

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO.
CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES EN EXTRACTOS NATURALES.

Gracia Nava Manuel Alejandro.

Resumen.

Los compuestos fenólicos, entre los cuales se encuentran los flavonoides, presentan una amplia ubicuidad en la naturaleza. Son responsables del buen funcionamiento de las plantas y, en su relación con el hombre, son utilizados para tratar desordenes cardiovasculares y prevenir algunos cánceres. Poseen una estructura química adecuada para ejercer actividad antioxidante, la cuál esta íntimamente relacionada con tales propiedades. Para su extracción se utilizan solventes polares cuyo extracto posteriormente se concentra. En este ensayo se obtuvieron los extractos metanólicos de la *Malva sylvestris* y el *Chenopodium murale* y junto a los extractos ya obtenidos de flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*), berros (*Nasturtium officinale*), hierba del venado (*Damianaturnera diffusa willd*), dracocephalum y taxodio se determinó el contenido de fenoles y flavonoides totales, en equivalentes de ácido gálico (GA) y catequina respectivamente, utilizando técnicas espectrofotométricas. Los resultados mostraron una gran cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides en la mayoría de los extractos, los cuales pueden estar estrechamente relacionados con las propiedades farmacológicas y medicinales de las plantas cuyos extractos fueron analizados, siendo de especial interés la cantidad exhibida por la flor de manita.

Palabras Clave: Fenoles; Flavonoides; Actividad antioxidante.

Introducción.

Los compuestos fenólicos presentan un numeroso grupo ampliamente distribuido en la naturaleza. Son componentes importantes en la dieta humana, el consumo promedio de fenoles en los países europeos se estima en 23 mg/día. Existe un interés creciente en los compuestos fenólicos debido a su efecto contra algunas enfermedades como ciertos cánceres y desordenes cardíacos derivados de su poderosa actividad antioxidante.

Los compuestos fenolicos poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante actuando como captore de radicales libres neutralizando peligrosas especies reactivas de oxígeno e iones metálicos quelantes. Además, debido a su reactividad, se encuentran en la mayoría de los casos combinadas con un ácido orgánico, un azúcar o bien, con ellas mismas para formar un polímero.

Los flavonoides, uno de los dos grandes grupos de compuestos fenólicos junto con los ácidos fenólicos, son un grupo extenso de compuestos derivados del benzo- γ -pirano. Poseen varios grupos hidroxilos enlazados a estructuras anulares, C₆-C₃-C₆, designadas como A, B y C (Fig 1.). Dependiendo del grado de oxidación y de sustitución del anillo pirano central pueden subdividirse en flavonas, flavonoles, flavononas, isoflavonas, flavanos y antocianinas. El anillo pirano puede ser abierto (chalconas) y reciclado en un anillo furano (auronas).

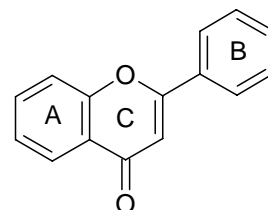


Fig 1. Estructura básica del esqueleto flavonólico.

Está comprobado que los flavonoides son importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas al protegerlas contra agentes agresores externos, como la radiación UV, microorganismos, animales herbívoros y del medio ambiente. Pueden actuar

como señalizadores químicos, indicando a los insectos que planta es apropiada para su alimentación, oviposición o simplemente guiándolos y facilitando así la polinización.

En su relación con el hombre, se utilizan para tratar enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y desordenes cardiovasculares debido a la actividad que ejercen sobre el sistema circulatorio mejorando la circulación periférica, la movilización del colesterol y disminuyendo la fragilidad capilar. Algunos flavonoides pueden presentar actividad hepática protectora, antialérgica, antitrombótica, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, e incluso pueden ejercer efectos inhibidores sobre algunas enzimas.

Otra de las propiedades de los flavonoides es su capacidad para contribuir a las propiedades de los alimentos, como el sabor o la dulzura. Utilizados en la industria de los cosméticos por su actividad desodorante y reductora de la hiperpigmentación causada por la vejez.

La extracción de los diferentes flavonoides se realiza a partir del material fresco o incluso seco, siempre y cuando no se altere su composición. Se utilizan inicialmente disolventes no polares o ligeramente polares para separar las clorofilas gomas y agliconas de flavonoides altamente metoxiladas. Los flavonoides, que poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares, son considerados polares, por lo que son ligeramente solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetona, DMSO o agua. El filtrado final se concentra y todo el disolvente se remueve. Este proceso es favorable para la extracción de la mayoría de los flavonoides pero no para antocianidinas o flavonoides de baja polaridad los cuales aparecen en la superficie de las plantas.

En el presente trabajo, el contenido de fenoles y flavonoides totales en siete extractos naturales fue determinado mediante espectrofotometría. Los resultados se reportaron en equivalentes de ácido gálico y de catequina.

Metodología.

Para la cuantificación de fenoles totales y flavonoides se analizaron los siguientes extractos naturales: flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*), berros (*Nasturtium officinale*), hierba del venado (*Damianaturnera diffusa willd*), dracocephalum, taxodio, malva (*Malva sylvestris*) y *Chenopodium murale*. Los dos últimos se obtuvieron mediante extracción soxhlet.

Extracción. Dado que los compuestos fenólicos y flavonoides son de naturaleza polar, se utilizó metanol para extraerlos, removiendo inicialmente todos los demás extractos cuyos compuestos no son de interés utilizando acetona y hexano como disolventes. Posteriormente se concentró los extractos metanólicos en un rotaevaporador hasta completa evaporación del disolvente.

Análisis de fenoles totales. La concentración de fenoles totales en extractos fue medida por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de oxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Preparación de la curva de calibración. Se utilizó una solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/mL) de la cual se tomaron volúmenes de 0 μ L a 160 μ L en intervalos de 20 μ L y se completó el volumen de cada uno a 500 μ L con agua destilada.

Determinación de fenoles en una muestra. Se pesaron 5 mg de extracto y se disolvieron en 1 mL de agua destilada (metanol para la malva y el *C. murale*). Se diluyó 1:10 en agua destilada y de ésta solución se tomaron 100 μ L para después completarse a 500 μ L con agua destilada.

Procedimiento. A cada uno de los estándares y muestras previamente preparados se le adicionaron 250 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N y se sonicó por 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 1250 μL de Na_2CO_3 al 20% y se dejó reposar por 2 horas. La absorbancia fue medida a 760 nm. Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por g de extracto (mg GA/g extracto).

Análisis de flavonoides totales. El contenido de flavonoides se determinó mediante el ensayo de Liu y col. (2002).

Preparación de la curva de calibración. Se utilizó una solución estándar de catequina (0.1 mg/mL) de la cual se tomaron volúmenes de 0 μL a 100 μL en intervalos de 20 μL .

Determinación de fenoles en una muestra. Se pesaron 5 mg de extracto y se disolvieron en 1 mL de agua destilada (metanol para la malva y el *C. murale*). Se diluyó 1:10 en agua destilada.

Procedimiento. A cada uno de los estándares y muestras previamente preparados se le adicionaron 1250 μL de agua destilada y después de adicionar 75 μL de NaNO_2 al 5% se dejaron reposar 6 minutos. Se adicionaron 150 μL de AlCl_3 al 10% y se dejó reposar 5 minutos. Después de esto se adicionaron 500 μL de NaOH 1M y finalmente se completó el volumen de cada referencia y muestra a 2.5 mL con agua destilada. La absorbancia fue medida a 510 nm inmediatamente antes de 30 minutos. Los resultados fueron expresados en mg de catequina por g de extracto (mg cat/g extracto).

Resultados y discusión.

Extracción. Los extractos obtenidos de la malva y el *C. murale* tuvieron una consistencia viscosa como se anticipaba al tratarse de extractos metanólicos.

Análisis de fenoles totales. La curva de calibración obtenida para este ensayo se presenta en la fig. 1. Los resultados (tabla 1) muestran que, por lo menos, todos los extractos contienen

Fig 2. Curva de calibración utilizando ác. gálico como estándar a 510 nm

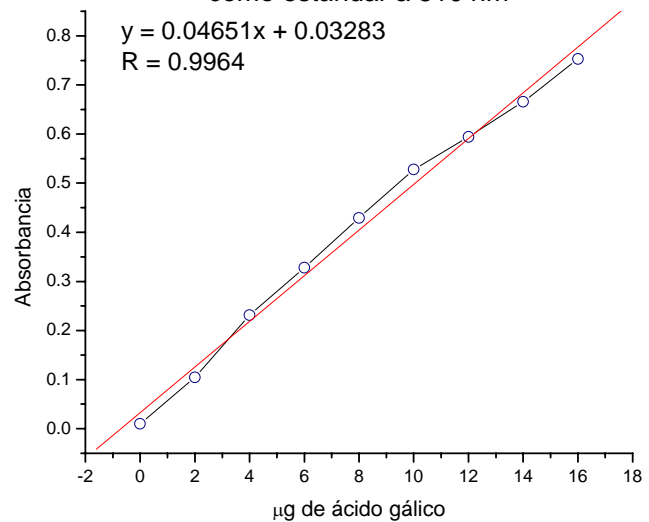


Fig 3. Curva de calibración utilizando catequina como estándar a 510 nm

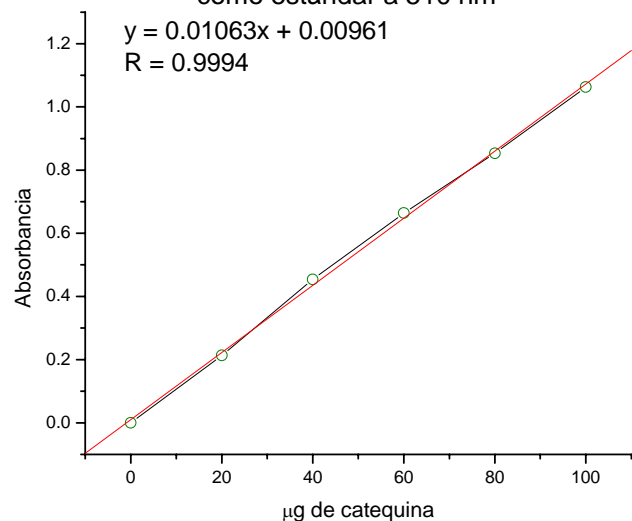


Tabla 1. Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en extractos naturales.

| Extracto | mg GA / g extracto | mg cat / g extracto |
|------------------|---------------------|---------------------|
| Flor de m. | 221.481 \pm 0.630 | 164.178 \pm 0.089 |
| Berros | 41.732 \pm 0.312 | 2.263 \pm 0.033 |
| Venado | 61.680 \pm 0.282 | 25.941 \pm 0.025 |
| Dracocep. | 110.244 \pm 0.097 | 72.078 \pm 0.123 |
| Taxodio | 50.137 \pm 0.819 | 17.480 \pm 0.033 |
| Malva | 21.094 \pm 0.101 | 8.708 \pm 0.012 |
| <i>C. murale</i> | 19.755 \pm 0.099 | 12.963 \pm 0.001 |

compuestos fenólicos en cantidades significativas. Por lo tanto la concentración de compuestos fenólicos, a su vez relacionada con la actividad antioxidante, en cada extracto de cada planta es el sostén sobre el cual se fundamenta su uso medicinal y farmacológico desde hace mucho tiempo.

Análisis de flavonoides totales. La curva de calibración obtenida para este ensayo se presenta en la fig. 2. Los resultados (tabla 1) muestran valores menores que los obtenidos para el análisis de fenoles. Esto se encuentra dentro de lo esperado, siendo que los flavonoides son un subgrupo de los compuestos fenólicos.

Según los resultados, el extracto que tuvo mayor contenido de fenoles y a su vez de flavonoides fue la flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) por lo que sería adecuado seguir analizando con más detalle esta planta y sus efectos en relación con el hombre, para el tratamiento de trastornos cardíacos y del sistema nervioso, que podrían deberse al contenido tan elevado de compuestos fenólicos.

Cabe señalar que la actividad antioxidante no esta simplemente relacionada con los compuestos fenólicos totales determinados en los extractos. Los siguientes hechos deben ser tomados en cuenta: La existencia de agliconas libres y su incorporación a la determinación, además el hecho de que pueden ocurrir interacciones entre los componentes del extracto. El sinergismo de los flavonoides con tocoferoles, palmitato ascorbil y ácido cítrico ya ha sido reportado (Rizner Hras, 2000).

Conclusión.

Los extractos analizados poseen un contenido de compuestos fenólicos significativo que va íntimamente relacionado con las propiedades farmacológicas y medicinales adjuntas a las plantas cuyos extractos fueron analizados. Es de especial interés el seguimiento que se le pudiera hacer a la flor de manita por su gran contenido de compuestos fenólicos.

Agradecimientos

Agradezco la Dra. Sandra O. Mendoza por facilitar las instalaciones, equipo y técnicas necesarias para efectuar esta investigación.

Bibliografía.

Cartaya, O., E., Reynaldo Inés. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*. 22. No 2. 5-14.

Filipiak Marian. (2001). Electrochemical Analysis of Polyphenolic Compounds. *Analytical Sciences, The japan society for analytical chemistry*, 17.
http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsac/analsci/ICAS2001/pdfs/1600/1667_p4069.pdf

Martínez de Toda Fernández, Fernando. (2002). Viticultura de calidad: factores que afectan al contenido de compuestos fenólicos. *ACE, Revista de Enología*, 21.
http://www.acenologia.com/ciencia59_1.htm

Rizner Hras, A., Hadolin, M., Knez, Z., & Baumann, D. (2000). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extraction with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, 71, 229-333.

Skerget Mojka, Kotnik, P., Hadolin, M., Rizner Hras, A., Simoncic, M., & Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavonols and flavones in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry* 89. 191-198.