

CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES EN HOJAS DE UN CLON DE *Uncaria tomentosa* (WILLD. EX SCHULT) D.C., PROVENIENTE DE TRES LOCALIDADES DE LA REGIÓN UCAYALI

Ruth S. Romero^a, Gilberto Domínguez^a, Deysi R. Guzmán^a

RESUMEN

Uña de gato (*Uncaria tomentosa* Willd. ex D.C.), de la familia Rubiaceae, es un arbusto que en el bosque toma forma de liana y del cual se utiliza, tradicional y comercialmente la corteza, debido a su actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, inmunoestimulante, antioxidante, etc. Se ha realizado diversos estudios sobre la composición química, principalmente en corteza, abundando los estudios en el grupo de los alcaloides. El objetivo de la presente investigación se centra en la cuantificación de polifenoles totales presentes en las hojas, para lo cual se tuvo como material de estudio plantas de un mismo clon establecido en tres localidades de la región de Ucayali, Perú, con condiciones edafoclimáticas diferentes.

Las muestras de hojas se recolectaron en noviembre de 2009, en las localidades de Tres de Octubre, El Porvenir y Nuevo Ucayali, de las provincias de Padre Abad y Coronel Portillo. Previo tratamiento post cosecha, se obtuvo un extracto por el método de percolación utilizando como solventes soluciones hidroalcohólicas en una relación 1:25 de hojas y solvente. Los extractos obtenidos fueron sometidos a pruebas cualitativas (marcha fitoquímica), en las que se detectaron metabolitos como alcaloides, compuestos grasos, flavonoides, azúcares, taninos condensados y saponinas, y también pruebas cuantitativas que permitieron determinar el contenido de polifenoles en el extracto y de taninos condensados presentes en las muestras.

Palabras clave: *Uncaria tomentosa*, uña de gato, Rubiaceae, polifenoles totales, taninos condensados.

QUANTIFICATION OF POLYPHENOLS IN LEAVES OF CAT'S CLAW *Uncaria tomentosa* (WILLD. EX SCHULT) D.C. FROM THREE LOCATIONS IN UCAYALI

ABSTRACT

Cat's claw (*Uncaria tomentosa* Willd. ex D.C.), Rubiaceae family, is a vine which is used, traditional and commercially, the crust in several towns in the Peruvian Amazon and other parts of South America: because of their actions antiinflammatory, antimicrobial, immunostimulatory, antioxidant, etc.

This study aimed to quantify total polyphenols present in the leaves of "cat's claw" *Uncaria tomentosa* from the same clone set in three locations from Ucayali.

The botanical material was collected in November 2009, in Tres de Octubre, El Porvenir and Nuevo Ucayali, covering the districts of Padre Abad Province Irazola and Coronel Portillo, Ucayali department. With the leaf samples was extracted by percolation method using as solvent an alcohol solution in a 1:25 ratio and solvent leaves. The extracts obtained were

^a Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias Forestales. Lima, Perú.
gdominguez@lamolina.edu.pe deysigl@lamolina.edu.pe

subjected to qualitative tests (phytochemical), which were detected as metabolites: alkaloids, fatty compounds, flavonoids, sugars, condensed tannins and saponins, and allowed to determine the quantitative content of polyphenols in the extract and the percentage condensed tannins present in the samples.

Key words: *Uncaria tomentosa*, cat's claw, Rubiaceae, polyphenols, condensed tannins.

INTRODUCCIÓN

El género *Uncaria* es una fuente importante de productos naturales medicinales, particularmente por el contenido de alcaloides y triterpenos. Durante los últimos 20 años, diversos alcaloides, triterpenos, glicósidos de ácido quinóico, flavonoides y cumarinas, han sido aislados de este género. La especie identificada con un mayor número de componentes químicos es la “uña de gato” *Uncaria tomentosa* de Perú^{1,2}

Uncaria tomentosa (Willd.) D.C., ha sido parte de diversas investigaciones en centros especializados de Austria (Universidad de Graz, Innsbruck), Alemania (Instituto de Biología Farmacéutica de la Universidad de Munich), Italia (universidades de Nápoles, Salerno, Pavia, Milan), Perú (Universidad Peruana Cayetano Heredia, Universidad Nacional Mayor de San Marcos) y en la Universidad Nacional Agraria La Molina, Universidad de Ucayali, Pontificia Universidad Católica del Perú y Universidad Agraria de la Selva (con énfasis en aspectos agronómicos), entre otras. De acuerdo a investigaciones se ha determinado que esta especie posee propiedades de tipo antiinflamatorio, inmunoestimulante, antioxidante, antimutágena y antiviral.

Aunque los principales compuestos activos, como los alcaloides, han sido estudiados mayormente en la corteza de *Uncaria*, estos pueden también estar presentes en diferentes partes de la planta³. Sin embargo, las propiedades de la uña de gato no se debe exclusivamente a la presencia de alcaloides; existen otros metabolitos secundarios que en conjunto presentan una acción sinérgica, las cuales, como los polifenoles, tienen efectos benéficos sobre el organismo humano. Estos compuestos constituyen un grupo químico importante y se encuentran presentes en muchas plantas medicinales; no necesariamente son esenciales para el metabolismo de la planta pero son sintetizados como mecanismos de defensa contra los predadores⁴, adaptación de la misma y contra la prevención de daños oxidativos⁵. Por ello, se enfatiza en la importancia del estudio de los diferentes compuestos existentes y no en el aislamiento de un solo tipo de metabolito.

Partiendo de esta hipótesis, en el marco del proyecto FINCyT - Pibap 023-2009 “Estandarización de un extracto seco purificado a partir de hojas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. con fines de formulación farmacológica”, desarrollado en la Universidad Nacional Agraria La Molina, se realizó el estudio en hojas de *Uncaria tomentosa* Willd. ex. Schult D.C. proveniente de plantaciones experimentales de un mismo clon producido *in vitro* y establecidos en tres localidades del departamento de Ucayali, que presentan condiciones de hábitat diferentes. El objetivo del estudio es determinar metabolitos secundarios, cuantificándolos y estableciendo las diferencias en el contenido de poli-fenoles de las hojas con la finalidad de contribuir al conocimiento fitoquímico y su variabilidad en las tres procedencias trabajadas.

PARTE EXPERIMENTAL

Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Transformación Química de la Madera de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Materiales reactivos y equipos

Muestra

Las muestras provienen de plantaciones experimentales a campo abierto de un mismo clon de *Uncaria tomentosa*, ubicadas entre los kilómetros 98 y 203 de la Carretera Federico Basadre (Pucallpa - Lima) en las localidades de: Tres de Octubre, El Porvenir y Nuevo Ucayali, pertenecientes a la cuenca del río Aguaytía, región Ucayali.

Reactivos

Ácido clorhídrico concentrado, butanol (grado reactivo), etanol 96°, acetona p.a, reactivo de Folin Ciocalteu (Merck), solución de carbonato de sodio (20%), cinta de magnesio, tricloruro férrico, cloruro de sodio sólido p.a, hidróxido de sodio sólido p.a., patrón de ácido tánico (Chromadex), se utilizó agua ultrapura para todos los experimentos.

Equipos

Hornillas eléctricas (Herhardt), mufla modelo Furnace 48000 (Thermolyne), balanza (SAUTER) de 0,01 g de precisión, balanza analítica (OHAUS) de 0,0001 mg de precisión, estufa de 0° - 115° C. modelo KT500 (Heraus), agitador orbital de 0 a 500 revoluciones/min. (IKA LABORTECHNIK), rotavapor modelo R-210 (BUCHI), espectrofotómetro UV – Vis modelo Helios ã (Thermo electron Corporation).

Métodos de análisis

Ensayos físicos a las hojas de *Uncaria tomentosa* Humedad gravimétrica

Se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la NRSP 309, norma cubana⁶. Este ensayo se realiza por el método gravimétrico cuando la droga cruda no contiene sustancias volátiles.

Cenizas totales

Se realizó el ensayo señalado para: métodos de ensayo en droga cruda para medicamentos de origen vegetal NRSP 309 Ministerio de Salud Pública de Cuba.

Solubilidad

Consiste en determinar el grado de alcohol del cual los diferentes metabolitos secundarios son más solubles, y el procedimiento está descrito en la norma NRSP – 309. Se hizo una prueba de solubilidad para cada muestra de hojas, con cuatro proporciones diferentes de solvente (agua: etanol) etanol al 30%, etanol al 50%, etanol al 70% y agua. Lo cual indica diferentes grados de polaridad del solvente⁶.

Obtención de los extractos

Se utilizó el método de re-percolación que consiste en pasar el solvente a través de la muestra vegetal hasta agotamiento de la muestra. El solvente utilizado para las hojas de *Uncaria tomentosa* fue una solución hidroalcohólica, cuyo porcentaje varía de acuerdo a la solubilidad previamente determinada, para cada una de las muestras; se humedeció la muestra vegetal, para aumentar el contacto con el solvente facilitando el paso del mismo y no permitiendo la formación de falsas vías, que perjudiquen la eficiencia; el humedecimiento se debe realizar fuera del percolador ya que la muestra podría hincharse excesivamente y comprimirse en las paredes del percolador obstaculizando el paso del solvente; seguidamente se dejó reposar por 24 horas, se colectó el primer extracto para luego pasarlo al siguiente percolador, y al primer percolador se le añadió solvente puro, el mismo volumen usado la primera vez y se dejó reposar otras 24 horas. Se realizó el mismo procedimiento para los cinco percoladores colectándose el extracto enriquecido después de seis días.

Caracterización del extracto

Se evaluó los parámetros de pH, densidad relativa, sólidos totales, polisacáridos totales.

Análisis fitoquímico

Una vez identificado el grado de alcohol en el que los metabolitos son más solubles mediante el ensayo de solubilidad, se enumeró 12 tubos de ensayo, uno para cada prueba, y en cada uno se colocó aproximadamente 1 mL del extracto obtenido; luego, se procedió a la identificación de los mismos mediante los diferentes ensayos fitoquímicos, usando los siguientes reactivos: Dragendorff (alcaloides), Mayer (alcaloides), Wagner (alcaloides), Bornträger (quinonas), Sudán (compuestos grasos), Fehling (azúcares reductores), ensayo de la espuma (saponinas), tricloruro férrico - FeCl₃ (compuestos fenólicos: taninos), Shinoda (flavonoides), Reactivo de Kedde, gelatina, reactivo de Legal.

Cuantificación de polifenoles totales mediante el método espectrofotométrico⁷

Determinación de la curva estándar

Sustancia de referencia: se utilizó ácido tánico p.a, del cual se pesó con precisión 0,5 mg de ácido tánico, se transfirió a una fiola de 500 mL y se completó el volumen con agua destilada.

Blanco: Se añaden 5 mL de agua destilada a un matraz aforado de 25 mL.

Muestra: Se midió exactamente 2 mL del extracto y fue transferido a una fiola de 100 mL, diluyendo con agua destilada hasta enrase.

Desarrollo de color

A cada matraz aforado de 25 mL, con las respectivas muestras, patrones (soluciones de ácido tánico de concentración 0 a 10 ppm, en intervalos de 2ppm) y blanco, se le añadió 2 mL de solución Folin Ciocalteu, se agitó y se dejó reposar durante 5 min. Luego se añadió 1 mL de solución de carbonato de sodio al 20 %, se agitó, enrasó con agua destilada y homogenizó. Se procedió a leer la absorbancia de dichas soluciones a 760 nm después de transcurridos 2 minutos y los resultados se expresan en μg equivalentes de ácido tánico/g muestra.

Cuantificación de taninos condensados mediante el método Número de Stiasny⁸

Se agregó 10mL de formaldehído al 37% y 5 mL de ácido clorhídrico concentrado a 50 mL del extracto. Esta mezcla se llevó a ebullición a reflujo durante 30 minutos; el precipitado formado se separó en papel filtro utilizando una bomba de vacío y se lavó con agua caliente para eliminar el ácido; luego se procedió a llevar a sequedad en la estufa y pesar; previamente se determinó la cantidad de sólidos totales en 50 mL del extracto, evaporándolos a sequedad y pesando.

El Número de Stiasny es la relación entre el precipitado formado respecto a los sólidos totales y corresponde al porcentaje de taninos condensados en el extracto. Este porcentaje se calcula multiplicando este número en fracción por el rendimiento en sólidos obtenidos en cada extracto.

$$\text{Número de Stiasny} = (\text{pp} \cdot 100) / \text{pr}$$

$$\text{tc} = (\text{ns} \cdot \text{et}) / 100$$

Donde:

pp: peso del precipitado (g)

pr: peso del residuo de 50 mL de extracto (g)

tc: porcentaje de taninos condensados

ns: N° Stiasny

et: Porcentaje del extracto total

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos físicos

Humedad gravimétrica

Los valores de humedad aceptados por la Farmacopea Europea para drogas vegetales tienen como límite superior 12% de contenido de humedad; por lo tanto los valores hallados en las muestras son los adecuados para trabajar los posteriores análisis (tabla 1).

Tabla 1. Contenido de humedad gravimétrica en hojas de *Uncaria tomentosa*

Localidad	Muestra	Humedad (%)	Humedad promedio (%)	Desviación estándar
Tres de Octubre	S1	109,944	112,110	0,4256
	S2	109,372		
	S3	117,013		
El Porvenir	S1	101,927	108,132	0,8434
	S2	104,732		
	S3	117,735		
Nuevo Ucayali	S1	96,423	99,083	0,2306
	S2	100,319		
	S3	100,508		

Contenido de cenizas totales

En las drogas vegetales, según la Real Farmacopea Española, los valores permitidos oscilan entre 5-24%, pero los valores más frecuentes están entre 8-10%; según esto, los porcentajes de cenizas encontrados en *Uncaria tomentosa*, para los tres lugares, se encontrarían dentro de los límites normales para drogas vegetales (tabla 2).

Tabla 2. Contenido de cenizas totales en *Uncaria tomentosa*

Localidad	Muestra	% Cenizas	Promedio cenizas (%)	Desv. estándar
Tres de Octubre	S1	38,025	30,213	18,666
	S2	0,8911		
	S3	43,704		
El Porvenir	S1	10,774	17,866	0,7246
	S2	25,257		
	S3	17,568		
Nuevo Ucayali	S1	41,309	42,295	0,1208
	S2	41,933		
	S3	43,643		

Grado de solubilidad

El grado alcohólico, donde se concentra la mayor cantidad de sólidos, fue variable entre las muestras, de acuerdo a la procedencia (tabla 3). Por tanto, cada extracto realizado posee diferente solubilidad; esto probablemente se deba a la variación en la cantidad de metabolitos presentes en las hojas; un grado de solubilidad alto podría deberse a un mayor contenido de compuestos extraíbles y de características similares al solvente de extracción.

Tabla 3. Resultados del ensayo de solubilidad

Localidad	% Solubilidad
Nuevo Ucayali	70
El Porvenir	50
Tres de Octubre	30

Análisis fitoquímico: (tabla 4)

Tabla 4. Tamizaje fitoquímico en extractos de hojas de *Uncaria tomentosa*

Ensayo	Tres de Octubre	El Porvenir	Nuevo Ucayali
Dragendorff	+	+	+++
Mayer	++	++	++
Wagner	-	-	-
Bornträger	++	+	+
Sudán	+	+	+
Fehling	++	+	++
Espuma	++	+	+
Cloruro Férrico Shinoda	++	++	++
Kedde	++	+	+++
Gelatina	+++	++	++
Legal	+	-	-

Leyenda: +++ Reacción muy evidente ++ Reacción evidente
 + Reacción poco evidente pero aceptable - No hubo reacción

Cuantificación de los polifenoles totales

Se obtuvo para la localidad de Tres de Octubre 2,24 ppm; para El Porvenir 3,99 ppm, y para Nuevo Ucayali 6,47 ppm, expresado como ácido tánico. De acuerdo a los resultados obtenidos, la localidad de Nuevo Ucayali es la que presenta mayor concentración. Se puede

significar que las hojas de uña de gato tienen actividad antiinflamatoria^{1,9,10} mayor con respecto a la corteza y podría deberse a la diferente concentración y composición química de las mismas, especialmente a la presencia de los flavonoides que conforman el gran grupo de los polifenoles.

Linealidad del método de cuantificación (tabla 5):

Tabla 5. Test de linealidad para el ácido tánico

X (ppm)	Y(abs)	F(y/x)		
0	0,011	0,000	Desviación estándar	3,742
2	0,132	0,066	Promedio	5,000
4	0,234	0,059	Coefficiente de correlación	0,994
6	0,338	0,056	Ecuación de la recta	Y=0,034+0,046X
8	0,406	0,051	c.v.f	0,75 %
10	0,476	0,048	Criterio c.v.f	< 5%

c.v.f: coeficiente de variación para el factor de respuesta f

La curva de calibración para la cuantificación de polifenoles totales en los rangos de concentración conocidos, responden a la ecuación: $Y=0,034+0,046X$ y tienen un coeficiente de correlación de 0,994. Los factores respuesta en la muestra se mostraron variables de acuerdo a su procedencia. Además, el gráfico “absorbancia versus concentración” de ácido tánico muestra linealidad en la curva de calibración (figura 1).

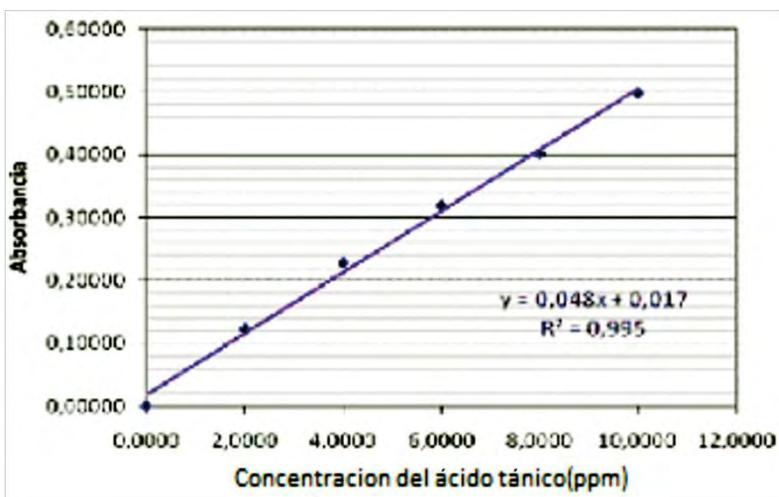


Figura 1. Linealidad para el ácido tánico

Cuantificación de los taninos condensados

Se obtuvo para la localidad de Nuevo Ucayali 31,84%, mientras que para la localidad El Porvenir fue 30,51% y para la localidad de Tres de Octubre 26,26% de taninos condensados como observamos en la tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje de taninos condensados

Localidad	Rendimiento del extracto (%)	N° de Stiasny	Taninos Condensados (%)
El Porvenir	43,15	60	25,85
		55	23,67
		68	29,26
Tres de Octubre	38,02	76	28,92
		82	31,31
		82	31,29
		96	44,36
Nuevo Ucayali	46,34	52	24,26
		58	26,89

La presencia de estos taninos condensados en partes aéreas de la planta constituye el mecanismo de defensa y estos podrían actuar como atrapadores de radicales libres y agentes antivirales⁴.

CONCLUSIONES

El tamizaje fitoquímico realizado permitió la detección de metabolitos en las muestras de hojas de *Uncaria tomentosa* de las diferentes procedencias. También se comprobó la presencia de: alcaloides, quinonas, flavonoides, taninos pirocatecólicos.

Se tiene como resultado de la cuantificación de polifenoles totales, que las muestras de hojas proveniente de Nuevo Ucayali presentan mayor contenido, expresados como ácido tánico; por otro lado, las muestras provenientes de Tres de Octubre presentan menor contenido de polifenoles totales.

El mayor porcentaje de taninos condensados en hojas de *Uncaria tomentosa* se obtuvo de las muestras de Nuevo Ucayali.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT PIBAP 023-2009)

BIBLIOGRAFÍA

1. Heitzman, M.; Neto, C.; Winiarz, E; Vaisberg, A. Hammond G. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*. 2005; 66(5): 5-29.
2. Angulo, P.; Wilder A.; Miguez, M.P.; Cascos, P. Actividad de las hojas y alcaloides de la uña de gato (*Uncaria tomentosa* Willd DC) en el modelo de inflamación intestinal crónica de Yamada *et al.* 2007. Artículo en línea, disponible en http://www.samento.co.ec/sciencelib/addins/4ccespn/rv_ArtUnaGato.pdf
3. Domínguez G. Efecto de diferentes hábitats en el rendimiento y la calidad fitoquímica del cultivo clonal de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. Tesis (Dr. Sc.) Pinar del Río, CU. Universidad Pinar del Río "Hermanos Saiz Montes de Oca". 2007.
4. Ricco, R.; Sena, G.; Vai, V.; Wagner, M.; Gurni, A. Taninos condensados de *Ephedra chilensis* K. presl (=E. Andina Poepp.Ex. May)- Ephedraceae. *Revista Dominguezia* 2002; 18(1): 17-25.
5. Marcano, D. y Hasegawa, M. Fitoquímica Orgánica. Segunda Edición, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad de Venezuela. 2002
6. Norma Ramal de Salud Pública N° 309 (NRSP). Medicamentos de origen vegetal, droga cruda. Métodos de ensayo. Ministerio de Salud Pública. La Habana, Cuba. MINSAP. 1992
7. Inocente, M.; Fuentes, C.; Jurado, B. Cuantificación de taninos condensados en *Triplaris americana* L. (tanganara colorada). *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2009; 76 (2):138-148.
8. Rosales, M. y Gonzales, R. Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. *Madera y Bosques* 2003 9(2): 41-49.
9. Giraldo, L.; Hernández, M.; Angulo; Fuertes, C. Actividad antitumorativa y antiinflamatoria de los flavonoides de las hojas de *Uncaria tomentosa* Willd. DC. (uña de gato). *Revista de la Sociedad Química del Perú*; 2003; 69(4); 229-242.
10. León, F. y Cabieses, F. Efecto antiinflamatorio de la *Uncaria tomentosa* (uña de gato). *Odontología Sanmarquina*. 2000; 1 (6): 66-68.