

Determinación de polifenoles en cinco especies amazónicas con potencial antioxidante.

Radice Matteo, Bravo Luis, Pérez Manuel, Joffre Cerda, Tapuy Andrea, Riofrío Andrea, Neill David, Chiurato Matteo.

Resumen

La Región Amazónica Ecuatoriana (RAE) representa una de las áreas del planeta más ricas en biodiversidad y una fuente de metabolitos secundarios para el sector farmacéutico, cosmético y de los alimentos funcionales. El presente estudio se enfoca, por primera vez, a la determinación de compuestos polifenólicos en extractos de cinco especies amazónicas: *Caryodaphnopsis tomentosa*, *Palicourea stenostachya*, *Palicourea schunkei*, *Schizocalyx bracteosus* y *Warszewiczia coccinea*. La actividad biológica de los polifenoles está relacionada con su carácter antioxidante y es relevante para la identificación de nuevos compuestos bioactivos. Los extractos hidroalcohólicos, considerando una variedad de vino tinto como referencia, han presentado, en cantidades diferentes, una notable presencia de polifenoles, aplicando la técnica de Folin-Ciocalteu. Los extractos de las especies *C. tomentosa*, *S. bracteosus*, *W. coccinea* y las hojas de *P. stenostachya*, han dado resultados superiores al doble del valor del patrón empleado. En los extractos de las raíces de *P. stenostachya* y de *P. schunkei* se han evidenciado valores de polifenoles totales ligeramente inferiores al patrón, sin embargo, se manifiesta una presencia importante de polifenoles que puede contribuir a su actividad antioxidante. Este resultado, aunque representa un ensayo preliminar, asienta un importante precedente para el estudio fitoquímico de las especies amazónicas mencionadas.

Palabras clave: biodiversidad amazónica, *Caryodaphnopsis tomentosa*, *Palicourea stenostachya*, *Palicourea schunkei*, *Schizocalyx bracteosus*, *Warszewiczia coccinea*, Folin-Ciocalteu, polifenoles

Abstract

The Ecuadorian Amazon Region (RAE) represents one of the most biodiverse areas of the planet and it is a source of secondary metabolites for the pharmaceutical, cosmetic and functional foods sector. The present study, for the first time, focuses on the determination of polyphenolic compounds in extracts of five Amazonian species: *Caryodaphnopsis tomentosa*, *Palicourea stenostachya*, *Palicourea schunkei*, *Schizocalyx bracteosus* and *Warszewiczia coccinea*. The biological activity of polyphenols is related to their antioxidant character and it is relevant in the identification of new bioactive compounds. The hydroalcoholic

extracts, considering a variety of red wine as reference, have presented in different quantities, a relevant presence of polyphenols, applying the Folin-Ciocalteu technique. Extracts of species *C. tomentosa*, *S. bracteosus*, *W. coccinea* and leaves of *P. stenostachya*, have yielded results superior to twice the value of the pattern used. *P. stenostachya* and *P. schunkei* root extracts showed slightly lower amounts of total polyphenols if compared with the standard, however, has been found an important presence of polyphenols that may contribute to their antioxidant activity. This result, although representing a preliminary test, establishes important preliminary findings for the phytochemical study of the above mentioned Amazonian species.

Key words: amazonian biodiversity, *Caryodaphnopsis tomentosa*, *Palicourea stenostachya*, *Palicourea schunkei*, *Schizocalyx bracteosus*, *Warszewiczia coccinea*, Folin-Ciocalteu, polyphenols

Introducción

Ecuador se encuentra entre los países definidos como megadiversos (Mittermeier et al. 1997), lo cual resulta asombroso considerando que su territorio abarca solamente el 0,2% de la superficie terrestre. Como ha sido informado por Sierra *et al.* (2002) y Lessmann et al., (2014). Si se considera la relación entre superficie del territorio y cantidad de especies, se puede asumir que el Ecuador es el país más biodiverso en el planeta. Esta enorme diversidad biológica representa un inmenso potencial en términos de compuestos activos de origen natural.

La bioprospección aborda un amplio abanico de aplicaciones y, posiblemente, los tres ámbitos más relevantes son el sector farmacéutico, el sector cosmético y el sector alimentario. Osorio (2009) menciona que las áreas de investigación relacionadas con la farmacognosia pueden incluir

tanto la química analítica como la química orgánica, pasando prevalentemente por el descubrimiento y la caracterización de compuestos, el estudio de sus propiedades terapéuticas y sus aplicaciones tecnológicas. Los productos naturales aportan directamente un gran número de metabolitos activos y varias moléculas de interés tecnológico. Una revisión bibliográfica relacionada con las moléculas con actividad anticancerígena (Newman y Cragg ; 2007), evidencia que en el periodo comprendido entre los años '40 del siglo XX y la actualidad, el 48,6% de las mismas han sido de origen natural o directamente derivadas de metabolitos secundarios de plantas.

En el ámbito de los compuestos bioactivos, los polifenoles representan un conjunto importante y cada año se presentan más estudios que relacionan esta clase de moléculas con funciones benéficas para la salud humana. La metodología más reconocida y aplica-

da para la determinación del contenido total de polifenoles es el ensayo de Folin-Ciocalteu (Proestos and Varzakas, 2017; Yoshioka *et al.*, 2017; Mansour *et al.*, 2017; Apostolou *et al.*, 2013).

El ensayo se basa en la determinación espectrofotométrica, a 765 nm de longitud de onda, de la absorbancia de la forma reducida del mencionado reactivo: una mezcla de volframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico. Producto de la reacción con los compuestos fenólicos presentes en las muestras a analizar, se desarrolla una coloración azul intensa cuya absorbancia está relacionada con la concentración de antioxidantes fenólicos y polifenólicos. Teniendo en cuenta el mecanismo de la reacción, esta puede considerarse también, como un método para evaluar la actividad antioxidante total. El método de Folin–Ciocalteu es sencillo, rápido y económico, y además permite la elaboración de varias muestras en poco tiempo; por su eficacia y facilidad de aplicación se continúa utilizando en la práctica científica actual. Recientemente, una investigación realizada por Musci and Yao (2017) ha aportado una optimización del método, enfocándose en la evaluación de parámetros de desempeño analítico como: linealidad, precisión y estabilidad y reduciendo aún más los tiempos de análisis.

La presencia del “OH fenólico” imparte a los polifenoles una marcada actividad antioxidante que se traduce

en efectos sinérgicos positivos con vistas a contrarrestar procesos inflamatorios, estrés oxidativo y daños del ADN. La actividad antioxidante y anti-radicalica parece estar estrictamente vinculada a un menor riesgo de incidencia de enfermedades cardiovasculares y patologías crónicas como la diabetes y el Alzheimer (Burton-Freeman *et al.*, 2016). Entre los polifenoles más investigados se menciona el resveratrol, un compuesto bioactivo que desde varias décadas atrás ha develado importantes propiedades terapéuticas; entre los estudios más recientes se destaca la protección de las células epiteliales de los bronquios en contra de los daños provocados por el humo de cigarrillo (Song *et al.*, 2017) y la obtención de derivados de semisíntesis que parecen poder prevenir la agregación plaquetaria y los eventos tromboembólicos (Dutra *et al.*, 2017).

En relación a la obtención de los extractos, ha sido elegido el método de extracción con ultrasonido (Ultrasonid Assisted Extraction – UAE), en cuanto representa una optimización del proceso de maceración. La extracción de metabolitos se facilita mediante el uso de ultrasonidos que inducen una tensión mecánica sobre las células por medio de la producción de cavitaciones en la muestra. La descomposición de la pared celular aumenta y acelera la solubilización de los metabolitos en el disolvente, mejorando los rendimientos de la extracción (Vilkhu *et al.*, 2007).

El contexto amazónico es obviamente una fuente importante de moléculas bioactivas y ya existen evidencias de especies locales que contienen polifenoles, entre ellas se menciona un estudio realizado por García-Ruiz et al. (2017) sobre extractos de la especie *Ilex guayusa* en los cuales se identificaron 14 compuestos fenólicos y se evidenció una considerable actividad antioxidante.

Con estos antecedentes el presente estudio pretende, por primera vez, determinar el contenido de antioxidantes fenólicos y polifenólicos de algunas especies de plantas amazónicas como ensayo preliminar indispensable para poder llevar a cabo una más profunda investigación fitoquímica.

Materiales y Métodos

Previamente a las operaciones de campo ha sido realizada una investi-

gación bibliográfica enfocada a los artículos científicos relacionados con las especies vegetales sujetas a investigación. Se ha encaminado la búsqueda a las siguientes bases de datos: Scopus, Scielo, PubMed y Scifinder. Los nombres científicos de las especies investigadas han sido adoptados como palabras clave para la búsqueda. Los artículos encontrados han sido separados en dos grupos: las investigaciones pertinentes (P) y las no pertinentes (NP), respectivamente, y se han identificado en el primer grupo los estudios enfocados a la fitoquímica, a la caracterización y a la bioactividad de los metabolitos secundarios de las especies objeto de estudio (Tabla 1). Los artículos considerados no pertinentes, aunque conservan su valor científico, han sido catalogados de esta forma porque abordan temas no relacionados con la fitoquímica.

Especie	Scopus		Scielo		PubMed		Scifinder	
	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P
<i>C. tomentosa</i>	1	0	0	0	8	0	0	0
<i>P. stenostachya</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. schunkei</i>	1	0	0	0	8	0	0	0
<i>S. bracteosus</i>	0	0	0	0	3	0	0	0
<i>W. coccinea</i>	5	0	0	0	2	0	1	1

Las especies fueron colectadas en la Región Amazónica del Ecuador (RAE) y especialmente, pero no exclusivamente, en el CIPCA (Centro de Investigación, Posgrado y Conservación Amazónica, km 44 vía

Puyo-Tena). Las mismas fueron identificadas por el botánico especialista Dr. David Neill, Herbario Amazónico del Ecuador (ECUAMZ) y reposan bajo los siguientes números de herbario:

<i>Caryodaphnopsis tomentosa van der Werff</i> (Lauraceae):	Neill 18032
<i>Palicourea stenostachya</i> (Standl.) C.M. Taylor (Rubiaceae):	Neill 18030
<i>Palicourea schunkei</i> (C.M. Taylor) C.M. Taylor (Rubiaceae):	Neill 18031
<i>Schizzocalyx bracteosus</i> Wedd. (Rubiaceae):	Neill 17770
<i>Warszewiczia coccinea</i> (Vahl) Klotszch (Rubiaceae):	Neill 17771

El material vegetal fue lavado con agua potable, secado en estufa (Barnstead International, E.E.U.U.) con recirculación de aire a una temperatura de 45 °C, pulverizado en molino de cuchillas (Thomas Scientific, E.E.U.U.) y luego tamizado, con el objetivo de garantizar un tamaño de partícula inferior a 0,5 mm, considerado adecuado para la posterior obtención de los extractos (Azwanida, 2015; Ph. Eur., 2017). Los extractos de las cinco plantas seleccionadas se realizaron con el método de Extracción Asistida por Ultrasonido (Ultrasound Assisted Extraction – UAE) (Branson Ultrasonics, E.E.U.U.). Para la extracción se utilizó una mezcla etanol: agua en proporción 9:1, con una relación de 400 mL de disolvente por cada 50 g de muestra pulverizada. Las extracciones fueron realizadas por triplica-

do. Se trabajó a 35 °C durante 1 hora y posteriormente la mezcla fue filtrada a través de un filtro de Gooch y el extracto crudo obtenido fue concentrado con evaporador rotatorio (Büchi, Alemania) a temperatura de 45°C y presión reducida de 600 mmHg hasta un volumen final de 50 mL.

Para la implementación del ensayo de Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965), se necesitó la construcción previa de una curva de calibración mediante diluciones sucesivas a partir de una disolución concentrada (disolución madre) de 1000 mg.L⁻¹ de ácido gálico (estándar de referencia). A partir de esta disolución se prepararon 10 ml de cada una de las disoluciones diluidas de concentraciones crecientes de ácido gálico entre 5 y 25 mg.L⁻¹ (Tabla 2).

Tabla 2. Preparación de la curva patrón de ácido gálico a partir de una disolución concentrada de 1 000 mg.L⁻¹. Volumen final 10 mL (agua destilada)

Componentes añadidos	Concentración de ácido gálico (mg.L ⁻¹)				
	5	10	15	20	25
Ácido gálico patrón (μL)	50	100	150	200	250
Reactivo de Folin-Ciocalteu (μL)	500	500	500	500	500
Disolución de Carbonato de sodio 10% (μL)	500	500	500	500	500

Para la preparación de las muestras, 40 μL de extracto y 500 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu se colocaron en un matraz aforado de 10 ml, se agitó y se dejó reposar protegido de la luz durante 8 minutos. Se añadieron después 500 μL de la disolución de carbonato de sodio al 10% y se llevó a un volumen de 10 ml con agua destilada. Se homogenizó la disolución agitando manualmente el matraz aforado y se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas. Se midieron las absorbancias de las muestras de extractos y de patrones 765 nm contra el blanco de reactivos. Como

referencia se analizó una muestra de vino tinto chileno cabernet sauvignon.

Resultados

Los valores de absorbancia registrados para la curva de calibración se recogen en la tabla 3, y en la figura 1 se puede apreciar el gráfico correspondiente.

El modelo matemático obtenido, luego del análisis de regresión lineal, y que permitió la realización de los cálculos es el siguiente: $C = (A + 0,0028) / 0,0734$

Tabla 3. Valores de concentración (mg.L⁻¹) y absorbancia correspondientes a la recta de calibrado

Concentración mg.L ⁻¹	5	10	15	20	25
Absorbancias	0,297	0,747	1,193	1,497	1,657

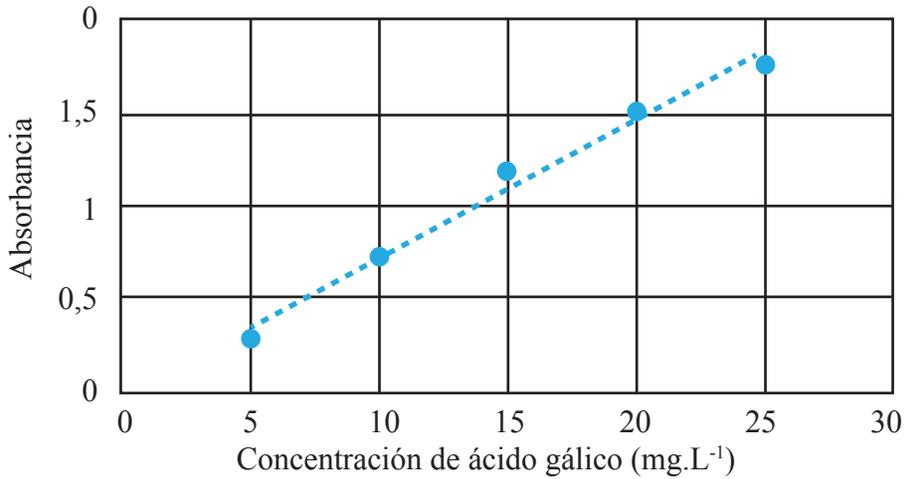


Figura 1. Gráfico de la curva patrón de ácido gálico.

En la tabla 4 se presentan los valores de absorbancia correspondientes a cada una de las muestras en estudio, así como las concentraciones calculadas

teniendo en cuenta el modelo matemático encontrado y la dilución practicada a los extractos. El factor de dilución fue 250.

Tabla 4. Resultados de concentración de antioxidantes fenólicos y polifenólicos totales sobre la base del ácido gálico en los extractos analizados

Muestra analizada	Valores de absorbancia				Concentración (mg.mL ⁻¹)	CV (%)
	A1	A2	A3	\bar{A}		
<i>C. tomentosa</i>	1,708	1,729	1,750	1,729	5,90	1,21
<i>P. stenostachya</i> (hojas)	2,035	1,988	1,893	1,972	6,73	3,67
<i>P. stenostachya</i> (raíces)	0,594	0,543	0,584	0,574	1,96	4,71
<i>P. schunkei</i>	0,537	0,564	0,533	0,545	1,87	3,09
<i>S. bracteosus</i>	1,640	1,684	1,653	1,659	5,66	1,36
<i>W. coccinea</i>	1,707	1,708	1,818	1,744	5,95	3,66
Vino Tinto (referencia)	0,655	0,657	0,691	0,668	2,28	3,03

A partir de los resultados de concentración de los extractos fue posible determinar el contenido de antioxidantes fenólicos y polifenó-

licos totales en los sólidos pulverulentos obtenidos a partir de los materiales vegetales en base seca (tabla 5).

Tabla 5. Resultados de concentración de antioxidantes fenólicos y polifenólicos totales en los sólidos pulverulentos de las plantas expresado en mg por cada 100 g de materia seca

Muestra de sólido pulverulento analizada	Concentración (mg/100g)
<i>Caryodaphnopsis tomentosa</i>	590
<i>Palicourea stenostachya</i> (hojas)	673
<i>Palicourea stenostachya</i> (raíces)	196
<i>Palicourea schunkei</i>	187
<i>Schizzocalyx bracteosus</i>	566
<i>Warszewiczia coccinea</i>	595
Vino Tinto (referencia)	228

Discusión

Una vez realizados los análisis de las especies amazónicas investigadas, se puede apreciar que en su mayoría, han dado resultados relevantes en relación a la presencia de compuestos antioxidantes fenólicos y polifenólicos, lo cual permite preliminarmente predecir una promisoriosa actividad antioxidante.

El estudio evidencia un elemento de innovación en cuanto la investigación bibliográfica pues se ha comprobado la escasez de información científica al respecto.

En lo que se refiere a los ámbitos fitoquímicos o de bioactividad, solamente para la especie *W. coccinea* se registra un estudio en el cual, por primera vez, se determina la presencia de dos triperpenos: el ácido 3 β , 6 β , 19 α -trihidroxi-urs-12-en-28-oico y el ácido 3 β ,6 β -dihidroxi-olean-12-en-28-oico, respectivamente. Las dos moléculas han demostrado actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa, como resultado preliminar de una potencial eficacia en el tratamiento del Alzheimer, y una moderada actividad antioxidante (DPPH free radical scavenging assay) en comparación con la querce-

tina (Calderón et al., 2009). Sin embargo, el anterior estudio de Calderón et al., (2009) no se enfoca al estudio de los polifenoles por lo que se hace evidente la necesidad de profundizar la investigación sobre *W. coccinea*. De igual manera, la falta de informaciones fitoquímicas sobre las otras especies objeto de la presente investigación justifica nuevos estudios.

En cuanto a la aplicación del método analítico de Folin–Ciocalteu, se obtuvo una aceptable linealidad para la curva de calibración, con un valor de coeficiente de correlación de 0,9925. A pesar del procedimiento relativamente complejo de obtención de los extractos, la precisión de los resultados de concentración de polifenoles fue adecuada, con coeficientes de variación en todos los casos inferiores al 5 %.

Conclusiones

Las especies amazónicas investigadas, en su mayoría, brindaron resultados relevantes en relación a la presencia de compuestos antioxidantes fenólicos y polifenólicos, lo cual permite preliminarmente predecir una promisoriosa actividad antioxidante. Existe un elemento de innovación en cuanto a la investigación bibliográfica dada la escasez de información científica al respecto. Por otro lado, la falta de informaciones fitoquímicas sobre las otras especies objeto de la presente investigación justifica nuevos estudios. El presente estudio preliminar

permitió identificar, por primera vez, nuevas fuentes de polifenoles en especies vegetales promisorias de la región amazónica ecuatoriana

Agradecimientos

La realización del presente artículo se enmarca en las actividades del Contrato Marco MAE – DNB – CM – 2015 – 0027, acuerdo vigente entre el Ministerio del Ambiente y la Universidad Estatal Amazónica.

Literatura Citada

Apostolou A., Stagos D., Galitsiou E., Spyrou A., Haroutounian S., Portesis N., Trizoglou I., Wallace Hayes A., Tsatsakis A.M., Kouretas D. 2013. *Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of Vitis vinifera stem extracts*. Food Chem Toxicol. Nov;61:60-8. doi: 10.1016/j.fct.2013.01.029.

Azwanida, N. 2015. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. Med Aromat Plants 4(3). doi:10.4172/2167-0412.1000196

European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 2017. 9th Edition. Council of Europe.

Burton-Freeman B.M, Sandhu A.K., Edirisinghe I. 2016. *Red Raspberries and Their Bioactive Polyphenols: Cardiometabolic and Neuronal Health Links*. Adv Nutr 7:44–65; doi:10.3945/an.115.009639

Calderón A.I., Simithy J., Quaggio G., Espinosa A., López-Pérez J.L. and Gupta M.P. 2009. Triterpenes from *Warszewiczia coccinea* (Rubiaceae) as inhibitors of Acetylcholinesterase

- se. Natural Product Communications Vol. 4 (10) Dutra L.A., Guanaes J.F., Johmann N., Lopes Pires M.E., Chin C.M., Marcondes S., Dos Santos J.L.. 2017. *Synthesis, antiplatelet and antithrombotic activities of resveratrol derivatives with NO-donor properties*. *Bioorg. Med Chem Lett.* Apr 4. pii: S0960-894X(17)30371-2. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.04.007.
- Vilkhu K., Mawson R., Simons L., Bates D. 2007. *Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. doi:10.1016/j.ifset.2007.04.014
- García-Ruiz A., Baenas N., Benítez-González A.M., Stinco C.M., Meléndez-Martínez A.J., Moreno D.A., Ruales J. Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *J Sci Food Agric.* 2017 Feb 11. doi: 10.1002/jsfa.8255.
- Lessmann, J., 1,2, Muñoz, J., Bonaccorso, E. 2014. Maximizing species conservation in continental Ecuador: a case of systematic conservation planning for biodiverse regions. *Ecology and Evolution*; 4(12): 2410–2422
- Mansour A., Celano R., Mencherini T., Picerno P., Piccinelli A.L., Foudil-Cherif Y., Csupor D., Rahili G., Yahi N., Nabavi S.M., Aquino R.P., Rastrelli L. A new cineol derivative, polyphenols and norterpenoids from Saharan myrtle tea (*Myrtus nivellei*): Isolation, structure determination, quantitative determination and antioxidant activity. *Fitoterapia.* 2017 Mar 28. pii: S0367-326X(17)30098-9. doi: 10.1016/j.fitote.2017.03.013.
- Mittermeier, R. A., Gil, P. R., Mittermeier, C. G. 1997. *Megadiversity: Earth's Biologically Wealthiest Nations*. Conservation International, Cemex, México, D.F., México.
- Musci and Yao. 2017. Optimization and validation of *Folin-Ciocalteu method for the determination of total polyphenol content of Pu-erh tea*. *Int. J. Food Sci. Nutr.* Apr 12:1-9. doi: 10.1080/09637486.2017.1311844.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. *Natural products as sources of new drugs over the last 25 years*. *J. Nat. Prod.* 2007. 70: 461-477.
- Osorio, D. (2009). Aspectos básicos de farmacognosia. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia.
- Proestos and Varzakas. 2017. *Aromatic Plants: Antioxidant Capacity and Polyphenol Characterisation*. *Foods*, 6, 28; doi:10.3390/foods6040028
- Sierra R., F. Campos, and J. Chamberlin. 2002. *Assessing biodiversity conservation priorities: ecosystem risk and representativeness in continental Ecuador*. *Landscape Urban Plann.* 59:95–110.
- Singleton V.L. and Rossi J. A.Jr. 1965. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16:144-58, Department of Viticulture and Enology. University of California, Davis. CA
- Song C., Luo B., Gong L. 2017. *Resveratrol reduces the apoptosis induced by cigarette smoke extract by upregulating MFN2*. *PLoSOne.* Apr 13;12(4):e0175009. doi: 10.1371/journal.pone.0175009.
- Yoshioka Y., Li X., Zhang T., Mitani T., Yasuda M., Nanba F., Toda T., Yamashita Y., Ashida H. 2017. *Black soybean seed coat polyphenols prevent AAPH-induced oxidative DNA-damage in HepG2 cells*. *J Clin Biochem Nutr.* Mar;60(2):108-114. doi: 10.3164/jcbn.16-48.