

ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR DEL FRUTO DE ICACO (*Chrysobalanus icaco* L.): FLAVONOLES Y FLAVONAS

G. Vargas-Simón¹; R. M. Soto-Hernández²; Ma. T. Rodríguez-González²; J. A. Escalante-Estrada²

¹División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 86000. Villahermosa, Tabasco, México.

²Especialidad de Botánica. Instituto de Recursos Naturales. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Edo. de México.

RESUMEN

Chrysobalanus icaco se considera una especie que presenta diferencias morfológicas, el análisis del contenido de metabolitos secundarios de sus frutos podría ser una herramienta útil en su clasificación, la presencia de flavonoles y flavonas contribuyen a la quimiotaxonomía para determinar el parentesco de híbridos, así como para el reconocimiento y registro de nuevos cultivares. De esta forma, como un estudio preliminar se realizó una serie de análisis fitoquímicos por medio de cromatografía en papel descendente y espectrofotometría UV/VIS para obtener valores de R_f y espectrales que sirvan como base para identificar a los flavonoles y flavonas del fruto de *C. icaco* y además para estudios fitoquímicos posteriores. Los resultados preliminares indicaron la presencia del flavonol quercetina 3-arabinósido y de la flavona apigenina-7-O-glucósido.

PALABRAS CLAVE: Cromatografía, espectrofotometría, flavonoides, frutos.

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF COCOPLUM (*Chrysobalanus icaco* L.) FRUIT: FLAVONOLS AND FLAVONES

SUMMARY

Chrysobalanus icaco is considered a species that has morphological differences. Analyses of the content of secondary metabolites in its fruit could be a useful tool for classification. Flavonols and flavones can serve chemical taxonomy to determine relationships of hybrids and to identify and register new cultivars. As a preliminary study, a series of phytochemical analyses were done using paper chromatography and UV/VIS spectrophotometry to obtain R_f and spectral values to identify flavonols and flavones of *C. icaco* fruit and contribute to further phytochemical studies. The preliminary results indicated the presence of quercitine 3-arabinoside and apigenin 7-O-glucoside.

KEY WORDS: Chromatography, spectrophotometry, flavonoids, fruit.

INTRODUCCIÓN

Existen cerca de 250 mil especies de plantas vasculares en el mundo, aproximadamente dos tercios de éstas se encuentran en los trópicos, al menos un sexto de la diversidad de plantas puede ser encontrada en Latinoamérica, principalmente en Ecuador, Perú y Colombia; a nivel mundial, México ocupa el cuarto lugar en cuanto a diversidad de especies de angiospermas, después de Brasil, Colombia y China (Anónimo, 1992; McNeely *et al.*, 1990).

De toda la flora a escala mundial, sólo el 1% ha sido examinado por la medicina moderna para explotarse comercialmente. Dentro del resto, existen algunas plantas vasculares que pudieran tener características medicinales relevantes, pero se requiere de una serie de estudios para conocer sus propiedades, es el caso de *Chry-*

sobalanus icaco, especie que forma parte de diferentes hábitats en los trópicos y tiene una utilidad potencial alimenticia, medicinal, artesanal industrial y ecológica, entre otras (Gunstone y Subbarao, 1967; Gustafson *et al.*, 1991; Morean, 1991).

El icaco pertenece a la familia Chrysobalanaceae, es originario tanto de América Tropical como de Africa, se le encuentra distribuido en sus zonas de origen, además de Asia (India y Vietnam) e islas del pacífico (Seychelles y Fidji) (Prance, 1973; Yadav, 1986).

El conocimiento que se ha generado de esta especie es escaso dado su estado de poca domesticación. Sus individuos presentan variabilidad en cuanto a sus características morfológicas y posiblemente tengan diferencias químicas en sus compuestos secundarios que pudieran

servir de base para estudios quimiotaxonómicos. En otras plantas, la identificación de flavonoles y flavonas ha sido útil para determinar el parentesco de híbridos, así como en el reconocimiento y registro de nuevos cultivares (Rhodes, 1994).

Los flavonoles y flavonas son útiles como marcadores porque: a) tienen una amplia distribución en el reino vegetal; b) sus patrones tienden a ser específicos de las especies; c) son fáciles de identificar por técnicas cromatográficas y; d) son relativamente estables (Rhodes, 1994).

Los flavonoles pertenecen al grupo de flavonoides, se caracterizan por tener anillo benzo- γ -pirano insaturado y por la presencia de un grupo hidroxilo en la posición-3. Se han identificado cerca de 200 agliconas de flavonoles en diferentes partes de las plantas (Harborne, 1991).

En frutos, se registran sólo cuatro agliconas: kaempferol (K), quercetina (Q), miricetina (My) e isorhamnetina (IR); siendo las más comunes, la quercetina, que se ha encontrado en todos los frutos analizados, y el kaempferol, encontrado en el 80% de 30 frutos estudiados (Macheix *et al.*, 1990).

Las flavonas son similares a los flavonoles, sólo que no tienen el grupo hidroxilo en la posición-3 y el sistema heterocíclico es saturado; se encuentran ampliamente distribuidas entre las plantas superiores en forma de agliconas o glicósidos. Existen alrededor de cien flavonas naturales, pero su presencia es mayor en flores, tallos y hojas. Se reconocen principalmente a la luteolina (Lu) y apigenina (Ap) (Harborne, 1967).

Las funciones de los flavonoles y flavonas en las plantas no se ha dilucidado totalmente, no obstante, existe evidencia marcada de que estas sustancias pueden actuar como protectores de la luz UV (copigmentos), contra insectos (disuasorios alimentarios), hongos, virus y bacterias; como antioxidantes, inhibidores enzimáticos y agentes alelopáticos. Como terapéuticos se sabe que la rutina e hidroetil-rutosido sirve para el tratamiento de una variedad de desórdenes circulatorios e hipertensión, y que algunas flavonas tienen un considerable potencial como agentes anticancerígenos, agentes antivirales, antihemorrágicos y en el tratamiento de edemas (Harborne, 1991; Markham, 1989).

La extracción de flavonoles y flavonas se realiza por hidrólisis con HCl 2N y lavados posteriores con acetato de etilo. La separación e identificación se puede llevar a cabo por métodos cromatográficos: cromatografía en papel, en capa fina y columna, principalmente, utilizando eluyentes como BAW (*n*-butanol-ácido acético-agua, 4:1:5) o TBA (*t*-butanol-ácido acético glacial-agua, 3:1:1), forestal (ácido clorhídrico concentrado-ácido acético glacial-agua, 3:30:10), ácido acético al 10% en cloroformo, ácido acético al 15%, acetato de etilo en benceno al 45%, benceno-éter de petróleo-butanona-metanol o fenol-

agua. La identificación se complementa por medio del revelado con luz UV y con vapores de amoníaco (Harborne, 1967, 1984; Markham, 1989).

Las técnicas actuales engloban la espectrofotometría de UV/VIS, las lecturas de las muestras se realizan en 320-385 nm para la banda I y de 250-285 nm para la banda II. Se usan además: técnicas como la resonancia magnética nuclear del tipo protónica o de ^{13}C , la espectrometría de masas y la cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) (Harborne, 1991; Markham, 1989).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de frutos de *Chrysobalanus icaco*

Se colectaron frutos maduros de una población silvestre en Barra Encantada, Paraíso, Tabasco, México. El sitio de colecta está ubicado a 93° 10.7' Longitud Oeste y a 18° 24.6' Latitud Norte, la zona se caracteriza por tener un clima Aw, cálido subhúmedo con una temperatura media anual de 26.5°C y una precipitación pluvial media de 1 500 a 1 600 mm. El suelo es de textura arenosa, tipo regosol de baja fertilidad. En dicho sitio, los árboles de *C. icaco* se encuentran asociados a *Coccoloba uvifera* y *Cocos nucifera* (Larios y Hernández, 1992).

Los frutos se transportaron al Laboratorio de Fitoquímica (Colegio de Postgraduados), donde se separaron los exocarpos y se congelaron en nitrógeno líquido para su liofilización y después se almacenaron en refrigeración a 4°C.

Estándares

Dado que los estándares de flavonoles y flavonas son inaccesibles por su alto costo, se tuvieron que identificar a través de pruebas cromatográficas y espectrales de diversas fuentes vegetales que sirvieron como tal, para ello se utilizaron los exocarpos de frutos de las siguientes especies: manzana (*Malus domestica* Borkn.), 'Golden Delicious'; durazno (*Prunus persica* L.), pera (*Pyrus communis* L.), 'D'Anjou'; y uva (*Vitis vinifera* L.) como fuentes de flavonoles (Macheix *et al.*, 1990; Ribéreau-Gayon, 1964). Los aquenios del apio (*Apium graveolens* L.) y los pétalos del crisantemo (*Chrysanthemum indicum*) como fuentes de flavonas (Harborne, 1967; Hattori, 1962).

Extracción

En los frutos, tanto de *C. icaco* como de los estándares, se utilizó el exocarpo (cáscara); a diferencia del apio y del crisantemo que se usaron los aquenios y los pétalos, respectivamente.

Las fuentes finamente picadas y molidas, se colocaron en matraces Erlenmeyer, se pusieron en "Baño María", donde se obtuvieron los extractos por medio de

hidrólisis con HCl 2N en ebullición durante 40 min, según metodología propuesta por Harborne (1967; 1984) y Markham (1989).

Las soluciones ya frías y filtradas se extrajeron con acetato de etilo (dos veces) en un embudo de separación. Los extractos se llevaron a sequedad en un rotavapor Büchi R-114, baño B-480 con bomba de vacío Cole Parmer Modelo 7049-50, manteniendo la temperatura del baño a 50°C para evaporar el acetato de etilo, después el residuo se pasó por una corriente de nitrógeno, para obtener el extracto crudo.

Separación e identificación.

Se realizó por medio de cromatografía en papel (CP) descendente con dos repeticiones, revelado no destructivo con luz ultravioleta, revelado con vapores de amoníaco y espectrofotometría UV/VIS (Harborne, 1967; 1984; Markham, 1989). Para la cromatografía se utilizó papel Whatman # 3, (46 x 57 cm), las muestras se aplicaron en bandas pequeñas de 2.5 cm de longitud y 1.5 de separación entre cada una; se colocaron en una cámara de cromatografía Chromatocab Mod. A-300, Ser. 5169, de 83 x 85 x 65 cm (L x A x P). Los eluyentes utilizados fueron: BAW (*n*-butanol-ácido-acético glacial-agua, 4:1:5), forestal (ácido acético glacial-agua- ácido clorhídrico concentrado, 30:10:3) y HOAc al 15% (ácido acético glacial-agua, 15:85). Para obtener los valores de R_f , se midió en el cromatograma la distancia que recorrió cada compuesto desde el punto de aplicación, se dividió entre la distancia de elución (35 cm) y se multiplicó por 100.

Para el revelado no destructivo, se utilizó una lámpara UV de onda corta y larga (Cole Parmer 9818-series Darkrooms). Adicionalmente, se reveló una de las repeticiones con vapores de amoníaco; de la otra, se obtuvieron los máximos de longitud de onda para lo cual cada banda se recortó y se diluyó en MeOH, se hizo el barrido de 500 a 200 nm en el espectrofotómetro UV SP8-100 PYE UNICAM y espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer LAMBDA 2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bajo las técnicas utilizadas y comparando los diferentes valores de R_f y espectrales que ofrece la literatura (Jurd, 1962; Harborne, 1967; Ribéreau-Gayon, 1964; Markham, 1989; Merck, 1972; Pfaltz y Bauer, 1980), se lograron separar e identificar cuatro agliconas de flavonoles y dos de flavonas en los frutos y plantas estudiadas (Macheix *et al.*, 1990; Williams y Harborne, 1993): para *M. domestica*, quercetina 3-arabinosido y quercetina 3-xilosido (bandas 2 y 3, respectivamente); en *P. communis*, isorhamnetina (banda 1); en *V. vinifera* (blanca), quercetina 3-glucósido (banda 1) y en la oscura, K-

glucurónido, así como My 3-glucurónido (bandas 1 y 2, respectivamente); en *P. persica*, K 3-glucósido (banda 1) (Cuadro 1).

En cuanto a *A. graveolens*, se encontró apigenina 7-O-glucósido (bandas 1 y 2) y en *C. indicum* luteolina (Cuadro 1).

Los valores obtenidos tanto de R_f como espectrales no son exactamente iguales con los registrados en la literatura, esto se debe a que los resultados pueden variar dependiendo de las condiciones de cada laboratorio y de la fuente vegetal utilizada en la identificación del compuesto, ya que en algunos casos como el flavonol isorhamnetina, cuyos valores de referencia se obtuvieron de los pétalos de *Cheiranthus* sp y no de *Pyrus communis* (Markham, 1989).

Por otra parte, en algunos casos se carece de datos para cada uno de los eluyentes o si se tienen no se informa sobre el tipo de fuente vegetal que se utilizó en la identificación, tal es el caso de las quercetina 3-arabinósido y quercetina 3-xilósido para forestal (Harborne, 1967; Merck, 1972).

Las flavonas a pesar de no ser comunes en frutos carnosos, de acuerdo a Macheix *et al.* (1990), pueden encontrarse en frutos como los aquenios de *Apium graveolens* y probablemente en otros tipos de frutos (Harborne, 1967).

Sin embargo, comparando los resultados de las diferentes técnicas utilizadas en este estudio se pudo determinar que probablemente *C. icaco* contenga quercetina 3-arabinósido y apigenina 7-O-glucósido (Cuadro 1), Watson y Dallwitz (1992), mencionaron que integrantes de la familia Chrysobalanaceae, contienen los cuatro flavonoles conocidos, aunque los autores no especifican en que especie o especies de la familia se hizo el análisis.

Dado el potencial de la especie y la importancia de estos compuestos para las plantas y el hombre, cabe insistir en la continuidad de la investigación fitoquímica. Es necesario, entonces, realizar análisis posteriores en el fruto de *C. icaco* para corroborar estos resultados con técnicas fitoquímicas más sofisticadas como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. También, obteniendo las propiedades físicas de estos flavonoides como punto de ebullición y de fusión (Harborne, 1991; Markham, 1989; Williams y Harborne, 1993). Asimismo, sería necesario validar el contenido de estos compuestos en diferentes épocas del año y en diferentes etapas de desarrollo del fruto, ya que en el caso de los flavonoles y flavonas el contenido es mayor en los frutos inmaduros (Macheix, *et al.* 1990).

CUADRO 1. Valores de R_f y espectrales de los flavonales y flavonas identificados por cromatografía en papel descendente y espectrofotometría UV/VIS de frutos de *Chrysobalanus icaco*.

Muestra ^z	R_f (100) ^x			λ_{max} en MeOH (nm)
	BAW	Forestal	HOAc 15%	
<i>Malus domestica</i>	65^y	49 82	47 68	210; 233; 241; 275; 280; 324
<i>Pyrus comunis</i>	93	80	48 72	233; 275; 293; 326
<i>Chrysobalanus icaco</i>	71 87	71 80 86	66 75	224; 257; 259; 266; 276; 286
<i>Vitis vinifera</i> (obscura)	53 65 76 91	69 79	46 59 80	236; 278; 291; 325
<i>Vitis vinifera</i> (blanca)	59 72 88	79	46 67 39	240; 272; 275; 326
<i>Prunus persica</i>	62 75 85	80	48 58 66 72	277; 282; 323
<i>Chrysanthemum indicum</i>	70	42 64 79	54 72	237; 260(h); 277; 288; 290; 326
<i>Apium graveolens</i>	33 77 91	66 82	26 40 48 58 61 66 71 79	251; 268; 272; 288; 337

^z Promedio de dos repeticiones

^y Los valores en negritas corresponden a los datos comparables entre los estándares y *C. icaco*

^x BAW: *n*-butanol-ácido acético glacial-agua, (4:1:5, fase superior); forestal: ácido acético glacial-agua-ácido clorhídrico concentrado (30:10:3) y HOAc al 15% (ácido acético glacial-agua, 15:85). (h): hombro

CONCLUSIONES

En el análisis realizado al fruto de *Chrysobalanus icaco*, se propone que el flavonol quercetina 3-arabinósido es el identificado por sus tendencias espectrales y su valor de R_f en BAW, en cuanto a las flavonas, los valores registrados se aproximan a los de la apigenina 7-O-glucósido.

LITERATURA CITADA

- ANÓNIMO, 1992. Conserving Biodiversity: a research a guide for development agencies. Report of a panel of the Board on Science and Technology for International Development U.S. National Research Council. National Academy Press, Washington, USA., 127 p.
- GUNSTONE, F. D.; SUBBARAO, R. 1967. New tropical seed oils Part 1. Conjugated trienoic and tetraenoic acids and their oxo de

rivates in the seed oils of *Chrysobalanus icaco* and *Parinarium laurinum*. Chem. Phys. Lipids 1: 349-359

- GUSTAFSON, K. R.; MUNRO, M. H.H.J.; BLUNT, W.; CARDELLINA, J. H. II.; MACMAHON, J. B.; GULAKOWSKI, R. J.; CRAGG, G. M.; COX, P. A.; BRINEN, L. S.; CLARDY, J.; BOYD M., R. 1991. HIV inhibitory natural products. 3. diterpenes from *Homalanthus acuminatus* and *Chrysobalanus icaco*. Tetrahedron 47(26): 4547-4554.
- HARBORNE, J. B. 1967. Comparative Biochemistry of the Flavonoids. Academic Press. London, Great Britain, pp. 1-35.
- HARBORNE, J. B. 1984. Phytochemical Methods. Chapman and Hall, London, Great Britain, pp. 33-99.
- HARBORNE, J. B. 1991. Flavonoid pigments, pp: 389-429. In: Herbivorous: their Interaction with Secondary Plant Metabolites. G.A. Rosenthal; A.H. Janzen (eds.). Academic Press. New York, USA.
- HATTORI, S. 1962. Glycosides of flavones and flavonols, pp: 317-351. In: The Chemistry of Flavonoid Compounds. Geissman, T.A. (ed.). The MacMillan Co., New York, USA.
- JURD, L. 1962. Spectral properties of flavonoid compounds, pp: 107-155. In: The Chemistry of Flavonoid Compounds. Geissman, T.A. (ed.). The MacMillan Co., New York, USA.
- LARIOS, R.J.; HERNÁNDEZ, J. 1992. Fisiografía, ambientes y uso agrícola de la tierra en Tabasco, Méx. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. de México. 130 p.
- MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. 1990. Fruit Phenolics. CRC Press, Inc. Florida, USA. pp. 1-17, 39-81, 105-149.
- MCNEELY, J. A.; MILLER K. R.; REID, W. V.; MITTERMEIER, R. A.; WERNER, T. B. 1990 Conserving the World's Biological Diversity International, Union for Conservation of Nature and Natural Resources, World Resources Intitute, Conservation International, World Wildlife Fund-US and the World Bank, Washington, USA. 193 p.
- MARKHAM, K. R. 1989. Flavones, flavonol an their glycosides. pp. 197-234. In: Methods in Plant Biochemistry. Vol. 1, plant phenolics. J.B. Harborne (ed.). Academic Press. London, Great Britain.
- MERCK, E. A.G. 1972. 3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflavone. Sadtler Research Laboratories Inc. Darmstadt, Germany. 2 p.
- MOREAN, F. K. 1991. L'icaquier ou fat-pork (*Chrysobalanus icaco*, famille des Rosacées). Fruits 46(6): 703-708.
- PFALTZ & BAUER, INC. 1980. 3, 3', 4', 5, 5', 7-hexahydroflavone. Sadtler Research Laboratories. Division of Bio-Rad Laboratories, Inc. Stamford, Connecticut, USA. 2 p.
- PRANCE, G. 1973. Chrysobalanaceae, pp. 14-21. In: Flora Neotropica. Monograph No. 10. Hafner Publishing Co., New York, USA,
- RHODES, M. J.C. 1994. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. Plant Molecular Biology, 24: 1-20.
- RIBÉREAU-GAYON, P. 1964. Les composés phénoliques du raisin et du vin. ann. Physiol. Vég. 6(3): 211-242.
- WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. 1992. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval. Version 8th May 1998. URL <http://biodiversity.uno.edu/delta/>
- WILLIAMS, C. A.; HARBORNE, J. B. 1993. Flavone and flavonol glycosides, pp. 337-385. In: The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. J.B. Harborne (ed.) Chapman & Hall, London, Great Britain
- YADAV, S.R. 1986. Coco plum *Chrysobalanus icaco* L. Chrysobalanaceae a New Record for Maharashtra, India. Indian Bot. Rep. 5(1): 103-104.