtained from fresh plant material reported by ancestral medicine in the San Juan de Nepomuceno area. To achieve this, modern methods based on proteomic assays were utilized to assess the antioxidant capacity of extracts derived from six endemic plants in the region. Furthermore, chromatographic conditions for the analysis and quantification of polyphenols and flavonoids present in these extracts were optimized using chromatography techniques coupled with UV-Vis and fluorescence detection, as well as spectroscopic techniques.

Our results allowed us to identify the extracts from Limonaria, Romero, Chuchuguaza, Achiote, Salvia, and Coca as having the highest content of these compounds. The evaluation of their antioxidant activity, based on protection against the carbonylation of a model protein exposed to the oxidizing agent (FeSO₄), through a Dot-Blot immunoassay, demonstrated that these extracts possess significant antioxidant capacity dependent on concentration. In particular, the carbonylation-inhibiting activity exhibited by the extracts of Achiote,



Chuchuguaza, and Salvia showed an inverse relationship with concentration, while the other extracts displayed a directly proportional relationship, suggesting a metabolic differential ^[3,5].

Simultaneously, the optimization of chromatographic conditions for obtaining the metabolite profile of each extract through HPLC-DAD-FLD required the use of a Phenomenex Gemini C18 column, eluting the compounds in a mobile phase (ACN/MeOH/H₂O) in a gradient and detecting at two wavelengths ^[6,7]. This process allowed the establishment of chromatographic patterns that identified characteristic peaks for each of the analyzed extracts. These chromatographic profiles will serve as a reference for establishing the specific chromatographic fingerprint of each extract and for comparing variations in metabolic composition between fresh and dried plant material.

Key words: Antioxidant activity, Bioassays, Plant extracts, Flavonoids, HPLC, Polyphenols.

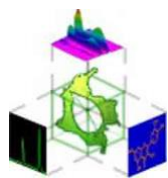
RESUMEN

El estrés oxidativo es un estado fisiológico producto del desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad del sistema antioxidante para neutralizarlas, de modo que la acumulación de ROS puede oxidar a las proteínas. La carbonilación es una modificación postraduccional resultante del estrés oxidativo que adiciona grupos carbonilos en aminoácidos específicos, alterando la funcionalidad de la proteína, deteriorando el sistema celular y desencadenando enfermedades neurodegenerativas, inflamatorias, cardiovasculares y cáncer, entre otras ^[1,2,3].

En este contexto, se ha promovido la búsqueda de plantas promisorias en fuentes antioxidantes, como flavonoides y polifenoles, que ofrezcan beneficios tanto terapéuticos como preventivos ^[4, 5].

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad antioxidante de extractos procedentes de material fresco de plantas reportadas por la medicina ancestral de la zona de influencia de San Juan de Nepomuceno. Para ello, se han utilizado métodos modernos basados en ensayos proteómicos con los que se ha evaluado la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de 6 plantas endémicas en la región. Asimismo, basado en técnicas cromatográficas acopladas a detección UV-Vis y fluorescencia; y técnicas espectroscópicas, se han optimizado las condiciones cromatográficas de análisis y de cuantificación de polifenoles y flavonoides, presentes en dichos extractos.

Nuestros resultados nos permitieron identificar a los extractos de las plantas Limonaria (*Cymbopogon citratus*), Romero (*Rosmarinus officinalis* L.), Chuchuguaza (*Maytenus leavis*), Achiote (*Bixa orellana* L.), Salvia (*Croton punctatus* Jacq.) y Coca (*Erythroxylon areolatum* L.) como las de mayor contenido en dichos compuestos. La evaluación de su actividad antioxidante, basada en la protección contra la carbonilación de una proteína modelo expuesta al agente oxidante (FeSO₄), mediante inmunoensayo Dot-Blot, nos permitió establecer que estos extractos poseen una capacidad antioxidante significativa dependiente de la concentración. En particular, la actividad inhibitoria de la carbonización mostrada por los extractos de Achiote, Chuchuguaza y Salvia fue



inversamente proporcional a la concentración, mientras que los demás extractos mostraron una relación directamente proporcional, lo que sugiere un diferencial metabólico ^[3,5].

Simultáneamente, la optimización de las condiciones cromatográficas para la obtención del perfil de metabolitos de cada extracto, mediante HPLC-DAD-FLD, requirió el uso de una columna Phenomenex Geminis C18, eluyendo los compuestos en una fase móvil (ACN/ MeOH /H₂O) movida en gradiente y detectando a dos longitudes de onda ^[6,7]. Así, se lograron establecer patrones cromatográficos que permitieron identificar picos característicos para cada uno de los extractos analizados. Estos perfiles cromatográficos servirán como referencia para establecer la huella cromatográfica específica de cada extracto y comparar variaciones de composición metabólica entre material vegetal fresco y seco.

Palabras clave: Actividad antioxidante, Bioensayos, Extractos vegetales, Flavonoides, HPLC, Polifenoles.

Acknowledgements

The authors thank the University of Cartagena for the financial support to the project under Commitment Act No. 0.32, 0.52 and 0.17 -2022; 0.20 and 078-2023.

References

- [1] De Almeida AJPO, De Oliveira JCPL, Da Silva Pontes LV, De Souza Júnior JF, Gonçalves TAF, Dantas SH, et al. ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways. Vol. 2022, Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Hindawi Limited; 2022.
- [2] Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., & Jin, B. (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food chemistry*, 383, 132531.
- [3] Marrugo-Padilla, Darío Méndez-Cuadro, Erika Rodríguez-Cavallo, Tetracycline residues induce carbonylation of milk proteins and alter their solubility and digestibility, *International Dairy Journal*, Volume 125, 2022, 105226, ISSN 0958- 6946. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105226>.
- [4] Akbar A, Gul Z, Chein SH, Sadiq MB. Investigation of Anti-Inflammatory Properties, Phytochemical Constituents, Antioxidant, and Antimicrobial Potentials of the Whole Plant Ethanolic Extract of *Achillea santolinoides* subsp. *wilhelmsii* (K. Koch) Greuter of Balochistan. *Oxid Med Cell Longev*. 2023;2023.
- [5] De la Rosa Cogollo, I., Marrugo-Padilla, A., Rodríguez-Cavallo, E., & Méndez-Cuadro, D. (2020). In natura tropical juices inhibit the in vitro carbonylation of bovine serum albumin. *Fruits*, 75(6), 247-257.
- [6] De Magalhães BEA, Dos Santos WNL. Phenolic content and antioxidant capacity of infusions herbs: Optimization of phenolic extraction and HPLC-dad method. *An Acad Bras Cienc*. 2020;92(3):1-17.
- [7] Li, Y., He, Z., Shao, N., Xu, Z., Rong, S., & Zhu, X. (2024). Establishment of multivariate digital high performance liquid chromatography fingerprints of fruit juice essence and its flavor quality evaluation. *Microchemical Journal*, 200, 110402