

CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE LA ESPECIE *Phyllanthus acuminatus* (Euphorbiaceae) Y ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

RESUMEN

En este trabajo se estableció una metodología para la caracterización de compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico de la especie *Phyllanthus acuminatus* (Euphorbiaceae), empleando electroforesis capilar en zona (CZE). Para los análisis se utilizó un equipo CAPEL-105 con detector ultravioleta que permitió la obtención del respectivo espectro para cada una de las señales observadas, en el rango de 192–378 nm. Además, se evaluó la actividad antioxidante a través del ensayo de decoloramiento del radical DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidracilo) y el contenido total de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu.

PALABRAS CLAVES: Electroforesis capilar en zona, espectro UV, actividad antioxidante, EC₅₀, Folin-Ciocalteu, *Phyllanthus acuminatus*.

ABSTRACT

This work established a methodology for the characterization of phenolic compounds present in the ethanolic extract of Phyllanthus acuminatus (Euphorbiaceae). Capillary electrophoresis (CAPEL-105, Lumex) with ultraviolet detection was used in the analyses to obtain the UV spectrum for each one of the observed signals, in the 192-378 nm range. In addition, the antioxidant activity was assessed through the test of decoloration of radical DPPH, and the total content of phenols was determined by means of the Folin-Ciocalteu method.

KEYWORDS: Capillary zone electrophoresis, spectrum UV, Antioxidant activity, EC₅₀, Folin-Ciocalteu, *Phyllanthus acuminatus*.

MÓNICA CALA MOLINA

Estudiante de Química
Universidad Industrial de Santander

ÁNGELA VÁSQUEZ CARDEÑO

Estudiante de Química
Universidad Industrial de Santander

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ M.

Químico, Ph D.
Profesor Titular
Escuela de Química
Universidad Industrial de Santander
rene@tucan.uis.edu.co

ELENA E. STASHENKO

Química, Ph D.
Profesora Titular
Escuela de Química
Universidad Industrial de Santander
Directora CENIVAM
elena@tucan.uis.edu.co

1. INTRODUCCIÓN

El creciente interés a nivel mundial por el desarrollo de productos de origen natural, capaces de detener o inhibir procesos oxidativos asociados a diferentes alteraciones de la salud, ha arrojado prometedores resultados en cuanto a la acción de compuestos fenólicos como agentes antioxidantes. Los estudios realizados a compuestos fenólicos han comprendido diversos tipos de matrices entre las que se encuentran principalmente las plantas [1]. Dichos estudios se han dirigido igualmente hacia el desarrollo de técnicas analíticas que permitan el análisis simultáneo de diferentes clases de analitos en tiempos reducidos. Así la electroforesis capilar en sus diferentes modalidades, ha permitido el análisis de compuestos fenólicos en plantas, presentando ventajas sobresalientes sobre otras técnicas, ya que emplea cantidades pequeñas de solvente, es muy sensible, rápida y se requiere poca preparación de la muestra [2].

2. CONTENIDO

2.1. Materiales y Métodos

2.1.1. Reactivos y materiales

La vitamina E (97%) (Batch # 05029PD USA), el DPPH (90%) (lot: 115K1319 Germany), el etanol (99.8%), el reactivo de Folin-Ciocalteu (2N) (lot: 1297128 Switzerland), el ácido gálico (98%) (lot: 1126284 Spain), se adquirieron de Sigma-Aldrich; ácido bórico (99.8%) fue obtenido Farmitalia Carlo Erba (Italy); dihidrógeno fosfato de sodio e hidróxido de sodio de Merck Chemical Co.

Los análisis de electroforesis capilar fueron realizados empleando un equipo CAPEL-105 (Lumex, San Petersburgo, Rusia) con detector de UV en un rango de 190-380 nm y un capilar de sílice fundida con 75 µm i.d. con largo total y efectivo de 60 y 50.5 cm, respectivamente.

Los datos espectrofotométricos para la determinación de fenoles se obtuvieron en un espectrofotómetro JENWAY 6300. En las medidas de absorbancia en el rango visible se utilizaron cubetas (1cmx1cmx4cm) de cuarzo.

2.1.2. Material vegetal. Muestras de la especie *Phyllanthus acuminatus* fueron obtenidas en la región del Meta e identificadas por el Dr. J. Murillo del Herbario Nacional Colombiano, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá., según N° Col: 512239.

2.1.3. Extracción del material vegetal. Se pesaron 30.224 g. de hojas secas de *Phyllanthus acuminatus* Luego en un frasco de vidrio, se añadió etanol hasta cubrir el total del material. La extracción exhaustiva se realizó mediante agitación a temperatura ambiente durante 30 min cada 8 horas. El extracto etanólico obtenido se llevó a sequedad en un rotoevaporador.

2.1.4 Electroforesis Capilar. Para los análisis por electroforesis capilar [3] del extracto etanólico de la especie *Phyllanthus acuminatus* se utilizó una solución buffer a pH 8.08, compuesta por soluciones de H_3BO_3 (25 mM) y Na_2HPO_4 (25 mM) adicionando solución de NaOH (1 M) para ajustar el pH. Los análisis se llevaron a cabo aplicando 25 kV, a 20°C, con inyección hidrodinámica a 30 mbar durante 10 segundos y un tiempo de análisis de 20 minutos. Para la obtención de los espectros ultravioleta de cada una de las señales, se realizaron corridas, variando la longitud de onda del detector cada 5 nm en el intervalo de 192 – 378 nm.

2.1.5. Ensayo con DPPH. Este ensayo se ejecutó según lo indicado por W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, y C. Berset. [4], por triplicado. Se evaluaron los estados estacionarios para cuatro valores de concentraciones diferentes, del extracto etanólico, la vitamina E. y el Trolox. Posteriormente, los valores de absorbancia en el estado estacionario, fueron utilizados para determinar el % DPPH remanente, para cada una de las concentraciones efectivas EC adicionadas. Luego, se estableció la correlación entre el porcentaje remanente y el EC efectiva, se interpolaron los valores de EC, correspondientes al 50% de DPPH remanente.

2.1.6. Contenido total de fenoles. Se estimó como equivalentes de ácido gálico, según modificación realizada al procedimiento descrito por Dastmalchi, K. et al. [5], a saber, una alícuota de 1 mL de extracto fue transferida a un tubo de ensayo que contenía 6 mL de agua destilada. Luego, se adicionaron 500 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu. Después de 5 min, se añadieron 1,5 mL de una solución de Na_2CO_3 (200g/L) y agua hasta completar un volumen de 10 mL. Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 760 nm y se comparó con la curva de calibración realizada con ácido gálico.

2.2. RESULTADOS

Los espectros UV obtenidos para cada una de las señales observadas en los electroforegramas presentan máximos de absorción en el rango de 228-238 nm (Fig 1). Esta región

de absorción es característica para compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides.

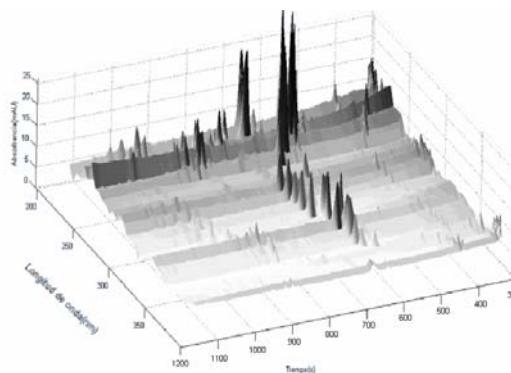


Figura 1. Respuesta espectral UV de los constituyentes del extracto etanólico de la especie *Phyllanthus acuminatus*.

De acuerdo con los valores de EC_{50} para cada una de las sustancias evaluadas reportados en la **Tabla 1**, se observa que el extracto etanólico de la planta *Phyllanthus acuminatus* muestra capacidad superior para atrapar radicales en comparación con la vitamina E, pero inferior frente al Trolox.

De acuerdo con los valores de EC_{50} para cada una de las sustancias evaluadas reportados en la **Tabla 1**, se observa que el extracto etanólico de la planta *Phyllanthus acuminatus* muestra capacidad superior para atrapar radicales en comparación con la vitamina E, pero inferior frente al Trolox.

SUSTANCIA	EC_{50} (g extracto/mmol DPPH)
Phyllanthus acuminatus	0,092 \pm 0,008
Vitamina E	0,117 \pm 0,003
Trolox	0,061 \pm 0,001

Tabla 1. Valores de EC_{50} de las sustancias evaluadas

El contenido total de fenoles de esta especie, estimado como equivalente de ácido gálico fue $4,30 \pm 0,12$ (mg fenoles/100 g de planta).

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A partir del espectro UV obtenido para cada una de las señales presentes en el extracto etanólico de la especie *Phyllanthus acuminatus* se determinó un rango característico de máxima absorción comprendido entre 228 – 238 nm, particular de algunos compuestos fenólicos. Esto sumado a los resultados del ensayo con Folin-Ciocalteu, los cuales indican la presencia de fenoles en el extracto y a la alta capacidad de atrapamiento de radicales, se puede atribuir las señales observadas en la respuesta espectral a los compuestos fenólicos presentes en el extracto.

De acuerdo con los resultados, es posible proponer la electroforesis capilar en zona como una técnica eficiente en el análisis de compuestos fenólicos y además considerar la especie *Phyllanthus acuminatus* como una promisoría candidata para la obtención de compuestos fenólicos a partir de su extracto etanólico.

4. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Colciencias por su apoyo financiero a través del Centro de Excelencia CENIVAM (*Contrato RC-432-2004*), a FUNDACOFAN por suministrar el material vegetal necesario para el desarrollo de esta investigación, al Herbario Nacional Colombiano y al Laboratorio de Cromatografía de la Universidad de Santander.

5. BIBLIOGRAFIA

[1] SURVESWARAN, S.; CAI, Y.; CORKE, H.; SUN, M.; Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants; *Food Chem*; 2006; 45; pp.1-16.

[2] HERRERO, M.; IBAÑEZ, E.; CIFUENTES, A.; Análisis of natural antioxidants by capillary electromigration methods; Institute of industrial fermentations; *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 883 – 897.

[3] MINUSSI, R.C.; ROSSI, M.; BOLOGNA, L.; CORDI, L.V.; ROTILIO, D.; PASTORE, G.M.; DURÁN, N.; Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines; *Food Chem.*; 2003; 82; pp. 409–416.

[4] BRAND-WILLIAMS, W. CUVELIER, M. BERSSET, C. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 28 (1995) 25.

[5] DASTMALCHI, K. DORMAN, D. KOSARB, M. HILTUNEN, R. Chemical composition and *in vitro* antioxidant evaluation of a watersoluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract, *LWT* 40, 240 (2007), 239–248.