

Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad

Ricco, Rafael A.; Ignacio J. Agudelo; Marcelo L. Wagner*

Cátedra de Farmacobotánica. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956, (C1113AAB) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina.

* Autor correspondiente: mlwagner@ffyb.uba.ar

► **Resumen** — Ricco, Rafael A.; Ignacio J. Agudelo; Marcelo L. Wagner. 2015. "Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad". *Lilloa* 52 (2). Los polifenoles son el grupo de compuestos provenientes del metabolismo secundario más estudiados. Abarcan una amplia variedad de moléculas que contienen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos en su estructura. Son metabolitos secundarios que participan en la defensa química de las plantas contra los depredadores y en las interacciones alelopáticas. Además, se les adjudican una amplia variedad de actividades biológicas, muchas de las cuales están asociadas con su acción antioxidante. La dinámica de los polifenoles estudia la modificación cuali-cuantitativa de los polifenoles en las plantas en respuesta a las interacciones con factores bióticos o abióticos, como así también, las modificaciones producidas por los cambios fenológicos y ontológicos. El objetivo del trabajo es introducir las técnicas de análisis de los polifenoles presentes en las plantas para estudios de ecología química o para ser empleados, por ejemplo, en el control de calidad de plantas medicinales. Estos procedimientos incluyen métodos para el estudio de fenoles totales y para cada tipo de compuestos fenólicos que puedan ser realizados en laboratorios de baja complejidad.

Palabras clave: cuantificación; dinámica; fenoles; taninos.

► **Abstract** — Ricco, Rafael A.; Ignacio J. Agudelo; Marcelo L. Wagner. 2015. "Methods used in the analysis of polyphenols in a low complexity laboratory". *Lilloa* 52 (2). Polyphenols are the most studied group of compounds from secondary metabolism. They comprise a broad variety of molecules that contain at least one aromatic ring with one or more hydroxyl group in their structure. They are secondary metabolites that participate in the chemical defense of plants against predators, and allelopathic interactions. Furthermore, a wide variety of biological activities are awarded to them, many of which are associated with their antioxidant action. Polyphenols dynamics studies the quali-quantitative modification of polyphenols in plants in response to interactions with biotic or abiotic factors, as well as, modifications made by phenological and ontological changes. The aim of this work is to introduce the analysis techniques of polyphenols present in plants for the study of chemical ecology, or to be employed, for instance, in the quality control of medicinal plants. These procedures include methods for the study of total phenols and for each type of phenolic compounds that can be made in low complexity laboratories.

Keywords: Dynamics; phenols; quantification; tannins.

INTRODUCCIÓN

¿POR QUÉ ESTUDIAR LOS POLIFENOLES DE LAS PLANTAS?

Hay muchas razones para investigar los polifenoles de las plantas. Desde las estructuras más sencillas, hasta las más complejas, los polifenoles exhiben un rango muy variado de propiedades bio-fisicoquímicas que los hacen productos naturales únicos e intri-

gantes. Además, desde el punto de vista de la salud humana, los polifenoles son micronutrientes presentes en nuestra dieta y cumplen una función muy importante en la prevención de enfermedades degenerativas, tales como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas (Manach *et al.*, 2004; Cheynier, 2005; Pandey y Rizvi, 2009; Habautz y Morand, 2012; Arranz *et al.*, 2013; Mushtag y Wani, 2013; Biasutto *et al.*, 2014).

La segunda pregunta que surge es: ¿que son los polifenoles? Edwin Haslam (1998) define a los polifenoles como compuestos solubles en agua, que tienen una masa molecular comprendida entre 500 y 3.000 a 4.000 Da y poseen de 12 a 16 grupos hidroxilos fenólicos sobre 5 o 7 anillos aromáticos por cada 1.000 Da de masa molecular. Además se caracterizan por dar positiva la reacción de fenoles y precipitan los alcaloides, la gelatina y otras proteínas en solución. Esta definición es conocida como WBS-SH porque es producto de los trabajos de Theodore White, Edgar Charles Bate-Smith, Tony Swain y Edwin Haslam (Quideau *et al.*, 2011).

Por lo tanto, de acuerdo con la definición hay tres clases de polifenoles: las proantocianidinas (taninos condensados), los galo y elagitaninos (taninos hidrolizables) y los flo-

rotaninos, estos últimos presentes en las algas pardas. A los tres grupos se los clasifica también con el término de «taninos» (Haslam, 1998; Lattanzio *et al.*, 2008; Quideau *et al.*, 2011) (Fig. 1).

Sin embargo, existen otros grupos de fenoles, más o menos complejos, a los cuales también se les adjudican el término de «polifenoles». Por ejemplo: los flavonoides, los ácidos hidroxicinámicos, los flobafenos (flobataninos) y los estilbenos (Haslam, 1998; Lattanzio *et al.*, 2008; Quideau *et al.*, 2011) (Fig. 2).

Quideau *et al.* (2011) proponen que el término de polifenoles sea utilizado para definir los metabolitos secundarios derivados exclusivamente de las vías metabólicas shikimato-fenilpropanoide y/o policétidos, que presenten más de un anillo fenólico y desprovisto de nitrógeno en su estructura.

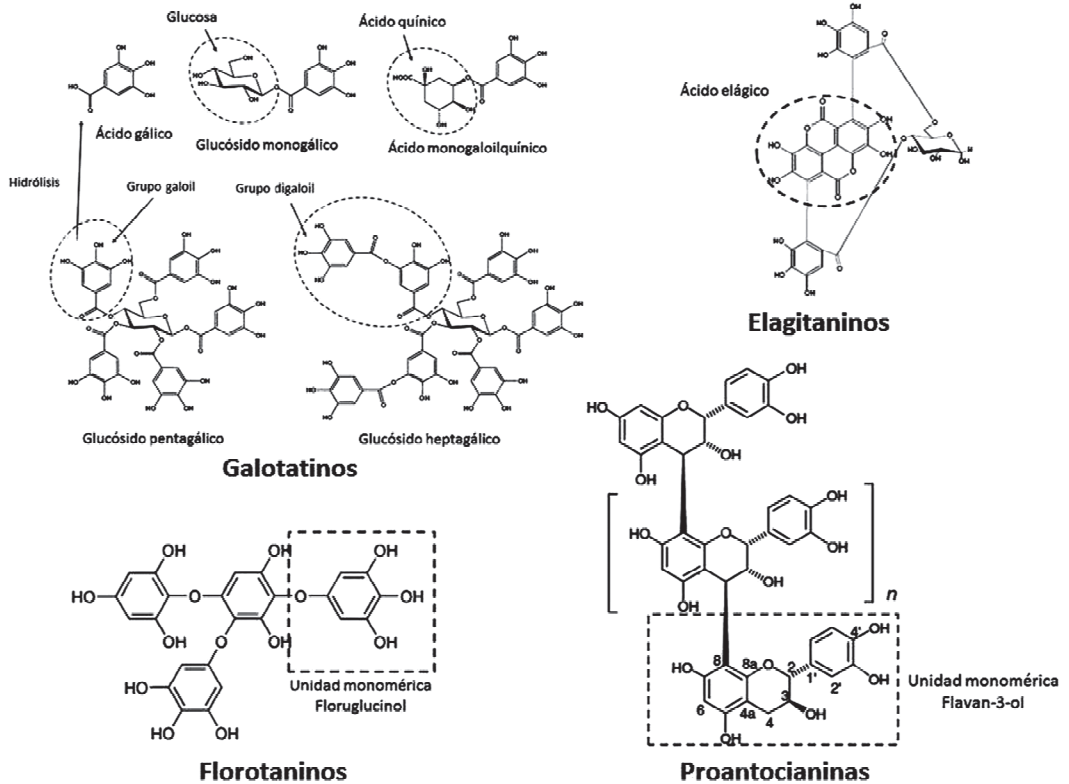


Fig. 1. Ejemplos representativos de las tres clases de polifenoles: las proantocianidinas (taninos condensados), los galo y elagitaninos (taninos hidrolizables) y los florotaninos.

La tercera pregunta que surge es: ¿por qué las plantas responden metabólicamente con tanta variedad de moléculas fenólicas? La respuesta a esta pregunta es aún un tema de debate y especulación y posiblemente sea diferente para los distintos tipos de polifenoles.

En general, a los polifenoles de las plantas, como fueron definidos anteriormente, se los han relacionado en diversos papeles, incluyendo la resistencia de las plantas contra microorganismos patógenos y animales herbívoros, como los insectos. Los polifenoles son importantes, también, en la protección del ADN frente a las radiaciones solares, en especial, la radiación UV-B, lo que probablemente fue un factor determinante en la evolución de las plantas terrestres (Harbone y Williams, 2000; Treutter, 2006; Lattanzio *et al.*, 2008; Quideau *et al.*, 2011).

En el curso de la evolución a largo plazo, así como a los rápidos cambios estacio-

nales, las plantas han aprendido a hacer frente a las cambiantes condiciones del medio y a las presiones ambientales, apoyándose, a través de su dinámico metabolismo secundario, en su arsenal químico.

Entre los principales grupos de metabolitos secundarios, como los alcaloides y los compuestos terpénicos, los polifenoles han demostrado su valor en la protección de las plantas durante la evolución, al tiempo que contribuyen a mantener un equilibrio ecológico, por encima y por debajo del suelo, entre las plantas y otros organismos vivos, muchos de los cuales se alimentan de ellas, incluyendo el hombre (Quideau *et al.*, 2011).

Por otro lado, una característica del metabolismo de las plantas es la flexibilidad para acomodar cambios en el desarrollo (metabolismo primario) para responder a cambios del ambiente (metabolismo secun-

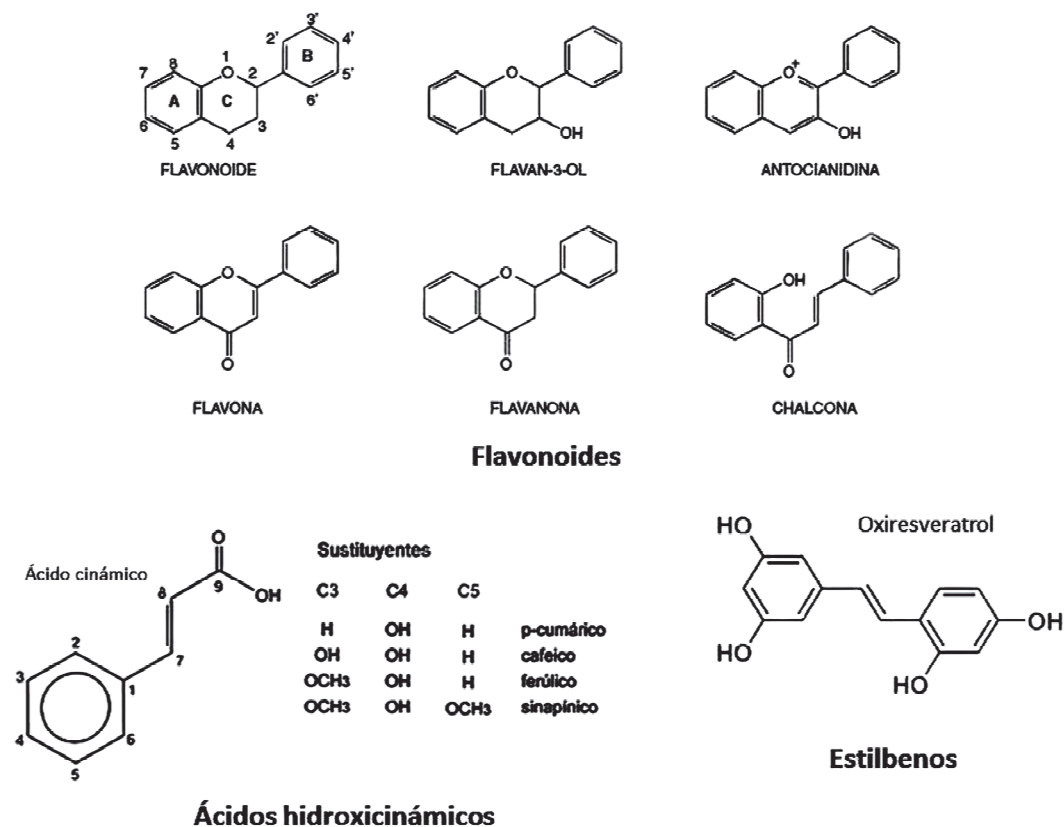


Fig. 2. Ejemplos representativos de flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y estilbenos.

dario). En un período relativamente corto se producen modificaciones en los metabolitos secundarios como respuesta al estrés producido por las interacciones con factores bióticos o abióticos (Lattanzio *et al.*, 2008).

La dinámica de los polifenoles estudia la modificación cuali-cuantitativa de los polifenoles en las plantas en respuesta a las interacciones de la planta con factores bióticos o abióticos, como así también, las modificaciones producidas por los cambios fenológicos y ontológicos.

El objetivo del trabajo es introducir las técnicas de análisis de los polifenoles presentes en las plantas. Estos procedimientos incluyen métodos para el estudio de fenoles totales y para cada tipo de compuesto fenólico que puedan ser realizados en laboratorios de baja complejidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. DE LA PLANTA AL EXTRACTO

El problema general que se presenta en el análisis de la dinámica de polifenoles está relacionado en la naturaleza misma del material objeto del análisis. En los estudios de ecología bioquímica se trata normalmente de tejidos vivos que serán sometidos a diversos procedimientos, dando como resultado final la obtención de un extracto.

El objetivo de la preparación de un extracto es la transferencia de los diversos compuestos presentes en el material vegetal a una solución, evitando todo aquello que pueda modificar su composición cuali-cuantitativa. Es decir, el extracto debería representar la composición fisiológica (normalmente estado vivo) presente en el material objeto de análisis.

La preparación de un extracto puede ser dividida en tres partes:

- 1°. Recolección y preservación del material vegetal;
- 2°. Preparación de las muestras a analizar (involucra todos aquellos procedimientos previos a la extracción) y
- 3°. Extracción.

1.1. Recolección del material vegetal.— La recolección del material vegetal constituye el punto de partida de una larga serie de eventos que nos permitirán conocer la composición cuali-cuantitativa del material en estudio. Es así que cobra importancia el tratamiento posterior a la recolección del material vegetal, con el objeto de evitar cambios en dicha composición.

En la siguiente tabla se presentan diversas posibilidades de recolección del material a analizar, presentados en orden decreciente, constituyendo la disponibilidad de material fresco en el laboratorio (invernadero) como la situación ideal (Waterman y Mole, 1994):

1. Llevar el material vivo al laboratorio.
2. Colocar el material fresco en nitrógeno líquido (en el campo).
3. Al material fresco congelarlo o liofilizarlo cerca del lugar de colección.
4. Al material fresco trasladarlo en hielo durante 3 o 4 horas antes de procesarlo.
5. Las muestras secadas en hornos con ventilación forzada a 60 °C.
6. Las muestras secadas directamente, sin condiciones controladas.
7. Las muestras transportadas sin ningún cuidado.

1.2. Extracción.— El objetivo de la extracción es la remoción de los compuestos fenólicos presentes en el material vegetal, obteniendo una solución rica en dichos metabolitos. La elección del solvente adecuado representa un punto clave en el análisis de los compuestos fenólicos, donde el solvente más empleado es el MeOH 50 %, constituyendo el MeOH 80 % y la acetona 70 % otros sistemas eficaces y adecuados a las necesidades del análisis.

Una vez elegido el solvente, la extracción puede llevarse a cabo a temperatura ambiente (25 °C), empleando solvente fresco en extracciones repetidas, usando un agitador orbital que permita un buen contacto entre el material vegetal y el solvente. Posteriormente, un proceso de filtración permitirá obtener un extracto adecuado para el análisis cuantitativo.

2. ESTUDIOS CUALITATIVOS

2.1. Perfil bidimensional de los polifenoles.— Se realiza por medio de cromatografías bidimensionales en capa delgada de celulosa, según metodología estándar (Mabry *et al.*, 1970; Markham, 1982).

Para el análisis de los flavonoides y ácidos hidroxycinámicos se emplea el sistema de solventes TBA (terbutanol-ácido acético-agua, 3:1:1) para la primera dimensión y ácido acético 15 % para la segunda dimensión. Los cromatogramas se observan a la luz ultravioleta antes y después de ser expuestos a vapores de amoníaco y, posteriormente, se revela con el reactivo de productos naturales (NP 1 % en metanol) (Wagner y Bladt, 1996).

Para el estudio de las proantocianidinas (taninos condensados) se realiza cromatografías bidimensionales empleando como sistema de solventes secBAA (butanol secundario-ácido acético-agua, 6:1:2) para la primera dimensión y ácido acético 6 % para la segunda dimensión. Se emplea como revelador el reactivo de vainillina-ácido clorhídrico (vainillina al 5 % en etanol-ácido clorhídrico concentrado, 4:1), con posterior calentamiento (5 min a 100 °C) (Markham, 1982).

3. ESTUDIOS CUANTITATIVOS

3.1. Cuantificación de fenoles totales.— Entre las mediciones realizadas en estudios de química ecológica, la determinación del contenido total de compuestos fenólicos ocupa un lugar preponderante. Las técnicas empleadas permiten cuantificar el contenido de hidroxilos fenólicos presentes en el material a analizar (extractos), independientemente de la naturaleza de cada componente presente.

En la actualidad, la cuantificación de los fenoles totales es llevada a cabo mediante dos técnicas: el método de Folin-Ciocalteu (el más empleado) y el método de Price y Butler. Ambos métodos se fundamentan en reacciones de óxido reducción.

En el método de Folin-Ciocalteu, el ión

fenolato es oxidado (en medio alcalino) mientras que el reactivo fosfotúngstico-molibdico es reducido, formando un complejo color azul (cromóforo).

En el método de Price y Butler, también el ión fenolato es oxidado mientras que el ión férrico (Fe^{3+}) es reducido a ión ferroso (Fe^{2+}) que se detecta mediante la formación de un complejo azul con el reactivo ferricianuro de potasio. El complejo formado de fórmula $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ se conoce con el nombre de azul de Prusia.

3.1.1. Método de Folin-Ciocalteu (Makkar *et al.*, 1993).— Una alícuota (50 - 100 μl) del extracto es transferida a un tubo de ensayos y el volumen se lleva a 500 μl con agua desionizada. Se adicionan a continuación 250 μl de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,25 ml de solución acuosa de carbonato de sodio al 20 %. Luego de 40 minutos se mide la absorbancia a 725 nm. El contenido de fenoles totales se expresa como equivalentes de ácido tánico (ATE, mg ácido tánico / g material seco) o equivalentes de ácido gálico (GAE, mg ácido gálico / g material seco).

Para confeccionar la curva de calibración se utiliza una solución madre de ácido tánico o ácido gálico (0,1 mg / ml). Las concentraciones finales que se usan para el ácido tánico van de 1 μg / ml hasta 5 μg / ml. En el caso del ácido gálico el rango queda comprendido entre 1 μg / ml hasta 10 μg / ml.

3.1.2. Método de Price y Butler (Price y Butler, 1977).— Se toma 250 μl del extracto y se le adicionan 25 ml de agua desionizada, seguido de 3 ml de cloruro férrico 0,1 M. Luego de 3 min se agregan 3 ml de ferricianuro de potasio 8 mM y se mezcla. Después de 15 min se lee la absorbancia a 720 nm. El contenido de fenoles totales se expresa como equivalentes de ácido tánico (ATE, mg ácido tánico / g material seco) o equivalentes de ácido gálico (GAE, mg ácido gálico / g material seco).

El ensayo se estandariza con una solución madre de 0,01 M de ácido gálico (188 μg / ml).

3.2. Cuantificación de taninos

3.2.1. *Cuantificación de taninos totales (Método D).*— El método se basa en la propiedad de los taninos de precipitar las proteínas. El ensayo consta de tres etapas, en la primera se realiza la determinación de los fenoles totales por el procedimiento de Folin-Ciocalteu.

En la segunda etapa se remueven los taninos mediante su precipitación con una solución de seroalbúmina bovina (BSA) (buffer acetato 0,2 M, pH 5,0; cloruro de sodio 0,17 M y 1,0 mg/ml de la fracción V de BSA). Para lograrlo, a 1 ml del extracto se le adiciona 1 ml de solución de BSA. Luego de 15 min a temperatura ambiente, se centrifuga a 5.000 rpm.

Finalmente el tercer paso es determinar sobre una alícuota del sobrenadante (50 - 100 μ L) la concentración de fenoles por el procedimiento de Folin-Ciocalteu.

Al valor obtenido de fenoles totales se le resta el valor de fenoles obtenidos posteriormente a la precipitación con BSA, de esta manera se obtiene el valor de fenoles que se comportan como taninos (taninos totales).

El contenido de taninos totales se expresa como equivalentes de ácido tánico (ATE, mg ácido tánico / g material seco) o equivalentes de ácido gálico (GAE, mg ácido gálico / g material seco). Se emplea la misma curva que se utiliza en la determinación de fenoles totales.

3.2.2. *Cuantificación de taninos (Método II)*

(Waterman y Mole, 1994).— Se toma 1 ml de muestra y se agrega 2 ml de una solución de BSA (buffer acetato 0,2 M, pH 5,0; cloruro de sodio 0,17 M y 1,0 mg/ml de la fracción V de BSA), se mezcla y se deja a temperatura ambiente durante 15 min. La suspensión se centrifuga a 5.000 rpm y se descarta el sobrenadante. Se lava el precipitado con buffer acetato 0,2 M, pH 5,0 y se resuspende en SDS (solución acuosa que contiene 1 % p/v de dodecil sulfato de sodio, 5 % v/v de trietanolamina y 20 % v/v de isopropanol). Luego se agrega 1 ml del reactivo cloruro férrico (0,01 M de FeCl_3 en 0,01 N de

HCl), se mezcla, se espera 15 a 30 min y se mide la absorbancia a 510 nm.

Se construye una curva de calibración utilizando ácido tánico o quebracho tanino purificado o el tanino purificado proveniente de la especie en estudio.

3.2.3. *Método de difusión radial para taninos*

(Waterman y Mole, 1994).— Preparación de las placas de agar-BSA: Se prepara una solución al 1% (p/v) de agarosa en el siguiente buffer: 50 mm de ácido acético, 60 μ M ácido ascórbico y se ajusta el pH a 5,0 con NaOH. El buffer se lleva a 100 °C para disolver la agarosa. Se enfria a 45 °C y se agrega la seroalbúmina bovina a una concentración de 0,1% p/v. Verter alícuotas de 10 ml dentro de cajas de Petri de 9 cm de diámetro y se deja enfriar a 4 °C. Se cortaron discos de 4 mm de diámetro con un sacabocados.

Ensayo: Se colocan 10 μ l de los extractos en los huecos. Para elaborar la curva de calibración se utilizan soluciones estándares de ácido tánico (10 mg / ml hasta 50 mg / ml). Se sellan las cajas de Petri con Parafilm® y se incuban a 30 °C durante 96-120 h.

Una vez que se generaron los anillos de precipitación se miden, para cada muestra, dos diámetros perpendiculares entre sí y luego se utiliza el cuadrado del diámetro promedio y se intercala en la curva de calibración para determinar la concentración de los taninos presentes.

3.3. *Cuantificación de taninos condensados (Proantocianidinas)*

3.3.1. *Método de la proantocianidina* (Porter *et al.*, 1986).— El método se basa en la despolimerización en medio ácido de los taninos condensados, como producto se origina las antocianidinas, compuestos coloreados que pueden ser cuantificados espectrofotométricamente.

Se toman alícuotas de 0,50 ml del extracto y se transfieren a tubos de ensayos y se agregan 3,0 ml del reactivo butanol-HCl (butanol-HCl, 95:5 v/v) y 0,1 ml de reactivo férrico (2 % sulfato férrico-amónico en HCl

2 M). Mezclar y colocar los tubos en baño María a ebullición durante 60 min. Luego de enfriarlos, se miden las absorbancias a 550 nm contra un blanco. El contenido en proantocianidinas se expresa como densidad óptica (D.O.) a 550 nm.

3.3.2. *Método de la vainillina* (Price *et al.*, 1978).— El ensayo involucra la reacción de un aldehído aromático, la vainillina, con el anillo A de los flavan-3-ol originando un aducto de color rojo (Hagerman, 2002).

Reactivo de la vainillina: Realizar dos soluciones, una solución metanólica al 8 % de HCl concentrado y la otra solución metanólica al 1 % de vainillina. El reactivo se prepara mezclando igual cantidad de esas soluciones, de manera tal que queda una solución metanólica de 4 % de HCl y 0,5 % de vainillina. Se prepara en el momento en que se va usar.

Procedimiento: La muestra (100 % en metanol) y el reactivo deben estar a 30 °C antes de comenzar en ensayo. A tiempo cero agregar 1 ml de la muestra a 5 ml de reactivo y mezclar. Mantener el ensayo a 30 °C durante 20 min. Medir la absorbancia a 500 nm.

Blanco de la reacción: Realizar un «blanco de reactivo» para lo cual se prepara una solución al 4 % de HCl en metanol.

Curva de calibración: Se construye la curva de calibración (Absorbancia vs mg de catequina) a partir de una solución 0,3 mg / ml de catequina.

3.4. Cuantificación de taninos hidrolizables

3.4.1. *Galotaninos. Método de la rodanina*.— El método consiste en la hidrólisis de los galotaninos en condiciones anaeróbicas, el ácido gálico reacciona con la rodanina originando un cromóforo de color rosado (Inoue y Hagerman, 1988).

Preparación de la muestra: Mezclar 5 ml de una solución 1 M de H₂SO₄ y 1 ml de muestra (en 70 % de acetona) en tubo de ensayo con rosca. Se puede proceder de dos maneras, se realiza vacío y se guarda el contenido congelado o se desplaza el oxígeno

por ventilación con nitrógeno. Se calienta el tubo sellado durante 26 h a 100 °C. Enfriar, llevara a 50 ml de volumen con agua desionizada.

Procedimiento: A tiempo cero mezclar 1 ml de muestra y 1,5 ml de reactivo (0,667 % de la solución metanólica de rodanina). Después de exactamente 5 min agregar 1 ml de 0,5 M de KOH. Esperar 2,5 min y diluir con agua hasta tener 25 ml, mezclar antes de leer la absorbancia a 520 nm después de 5-10 min. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico

La curva de calibración se realiza por medio de una solución madre de ácido gálico (0,10 mg / ml en 0,2 N H₂SO₄). Se utiliza entre 0,2 y 1 ml de la solución madre de ácido gálico en la construcción de la curva.

3.4.2. *Elagitaninos. Método de Bate-Smith*

(Waterman y Mole, 1994).— Mezclar 2 ml de muestra (extracto crudo en metanol 50 %) con 160 µl de ácido acético acuoso al 6 % en una cubeta y remover el oxígeno de la mezcla mediante burbujeo suave de una corriente de nitrógeno durante 15 min. Posteriormente se agrega 160 µl de reactivo (nitrito de sodio al 6 % en agua) y sobre la superficie dejar pasar una corriente de nitrógeno durante 15 min. Tapar la cubeta con teflón y leer la absorbancia a 600 nm después de 1 h.

Se utiliza una solución madre de 1 µg / ml de ácido gálico en dimetilsulfóxido

3.5. *Cuantificación de flavonoides*.— Los métodos que se describen se basan en la formación de complejos coloreados entre los hidroxilos fenólicos y el grupo ceto de los flavonoides con el tricloruro de aluminio o el 2-aminoetil difenilborato (Ho *et al.*, 2012).

Curva de calibración: La curva de calibración se realiza con soluciones metanólica de rutina de 1,000 mg / ml, 0,500 mg / ml, 0,250 mg / ml, 0,125 mg / ml, 0,0625 mg / ml. De acuerdo con la técnica empleada se utilizarán las concentraciones que permitan una relación lineal entre la absorbancia y la concentración.

3.5.1. *Modificación de la técnica de Maksimovic et al. (2005).*— A 0,1 ml del extracto se le adicionan 1,4 ml de agua desionizada y 0,50 ml del reactivo de flavonoides (133 mg tricloruro de aluminio, 400 mg acetato de sodio en 100 ml de solvente constituido por 140 ml metanol, 50 ml agua, 10 ml ácido acético). Luego de 5 min a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 430 nm.

Se realiza una curva de calibración con rutina. El contenido de flavonoides se expresa como equivalentes de rutina (RE, mg rutina / g material seco).

3.5.2. *Adaptación de las técnicas de Woisky y Salatino y Chang et al. (Woisky y Salatino, 1998; Chang et al., 2002).*— 0,5 ml del extracto se mezcla con 1,5 ml de etanol 95 %. Se agrega posteriormente 0,1 ml de una solución acuosa de tricloruro de aluminio al 10 % (p/v) y 0.1 ml de una solución acuosa 1 M de acetato de sodio. Se lleva a un volumen final de 5 ml con agua destilada y la mezcla se deja reposar por 30 min. Posteriormente se determina la absorbancia a 415 nm. Se realiza una curva de calibración con rutina. El contenido de flavonoides se expresa como equivalentes de rutina (RE, mg rutina / g material seco).

3.5.3. *Técnica de Shohaël et al. (2006).*— A una alícuota del extracto se le adiciona 1,25 ml de agua desionizada y 75 μ l de una solución acuosa de NaNO_2 (5 % p/v). La mezcla se agita con un mezclador de vórtice y se incuba a temperatura ambiente durante 6 min. Luego se añade 150 μ l de una solución acuosa de AlCl_3 (10 % p/v) y, después de 5 min, se agrega 0,5 ml de una solución acuosa 1 M de NaOH y 2,5 ml de agua desionizada. Finalmente, la mezcla se incuba durante 30 min a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 510 nm utilizando metanol como blanco. Los valores se expresan como equivalentes de quercetina (QE, mg de quercetina / g material seco) o como equivalentes de rutina (RE, mg rutina / g material seco).

3.5.4. *Adaptación de las técnicas de Jia et al. y Yoo et al.*— Se agrega a 1 ml del extracto a analizar 4 ml de agua destilada y 0,3 ml de una solución acuosa de nitrito de sodio al 5 % (p/v). Luego de 5 min de reacción, se agregan 0,6 ml de una solución acuosa de tricloruro de aluminio al 10 % (p/v). Luego de 6 min, se agregan 2 ml de una solución acuosa 1 M de hidróxido de sodio y agua destilada hasta llegar a un volumen de 10 ml. La mezcla es centrifugada a 3.000 rpm durante 3 min, y la absorbancia del sobrenadante se mide a 510 nm. Se realiza una curva de calibración con quercetina. Los valores se expresan como equivalentes de quercetina (QE, mg de quercetina / g material seco). Todas las mediciones se efectúan por triplicado.

3.5.5. *Técnica adaptada de Hariri et al. (1991).*— A 2 ml del extracto se mezcla con 100 μ l de una solución metanólica al 1 % (p/v) del reactivo 2-aminoetil difenilborato. Luego de 20 min a temperatura ambiente, se determina la absorbancia a 404 nm. Los valores se expresan como equivalentes de rutina (RE, mg rutina / g material seco).

3.6. *Cuantificación de ácidos hidroxicinánicos totales. Modificación del método de Dao y Friedman (1992).*— Alícuotas de 50 μ l del extracto se lleva a volumen (2 ml) con etanol absoluto. Se determina la absorbancia a 328 nm. Se realiza una curva de calibración con ácido clorogénico (la concentración final en el medio de reacción es de 0,0025 – 0,0150 mg / ml). Los valores se expresan como equivalentes de ácido clorogénico (CA, mg de ácido clorogénico / g material seco).

4. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

La elucidación de las estructuras de los polifenoles no es un tema indispensable en ecología química. Por otro lado, para realizar la elucidación de las estructuras se requiere de técnicas complejas, en donde el equipamiento es muy costoso y, en general, no se dispone en los laboratorios de baja complejidad.

Entre las técnicas que se utilizan se encuentran (Balas y Vercauteren, 1994; Kruger *et al.*, 2000; March y Brodbelt, 2008; Vukics y Guttman, 2010):

- Espectroscopia de masa con ionización por electrospray (ESI-MS),
- Mecanismos de fragmentación múltiple en condiciones de espectrometría de masas en tándem (CID MS),
- Espectrometría de masa en modalidad de MALDI,
- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), análisis ¹D y ²D homo y heteronuclear.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE LOS POLIFENOLES

Como se mencionó anteriormente, la presencia de compuestos fenólicos puede variar, dentro de un individuo, en respuesta a factores genéticos, ontogénicos, bióticos y abióticos, afectando de diversa manera a los diferentes órganos de la planta (Waterman y Mc Key, 1989; Riipi *et al.*, 2002; Del Baño *et al.*, 2002; Rugna *et al.*, 2008).

Los polifenoles son compuestos que intervienen activamente en la interacción planta-insecto, regulando la performance de los herbívoros (Haslam, 1988; Barbehenn y Constabel, 2011). Entre los trabajos que se realizan en nuestro laboratorio podemos comentar los siguientes casos en donde se pueden apreciar las técnicas de estudio aplicadas al estudio de la dinámica de polifenoles en la interacción planta-insecto:

Schinus longifolius (Lindl.) Speg. (Anacardiaceae), conocido con los nombres

vulgares de «molle», «incienso» y «trementina», es un árbol o arbusto cuyas hojas, bajo la forma de infusión, son empleadas como expectorante y purgante en la medicina tradicional. Es una especie que a menudo se encuentra parasitado por insectos galígenos de diversos órdenes, entre los que se encuentra *Calophya mammifex* (Hemiptera - Calophyidae). El análisis del perfil bidimensional de los flavonoides y ácidos hidroxycinámicos permite observar una variación de tipo cuali-cuantitativo, determinada por una disminución de estos metabolitos en los extractos provenientes de las agallas (Fig. 3). En el análisis del perfil de proantocianidinas también se observa una modificación cuali-cuantitativa, pero en éste caso la agalla presenta una alta concentración de proantocianidinas acompañada de una mayor complejidad de compuestos (monómeros y oligómeros), respecto de lo observado para las hojas sanas (Fig. 4) (Agudelo *et al.*, 2013). Con excepción de las proantocianidinas, se pudo observar una disminución en los valores de fenoles totales, taninos totales, flavonoides totales y ácidos hidroxycinámicos totales en las hojas que tenían agallas, respecto de las sanas (Tabla 1) (Agudelo *et al.*, 2013).

Tripodanthus acutifolius (Ruiz et Pav.) Tiegh. (Loranthaceae) es una de las especies comprendida dentro del grupo de los «muérdagos», que en su ambiente natural puede infestarse con cochinillas, insectos con piezas bucales perforadoras y chupadoras que se alimentan de jugos vegetales, pertenecen al orden Homópteros. Al comparar los polifenoles de los individuos de *T. acutifolius* infestados con los individuos sanos se observan modificaciones cuali-cuantitativas en el con-

Tabla 1. Cuantificación de fenoles totales, taninos totales, proantocianidinas, flavonoides totales y ácidos hidroxycinámicos en hojas sanas y con agallas de *Schinus longifolius*. Los valores expresados como media ± (SD).

| Muestras | Fenoles totales mg ácido tánico / g material seco | Taninos totales mg ácido tánico / g material seco | Proantocianidinas D.O. 550 nm | Flavonoides totales mg rutina / g material seco | Ácido hidroxycinámico totales mg ácido clorogénico / g material seco |
|-------------------|---|---|----------------------------------|---|--|
| Hojas sanas | 205,80 ± 15,11 | 151,14 ± 16,92 | 0,5497 ± 0,0375 | 1,11 ± 0,10 | 10,81 ± 0,56 |
| Hojas con agallas | 147,32 ± 11,76 | 110,70 ± 12,09 | 1,294 ± 0,130 | 0,46 ± 0,03 | 7,48 ± 0,38 |

Tabla 2. Valores de fenoles totales y taninos totales en hojas sanas e infectadas de *Tripodanthus acutifolius*. Valores expresados como la media \pm (SD).

| Muestra | Fenoles totales mg ácido tánico / g material seco | Taninos totales mg ácido tánico / g material seco |
|------------------|---|---|
| Hojas sanas | 67,80 \pm 3,00 | 10,10 \pm 3,16 |
| Hojas infectadas | 96,87 \pm 3,49 | 23,35 \pm 4,10 |

tenido de los polifenoles. En las hojas infectadas los polifenoles se elevan aproximadamente un 40 % respecto de las sanas. Los niveles de taninos totales aumentan hasta un 130 % en los individuos infectados si se lo compara con los individuos sanos. En las hojas sanas, los taninos totales representan aproximadamente el 15 % del total de fenoles. En las hojas infectadas esta relación aumenta hasta el 25 % (Tabla 2) (Ricco *et al.*, 2008).

Otro ejemplo lo constituye *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae), especie que es atacada por la oruga de la mariposa *Agraulis vanillae* L. (Heliconidae). Si se comparan los perfiles de polifenoles entre hojas sanas y comidas, la concentración de fenoles totales se triplica en las últimas, respecto de las

Tabla 3. Cuantificación de fenoles totales en hojas sanas y atacadas de *Smilax campestris*. Los valores expresados como la media \pm (SD).

| Muestra | Fenoles totales mg ácido tánico / g material seco |
|----------------|---|
| Hojas sanas | 3,46 \pm 0,62 |
| Hojas atacadas | 12,96 \pm 2,06 |

hojas sanas. En esta especie se pudo observar que el aumento de los fenoles totales es a expensas del aumento de la síntesis de flavonoides (Tabla 3) (Rugna *et al.*, 2011).

Por otro lado, la concentración de compuestos fenólicos puede variar, en un individuo, en respuesta a factores ontogénicos, afectando de diversa manera a los diferentes órganos de la planta:

Estudios realizados en *Aloysia citrodora* Palau (Verbenaceae) han demostrado una clara diferencia en la concentración de polifenoles en relación al grado de desarrollo foliar, donde los principales polifenoles presentes en las hojas (ácidos hidroxicinámicos y flavonoides), tienen mayor acumulación en aquellas hojas que presentan una alta tasa de crecimiento, es decir, en las hojas jóvenes.

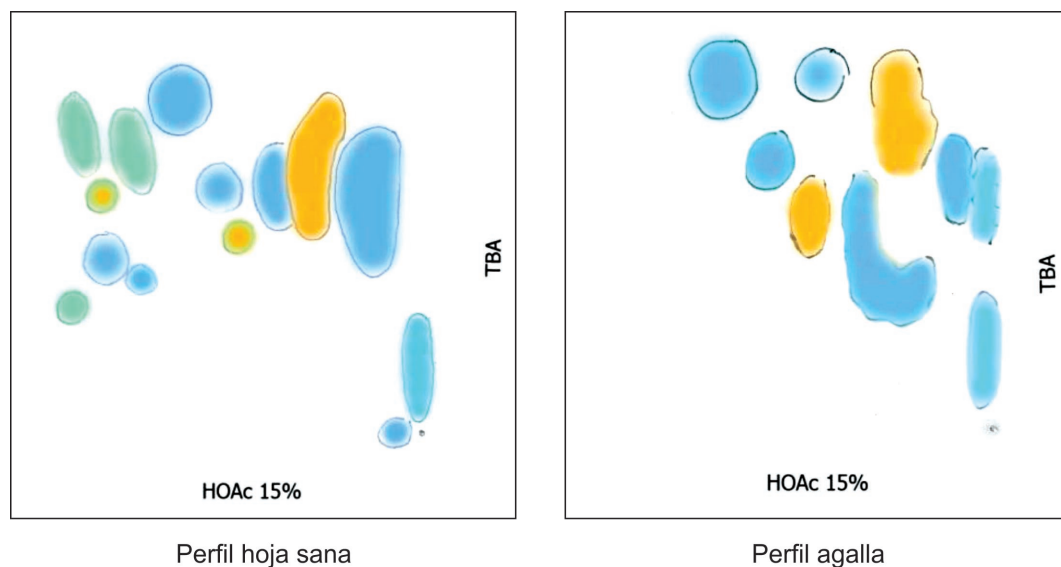


Fig. 3. Reacción con NP. Los compuestos celestes y verdes corresponden a los ácidos hidroxicinámicos. Los compuestos amarillo-anaranjados a los flavonoides.

Tabla 4. Cuantificación de fenoles totales, taninos, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos en hojas jóvenes y adultas de *Aloysia citrodora*. Los valores expresados como media \pm (SD).

| Muestra | Fenoles totales mg ácido tánico / g material seco | Taninos totales mg ácido tánico / g material seco | Flavonoides totales mg rutina / g material seco | Ácidos hidroxicinámicos totales mg ácido clorogénico / g material seco |
|---------------|--|--|--|---|
| Hojas jóvenes | 50,02 \pm 3,84 | 15,90 \pm 1,85 | 24,91 \pm 1,90 | 35,01 \pm 2,84 |
| Hojas adultas | 26,43 \pm 2,49 | 16,12 \pm 1,60 | 20,51 \pm 1,15 | 19,72 \pm 1,72 |

Los niveles de polifenoles decrecen rápidamente con la edad de la hoja. Se ha observado que la concentración de los fenoles totales en las hojas jóvenes es aproximadamente un 90 % mayor respecto al contenido de las hojas adultas. Los flavonoides totales son un 20 % superior en las hojas jóvenes. Pero el mayor aporte a los fenoles totales lo realizan los derivados del ácido hidroxicinámico, donde la concentración en las hojas jóvenes es hasta aproximadamente 80 % superior respecto de la hojas adultas. Estos compuestos constituyen la principal diferencia entre los perfiles obtenidos como así también el principal aporte al contenido de fenoles totales (Tabla 4) (Ricco *et al.*, 2011 a).

Equisetum giganteum L. (Equisetaceae) es una especie nativa de Sudamérica y Amé-

rica Central, que es empleada en la medicina tradicional como diurético y en el tratamiento de diversas patologías. El objetivo de este trabajo fue estudiar el perfil de polifenoles presentes en las ramas laterales (tallos finos), tallos entrenudos y tallos basales. El análisis de los resultados permite establecer una diferencia significativa entre los valores obtenidos para las ramas laterales (tallos finos) respecto de los tallos entrenudos y tallos basales. Las concentraciones de todos los metabolitos analizados son mayores en las ramas laterales, seguido por los tallos entrenudos y tallos basales. Estas variaciones cuantitativas se ven acompañadas también de una variación cualitativa, observándose una mayor complejidad biosintética en las ramas laterales, determinada por la presen-

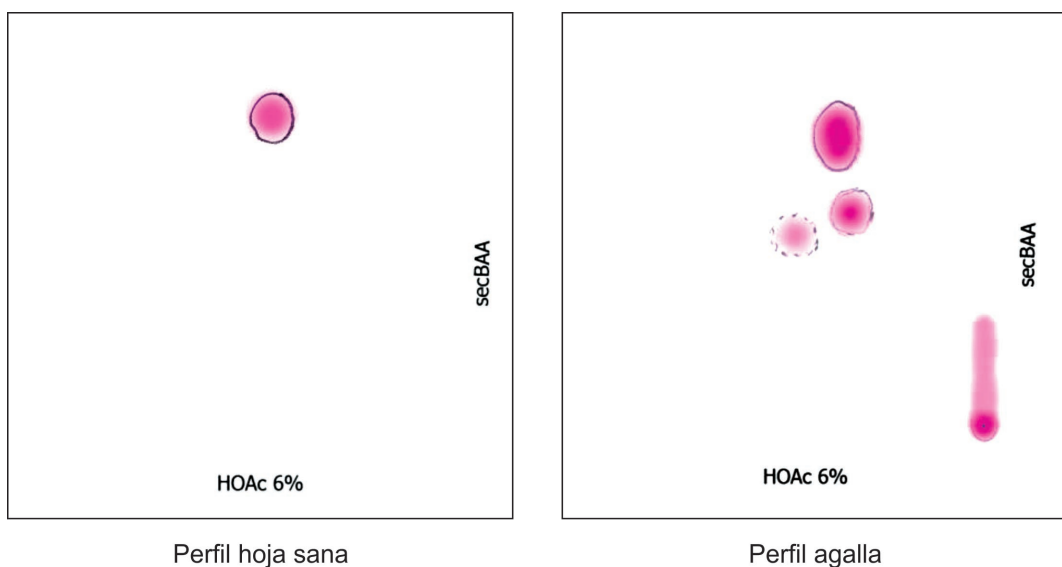
**Fig. 4.** Reacción de la vainillina. Las proantocianidinas se observan de color púrpura.

Tabla 5. Cuantificación de fenoles totales, taninos totales, proantocianidinas, flavonoides totales y ácidos hidroxycinámicos totales en *Equisetum giganteum*. Los valores expresados como media \pm (SD).

| Muestra | Fenoles totales (mg ácido tánico / g material seco) | Taninos totales (mg ácido tánico / g material seco) | Proantocianidinas (D.O. 550 nm) | Flavonoides totales (mg rutina / g material seco) | Hidroxycinámicos totales (mg ác. clorogénico / g material seco) |
|-------------------|---|---|------------------------------------|--|--|
| Ramas laterales | 17,62 \pm 2,10 | 8,22 \pm 1,10 | 0,3422 \pm 0,0250 | 24,37 \pm 2,65 | 12,06 \pm 1,20 |
| Tallos entrenudos | 7,89 \pm 1,90 | 3,70 \pm 0,80 | No detectado | 11,50 \pm 1,50 | 5,47 \pm 0,60 |
| Tallos basales | 5,40 \pm 0,75 | 2,88 \pm 0,25 | No detectado | 8,90 \pm 0,30 | 2,94 \pm 0,25 |

cia de proantocianidinas, compuestos ausentes en los otros materiales analizados. Estos resultados permiten inferir una distribución espacial particular de los taninos condensados (proantocianidinas) en *E. giganteum* (Tabla 5) (Ricco *et al.*, 2011 b).

CONCLUSIONES

Estos ejemplos corresponden a especies utilizadas en la medicina popular y en la elaboración de medicamentos herbarios. Por lo tanto, el estudio de la dinámica de los polifenoles, con técnicas sencillas, aporta información que debería tenerse en cuenta porque nos permitiría detectar variaciones en los parámetros químicos que afectan la calidad de la droga e incluso modificarían su actividad biológica.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires por la provisión del subsidio 20020130100641BA, que financia este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

Agudelo I., Wagner M. L., Gurni A. A., Ricco R. A. 2013. Dinámica de polifenoles y estudio anatómo-histoquímico en *Schinus longifolius* (Lindl.) Speg. (Anacardiaceae) en respuesta a la infección por *Calophya mammifex* (Hemiptera – Calophyidae). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 12: 162-175.

Arranz S., Valderas-Martínez P., Chiva-Blanch G., Casas R., Urpi-Sarda M., Lamuela-Raventos R. M., Estruch R. 2013. Cardioprotective effects of cocoa: clinical evidence from randomized clinical

intervention trials in human. Molecular Nutrition & Food Research 57: 936-947.

- Balas L., Vercauteren J. 1994. Extensive high-resolution reverse 2D NMR analysis for the structural elucidation of procyanidin oligomers. Magnetic Resonance in Chemistry 32: 386-393.
- Barbehenn R. V., Constabel C. P. 2011. Tannins in plant-herbivore. Phytochemistry 72: 1551-1565.
- Biasutto L., Mattarei A., Sassi N., Azzolini M., Romio M., Paradisi C., Zoratti M. 2014. Improving the efficacy of plant polyphenols. Anticancer Agents in Medicinal Chemistry 14: 1332-1342.
- Chang C. C., Yang M. H., Wen H. M., Chern J. C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis 10: 178-182.
- Cheynier V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. The American Journal of Clinical Nutrition 81: 223S-229S.
- Dao L., Friedman M. 1992. Chlorogenic Acid Content of Fresh and Processed Determined by Ultraviolet Spectrophotometric. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40: 2152-2156.
- Del Baño M. J., Lorente J., Castillo J. N., Benavente-García O., Del Río J. A., Ortuño A., Quirín K. W., Gerard D. 2003. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 4247-4253.
- Habauzit V., Morand C. 2012. Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians. Therapeutic Advances in Chronic Disease 3: 87-106.
- Hagerman A. E. 2002. Vanillin Assay. <http://www.users.muohio.edu/hagermae/Vanillin%20Assay.pdf> [julio 2015].
- Harbone J. B., Williams C. A. 2000. Advance in flavonoids research since 1992. Phytochemistry 55: 481-504.
- Hariri B., Salle G., Andary C. 1991. Involvement of flavonoids in the resistance of two popular cul-

- tivars to mistletoe (*Viscum album* L.). *Protoplasma* 162: 20-26.
- Haslam E. 1988. Plant Polyphenols (syn. vegetable tannins) and chemical defense – reappraisal. *Journal of Chemical Ecology* 14: 1789-1805.
- Haslam E. 1998. *Practical Polyphenols - From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*. Cambridge University, Cambridge, UK, pp. 18-22.
- Ho Y. C., Yu H. T., Su N. W. 2012. Re-examination of Chromogenic Quantitative Assay for Determining Flavonoid Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 2674-81.
- Inoue K. H., Hagerman A. E. 1988. Determination of Gallotannin with Rhodanine. *Analytical Biochemistry* 169: 363-369.
- Jia Z. S., Tang M. C., Wu J. M. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64: 555-559.
- Kruger C. G., Dopke N. C., Treichel P. M., Folts J., Reed J. D. 2000. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of polygalloyl polyflavan-3-ols in grape seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1663-1667.
- Lattanzio V., Kroon P. A., Guideau S., Treutter D. 2008. Plant Phenolics - Secondary Metabolites with diverse Functions, pp. 1-36. en *Recent Advances in Polyphenol Research*. Volumen 1. Editado por Fouad Daayf y Vincenzo Lattanzio, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B. 1970. *The systematic identification of the flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin and New York, New York pp. 354.
- Makkar H. P. S., Bluemmel M., Borowy N. K., Becker K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 61: 161-165.
- Maksimovic Z., Malencic D., Kovacevic N. 2005. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioreserch Technology* 96: 873-877.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémès C., Jiménez L. 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79: 727-747.
- March R., Brodbelt J. 2008. Analysis of flavonoids: tandem mass spectroscopy, computational methods, and NMR. *Journal of Mass Spectrometry* 43: 1581-1617.
- Markham K. R. 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London, UK, pp. 144.
- Mushtag M., Wani S. M. 2013. Polyphenols and Human health. A review. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 4: (B) 338-360.
- Pandey K. B., Rizvi S. I. 2009. Plant Polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2: 270-278.
- Price M. L., Butler L. G. 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 25: 1268-1273.
- Price M. L., Van Scoyoc S., Butler L. G. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannins in sorghum grains. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 26: 1214-1218.
- Porter L. J., Hrstich L. N., Chan B. C. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. *Phytochemistry* 25: 223-230.
- Guideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C., Pouységu L. 2011. *Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis*. *Angewandte Chemie International Edition* 50: 586-621.
- Ricco R. A., Lozano V., Lator V., Gurni A. A., Wagner M. L. 2008. Modificación en el perfil de polifenoles de *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz et Pav.) Tiegh. (Loranthaceae) infectado por «cochinilla» (Homoptera) – Lecanidae. *Latin American Journal of Pharmacy*. 27: 258-262.
- Ricco R. A., Wagner M. L., Gurni A. A. 2011 a. Dinámica de polifenoles de «cedrón» (*Aloysia citrodora* Palau -Verbenaceae-) en relación al desarrollo foliar. *Boletín Latinoamericano del Caribe Plantas Medicinales y Aromáticas* 10: 67-74.
- Ricco R. A., Agudelo I. J., Garcés M., Evelson P., Wagner M. L., Gurni A. A. 2011 b. Polifenoles y actividad antioxidante en *Equisetum giganteum* L. (Equisetaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10: 325-332.
- Riipi M., Ossipov V., Lempa K., Haukioja E., Koricheva J., Ossipova S., Pihlaja K. 2002. Seasonal changes in birch leaf chemistry: are there trade-offs between leaf growth and accumulation of phenolics? *Oecology* 130: 380-390.
- Rugna A., Ricco R., Gurni A., Wagner M. 2008. Variaciones en el contenido de los polifenoles foliares en *Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae- según su grado de desarrollo. *Latin American Journal of Pharmacy* 27: 247 - 249.
- Rugna A. Z., Ricco R. A., Gurni A. A., Wagner M. L. 2011. *Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae-: variaciones en la producción de polifenoles en hojas sanas y atacadas por la oruga de la mariposa *Agraulis vanillae* L. -Heliconidae-. *Dominiquezia* 27: 27-33.
- Shohael A. M., Ali M. B., Yu K. W., Hahn E. J., Paek K. Y. 2006. Effect of temperature on secondary metabolites production and antioxidant enzyme activities in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85: 219-228.

- Treutter D. 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letter* 4: 147-157.
- Vukics V., Guttman A. 2010. Structural characterization of flavonoids glycosides by multi-stage mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 29: 1-16.
- Wagner H., Blatt S. 1996. *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Second edition.* Springer-Verlag. Berlin, Germany, pp. 384.
- Waterman P. G., Mckey D. B. 1989. Herbivory and secondary compounds in rain forest plants. En: H. Lieth y M.J. A. Werger (editores), «Tropical rain forest ecosystems». Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 513-536.
- Waterman P. G., Mole S. 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 66-103.
- Woisky R. G., Salatino A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* 37: 99-105.
- Yoo K. M., Lee C. H., Lee H. G., Moon B. K., Lee C. Y. 2008. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry* 106: 929-936.