

## Extracción, aislamiento y cuantificación de epicatequina con actividad biológica presente en la cáscara de la granada

A. Domínguez-López<sup>1</sup>, J. M. Talamantes-Gómez<sup>2</sup> y J.C. Ramírez-Orejuel<sup>2</sup>

**1** Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. **2** Laboratorio de Bromatología II, Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. [jose.talamantes@comunidad.unam.mx](mailto:jose.talamantes@comunidad.unam.mx)

**RESUMEN:** El 50% de la granada se compone de membranas y cáscara las cuales son desechadas y no aprovechadas, sin embargo, varios estudios han encontrado una mayor proporción de compuestos fenólicos en la cáscara, principalmente flavan-3-ols (catequinas y proantocianidinas). Por lo que el objetivo de este trabajo fue ampliar la información acerca de estos compuestos bioactivos, principalmente catequinas, mediante la extracción por cuatro métodos diferentes: Soxhlet, líquido-líquido, acuosa y microondas, la identificación y purificación por medio de una cromatografía en capa fina (TLC) y la cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con la ayuda de un estándar comercial. Los resultados mostraron que el método de extracción más eficiente fue por líquido-líquido con un rendimiento 41.07% para obtención de extracto crudo y 24.07% para el compuesto puro de epicatequina, por otro lado mediante la cromatografía en capa fina (TLC) se aisló, identificó y purificó a la epicatequina, la cual tuvo un Rf de 0.286 por lo que se procedió a cuantificar e identificar mediante HPLC, comparándola con un estándar comercial, dando como resultado un tiempo de retención de 3.63 minutos y una concentración de 0.07 mg/mL. Por último, para completar la identificación del analito se utilizó espectroscopia infrarroja (FT-IR) obteniendo bandas características de la epicatequina.

**Palabras clave:** cáscara de granada, epicatequina, HPLC.

**ABSTRACT:** The 50% of the pomegranate is composed of membranes and peel which are discarded and unused; however several studies have found a greater proportion of phenolic compounds in the rind, mainly flavan-3-ols (catechins and proanthocyanidins). The purpose of this study was to expand the information about these bioactive compounds, mainly catechins, by doing four different extraction methods: Soxhlet, liquid-liquid, aqueous and microwave, their identification and purification by thin-layer chromatography (TLC) and its quantification by high performance liquid chromatography (HPLC) with the help of a commercial standard. The results showed that the most efficient method was liquid-liquid obtaining a yield of 41.07% for the crude extract and 24.07% for the pure compound, epicatechin, on the other hand by using thin layer chromatography (TLC) epicatechin was isolated, identified, and purified obtaining a Rf of 0.286 which then was quantified and identified by HPLC, comparing it with a commercial standard, resulting in a retention time of 3.63 minutes and a concentration of 0.07 mg/mL. Finally, to complete the identification of the analyte, infrared spectroscopy (FT-IR) was used, obtaining characteristic bands of the epicatechin.

**Keywords:** Epicatechin, pomegranate peel, HPLC.

Área: Aprovechamiento y valoración de subproductos

### INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Malviya *et al.*, 2013, durante la última década, se han realizado considerables esfuerzos para extraer e identificar compuestos bioactivos de la granada, los cuales tienen diversos beneficios para la salud debido a la presencia de varios taninos, flavonoides, alcaloides y ácidos orgánicos. Algunos flavonoides como catequina, epicatequina, epigalocatequina-3-galato, flavan-3-ol, kaempferol, kaempferol-3-O-glucósido, luteolina, luteolina-7-O-glucósido, pelargonidina, prodelfindina, quercetina y rutina, también se han encontrado en extractos de cáscara de granada que muestran bioactividades antibacterianas, antivirales, antioxidantes, antiinflamatorias y antineoplásicas. Además de la actividad antioxidante, el extracto de cáscara de granada también tiene propiedades antimutagénicas y efectos beneficiosos sobre las enfermedades cardiovasculares (Malviya *et al.*, 2013).

El 50% de la granada se compone de membranas y la cáscara, las cuales son desechadas y no aprovechadas, sin embargo se ha encontrado una mayor proporción de compuestos fenólicos en la cáscara, principalmente los flavan-3-ols (catequinas y proantocianidinas) las cuales desempeñan un papel importante en la prevención de algunas patologías, como las enfermedades cardiovasculares y ciertas formas de cáncer (de Pascual Teresa *et al.*, 2000). Así mismo, la cáscara tiene una mayor capacidad antioxidante y de inhibición de la oxidación de LDL que el extracto de pulpa (Li *et al.*, 2006).

Por lo tanto, se plantea en el siguiente trabajo ampliar la información acerca de estos compuestos bioactivos (catequinas), mediante diferentes métodos de extracción y aislamiento, donde el proceso de extracción es la separación de un compuesto desde una mezcla sólida o líquida hacia una fase líquida, normalmente un disolvente orgánico, el éxito de la técnica depende básicamente de la diferencia de solubilidad en el disolvente de extracción entre el compuesto deseado y los otros compuestos presentes en la mezcla inicial (Angurell *et al.*, s.f.), por lo que en este trabajo se hace énfasis en la obtención de epicatequina a partir de una fuente diferente a las ya reportadas, para combatir y reducir el síndrome metabólico.

Los objetivos de este trabajo son la extracción de la epicatequina por medio de cuatro métodos de extracción: líquido-líquido, acuosa, Soxhlet y microondas para conocer el método más eficiente; aislar y purificar al analito por cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) y por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) comparándolo con un estándar comercial. Y por último la cuantificación de epicatequina por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) e identificación por espectroscopía infrarroja (FT-IR, por sus siglas en inglés). En una segunda fase evaluar la actividad biológica en ratas con la finalidad de reducir los síntomas del síndrome metabólico.

Los resultados obtenidos en la primera fase se observó que el método más eficiente fue la extracción líquido-líquido con un rendimiento de extracto crudo de 41.07% y de compuesto puro de 24.73%. Además, se aisló e identificó al compuesto bioactivo, epicatequina, mediante cromatografía en placa fina (TLC) obteniéndose un  $R_f$  de 0.286, finalmente se cuantificó por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) mostrando un tiempo de retención de 3.63 min y una concentración de 0.07 mg/mL con ayuda de un estándar comercial.

En conclusión se puede aprovechar y utilizar un subproducto considerado de desecho (cáscara de granada) como una fuente diferente a las ya reportadas, para la obtención de compuestos bioactivos, como la epicatequina, perfil de catequinas y quercetina, así como la implementación de nuevos métodos de extracción e identificación, purificación y aislamiento.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

La granada (*Punica granatum L.*) utilizada para este trabajo se obtuvo de una pequeña huerta en calle Clavel, San Agustín, Estado de México con un estado de madurez intermedio, es decir de un color de cáscara rojo con tonos amarillos-naranjas y el estándar comercial de (-)-epicatequina se obtuvo de Sigma Aldrich. La preparación de la muestra fue la siguiente: lavado, separación de la cáscara de los demás componentes de la granada, secado a 50°C por 3 días en una estufa. Posteriormente, se molió y se pesó, el peso total se dividió en cuatro partes para los métodos de extracción diferentes: acuosa, líquido-líquido, microondas y Soxhlet (Kalai *et al.*, 2018). Para cada método se utilizaron 10g de cáscara molida y seca, haciendo un triplicado para los métodos líquido-líquido, acuoso y microondas, mientras que para Soxhlet solo se hizo un duplicado. Para el método por extracción acuosa, los 10g en 200 mL de agua destilada se calentaron a 80°C/15 min, posteriormente se hizo una extracción líquido-líquido (1:1 v/v) utilizando como disolventes metanol y cloroformo grado HPLC, por lo que para el

método de extracción líquido-líquido se utilizó lo obtenido por la extracción acuosa, ya que de acuerdo a lo reportado por Kalat *et al.*, 2018 antes de realizar la extracción líquido-líquido se realiza una extracción acuosa, por lo que al final se realiza la misma metodología y se obtiene solo 1 resultado para los dos métodos (acuoso y líquido-líquido). Para la extracción por Soxhlet, 10g en 80mL de eter etílico se extrajeron a 80°C/4 horas, después se realizó una extracción líquido-líquido (1:1 v/v). Por otra parte, para el método de microondas, los 10g en 200 mL se extrajeron en un microondas marca Mabe, con una potencia de 1000W por 10 minutos, posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido (1:1 v/v). Además, para la identificación de los compuestos bioactivos se realizó una cromatografía en placa fina (TLC), utilizando un estándar comercial para comparar los Rf de cada mancha obtenida. De igual forma para la identificación y cuantificación de las catequinas se utilizó el método analítico de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) reportado por Cerilliant (2018), utilizando un cromatógrafo líquido Agilent 1100 Series y una columna Acclaim 120 C18 de fase reversa, marca ThermoFischer Scientific, 4.6 x 125 mm, 3µm, 120 Å, con condiciones de temperatura de 35°C, detector UV a 278 nm con un flujo de 0.8mL/min utilizando como fases móviles: A) ácido acético 0.5% y B) mezcla de acetonitrilo:acetato de etilo:ácido acético 0.1% (100:20:880). Por otro lado para el análisis de los resultados obtenidos no se realizó un análisis estadístico, solamente se obtuvieron los promedios, desviación estándar y coeficiente de variación de cada método. Por último, para una completa identificación de los compuestos se utilizó espectroscopía infrarroja (FT-IR), utilizando el equipo FT-IR Spectrometer, Spectrum Two, de la marca PerkinElmer.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para los cuatro diferentes métodos de extracción se presentan en la Tabla I. De acuerdo a los resultados, el método más eficiente de extracción es líquido-líquido ya que se obtuvo un rendimiento de 41.07% de extracto crudo, debido a que el tiempo utilizado no fue largo y la temperatura la adecuada (80°C), ya que se ha reportado que a tiempos de 30 minutos con temperaturas mayor a 90°C ocasiona que haya una reducción del 12% de catequinas y una isomerización de las mismas (López, 2013), por lo que esto pudo ocurrir en las extracciones de Soxhlet y microondas obteniendo rendimientos menores. Otro factor importante en cuanto a la extracción es el uso del disolvente adecuado ya que las catequinas al ser más solubles en disolventes polares como: metanol, etanol, acetona, son extraídas de manera más eficiente y en mayor proporción.

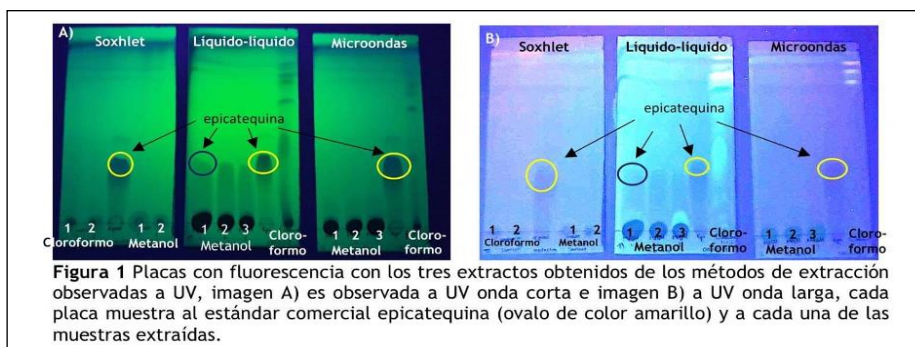
Método de extracción	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Rendimiento (%) <sup>1</sup>
Acuosa	15	80	41.07 <sup>2</sup>
Líquido-líquido	60	80	41.07 <sup>2</sup>
Soxhlet <sup>3</sup>	240	80	10.90
Microondas	10	92	27.11

<sup>1</sup> Promedio de tres determinaciones.

<sup>2</sup> El promedio es el mismo ya que después de la extracción acuosa se realizó una extracción líquido-líquido de acuerdo a lo reportado por Kalai *et al.*, 2018.

<sup>3</sup> Después de la extracción por Soxhlet se realizó una extracción líquido-líquido.

Para la identificación por cromatografía en placa fina (TLC) se muestra en la Figura 1, obteniéndose los siguientes resultados.



Se observa en la Figura 1 que la mancha “MeOH 1 liq-liq” (ovalo negro) tiene el Rf similar a la mancha del estándar, epicatequina (ovalo amarillo), 0.286 y 0.321, respectivamente. Por lo que hay presencia

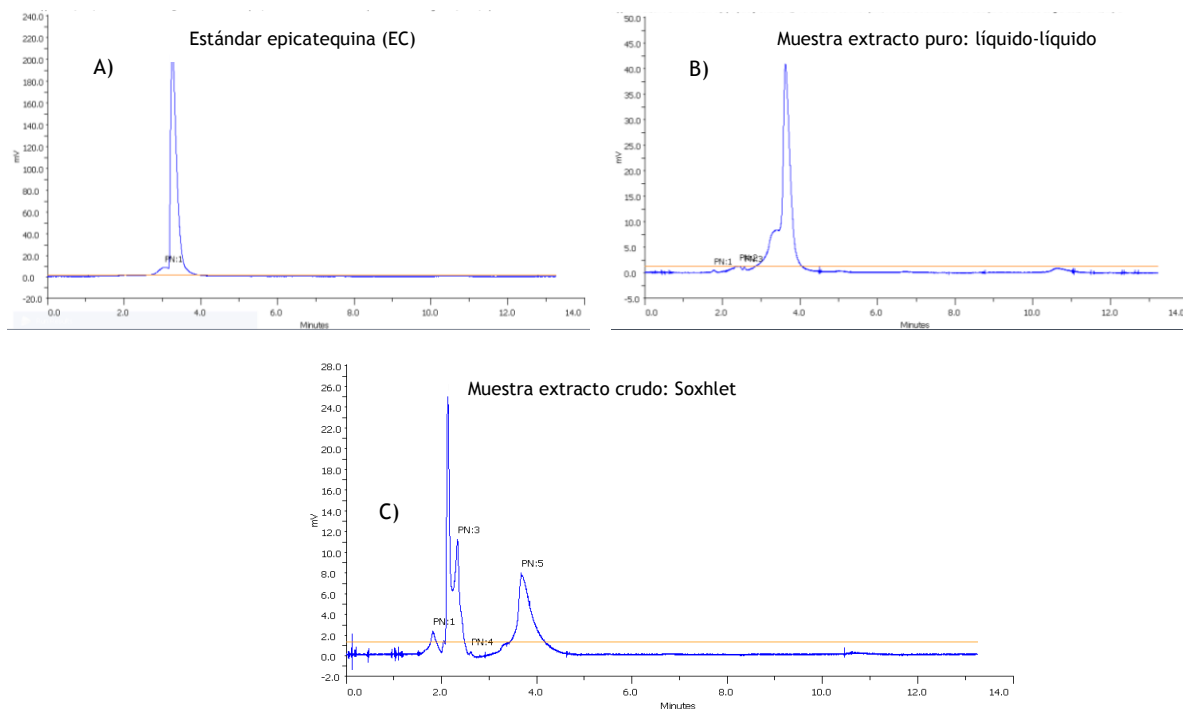
de compuestos flavan-3-ol en el extracto obtenido por el método de extracción líquido-líquido, sin embargo en el método de Soxhlet y microondas no se encontró una mancha con un Rf similar al estándar. De igual forma se observan manchas diferentes al estándar en las fases de cloroformo de cada uno de los extractos, esto quiere decir que la cáscara posee una diversidad de compuestos que podrían ser beneficios para el ser humano si se aíslan e identifican.

Método de extracción	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Rendimiento (%) <sup>1</sup>
Acuosa	15	80	24.73
Líquido-líquido	135	80	24.73
Soxhlet	240	80	5.56
Microondas	10	92	2.11

<sup>1</sup>Promedio tres determinaciones.

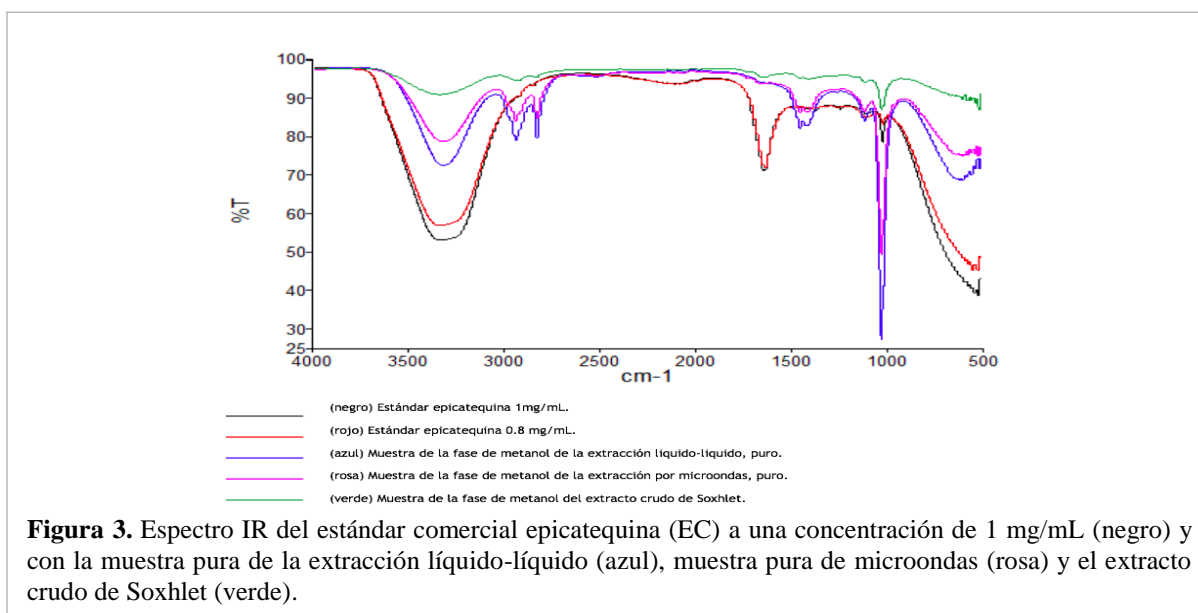
En la Tabla II se presentan los rendimientos obtenidos de la epicatequina ya purificada por cada uno de los métodos de extracción, la técnica utilizada para la purificación fue cromatografía en capa fina, con lo cual se separó del resto de los componentes comparándolos con la ayuda de un estándar, por lo que se corrió 3 veces la placa, se raspó la parte donde se encontraba el compuesto de interés, se filtró, se quitó el color con un poco de carbón activado, se disolvió en metanol y se volvió a plaquar para asegurarse de que se había obtenido el compuesto puro, donde el mayor rendimiento obtenido fue para la extracción líquido-líquido, de 24.73 %, esto quiere decir que el tiempo y la temperatura influye para una obtención eficiente de la epicatequina pura.

En la Figura 2, se observa que la muestra de la fase de MeOH por la extracción líquido-líquido (imagen B) presenta un tiempo de retención de 3.63 minutos mientras que el estándar (imagen A) tuvo un tiempo de 3.27 minutos, lo que indica la presencia de la epicatequina en esa muestra, de igual forma el extracto crudo obtenido por el método de Soxhlet (imagen C) presentó un tiempo de retención de 3.69 minutos, lo cual indica que aunque no se encuentra puro, la epicatequina está presente en esa muestra en una concentración mucho menor por lo que no es un método muy eficiente y para la extracción por microondas no se identificó al analito de interés ya que el método no fue eficiente para la extracción de epicatequina por eso la obtención de un rendimiento muy bajo. Por lo que, de acuerdo al rendimiento de extracto puro obtenido de cada método la extracción líquido-líquido presenta un pico más alto que los demás indicando que es el método donde se aisló de manera más eficiente al compuesto de interés, además se cuantificó por HPLC a la epicatequina obteniendo una concentración de 0.07 mg/mL en la cáscara de granada.



**Figura 2.** Cromatogramas del estándar epicatequina EC (imagen A) y el compuesto puro de epicatequina obtenido de la fase de metanol de la extracción líquido-líquido (imagen B) y el extracto crudo de la fase de metanol por Soxhlet (imagen C).

En la Figura 3 se observan los espectros de IR para el estándar (EC) a diferente concentración (1 y 0.8 mg/mL) y para cada muestra obtenida de los 3 métodos de extracción, dando como resultado bandas anchas a  $3321\text{-}3339\text{ cm}^{-1}$  lo que indica la presencia de enlaces O-H (hidroxilos) y C-H (aromáticos) lo cual es característico en la estructura de la epicatequina. También se obtuvieron en las muestras, pero en menor proporción en el estándar, ya que se traslapan y no se distinguen correctamente, bandas entre  $2944\text{-}2948\text{ cm}^{-1}$  lo que indica la presencia de enlaces C-H, es decir metilos y metilenos tensionados, además se obtuvieron para los estándares bandas a  $1633\text{-}1636\text{ cm}^{-1}$  que indica la presencia de C=C conjugados, mientras que para las muestras se obtuvieron bandas largas a  $1023\text{-}1115\text{ cm}^{-1}$  lo cual indica presencia de éteres cíclicos que es una parte importante en la estructura de la epicatequina. Por lo que mediante estos resultados se completa de mejor manera la identificación de la epicatequina presente en la cáscara de granada, principalmente por el método de extracción líquido-líquido. Por lo tanto, el método de extracción líquido-líquido puede ser considerado como una alternativa a los métodos usados actualmente en la industria para la obtención de epicatequina, asimismo la cáscara de la granada funciona como una fuente distinta para la obtención del flavan-3-ol y así el subproducto (desecho) de la granada es aprovechado de mejor manera.



## BIBLIOGRAFÍA

- Angurell, I., Casamitjana, N., Caubet, A., Dinares, I., Llor, N., Muñoz, D., Nicolás, E., Pérez, L., Pujol, D. Rosell, G., Seco, M. y Velasco D. (s.f) Operaciones básicas en el laboratorio de Química. Universidad de Barcelona. Recuperado el 15 de abril de 2019 de, <http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/index1.html#>
- Cerilliant. 2018. Certified Reference Material-Certificate of Analysis. Green Tea Catechin Mix. Cerilliant Corporation: USA. 1-13.
- de Pascual-Teresa, S., Santos C. y Rivas, J.C. 2000. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5331-5337.
- Kalai, I. & Nagarajan, S. (2018) Separation of catechins from green tea (*Camellia sinensis* L.) by microwave assisted acetylation, evaluation of antioxidant potential of individual components and spectroscopic analysis. *LWT - Food Science and Technology* 91, 391–397
- Li, YF., Guo, CJ., Yang, JJ., Wei, J., Xu, J. & Cheng, S. 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry* 96 (2), 254-260.
- López, M. 2013. Metodología para la determinación de epigalocatequinagalato en té verde por UPLC-PDA. Tesis de Licenciatura. Universidad ICESI, Santiago de Cali. 15-17
- Malviya, S., Arvind & Jha, A. 2013. Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *J Food Science Technology* 51(12). 4132-4137.