

Desarrollo y Validación de Técnicas Espectrofotométricas para la Determinación de Flavonoides Totales, Basada en Quercetina, en las Hojas de *Psidium guajava* L.

William Ortíz Fernández¹, Yoel Aguilera¹, María Elisa Jorge Rodríguez², Dorys Magaly Guzmán Mayancha³, Hugarita Maribel Cobo Salinas³, Luis Ramón Bravo Sánchez³.

¹Instituto Tecnológico de Tijuana. México

²Universidad Central de Las Villas. Cuba

³Universidad Estatal Amazónica. Ecuador

lbravo@uea.edu.ec

Resumen

Se analizaron los sólidos pulverulentos obtenidos de las hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba), para lo cual se realizó una extracción por decocción a reflujo con acetona, una posterior hidrólisis ácida y finalmente la extracción líquido – líquido con acetato de etilo. Los flavonoides se identificaron mediante reacciones colorimétricas en los extractos totales y previa separación por cromatografía en capa fina. Para la cuantificación se empleó la espectrofotometría ultravioleta - visible como método analítico para la determinación de flavonoides totales respecto al metabolito quercetina; se desarrolló un método directo y otro indirecto y ambos fueron validados sobre la base del cumplimiento de los parámetros de desempeño analítico: Linealidad, Precisión, Exactitud y Sensibilidad. El contenido de flavonoides totales en la muestra de los sólidos pulverulentos de las hojas de *Psidium guajava* L. fue de $1,018 \pm 0,080 \%$ para el método directo y un $0,936 \pm 0,090 \%$ para el método indirecto. Ambos valores fueron relativamente cercanos; para el método indirecto la concentración fue ligeramente menor porque, bajo las condiciones de este análisis, la absorbancia está menos influida por sustancias interferentes. Los dos métodos espectrofotométricos pueden ser adecuados para llevar a cabo la cuantificación de flavonoides en

hojas de guayaba.

Palabras Claves: polifenoles, *Psidium guajava* L., flavonoides, quercetina, espectrofotometría, validación.

Abstract

Pulverulent solids obtained from *Psidium guajava* L. (guava) leaves were analyzed. This was performed through a decoction extraction with acetone refluxing and an acid hydrolysis. Finally, a liquid – liquid extraction was performed using ethyl acetate. After being separated by a thin layer chromatography, flavonoids were identified by colorimetric reactions in total extracts. Ultraviolet-visible spectrophotometry was used for the quantification process as an analytical method for the determination of total flavonoids. It was developed as both a direct and an indirect method, in respect to the quercetin metabolite and both were validated on the basis of completion with the analytical performance parameters: linearity, precision, accuracy and sensitivity. The total flavonoid content in the sample of pulverulent solids from *Psidium guajava* L. leaves was $0.080 \pm 1.01\%$ through the direct method and $0.936 \pm 0.090\%$ for the indirect method. Both values were relatively close. The fact that the concentration obtained by the indirect method was slightly smaller was because, under the conditions of this analysis, the absorbance is less influenced of any interfering substances. The two spectrophotometric methods can be suitable to perform the quantification of flavonoids in *Psidium guajava* L. leaves.

Key Words: polyphenols, *Psidium guajava* L., flavonoids, spectrophotometry, validation.

Introducción

Desde tiempos remotos de la humanidad, la medicina siempre ha sido considerada la ciencia principal. Muchos estudiosos indican que los inicios de la medicina tradicional herbolaria se remontan al propio surgimiento de la Humanidad (Euskalategi, 2001). Las plantas medicinales han sido utilizadas ancestralmente como medios curativos o para aliviar padecimientos y son un conjunto de especies vegetales que poseen metabolitos biológicamente activos (Wu P, 2000).

La guayaba es conocida como la manzana del hombre pobre de los trópicos y tiene una historia larga de uso tradicional que ha sido validada por la investigación científica. Debido a su extenso uso tradicional y a un conjunto de propiedades que son las que le confieren importancia, esta planta ha sido empleada para tratar una gran diversidad de enfermedades. Algunas de las principales acciones descritas son: antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante, antiespasmódica, antiulcerosa, hipoglucemiante y antidiarreaica, para lo cual se ha empleado casi siempre la infusión o decocción de sus hojas. Además de su uso tradicional, se han desarrollado un conjunto de preparados como son: extractos fluidos, elixires, jarabes y tinturas para potenciar su uso en las distintas

enfermedades que puedan curar o aliviar (Qian, 2004; Wang, 2005; Prabu, 2006).

Las propiedades curativas de las hojas de guayaba se deben a los metabolitos que se encuentran en ellas, tales como: taninos, fenoles, triterpenos, aceites esenciales, saponinas, vitaminas, ácidos grasos y flavonoides, dentro de los cuales se encuentra la quercetina que es a la que se le atribuyen varias de sus propiedades (Kuklinski, 2000).

Los flavonoides son metabolitos ampliamente distribuidos en el reino vegetal; pueden mejorar los estados de diarrea aguda y crónica a través de la inhibición de la secreción y motilidad intestinal y también ser muy útiles en la reducción del daño inflamatorio crónico en el intestino, protegiéndolo del estrés oxidativo y preservando la función de la mucosa (Lozoya, 2002). Para el desarrollo industrial de preparados medicinales a partir de las hojas de guayaba es imprescindible identificar y cuantificar sus metabolitos principales con vistas a establecer criterios de dosificación y poder llevar a cabo el control químico de su calidad. Con este propósito se pueden emplear diferentes técnicas de análisis como: cromatografía en capa fina (CCF), de gases (CG) y de

líquidos de alta eficacia (HPLC), así como la espectrofotometría ultravioleta visible (UV-Vis), la cual ha sido una de las que más ampliamente se ha utilizado por su sencillez y su bajo costo (Kostennikova, 1997; Gutiérrez, 2003).

Finalmente es importante recalcar que todas las técnicas analíticas que se desarrollen para ser aplicadas en el control de productos farmacéuticos deben ser adecuadamente validadas con este propósito (European Pharmacopeia, 2016).

Materiales y Métodos.

Material vegetal

Se emplearon hojas consideradas adultas (≥ 11 cm de longitud y ≥ 4 cm de ancho) de *Psidium guajava* L. Se pesó alrededor de 1 kg del material vegetal recolectado, el cual fue desecado a una temperatura de 105 °C hasta peso constante. Las hojas secas fueron molinadas y pasadas a través de un tamiz de 0,5 mm, con el objetivo de buscar un tamaño de partícula uniforme (European Pharmacopeia, 2016).

A partir de la droga cruda

obtenida se prepararon las muestras para el desarrollar y validar las dos técnicas espectrofotométricas (directa e indirecta) para la cuantificación de flavonoides totales expresados como quercetina.

Reactivos

Los reactivos y disolventes empleados en este estudio fueron: Metanol (puro para HPLC) UNI-CHEM, Acetona, p.a. UNI-CHEM, Ácido acético glacial, p.a. UNI-CHEM, Acetato de etilo, p.a. UNI-CHEM, Ácido fórmico, p.a. Reachim, Ácido Clorhídrico, Panreac, Etanol comercial, Hexamina (Hexametiltetramina), p.s. Reachim, Ácido fórmico, p.s. Reachim, Sulfato de sodio anhidro, UNI-CHEM, Tricloruro de aluminio, p.s. Reachim, Tolueno, p.a. UNI-CHEM, Diclorometano, p.a. UNI-CHEM.

Método de análisis cualitativo

La identificación de flavonoides se realizó mediante una reacción colorimétrica con tricloruro de aluminio, o sea, se tomaron 2 mL de la muestra problema disuelta en acetato de etilo y se le adicionó 1 mL de tricloruro de aluminio (AlCl_3): (disolución preparada con 500 mg de AlCl_3 en 25 mL de una disolución de ácido acético al 5% en metanol). Si se

obtiene una coloración amarilla, en este caso, la prueba es positiva a la presencia de flavonoides.

Otro método de identificación empleado fue la cromatografía en capa fina (CCF), bajo las siguientes condiciones:

Como fase móvil se empleó una mezcla diclorometano-metanol (80:20) y como fase estacionaria gel de sílice (F 254) de dimensiones: 20x20 cm y 0,2 mm de espesor. Como revelador se usó la disolución de tricloruro de aluminio antes mencionada; con este fin se utilizó también la lámpara ultravioleta.

Método de análisis cuantitativo directo

Preparación del patrón

Se pesó 1,5 mg de quercetina y se disolvió en acetato de etilo, con ayuda de un baño ultrasónico, se enrasó en un matraz aforado de 10 mL con el mismo disolvente.

A partir de este patrón (150 mg/L) se prepararon las disoluciones de la curva de calibración en el intervalo de 3 a 9 mg/L.

Preparación de la muestra

La extracción del concentrado de flavonoides se realizó utilizando la metodología descrita en la literatura oficial (European Pharmacopeia, 2016), o sea, pesar 200 mg del sólido pulverulento de *Psidium guajava* L., colocar en un balón de 250 mL, conjuntamente con 20 mL de acetona, posteriormente adicionar 1 mL de hexamina (5g/L) y 2 mL de ácido clorhídrico concentrado. Extraer a reflujo durante 30 minutos, filtrar con la ayuda de un algodón y extraer nuevamente a reflujo con 20 mL de acetona por 10 minutos. Reunir los filtrados en un matraz aforado de 100 mL y completar el volumen con acetona.

Del extracto obtenido se tomaron 20 mL, se transfirieron a un embudo separador con 20 mL de agua destilada y se realizaron varias extracciones con acetato de etilo (15, 10 y 10 mL). Los extractos orgánicos se colocaron en una vaso de precipitado y se le adicionaron 10 g de sulfato de sodio anhidro con el objetivo de eliminar el agua en el medio; a continuación se filtró, se vertió en un matraz aforado de 50 mL y se enrasó con acetato de etilo. A la muestra obtenida se le midió la absorbancia a 370 nm contra acetato de etilo

Método de análisis cuantitativo directo

Preparación del patrón

Se preparó una disolución madre de 150 mg/L. De dicha disolución se tomó una alícuota de 0,1 mL, se transfirió a un matraz aforado de 5 mL y se le adicionó 0,2 mL de una disolución de tricloruro de aluminio preparada al 2% con una disolución de ácido acético en metanol al 5%. A continuación se completó el volumen con la disolución de ácido acético en metanol al 5%.

Preparación de la muestra:

La preparación de la muestra coincide con lo descrito anteriormente. La absorbancia se lee inmediatamente a 425 nm contra blanco.

Cálculos

Se realizó por el método de la curva de calibración en el intervalo de 1,5 a 7,5 mg/L.

Validación de los métodos desarrollados.

Se evaluaron algunos parámetros de desempeño (European Pharmacopeia, 2016). El

procesamiento de los resultados se realizó utilizando las posibilidades de cálculo estadístico del Microsoft Office Excel, 2003.

Linealidad

Se prepararon cinco disoluciones del patrón de quercetina, por triplicado, de concentraciones: 3.0, 4.5, 6.0, 7.5 y 9.0 mg/L, para la técnica directa y para la indirecta las concentraciones: 1.5, 3.0, 4.5, 6.0 y 7.5 mg/L. Se midieron las absorbancias y se construyeron las curvas de calibración. Se efectuó un análisis de regresión lineal y se calcularon los coeficientes de correlación (r) y de determinación (r^2), el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CVf), las pendientes, interceptos y su significación.

Precisión

Repetibilidad:

Se realizaron cinco réplicas, por el mismo analista, el mismo día, con el mismo instrumento y se calculó la desviación estándar relativa.

Precisión intermedia:

Se analizaron cinco muestras por triplicado y por dos analistas, dos días diferentes y en dos instrumentos

diferentes. Se calculó la desviación estándar relativa y se tuvieron en cuenta, además, los resultados del cálculo de la C de Cochran y H de Horwitz.

Exactitud

Se utilizó el método de adición de estándar. Se partió de una muestra, preparada según lo descrito con anterioridad, de la que se tomaron tres alícuotas iguales de 2,5 mL. Se les añadieron cantidades crecientes de patrón correspondiente a 3.0, 4.5 y 6.0 mg/L de quercetina, para el método directo.

Para el método indirecto se tomaron tres alícuotas de 2 mL de la muestra, se le adicionaron concentraciones crecientes de patrón, correspondientes a 1.5, 3.0 y 4.5 mg/L de patrón de quercetina. Estas adiciones sucesivas se realizaron para la cuantificación de flavonoides sobre la base del estándar añadido. Los resultados de la exactitud se expresaron como porcentaje de recobro (R).

Sensibilidad

Como criterio de la sensibilidad se tomó el valor de la pendiente de la curva, así como los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) (Eurachem, 1998). Los cálculos se realizaron por

el criterio de 3S y 10S, respectivamente, es decir el límite de detección como la concentración de analito que produce una señal igual a tres veces la desviación estándar del blanco (criterio 3σ de la IUPAC) bajo las condiciones experimentales óptimas. El límite de cuantificación se calculó como la concentración de analito que produce una señal igual a diez veces la desviación estándar del blanco (Thompson M., col., 1999) bajo las condiciones experimentales óptimas.

Especificidad

Los métodos desarrollados y validados se caracterizan por ser inespecíficos, al tratarse de **d e t e r m i n a c i o n e s e s p e c t r o f o t o m é t r i c a s**, independientemente de que se puede lograr una mayor especificidad en la determinación a través del método indirecto.

Resultados y Discusión

Análisis cualitativo de flavonoides en hojas de *Psidium guajava* L.

La identificación colorimétrica resultó positiva a la presencia de flavonoides, ya que la reacción con el tricloruro de aluminio evidenció una coloración amarilla (European Pharmacopeia, 2016).

Además de las reacciones que producen compuestos coloreados, la cromatografía en capa delgada es otro de los ensayos comúnmente utilizados para el control cualitativo de los metabolitos activos de origen vegetal pues son métodos de separación que permiten lograr una mayor especificidad en los análisis.

Para la identificación se tomó como referencia un patrón de quercetina, teniendo en cuenta su color al revelado específico con el tricloruro de aluminio y el cálculo y análisis comparativo de los valores de R_f (tabla 1).

Además de las reacciones que producen compuestos coloreados, la cromatografía en capa delgada es otro de los ensayos comúnmente utilizados para el control cualitativo de los metabolitos activos de origen vegetal pues son métodos de separación que permiten lograr una mayor especificidad en los análisis.

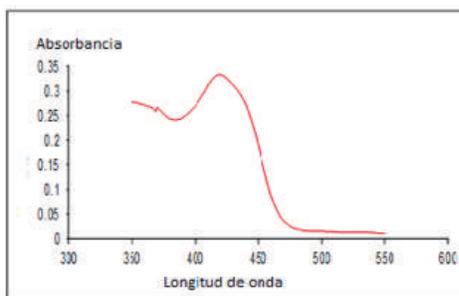
Para la identificación se tomó como referencia un patrón de quercetina, teniendo en cuenta su color al revelado específico con el tricloruro de aluminio y el cálculo y análisis comparativo de los valores de R_f (tabla 1).

Tabla 1. Valores de R_f obtenidos para el patrón de quercetina y la muestra.

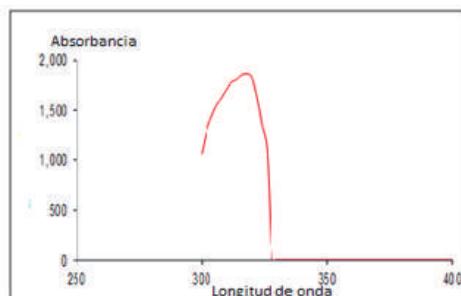
Patrón	Muestra
0,66±0,03	0,64±0,03

Teniendo en cuenta lo anterior puede inferirse que la mancha observada en la muestra se debe a la presencia de quercetina en la misma, la cual es el único metabolito, tal vez por su abundancia relativa, detectada bajo las condiciones experimentales seleccionadas.

Se observó el comportamiento espectral (Figura 1) una vez desarrollado el color con tricloruro de aluminio (a) y sin desarrollar (b).



a



b

Figura 1. Espectros de la muestra por el método indirecto (a) y directo (b).

Los espectros para la muestra concuerdan con los obtenidos para los patrones (Figura 2, a y b).

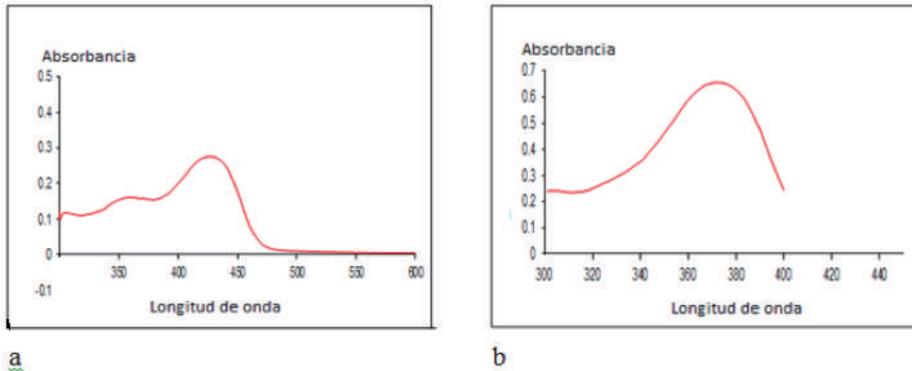


Figura 2. Espectro correspondiente al patrón de quercetina por el método indirecto (a) y por el método directo (b).

Los espectros obtenidos muestran una semejanza entre las longitudes de onda de máxima absorción respecto a los patrones y muestras evaluados por ambos métodos, lo que posibilita que las condiciones espectrofotométricas evaluadas puedan ser utilizadas para desarrollar técnicas cuantitativas.

Análisis cuantitativo de flavonoides en hojas de *Psidium guajava* L. La técnica consistió en cuantificar espectrofotométricamente los flavonoides presentes en el extracto de las hojas de *Psidium guajava* L., sobre la base del patrón de quercetina.

Independientemente de que se conoce que las longitudes de onda de máxima absorción de los compuestos orgánicos en diferentes disolventes

puede sufrir variaciones, la falta de concordancia de este parámetro en los extractos obtenidos con los diferentes disolventes empleados, por uno u otro método de extracción, en comparación con el patrón de quercetina en los mismos disolventes, llevó a pensar que la forma en la que se encontraba el metabolito en los extractos podía ser diferente, unas veces se podía estar en presencia de la aglicona y otras del glucósido. Es por eso que fue necesario someter la muestra a un proceso extractivo que incluyera una hidrólisis ácida. De esta manera se logró la necesaria concordancia entre las longitudes de onda de máxima absorción de muestras y patrones al romperse los enlaces glicosídicos.

Según el espectro registrado (Figura 2), la longitud de onda de

máxima absorción de quercetina en acetato de etilo fue 370 nm, por lo que dicha longitud de onda deberá utilizarse para la determinación cuantitativa por el método ultravioleta directo. Por otra parte, la longitud de onda de máxima absorción del compuesto coloreado formado a partir de quercetina y triocloruro de aluminio en acetato de etilo es de 425 nm (Figuras 1 y 2).

Finalmente se las muestras se analizaron por los dos métodos (directo e indirecto) y la concentración promedio de flavonoides totales (respecto a quercetina) por el método directo fue de $1,018 \pm 0,008 \%$, mientras que por el método indirecto el resultado fue $0,936 \pm 0,008 \%$. La diferencia significativa puede deberse a la falta de especificidad más marcada en el intervalo ultravioleta.

Validación de los métodos

Linealidad

Método indirecto:

Al comparar los valores obtenidos para cada parámetro calculado a partir de la curva de calibración (Figura 3), con los criterios establecidos (Eurachem, 1998; European Pharmacopeia, 2016), se puede afirmar que todos se encuentran dentro de los intervalos especificados.

La ecuación de la recta obtenida para la quercetina patrón fue $Y = 0,1195x - 0,0192$ con un coeficiente de correlación de 0,9966, un coeficiente de variación de los factores respuesta 3,73 % (inferior a 5,00 %) y una desviación estándar relativa de la pendiente de 0,001% (inferior a 2%). Con el propósito de corroborar los resultados anteriores se realizó un análisis de varianza en el cual se obtuvo un valor de $F = 3853,04$ (mucho mayor que el F crítico: $1,82 \times 10^{-17}$), estadísticamente significativo. Se pudo afirmar que el método desarrollado fue lineal en el intervalo de concentración evaluado.

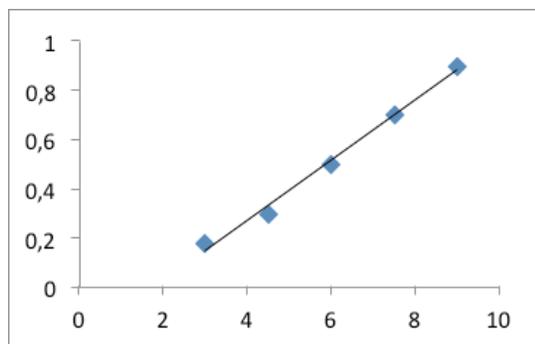


Figura 3. Curva de calibración para quercetina patrón (compuesto coloreado).

Método directo:

La Figura 4 muestra la curva de calibración. Todos los parámetros se encuentran dentro del intervalo especificado.

La ecuación de la recta obtenida a partir del patrón de quercetina fue $Y = 0,0796x + 0,0003$ con un coeficiente de correlación de

0,9900, un coeficiente de variación de los factores respuesta 4,3 % (inferior a 5%) y una desviación estándar relativa de la pendiente de 0,002 % (menor que 2%).

El valor de F de Fischer: 1425,29 obtenido (mucho mayor que F crítico: $1,13 \times 10^{-14}$) fue estadísticamente significativo.

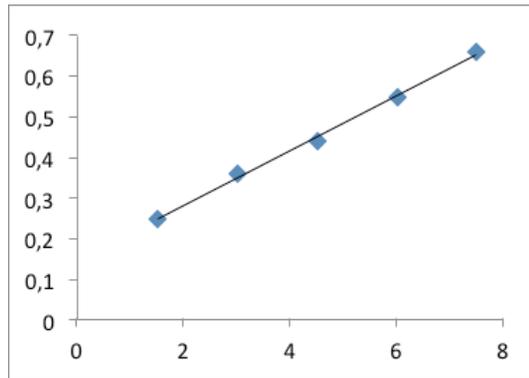


Figura 4. Curva de calibración para el método directo.

Precisión

Este parámetro incluye los términos repetibilidad y precisión intermedia. Para el primer caso la técnica se repitió sin alterar las condiciones, mientras que en el segundo la técnica se desarrolló en diferentes días. Este parámetro también fue evaluado en ambos

métodos tanto el directo como el indirecto.

El coeficiente de variación para una serie repetida de datos en condiciones homogéneas no fue nunca superior a 0,84% ($\leq 1,5\%$), lo cual indica una adecuada precisión en términos de repetibilidad. Para la precisión intermedia se obtuvo un

coeficiente de variación adecuado nunca superior a 1,8% ($\leq 3\%$).

Exactitud

La recuperación promedio fue de 99,81 %. Se realizó una prueba t-Student que permitió corroborar que el recobrado obtenido no era significativamente diferente de 100 %.

Los resultados anteriores se corroboraron con las curvas de recuperación (Figuras 5 y 6); el valor de la pendiente corresponde con la recuperación y es consistente con el valor del recobrado promedio anteriormente calculado. Esto demuestra una elevada exactitud en las determinaciones.

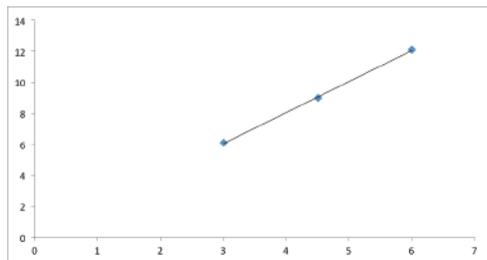


Figura 5. Curva de recuperación en la técnica de espectrofotometría indirecta.

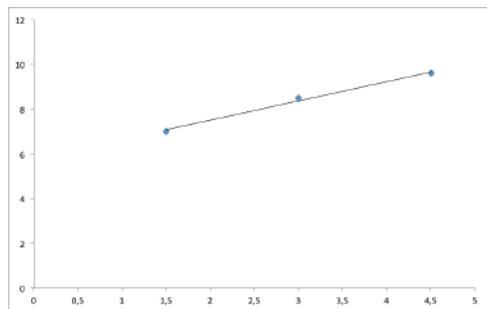


Figura 6. Curva de recuperación en la técnica de espectrofotometría UV directa.

Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC).

Los valores más bajos se lograron para el método directo. Como LD se obtuvo un valor de 0,086 $\mu\text{g/mL}$ y como LC 0,261 $\mu\text{g/mL}$; estos valores se encuentran por debajo del valor más bajo de concentración evaluado en la técnica.

Especificidad

Los métodos aplicados fueron inespecíficos, pues son determinaciones espectrofotométricas, independientemente de que se puede lograr una mayor especificidad en la determinación a través del método indirecto.

Con los resultados obtenidos para los parámetros de desempeño se puede afirmar que los métodos desarrollados son fiables.

Conclusiones

Tanto el método espectrofotométrico directo como el indirecto permiten la cuantificación de flavonoides en hojas de *Psidium guajava* L.

Ambos métodos desarrollados con confiables para la cuantificación de flavonoides en hojas de *Psidium guajava* L.

Literatura citada:

Eurachem G. "The Fitness for Purpose of Analytical Methods". A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics". 1998. ISBN: 0-948926-12-0. Reino Unido.

European Pharmacopeia. 8th ed. Strasbourg, France. Council of Europe, 2016.

Euskaltegi G, Millet Y, Morales T. Historia de las plantas medicinales. REV CUBANA PLANT MED 2001; (2): 56-6.

Gutiérrez Y, Miranda M, y col. Validación de dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajava*, L. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana 2003. 38 (1): 20-35.

Kostennikova Z. UV spectrophotometric quantitative determination of flavonoid in calendula tincture. Farmatsiya 1997; 33(6):83-6.

Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural. Omega S.A.,

Barcelona. 2000. P.12 – 16.

Lozoya X, Reyes H, Chavez M, Martinez C, Soto Y, Doubova V. Intestinal anti-spasmodic effect of a phyto-drug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. J Ethnopharmacol. 2002 Nov; 83 (1-2):19-24.

Prabu G, Gnanamani A, Sadula S. Guaijaverin - a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. J Appl Microbiol. 2006 Aug; 101(2): 487-95.

Qian H, Nihorimbere V. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. J Zhejiang Univ Sci. 2004 Jun; 5(6):676-83.

Thompson M, Ellison SL, Fajgelj A, Willetts P, Wood R. Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement (Technical Report). Pure Appl. Chem. 1999; 71(2): 337-348.

Wang B, Liu H, Ju C. Study on the hypoglycemic activity of different extracts of wild *Psidium guajava* leaves in Panzhihua Area. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2005 Nov; 36(6):858-61.

Wu P. y Pérez Y. Etonobotánica. 15 de noviembre 2000. 11(1-2):12-22.