

CARACTERIZACIÓN DE FENOLES DE *Fouquieria splendens*, *Dodonaea viscosa* y *Physalis angulata* POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS: RESULTADOS PRELIMINARES

Hugo Manuel Monreal-García, José Antonio Ávila-Reyes, Eli Amanda Delgado-Alvarado, Marcos Cobaleda-Velasco, Ruth Elizabeth Alanís-Bañuelos, José Roberto Medina-Medrano, René Torres-Ricario, Alfonso Reyes-Martínez

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional
Sigma 119, Fraccionamiento 20 de Noviembre II, Durango, Durango, México, 34220
Tel/Fax: 618 8142091
Correo electrónico: hugomonreal@hotmail.com

RESUMEN

Se prepararon extractos etanólicos para obtener compuestos fenólicos de tejidos foliares de *Fouquieria splendens*, *Dodonaea viscosa* y *Physalis angulata*. Los resultados de los análisis de cromatografía preparativa en papel (PC) y de cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) revelaron que los principales compuestos fenólicos presentes en las hojas de *Fouquieria splendens* fueron flavonoles y ácidos fenólicos; los de *Dodonaea viscosa* fueron ácidos fenólicos, dihidroflavonoides, flavonas, y derivados glicósidos de los flavonoles quercetina y canferol; y los de *Physalis angulata* fueron ácidos fenólicos y derivados glicósidos de quercetina y canferol. Ya que tanto los ácidos fenólicos como los derivados de quercetina han sido reportados como compuestos antioxidantes, los resultados del presente trabajo sugieren que las tres especies pueden ser fuente importante de antioxidantes naturales.

PALABRAS CLAVE: Compuestos fenólicos, cromatografía, HPLC.

ABSTRACT

Ethanol extracts were prepared to obtain phenolic compounds from foliar tissues of *Fouquieria splendens*, *Dodonaea viscosa* and *Physalis angulata*. Results of paper chromatography and HPLC-DAD revealed that the major phenolic compounds found in the leaves of *Fouquieria splendens* were flavonols and phenolic acids; in *Dodonaea viscosa*, phenolic acids, dihydroflavonoids, flavones, and glycosides of the flavonols quercetin and kaempferol; and in *Physalis angulata*, phenolic acids and glycosides of quercetin and kaempferol. As phenolic acids and quercetin derivatives have been reported as antioxidant compounds, the results of the present study suggest that those three species can be regarded as important sources of natural antioxidants.

KEY WORDS: Phenolic compounds, chromatography, HPLC.

INTRODUCCIÓN

México es uno de los países que cuentan con mayor diversidad de especies vegetales en el mundo. En el territorio nacional según Rzedowski (1991) existen 220 familias, 2410 géneros y 22000 especies, aproximadamente. Esa diversidad representa entre el 10 y 12% del total mundial (CONABIO-CONANP-SEMARNAT, 2008).

El estado de Durango cuenta con condiciones fisiográficas y ecológicas muy variadas, lo cual se traduce en una alta diversidad paisajística, riqueza biológica, y abundancia de recursos naturales (Periódico Oficial del Gobierno Constitucional del Estado de Durango, 2009), gracias a esas características se puede encontrar gran cantidad de especies vegetales, entre ellas *Physalis angulata*, *Fouquieria splendens* y *Dodonaea viscosa*, estas especies se caracterizan por contener compuestos derivados del metabolismo secundario, entre ellos compuestos fenólicos, que cuentan con propiedades medicinales (Rzedowski, 2001, citado por Juan-Pérez, 2009; Vines, 1960, citado por Ladyman, 2004; Bastos *et al.*, 2006).

Ávalos y Pérez-Urria (2011) definen a los fenoles vegetales como los metabolitos secundarios que contienen en su estructura el grupo fenol, que es un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Esos compuestos son sintetizados y acumulados en las plantas en gran número y variedad, hasta la fecha se han identificado aproximadamente 8000 compuestos. Los compuestos fenólicos también son llamados polifenoles o fenilpropanoides (Harborne, 1989, citado por Almaraz *et al.*, 2006), participan en diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente. Están relacionados con el color, el sabor, el olor, y propiedades nutritivas y antioxidantes de las plantas (Paladino, 2001). Los fenoles vegetales se clasifican de acuerdo al número de anillos fenólicos que poseen y de los grupos funcionales que contienen. Los principales grupos son los ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones *et al.*, 2012).

Dos rutas básicas participan en la síntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico. La ruta de ácido siquímico se lleva a cabo a partir de la eritrosa-4-P (E4P) y el ácido fosfoenolpirúvico (PEP). A partir del ácido siquímico se derivan otros compuestos, como los aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptófano y tirosina. Gran parte de los compuestos fenólicos se derivan de la fenilalanina (Ávalos y Pérez-Urria, 2011).

Entre los compuestos fenólicos, los flavonoides son el grupo más abundante en el reino vegetal, éstos cuentan en su estructura con 15 carbonos y dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos; se clasifican con base en el grado de oxidación de ese puente, entre los principales se encuentran las antocianinas, flavonas, flavonoles e isoflavonas, cuyas principales funciones son la defensa y la pigmentación (Ávalos y Pérez-Urria, 2011).

Los flavonoides cuentan con propiedades antioxidantes importantes, ya que ayudan a disminuir la degradación oxidativa de los lípidos, previniendo así el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (Bedascarrasbure *et al.*, 2004).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar parcialmente los fenoles foliares de *Physalis angulata*, *Fouquieria splendens* y *Dodonaea viscosa*, mediante cromatografía preparativa en papel y por HPLC-DAD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En la Tabla 1 se muestra los sitios de colecta de tejido foliar de las tres especies analizadas. Ejemplares de referencia se colectaron para cada una y se depositaron en el Herbario CIIDIR.

Tabla 1 . Lugares de colecta de las especies del presente estudio.

Num. de ref.	Especie	Latitud N	Longitud O	Altitud (msnm)	Localidad	Fecha de colecta
1	<i>Fouquieria splendens</i>	24° 47' 25.4"	103° 44' 30.9"	1792	Carretera Durango-Torreón Km 1.7	Junio de 2012
2	<i>Dodonaea viscosa</i>	24° 07' 16.5"	104° 45' 00.1"	1969	San Vicente Chupaderos, Durango.	Septiembre de 2013
3	<i>Physalis angulata</i>	28° 08' 15.4"	104° 31' 58.5 "	1864	Autopista Durango-Torreón kilómetro 15, Camino a Málaga.	Agosto de 2012

Las hojas se secaron durante tres días, se pulverizaron y almacenaron en bolsas de plástico en obscuridad y a temperatura ambiente hasta su uso.

Análisis cromatográfico

Se prepararon, de manera independiente, extractos etanólicos al 80% (v/v), dejando macerar durante 24 hrs. Los extractos se centrifugaron (8,000 rpm, durante 10 min, a temperatura ambiente) y se recuperaron los sobrenadantes. Las pastillas se reextractaron con etanol al 20% (v/v) bajo las condiciones descritas. Los dos sobrenadantes de una misma muestra se combinaron para formar el extracto crudo. Cada extracto crudo se analizó con cromatografía preparativa en papel, de acuerdo a Markham (1982), utilizando papel Whatman número 3 como fase estacionaria y como fase móvil ácido acético- agua al 15% (v/v). Los compuestos separados se visualizaron bajo luz ultravioleta (254 nm). Para obtener información estructural, los compuestos resueltos se sometieron a vapores de amonio y se registró el viraje de color. El factor de retención (Rf) de cada compuesto fue estimado. La información estructural se obtuvo por comparación de los valores de Rf y de color bajo luz UV, antes y después de la exposición a vapores de amoniaco de cada compuesto, con los datos compilados por Mabry *et al.* (1970).

Alícuotas (100 μ L) de cada extracto crudo fueron analizadas en un HPLC-DAD marca Perkin Elmer Series 200, de acuerdo a un método en gradiente (Campos y Markham, 2007), usando una columna Perkin Elmer Brownlee Analytical C18 (4.6 x 250 mm, 5 μ m). Los espectros de cada compuesto se registraron entre 200 y 400 nm, usando un DAD Perkin Elmer Series 200. Información estructural fue obtenida por comparación de los tiempos de retención (TR) y espectros UV de cada compuesto resuelto en los cromatogramas con los datos compilados por Campos y Markham (2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La importancia de identificar compuestos fenólicos en especies vegetales es sustancial ya que una correcta identificación ayuda a sugerir aplicaciones de las especies estudiadas. Además la presencia de esos compuestos puede servir como indicador del ataque de algún agente patógeno, dado que éstos son secretados como mecanismo de defensa, incluyendo también defensa contra estrés por diferentes factores (Muñoz Jáuregui *et al.*, 2007).

En las hojas de *Fouquieria splendens* se encontraron siete compuestos, los colores encontrados por PC fueron morado fuerte (F1), morado claro (F2), café claro (F8), verde claro (F10), café fuerte (F9), azul (F5), y amarillo (F4); para las hojas de *Physalis angulata* se encontraron ocho compuestos, los colores encontrados fueron café claro (P8), azul (P5), naranja claro (P12), amarillo (P4), naranja fuerte (P6), café fuerte (P9), morado claro (P2), y morado fuerte (P1); y para *Dodonaea viscosa* se encontraron siete compuestos, los colores encontrados fueron: café claro (D8), amarillo (D4), azul (D5), café fuerte (D9), verde-azul (D11), verde (D3), y morado claro (D2). Se consideraron sólo los compuestos (colores) más representativos y se calculó el valor de Rf para cada uno: F2 (0.1345), F8 (0.7703), F10 (0.4596), P5 (0.8560), P8 (0.8073), P12 (0.5536), D4 (0.9725), y D8 (0.3175). La gama amplia de valores de Rf (0.134 a 0.9725) indicó que esos compuestos presentan polaridades variables. En cuanto al viraje de color, de acuerdo a la información reportada por Mabry *et al.* (1970), se observó que el cambio más común fue de café claro a verde-amarillo fluorescente, lo que indicó la presencia de posibles flavonas y flavanonas que carecen de 5-OH libre, o de flavonoles que carecen de 5-OH libre, con 3-OH sustituido.

Los cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD de los extractos de *Dodonaea viscosa* y *Physalis angulata* se muestran en las Figuras 1 y 2, respectivamente. De acuerdo a la comparación de las características espectrales de los principales compuestos resueltos con la información publicada por Campos y Markham (2007), en *D. viscosa* se encontraron dos ácidos fenólicos (compuesto 6 y 8), un dihidroflavonoide (compuesto 14), una flavona (compuesto 18), cuatro derivados glicósidos de quercetina (compuestos 10, 11, 12, 13), y un derivado glicósido de canferol (compuesto 16); y en *Physalis angulata*, se encontró un ácido fenólico (compuesto 3), dos derivados glicósidos de quercetina (compuestos 2 y 8), y cuatro derivados glicósidos de canferol (compuestos 4, 6, 10, y 11). Las características espectrales de los compuestos se presentan en las Tablas 2 y 3.

Los cromatogramas correspondientes a *Fouquieria splendens* están siendo actualmente analizados, las evidencias sugieren que flavonoles y ácidos fenólicos se encuentran entre los compuestos resueltos (datos no presentados).

La diversidad de compuestos fenólicos en las hojas de cualquiera de las tres especies analizadas fue relativamente compleja, menos que la reportada por Falleh *et al.* (2011) para las hojas de *Mesembryanthemum edule* (17 compuestos), una especie medicinal utilizada en Túnez, pero más alta que la reportada por Almaraz-Abarca *et al.* (2009) para las hojas de *Agave asperrima* (tres derivados glicósidos de canferol), una especie de zonas áridas.

CONCLUSIONES

Los perfiles fenólicos de las hojas de *Physalis angulata*, *Fouquieria splendens* y *Dodonaea viscosa* son relativamente complejos en número y diversidad de compuestos. La presencia de ácidos fenólicos y derivados de quercetina indica que esas especies son fuentes importantes de compuestos con actividad biológica relevante.

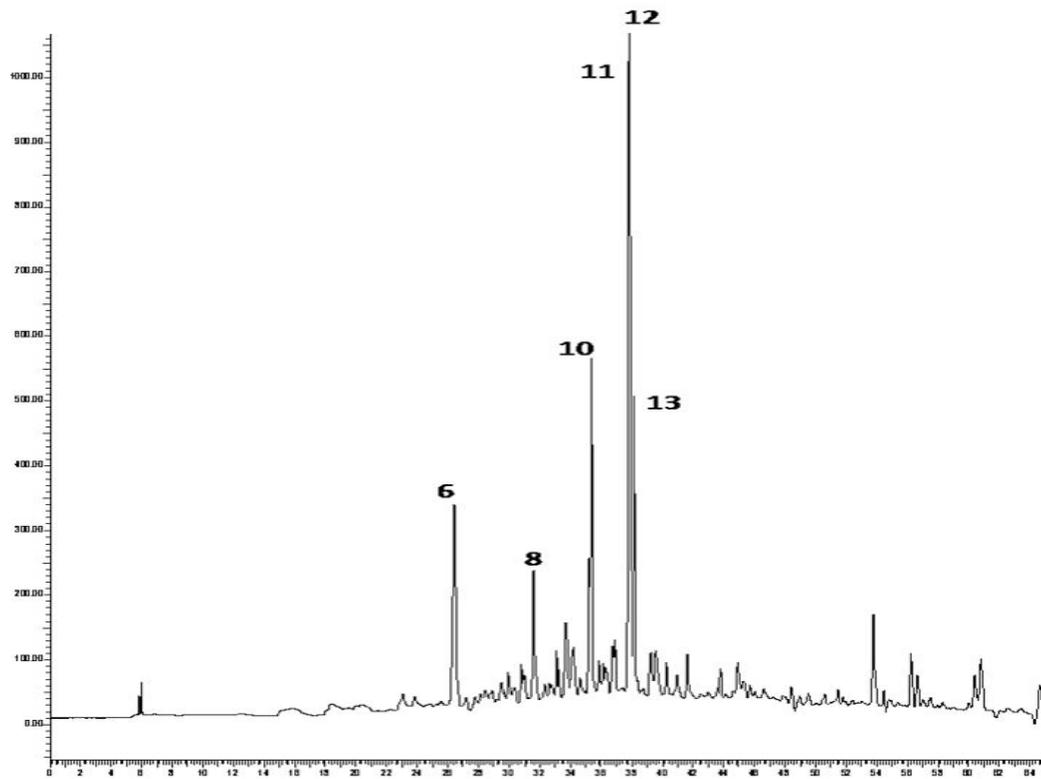


Figura 1 . Cromatograma obtenido por HPLC-DAD del extracto etanólico de tejido foliar de *Dodonaea viscosa*

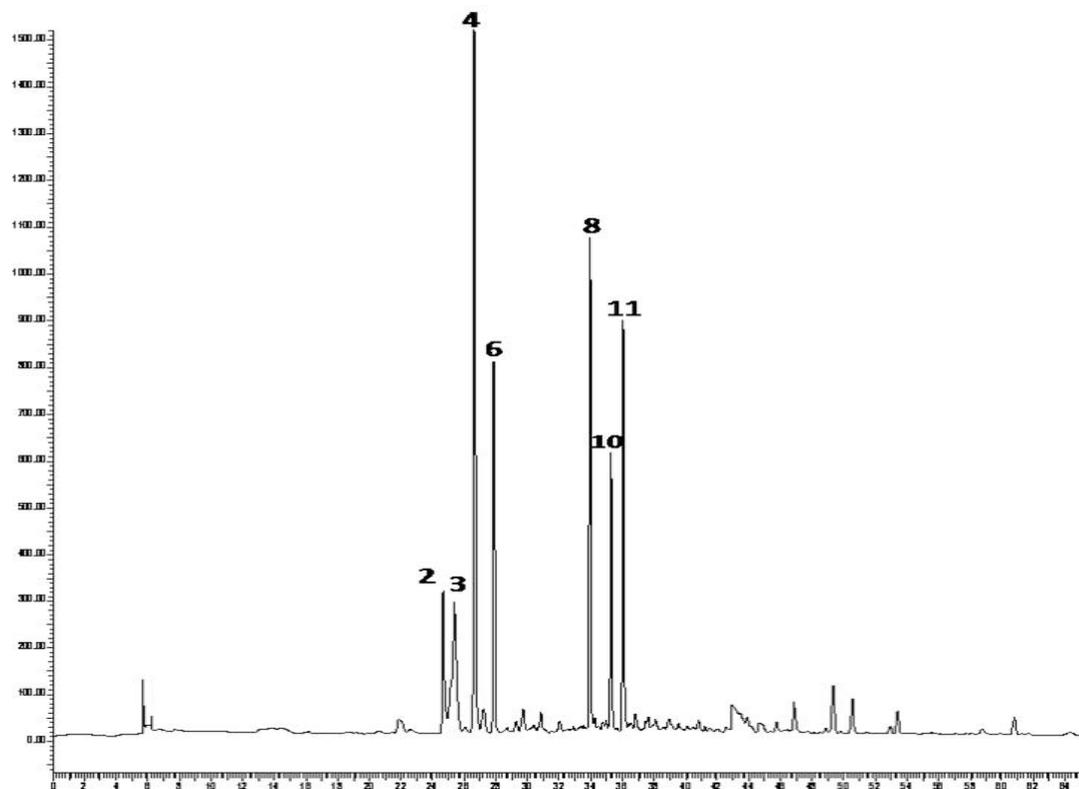


Figura 2 . Cromatograma obtenido por HPLC-DAD del extracto etanólico de tejido foliar de *Physalis angulata*.



Tabla 2 . Datos cromatográficos y espectrales de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de *Dodonaea viscosa*.

Núm. de compuesto	RT (min)	λ max	Tipo de compuesto
6	26.374	239.16sh, 297.20, 324.73 nm	Ácido fenólico
8	31.581	280.36 nm	Ácido fenólico
10	35.399	255.23, 266.16sh, 293.59sh, 354.98 nm	Quercetina-3- <i>O</i> -glicósido
11	37.797	254.09, 266.72sh, 292.95sh, 355.12 nm	Quercetina-3- <i>O</i> -glicósido
12	37.873	253.94, 267sh, 294.43sh, 355.33 nm	Quercetina-3- <i>O</i> -glicósido
13	38.166	255.54, 266.72sh, 293.43sh, 355.61 nm	Quercetina-3- <i>O</i> -glicósido
14	53.801	289, 326.25sh nm	Dihidroflavonoide
16	56.265	265.95, 289.74sh, 320.97sh, 348.93 nm	Canferol-3- <i>O</i> -glicósido
18	60.401	278.13, 336.71sh nm	Flavona

Tabla 3 . Datos cromatográficos y espectrales de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de *Physalis angulata*.

Núm. de compuesto	RT (min)	λ máx	Tipo de compuesto
2	24.732	255.70, 267sh, 254.26 nm	Quercetina-3- <i>O</i> -glicósido
3	25.421	224.47sh, 270.09sh, 311.38 nm	Ácido fenólico
4	26.58	265.32, 322.46sh, 348.34 nm	Canferol-3- <i>O</i> -glicósido
6	27.929	265.88, 321.07sh, 346.56 nm	Canferol-3- <i>O</i> -glicósido
8	33.986	255.43, 266.58sh, 294.45sh, 355.20 nm	Quercetina-3- <i>O</i> -glicósido
10	35.277	265.36, 292.16sh, 323.16sh, 346.25 nm	Canferol-3- <i>O</i> -glicósido
11	36.04	265.53, 293.78sh, 320.25sh, 346.73 nm	Canferol-3- <i>O</i> -glicósido

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almaraz-Abarca, N., J. A. Ávila-Reyes, E. A. Delgado-Alvarado, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera-Corral. 2006. El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto. *Vid Supra* 1: 39-49.
- Almaraz-Abarca, N., E. A. Delgado-Alvarado, V. Hernández-Vargas, M. Ortega-Chávez, G. Orea-Lara, A. Cifuentes-Díaz de León, J. A. Ávila-Reyes, R. Muñoz-Martínez. 2009. Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of *Agave durangensis* Gentry (Agavaceae). *American Journal of Applied Sciences* 6: 1076-1085.
- Ávalos, G. A., C. E. Pérez-Urria. 2011. Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA (Biología)* 2: 119-145.
- Bastos, G. N. T., A. R. S. Santos, V. M. M. Ferreira, A. M. R. Costa, C. I. Bispo, A. J. A. Silveira, J. L. M. Do Nascimento. 2006. Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. *Journal of Ethnopharmacology* 103: 241-245.
- Bedascarrasbure, E., L. Maldonado, A. Álvarez, E. Rodríguez. 2004. Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 23: 369-372.

- Campos, M. G., K. R. Markham. 2007. Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra – flavone, flavonols and phenolic acids. Coimbra University Press. Portugal.
- CONABIO-CONANP-SEMARNAT. 2008. Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal: Objetivos y Metas. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Falleh, H., R. Ksouri, F. Medini, S. Guyot, C. Abdelly, C. Magné. 2011. Antioxidant activity and phenolic composition of the medicinal and edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L. *Industrial Crops and Products* 34: 1066-1071.
- Juan-Pérez, J. I. 2009. Función e importancia económica del recurso Chapulixtle (*Dodonaea viscosa*) en un ejido del subtropico mexicano. *Observatorio Iberoamericano del Desarrollo Local y la Economía Social* 7: Recuperado el 20 de Noviembre de 2013, de <http://www.eumed.net/rev/oidles/14/multiproposito.pdf>.
- Ladyman, J. A. 2004. *Fouquieria splendens* Engelm. Fouquieriaceae. En: *Wildland shrubs of the United States and its territories: thamnisc descriptions* Vol. 1 (Ed: Francis, J. K). USDA-Forest Service-International Institute of Tropical Forestry San Juan, PR. USA, pp. 347-349.
- Mabry, T. J., K. R. Markham, M. B. Thomas. 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag. New York.
- Markham, K. R. 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press. London.
- Muñoz Jáuregui, A. M., D. F. Ramos-Escudero, C. Alvarado-Ortiz Ureta, B. Castañeda Castañeda. 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 73: 142-149.
- Paladino, S. C. 2001. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L.). Tesis de maestría. Universidades Nacionales del Cuyo La Rioja, San Juan y San Luis. Sede Mendoza, Facultad de Ciencias Agrarias-Unicuyo. Extraído el 14 de Abril del 2014 desde: http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/2627/tesispaladino.pdf.
- Periódico Oficial del Gobierno Constitucional del Estado de Durango. 2009. Programa de ordenamiento ecológico del Estado de Durango. Número 5, Página Dos. México. Extraído el 14 de Abril del 2014 desde: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Estatal/DURANGO/Programas/DGOPROG01.pdf>
- Quiñones, M., M. Miguely, A. Aleixandre, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria* 27: 76-89.
- Rzedowski, J. 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana* 14: 3-21

