

Adecuación de un método espectrofotométrico de cuantificación de terpenoides totales en extractos vegetales

Adaptation of a spectrophotometric method for the quantification of total terpenoids in plant extracts

Presentación: 13 y 14 de septiembre de 2023.

Carolina Aloisio

Ingeniería de Procesos Sustentables (InProSus), UTN Facultad Regional San Francisco, San Francisco, Córdoba, Argentina; y Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA), CONICET, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Ciudad Universitaria, 5000-Córdoba, Argentina.

caloisio@facultad.sanfrancisco.utn.edu.ar

Marcela Longhi

Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA), CONICET, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Ciudad Universitaria, 5000-Córdoba, Argentina.

mrlonghi@unc.edu.ar

Alfonsina Ester Andreatta

Ingeniería de Procesos Sustentables (InProSus), UTN Facultad Regional San Francisco, San Francisco, Córdoba, Argentina
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina.

aandreatta@sanfrancisco.utn.edu.ar

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue adaptar un protocolo de análisis por espectrofotometría visible para cuantificar los terpenoides totales presentes en extractos de romero, que sea reproducible, rápido y de bajo costo. El protocolo reportado por Ghorai *et al.* para la determinación de terpenoides totales, presenta un procesamiento tedioso de la muestra, utiliza recursos costosos e insume mucho tiempo. Por este motivo, se efectuaron 4 modificaciones del protocolo original, relacionadas con la conservación (I), y homogeneización del material vegetal (II), extracción de terpenos y terpenoides (III) y obtención del precipitado y cuantificación (IV). Fue posible obtener la ecuación lineal ($y = 0,123 x + 0,0191$), a partir de la curva estándar de linalool, aplicando el nuevo protocolo, con una correlación adecuada ($R=0,99$), y en rangos adecuados de concentración de linalool y absorbancia. De esta manera, se obtuvo un protocolo adaptado que resultó reproducible, rápido y de bajo costo.

Palabras clave: terpenoides totales, extractos vegetales, espectrofotometría visible, adecuación de metodología.

Abstract

The objective of this work was to adapt a protocol for analysis by visible spectrophotometry to quantify the total terpenoids present in rosemary extracts, which is reproducible, fast and low cost. The protocol reported by Ghorai *et al.* for the determination of total terpenoids, presents a tedious sample processing, uses expensive resources and is time consuming. For this reason, 4 modifications of the original protocol were made, related to conservation (I), and homogenization of plant material (II), extraction of terpenes and terpenoids (III) and obtaining the precipitate and quantification (IV). It was possible to obtain the linear equation ($y = 0.123 x +$

0.0191), from the linalool standard curve, applying the new protocol, with an adequate correlation ($R=0.99$), in a proper ranges of linalool concentration and absorbance. In this way, an adapted protocol was obtained that was reproducible, fast and low cost.

Keywords: Total terpenoids, plant extracts, visible spectrophotometry, methodology adaptation.

Introducción

La República Argentina posee una gran disponibilidad de recursos biomásicos importantes, especialmente de origen vegetal, los que contienen una gran variedad de compuestos de interés para la industria farmacéutica. El extracto vegetal de *Rosmarinus officinalis* (romero), perteneciente a la familia de Lamiaceae, ha sido utilizado históricamente como antibacteriano, antifúngico, y agente antioxidante (De Oliveira *et al.*, 2019; Killeit, 2019). Además, estudios recientes indicaron que sus terpenoides constituyentes son potentes agentes antiinflamatorios, que inhiben la inflamación dérmica crónica e inducen significativamente la proliferación celular (Ahmadi *et al.*, 2018). Por este motivo, surgió la necesidad de contar con una metodología para cuantificar terpenoides totales, debido a su importancia en los materiales vegetales estudiados.

Existen numerosos métodos, cuantitativos y cualitativos, utilizados para determinar el contenido de sustancias activas vegetales a partir de material vegetal. Entre ellos se pueden mencionar la espectrometría de masas, la cromatografía, espectrometría de emisión atómica, la fluorescencia de rayos X, los métodos de titulación, espectrometría infrarroja, UV y visible (Łukowski *et al.*, 2022). Sin embargo, si bien muchos de estos métodos proveen de alta precisión, requieren acceso a instrumentos de medición costosos. Además, en algunos casos se requiere de estándares de alta pureza para cada una de las sustancias activas vegetales valoradas, también de alto costo. En muchas aplicaciones o como control de rutina, no se requiere una precisión de medición elevada (tanto cualitativa como cuantitativa) de compuestos orgánicos individuales o grupos de ellos (fenoles, antocianinas, flavonoides, etc.) (Łukowski *et al.*, 2022).

Se presentó el desafío de diseñar una nueva metodología para la valoración de terpenoides en los extractos vegetales, utilizando el equipamiento disponible en nuestra institución, un espectrofotómetro visible. Para ello, se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica, en diversas fuentes primarias para conocer los antecedentes relacionados a nuestro problema. Para la cuantificación de terpenoides totales, no se halló en artículos científicos una metodología que indicara la cuantificación de estos compuestos por espectrofotométrica visible. Finalmente, se encontró una publicación de un protocolo, reportado por Ghorai *et al.* donde se describe un ensayo rápido, a pequeña escala y de alto rendimiento para aproximar el contenido total de terpenoides en tejido vegetal usando un monoterpeno, linalool como reactivo estándar. El mismo se basa en la formación de un precipitado marrón rojizo, tras el agregado de cloroformo y ácido sulfúrico a la muestra conteniendo terpenoides, el cual debe ser resuspendido en metanol y valorarse espectrofotométricamente a 538 nm (Ghorai *et al.*, 2012). La concentración de linalool se calculó a partir de la curva de calibrado de linalool, construida para tal fin. Sin embargo, el procesamiento de la muestra propuesta por los autores era tediosa y presentaba algunos inconvenientes para su empleo, debido a que incluía algunos recursos costosos e insumía mucho tiempo. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue adaptar el protocolo original para la cuantificación de los terpenoides totales en extractos vegetales, para poder ser llevado a cabo en nuestro laboratorio, que sea reproducible, rápido y de bajo costo.

Desarrollo

Material vegetal y productos químicos:

Las hojas frescas de *Rosmarinus officinalis* (romero) fueron recolectadas en la región de San Francisco, Córdoba, en febrero de 2022. Cloroformo, ácido sulfúrico concentrado y metanol al 95% (V/V) fueron obtenidos de Cicarelli (Argentina) mientras que el linalool de Sigma-Aldrich (Argentina).

Protocolo original:

En este estudio, se adaptó una metodología descrita previamente (Ghorai *et al.*, 2012). Este procedimiento consta de 12 pasos:

1. Coseche el material vegetal (aproximadamente 500 mg) en tubos con tapa de rosca y conge inmediatamente en nitrógeno líquido.

[La muestra debe almacenarse a -80°C durante 1-2 meses, pero se prefiere la muestra fresca]

2. Para homogeneizar el tejido, coloque tres cuentas de carburo de tungsteno y 3,5 ml de metanol al 95% (V/V) frío en cada tubo de muestra e inserte la muestra en adaptadores de teflón pre-enfriados. Homogeneizar el tejido durante 5 minutos a 30 Hz. Si no se dispone de un molino mezclador, el tejido se puede homogeneizar en un mortero y mano.

3. Retire las cuentas de carburo de tungsteno con un imán e incube la muestra a temperatura ambiente durante 48 h en la oscuridad.

4. Centrifugue las muestras (4000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente) y recoja el sobrenadante en un nuevo tubo microcentrífugo de 2 mL.

5. Agregue 1,5 mL de cloroformo en cada tubo de microcentrífugo de 2 mL y luego agregue 200 μL de sobrenadante de muestra en cada uno.

OBSERVACIÓN: Para la curva estándar, agregar 200 μL de solución de linalool preparada previamente en metanol a 1,5 mL de cloroformo, y se debe realizar una dilución en serie [nivel de dilución: 100 mg/200 μL a 1 mg/200 μL (12,965 μM - 1,296 μM) de concentración de linalool]. En caso de dilución en serie, el volumen total de 200 μL se completará agregando metanol al 95% (V/V).

6. Vortexee la mezcla de muestra a fondo y deje reposar durante 3 minutos.

7. Agregue 100 μL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) a cada tubo de microcentrífugo de 2 mL.

PASO CRÍTICO: Si se produce generación de calor, todo el sistema debe enfriarse utilizando una almohadilla de hielo, pero no más de 15 minutos.

8. Luego, el tubo de ensayo debe incubarse a temperatura ambiente durante 1,5 a 2 h en la oscuridad.

PUNTO DE PAUSA: Para la solución estándar (linalool), incubarse no más de 5 min y durante el tiempo de incubación no se debe perturbar el tubo de microcentrífugo.

9. Al final del tiempo de incubación, se formará un precipitado marrón rojizo en cada tubo de microcentrífugo de ensayo. Luego, cuidadosa y suavemente decante todo el líquido de la mezcla de reacción sobrenadante sin perturbar el precipitado.

PASO CRÍTICO: El precipitado marrón rojizo es parcialmente soluble en la solución de mezcla de reacción, por lo que debe decantar suavemente el líquido sobrenadante.

10. Agregue 1,5 mL de metanol al 95% (V/V) y agita enérgicamente hasta que todo el precipitado se disuelva completamente en el metanol.

11. Transfiera la muestra del tubo de ensayo de análisis a una cubeta colorimétrica [se utilizará metanol al 95% (V/V) como blanco] para leer la absorbancia a 538 nm.

12. Construya la curva estándar, a partir de la corrección en blanco en la longitud de onda de 538 nm, del estándar de linalool (Figura 1). Calcule la concentración total de terpenoides de la muestra de planta desconocida como equivalentes de linalool utilizando la ecuación de regresión de la curva estándar de linalool.

La ecuación lineal reportada por los autores a partir de la curva estándar fue:

$$y = 0,012x + 0,011 \quad (R^2 = 0,982)$$

(Ghorai *et al.*, 2012)

(1)

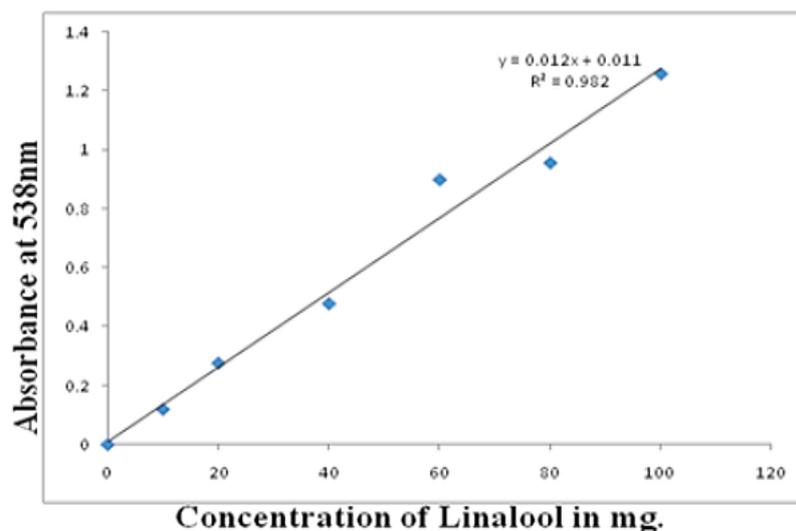


Figura 1. Ejemplo de una curva estándar de linalool, a partir el protocolo original (Ghorai *et al.*, 2012)

Modificaciones del protocolo original:

Modificación I: Conservación del material vegetal

La primera modificación de esta metodología, consistió en procesar el material vegetal para su conservación, lo cual se ensayó utilizando hojas frescas de romero. Las mismas fueron secadas a temperatura ambiente y en oscuridad durante aproximadamente 10 días. Posteriormente, las hojas fueron separadas de los tallos y conservadas al resguardo de la luz (Figura 2 a). Cabe destacar que este procesamiento permite eliminar el uso de nitrógeno líquido para la criopreservación del material vegetal fresco. Además, según el protocolo reportado por Ghorai *et al.* se debían mantener las muestras congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para lo cual se requiere un ultra-freezer, equipamiento de elevado costo, y en el protocolo adaptado tampoco se requiere de dicho recurso. Łukowski 2022 *et al.* propusieron también el secado del material vegetal, en lugar de la criopreservación del material fresco, en modificación al método de Ghorai *et al.* para analizar posteriormente terpenoides en hojas de *Pinus sylvestris* (Łukowski *et al.*, 2022)

Modificación II: Homogeneización del material vegetal seco

El material vegetal seco fue colocado en una picadora eléctrica para obtener un polvo fino (Figura 2 b). Este último fue pasado a través de dos tamices ASTM E11: N° 12 (1,68 mm de diámetro de apertura) y posteriormente el N° 20 (0,841 mm de diámetro de apertura) (Figura 2 c y d). La importancia de esta etapa es que el tamaño micrométrico del material vegetal propicia el aumento de la superficie de contacto con el solvente, lo que podría incrementar el rendimiento de extracción (Dias *et al.*, 2021).

Modificación III: Extracción de los terpenoides

Para la extracción de terpenos y terpenoides a partir del material pre-procesado, se utilizó un procedimiento (*protegido por patente*) utilizando ultrasonido y un solvente sustentable. A partir del mismo, se obtuvieron muestras conteniendo los terpenoides suspendidos en un solvente (Figura 2 e). Al efectuar este procedimiento, se evita el uso de carburo de tungsteno, adaptadores de teflón pre-enfriados, molino mezclador, y verter la muestra en un mortero, lo cual puede generar pérdida de material. Por otro lado, en el protocolo original, los autores proponen incubar la muestra durante 48 h, lo cual incrementa sustancialmente el tiempo del ensayo, lo cual resulta inconveniente. En nuestro protocolo, se reduciría este período de tiempo a menos de 1 hora.

Modificación IV: Obtención del precipitado y cuantificación

Similar al paso 5 del protocolo original, en este procedimiento adaptado se añadieron 1,5 mL de cloroformo en tubos eppendorf de fondo cónico, con la diferencia que en este procedimiento se agregaron 200 μL del extracto obtenido según lo descrito en la *modificación III* (los autores se referían al sobrenadante de muestra, obtenido el paso 2-4). Al igual que reportaron los autores del protocolo original en el paso 6-8, las mezclas fueron agitadas

con vórtex, se dejaron reposar durante 3 min y luego se agregaron 100 μL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) a cada tubo. *En el protocolo original*, los autores mencionan como “paso crítico” dejar enfriar el sistema en un baño de hielo por un tiempo máximo de 15 min debido a la generación de calor, lo cual no se observó en este procedimiento aquí implementado. Posteriormente, los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 1,5 a 2 h en la oscuridad. Es importante destacar que pese a las modificaciones del protocolo original, fue posible obtener el precipitado marrón rojizo al final del tiempo de incubación (Figura 2 f). Luego, se retiró y descartó el sobrenadante suavemente, para no perturbar el precipitado. Otro punto para destacar, es que los autores se refieren como “paso crítico” a que el precipitado marrón rojizo es parcialmente soluble en la solución de mezcla de reacción, por lo que debe decantar suavemente el líquido sobrenadante.

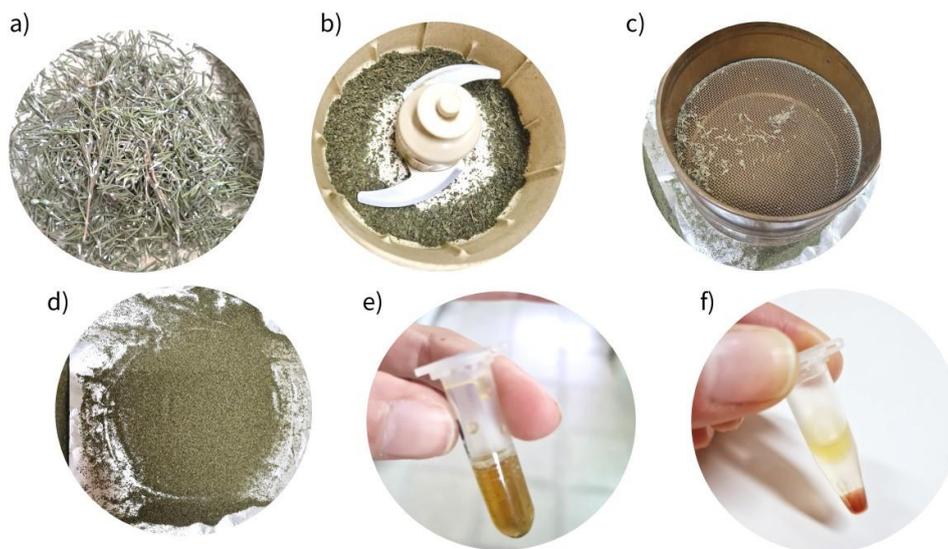


Figura 2. Procesamiento de hojas de *Rosmarinus officinalis* (romero): a) hojas desecadas a temperatura ambiente; b) picado; c) tamizado; d) material vegetal tras el secado, picado y tamizado; e) extractos de romero conteniendo terpenos y terpenoides; f) precipitado marrón rojizo obtenido aplicado el nuevo protocolo de determinación de terpenoides totales.

En nuestro ensayo observamos que se formaba fácilmente el precipitado al añadir cloroformo y ácido sulfúrico, y en caso de resuspenderse, volvía a precipitar en pocos segundos. Para el análisis colorimétrico, se agregó 1,5 mL de metanol al 95% (V/V) y se agitó enérgicamente hasta que todo el precipitado se disolviera completamente y se transfirió la muestra a tubos Hach, aptos para ser analizados en el espectrómetro visible. Esta fue la única vez que se requirió cambiar las mezclas del envase contenedor, y podrían haberse realizado también en los tubos aptos para el equipo, a diferencia de los autores del protocolo original, que utilizan tubos de centrifuga, tubos de ensayo y cuba. Se utilizó también metanol al 95% (V/V) como blanco y se leyó la absorbancia a 538 nm en el espectrofotómetro UV-visible.

La curva estándar se efectuó del mismo modo que proponía el protocolo original, por triplicado, agregando 200 μL de solución madre de linalool en metanol a 1,5 mL de cloroformo, y realizando una dilución seriada de 14 a 100 mg/200 μL de concentración de linalool, la cual difirió levemente de la de la reportada por Ghorai *et al.* (1 a 100 mg/200 μl). Sin embargo, fue posible abarcar un rango adecuado de absorbancias (de 0,150 a 1.20), con repetitibilidad adecuada. La curva estándar construida a partir de nuestro protocolo se presenta en la Figura 3, presentó un coeficiente de correlación lineal $R = 0,99$ y la ecuación lineal obtenida fue la siguiente:

$$y = 0,137 x + 0,0831 \quad (2)$$

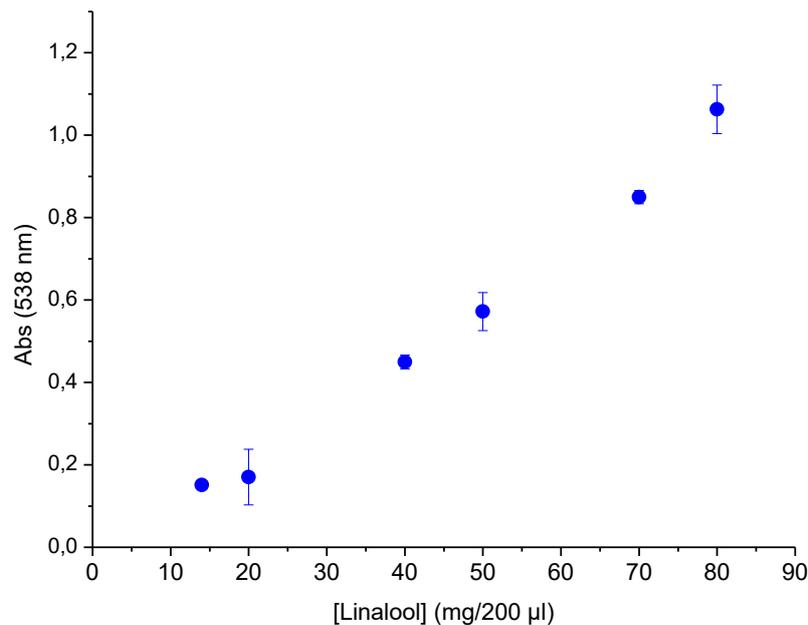


Figura 3. La curva estándar de linalool, por espectrofotometría visible, determinada a 538 nm, a partir del protocolo modificado.

Conclusiones

Fue posible adaptar el protocolo para la cuantificación por espectrofotometría visible propuesto por Ghorai *et al.*, obteniéndose una correlación adecuada entre los valores de concentración de linalool y la absorbancia a 538 nm. De esta forma, se logró el objetivo de poder determinar terpenoides totales presentes en extractos de romero, con un protocolo adaptado que resultó reproducible, rápido y de bajo costo.

Referencias

- Ahmadi, A. H. R., Salehinia, F., Rastegar, H., Allameh, A. A., & Rezazadeh, S. (2018). Differences in growth response of human hair follicle mesenchymal stem cells to herbal extracts and a growth factor. *Journal of Medicinal Plants*, 17(65), 36–46. <https://doi.org/10.1038/71866>
- De Oliveira, J. R., Camargo, S. E. A., & De Oliveira, L. D. a. (2019). Rosmarinus officinalis L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent (Review). *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 5. <https://doi.org/10.1021/jf9026487>
- Dias, A. L. B., de Aguiar, A. C., & Rostagno, M. A. (2021). Extraction of natural products using supercritical fluids and pressurized liquids assisted by ultrasound: Current status and trends. *Ultrasonics Sonochemistry*, 74, 105584. <https://doi.org/10.1016/j.ULTSONCH.2021.105584>
- Ghorai, N., Ghorai, N., Chakraborty, S., Guchait, S., Saha, S. K., & Biswas, S. (2012). Estimation of total Terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, Linalool as standard reagent. *Protocol Exchange*. <https://doi.org/10.1038/protex.2012.055>
- Killeit, U. (2019). Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 115(3). <https://doi.org/10.1016/j.gmh.2013.04.007>
- Łukowski, A., Jagiełło, R., Robakowski, P., Adamczyk, D., & Karolewski, P. (2022). Adaptation of a simple method to determine the total terpenoid content in needles of coniferous trees. *Plant Science*, 314. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111090>