

ESTIMACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE FENOLES TOTALES EN ESPECIES DE LA FAMILIA MELASTOMATACEAE

A SPECTROMETRIC APPROACH TO THE PHENOL TOTALS IN SPECIES OF MELASTOMATACEAE
FAMILY

José H. Isaza^{1,2}, Luz Ángela Veloza¹, Carlos A. Guevara¹, Yenny P. Ávila¹, Omaira Díaz¹.

Resumen

El presente trabajo describe tres métodos analíticos para cuantificar fenoles totales extractos en acetona acuosa al 70% de doce plantas de la familia Melastomataceae; la cual es rica en compuestos fenólicos, principalmente taninos hidrolizables. Los extractos fueron evaluados por espectrofotometría UV-VIS empleando el método de medición directa a 280 nm y los métodos colorimétricos de Folin-Ciocalteu (820 nm) y azul de Prusia (700 nm) utilizando ácido gálico como referencia. Se escogió el método de Folin-Ciocalteu como el mejor para la determinación de fenoles totales en plantas melastomatáceas debido a su reproducibilidad y fácil manejo.

Palabras clave: azul de Prusia, Folin-Ciocalteu, Melastomataceae, taninos hidrolizables

Abstract

This work describes the standardization and evaluation of three analytical methods to quantify total phenolics in 70% aqueous acetone extracts from twelve species belonging to the Melastomataceae family; a rich source in phenolic compounds, mainly hydrolyzable tannins. The extracts were evaluated by UV-VIS spectrophotometry using a direct method (280 nm) and the colorimetric methods of Folin-Ciocalteu (820 nm) and Prussian blue (700 nm), using gallic acid as standard.

Key words: Folin-Ciocalteu, hydrolyzables tannins, Melastomataceae Prussian blue.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos (fenoles y polifenoles) constituyen un amplio conjunto de metabolitos de plantas derivados por las dos principales vías de la aromagénesis, la del shikimato y la del acetato, que hacen parte integral de la dieta tanto de animales como de humanos (Bravo, 1998; Haslam, 1996). Han ganado un interés creciente por sus diversas actividades biológicas tales como antitumorales (Ito et al.,

2002), antivirales (Lamien et al., 2005), antimicóticos (Latte y Kolodziej, 2000), antioxidante y captora de radicales libres (Okuda, 2005; Maldonado et al., 2005). Algunas especies de la familia Melastomataceae son ricas en polifenoles del tipo taninos hidrolizables (Isaza et al., 2004; Yoshida et al., 1999). La extracción con acetona al 70% y el uso acetona en el gradiente por etapas para la separación cromatográfica de estos compuestos causa interferencia en el monitoreo directo por

¹ Grupo Polifenoles (UTP), Escuela de Química. Facultad de Tecnología. Universidad Tecnológica de Pereira. A. A. 097. Pereira (Risaralda), Colombia.

² Correo electrónico: <jhim@utp.edu.co>.

espectrofotometría UV a 280 nm. Además, para la estimación espectrofotométrica preliminar, también interfieren las clorofilas y otros pigmentos. Con el ánimo de eliminar estos inconvenientes, se evaluaron y modificaron los métodos colorimétricos de Folin-Ciocalteu (Grubestic et al., 2005; Lastra et al., 2000) y azul de Prusia (Thoss et al., 2002) para cuantificar fenoles totales en extractos de plantas utilizando como referencia el ácido gálico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Las especies *Miconia elata* (Sw.) D.C., *Miconia minutiflora* (Bonpl.) D.C., *M. dolychorrhyncha* Naud., *M. prasina* (Sw.) D.C., *M. trinervia* (Sw) D. Don ex Loud. fueron colectadas en el Meta (Colombia) y suministradas por la Dra. Luz Mila Quiñónez del Herbario de la Universidad de los Llanos (Villavicencio), Colombia. *Tibouchina ciliaris* (Vent.) Cogn., *T. urvileana* (D.C.) Cogn., *Henrietta trachyphylla* Triana, fueron colectadas por el Dr. José H. Isaza en la vereda Laguneta vía Pereira-Armenia (Colombia), e identificadas por el Dr. Frank Almeda de la Academia de Ciencias de California (E. U. A.). *T. multiflora* (Gardn.) Cogn., colectada por el Dr. José H. Isaza en Pereira (Risaralda), Colombia, e identificada por la Dra. Sussane S. Renner del *Missouri Botanical Garden* (E. U. A.). *M. aeruginosa* Naud y *M. coronata* (Bonpl) D.C. colectadas por José H. Isaza en la vereda la Bananera, orilla del río Otún (Colombia), e identificadas por el Dr. Carlos Parra del Herbario Nacional de Colombia. Las hojas de cada especie se secaron al ambiente por 15 días, luego se molieron en un molino de cuchillas y posteriormente fueron almacenadas en frascos de vidrio.

Extracción del material vegetal. Para todos los propósitos de este trabajo se hicieron cuatro réplicas de cada muestra. Para la determinación de fenoles totales, las hojas secas y molidas de cada una de las especies (0.5 g +/- 0.0005 g) se extrajeron con tres porciones de 10 ml en acetona al 70%

durante treinta minutos cada vez y se centrifugaron durante 3 minutos a 3000 r.p.m. Los tres sobrenadantes se juntaron y se aforaron hasta 100 ml con agua destilada almacenándolos en frascos herméticamente cerrados a 4 °C.

Estandarización de las técnicas espectrofotométricas. Se preparó una solución stock de ácido gálico de 250 ppm (25 mg ácido gálico, 2 gotas de ácido fosfórico y completar a 100 ml con agua destilada). A partir de ésta se hicieron diluciones para cada curva de calibración. Los espectros UV-vis se registraron en un espectrofotómetro Milton-Roy Genesis 5 (190-1100 nm) y las medidas cuantitativas se tomaron en un Spectronic Genesis 20 D.

En el método directo para fenoles totales se construyó la curva de calibración con ácido gálico (1.0-50 ppm) a 280 nm utilizando como blanco agua destilada. El rango óptimo de trabajo se determinó mediante la curva de Ringbom.

Método de Folin-Ciocalteu. En este método el reactivo se preparó llevando a reflujo por 8 horas una mezcla de tungstato de sodio (10 g), molibdato de sodio (2.5 g), H₃PO₄ (5 ml) y HCl concentrado (10 ml). Luego de enfriar al ambiente, se adicionó sulfato de litio (16 g) y una gota de bromo y se reflujo nuevamente por 15 minutos. Finalmente se aforó a 100 ml con agua destilada. El reactivo de trabajo se preparó diluyendo (1:1) la solución anterior con agua destilada (Lastra et al., 2000). El espectro de absorción se registró en celda de cuarzo de 1 cm de paso, entre 350 y 1100 nm utilizando 3.2 ml de solución de ácido gálico (50 ppm), 0.4 ml de reactivo de trabajo y 0.2 ml de carbonato de sodio (20%), aforando a 10 mL con agua destilada. Como blanco se utilizaron 3.2 mL de agua destilada y los demás reactivos. Una vez fijada la longitud de onda de máxima absorción, se optimizaron los parámetros temperatura (50, 60, 70 y 100 °C), orden de adición de los reactivos, volumen de reactivo de Folin-Ciocalteu (0.2, 0.4, 0.8, 1.2 ml) volumen de carbonato de sodio (0.2, 0.4, 0.8, 1.6 ml). Con

las condiciones optimizadas se construyeron las curvas de calibración y de Ringbom.

Método del azul de Prusia. Siguiendo el método modificado de Hagerman (1998), se prepararon soluciones generadoras de color de $K_3Fe(CN)_6$ 0,016 M, $FeCl_3$ 0,02 M en HCl 0,10 N y la solución estabilizadora con 30 ml de agua destilada, 10 ml H_3PO_4 85% y 10 ml goma arábica 1%. A partir de la solución stock de ácido gálico, se prepararon diluciones en el rango de concentración de 0-5 ppm. La longitud de onda de máxima absorción se determinó con el estándar de 2,5 ppm. Se varió el orden de adición de reactivos, las proporciones de los reactivos, el pH, los volúmenes de ácido fosfórico, tiempo de espera para adición de ácido fosfórico y temperatura de reacción.

Cuantificación de fenoles totales. Cada una de las cuatro réplicas preparadas de cada especie de planta melastomatácea se cuantificó por las tres técnicas en las condiciones estandarizadas. En el método directo, los extractos se diluyeron 1/50 o 1/100 para leer la absorbancia a 280 nm frente a un blanco de agua destilada en una celda de cuarzo de 1 cm de paso. En el método de Folin-Ciocalteu todas las réplicas se diluyeron 1/100. La solución de lectura se preparó con 1 ml de cada dilución anterior, 0,8 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu y 0,2 ml de Na_2CO_3 20% aforados a 10 ml en tubos de 1 cm de paso con tapa rosca. Se calentaron a 60 °C por 90 minutos y se midieron a 820 nm frente a un blanco preparado de la misma manera. En el método del azul de Prusia modificado, cada réplica de cada extracto se diluyó 1/200 ó 1/500, para luego tomar 1 ml es ésta, mezclarlo con 1 ml de $K_3Fe(CN)_6$ 0,016 M, 1 ml de $FeCl_3$ 0,02 M en HCl 0,10 N, después de 10 minutos se adicionó 1 ml de H_3PO_4 85% y se aforo a 10 ml con agua destilada en tubos tapa rosca de 1 cm de paso. La medida de absorbancia se realizó a 700 nm frente a un blanco preparado con la metodología anterior.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método directo para la determinación de fenoles totales a 280 nm dio un rango lineal de 0-50 ppm como ácido gálico; el rango óptimo de trabajo obtenido de la curva de Ringbom fue de 5-30 ppm con una ecuación de la línea recta $C_{ppm} = 24,155A$ y $R^2 = 0,9959$. En el método de Folin-Ciocalteu, la longitud de onda de máxima absorción determinada a 820 nm difiere de aquella a 700 nm reportada en la literatura (Lastra *et al.*, 2000). Se obtuvo un rango lineal de 0-22 ppm como ácido gálico, rango óptimo de 2.0-12 ppm con una ecuación $C_{ppm} = 11,89A$ y $R^2 = 0,9967$. El rango lineal del método modificado del azul de Prusia modificado fue de 0 a 2,5 ppm como ácido gálico y el rango óptimo de 0,25 a 2,0 ppm, con una ecuación $C_{ppm} = 3,165A$ y $R^2 = 0,999$. La mayor sensibilidad es para el método de azul de Prusia, sin necesidad de la solución estabilizadora con goma arábica propuesta por Hagerman, 1988. Por el contrario, el uso de ácido fosfórico mejoró la estabilidad del complejo azul, pero con un rango lineal muy limitado debido a la precipitación a concentraciones mayores de 2,5 ppm de ácido gálico. El pH ácido fue favorable para la formación del complejo azul de Prusia, mientras a pH neutro y básico se forma turbidez. El tiempo de espera para la adición de ácido fosfórico mostró un comportamiento de tres escalones de aumento de absorbancia, aparentemente relacionados con la oxidación secuencial de los tres grupos hidroxilo del ácido gálico, a 10, 20 y 30 minutos. Este último se mantuvo por 30 minutos más. Por esta razón se estandarizó a 10 minutos el tiempo de espera para la adición de ácido fosfórico, con el propósito de cuantificar los fenoles totales solo con la primera oxidación. Este comportamiento se verificó a temperatura ambiente, mientras el aumento en la temperatura de reacción, produjo turbidez, causando inestabilidad en las lecturas.

En la figura 1 se muestran los resultados cuantitativos para fenoles totales comparando las tres técnicas en las condiciones estandarizadas descritas anteriormente en la sección cuantificación de fenoles.

Los porcentajes de error relativo promedio fueron 6,0% en las determinaciones a 280 nm, 5,4% en el método de Folin-Ciocalteu y 4,2% para el método del azul de Prusia. Se observa una sobrestimación generalizada de fenoles con la cuantificación directa a 280 nm con respecto a los métodos de Folin-Ciocalteu y azul de Prusia. Este efecto se debe a la contribución de las absorciones de las clorofilas y otros pigmentos presentes en los extractos. En las dos muestras de la especie *T. ciliaris* se estimó un valor mayor por el método de Folin-Ciocalteu, lo cual puede ser debido a interferencia positiva de otras sustancias

tales como aminas alifáticas terciarias, triptófano, hidroxilamina, hidracina, ciertas purinas, pirroles, indoles, ácido ascórbico o glutamina y otros agentes reductores orgánicos e inorgánicos (Ikawa et al., 2003). Los valores menores obtenidos por el método del azul de Prusia puede explicarse en el tiempo de espera de 10 minutos para la adición del ácido fosfórico, el cual está relacionado con la primera oxidación del ácido gálico (trihidroxibencenos), más fácil que en monohidroxibencenos. Esto está de acuerdo con la selectividad del método del azul de Prusia para polifenoles (Thoss et al., 2002).

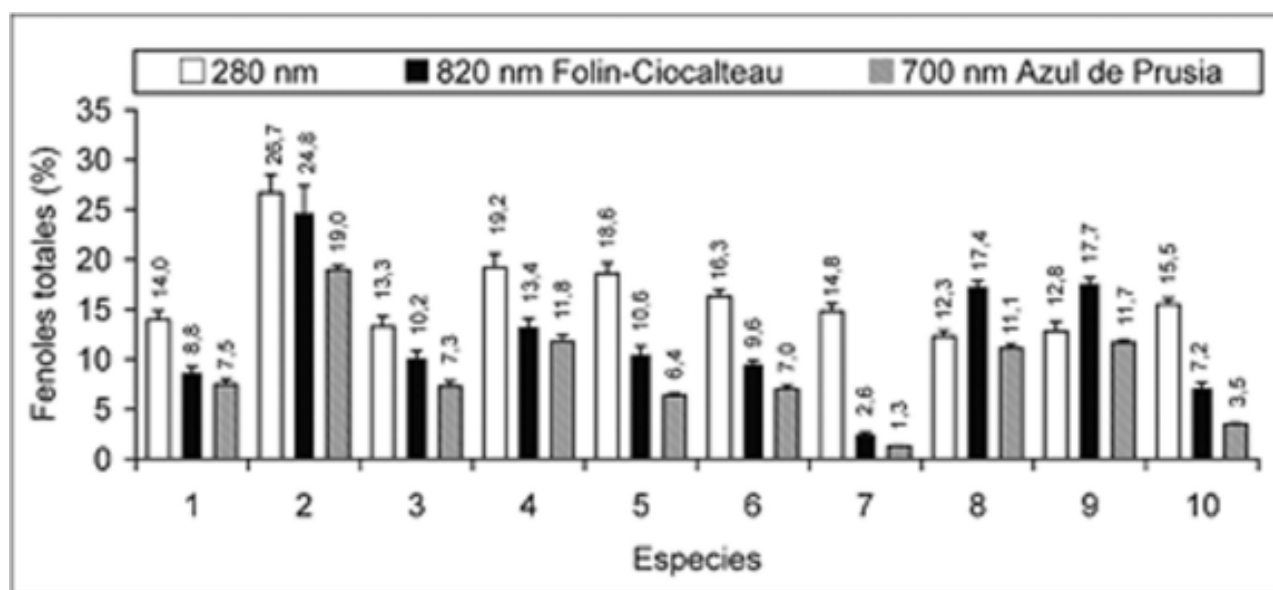


Figura 1. Comparación del porcentaje de fenoles totales determinados por tres técnicas espectrofotométricas, directo a 280 nm, Folin-Ciocalteu a 820 nm y Azul de Prusia a 700 nm. 1. *Miconia trinervia*, 2. *M. Prasina*, 3. *M. elata*, 4. *M. dolichorryncha*, 5. *M. minutiflora*, 6. *M. aeruginosa*, 7. *H. trachyphylla*, 8. *T. ciliaris* I, 9. *T. ciliaris* II, 10. *M. coronata*

Por su facilidad y reproducibilidad se seleccionó el método de Folin-Ciocalteu como mejor método para la determinación de fenoles totales en extractos vegetales en acetona al 70% y como sistema de reacción post-columna en los sistemas cromatográficos utilizados para el aislamiento y purificación de fenoles y polifenoles en plantas melastomátáceas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Tecnológica de Pereira (Risaralda, Colombia), y su oficina de investigaciones por el financiamiento de este proyecto (511-3-265-01), a COLCIENCIAS por la financiación parcial del proyecto (1110-07-12544) y a CENIVAM contrato COLCIENCIAS RC-432, 2004.

REFERENCIAS

- Bravo L.** 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 56:317-333.
- Grubestic RJ, Vukovic J, Kremer D, Vladimir-Knezevic S.** 2005. Spectrophotometric method for polyphenols analysis: prevalidation and application on *Plantago L.* species. *J. Pharm Biomed Anal.*, 39:837-842.
- Hagerman A.** 1998. *Modified prussian blue assay for total phenolics in tannin chemistry.* Miami University. <<http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>>. Fecha de consulta: Octubre 2005.
- Haslam E.** 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59:205-215.
- Ikawa M, Schaper TD, Dollard CA, Sasner JJ.** 2003. Utilization of folin-ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 51:1811-1815.
- Isaza JH, Ito H, Yoshida T.** 2004. Oligomeric hydrolyzable tannins from *Monochaetum multiflorum*. *Phytochemistry*, 65:359-367.
- Ito H, Kobayashi E, Li SH, Hatano T, Sugita D, Kubo N, Shimura S, Itoh Y, Tokuda H, Nishino H, Yoshida T.** 2002. Antitumor activity of compounds isolated from leaves of *Eriobotrya Japonica*. *J. Agric. Food Chem.*, 50:2400-2403.
- Lamien CE, Meda A, Mans J, Romito M, Nacoulma OG, Viljoen GJ.** 2005. Inhibition of fowlpox virus by an aqueous acetone extract from galls of *Guiera senegalensis*. J. F. Gmel (Combretaceae). *J. Ethnopharmacol.*, 96:249-253.
- Lastra H, Rodríguez E, Ponce de León RH, González ML.** 2000. Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. *Revista Cubana Plant. Med.*, 5:17-22.
- Latte KP, Kolodziej H.** 2000. Antifungal effects of hydrolyzable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. *Z Naturforsch [C]*, 55:467-472.
- Maldonado PD, Rivero-Cruz I, Mata R, Pedraza-Chaverri J.** 2005. Antioxidant activity of a-type proanthocyanidins from *Geranium niveum* (Geraniaceae). *J. Agric. Food Chem.*, 53:1996-2001.
- Okuda T.** 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, 66:2012-2031.
- Yoshida T, Amakura Y, Yokura N, Ito H, Isaza JH, Ramírez LS, Peláez DP, Renner SS,** 1999. Oligomeric hydrolyzable tannins from *Tibouchina multiflora*. *Phytochemistry*, 52:1661-1666.

