

**TEMA: COMPUESTOS FENÓLICOS DETERMINADOS POR
ESPECTROFOTOMETRIA UV MEDIANTE CROMÓFOROS EN EXTRACTO
DE ORÉGANO *Origanum vulgare*.**

Q.F. Johnny Bravo L. MPA DOCENTE MEDICINA VETERINARIA ESPAM MFL

Correo: jonisitobravo@hotmail.com

RESUMEN.- Se determinó mediante espectrofotometría UV visible la concentración en % de compuestos fenólicos en un extracto de aceite esencial de hojas de orégano *origanum vulgare* obtenido en el laboratorio por destilación con arrastre de vapor. Se alcanzó una banda del espectro de absorción a una longitud de onda de 330 nm creando un cromóforo entre las moléculas del extracto y una solución etanólica de cloruro de hierro III. Se realizó una curva de calibración con un estándar de carvacrol (5-isopropil-2-methylphenol) al 99,7 % de concentración, se diluyó con etanol al 95% en serie de cinco patrones de concentraciones conocidas (9,97 - 11 - 12 - 13 - 14 % v/v), y graficó la recta de calibrado cumpliéndose la proporcionalidad entre la magnitud de la señal con la intensidad en el color de los analitos. En la gráfica se determinó la función matemática que presenta dicha recta a través de un análisis de la varianza. Se midió la absorbancia de la solución problema e interpoló con valores de la gráfica obteniéndose valores entre 12 y 14 % de compuestos fenólicos. La concentración de los compuestos fenólicos presente en el extracto de orégano se determinó mediante un espectrofotómetro UV visible al hacer reaccionar a los grupos hidroxilo de los fenoles con los cationes Fe⁺⁺⁺, que actúan como auxocromos responsables de alcanzar absorbancias en el espectro UV visible.

INTRODUCCIÓN.- A los aceites esenciales entre ellos el de *origanum vulgare* se los están considerando cada vez más como una alternativa para disminuir el uso de antibacterianos y antifúngicos sintéticos, con compuestos fenólicos que contienen grupos funcionales hidroxilo sobre anillos aromáticos contribuyen a la prevención de enfermedades relacionadas con fenómenos de estrés oxidativo (Huang D., 2005); pero los procedimientos para cuantificarlos y determinarlos resultan onerosos cuando se emplean métodos cromatográficos gaseosos o incluso líquidos. Se difunden precios de 90\$ sin contemplar IVA por

ensayos (Fuente: Instituto de Química UNAM, 2011-2012), y determinación de otros ingredientes activos (un analito) por cromatografía líquida de alta performance HPLC, y por cromatografía de gases con detector de ionización de llama GC-FID con costos de 315.36, y 329.04 Soles respectivamente, con duraciones de servicio de hasta 5 días desde el ingreso de la muestra a su resultado (Senasa-Peru, 2007-2017). La detección o cuantificación ideal con estos equipos es que la muestra a analizar debe ser poco volátil y estable térmicamente, en cromatografía de gases en donde la temperatura óptima para los ensayos depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerida (Gomis, 2008), con puntos de ebullición por debajo de 0 °C grados los compuestos presentes en los aceites esenciales como es el caso del orégano son térmicamente lábiles. No obstante el espectrofotómetro UV visible equipo menos sofisticado y poco más accesible y amigable con el ambiente ha sido más ampliamente utilizado por su sencillez y su bajo costo (Gutiérrez, 2003), en él se emplean métodos como el reactivo de Folin-Ciocalteu que contiene molibdato y tungstato sódico y reaccionan con cualquier tipo de fenol formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico (Peterson, 1979), dando un cromógeno de color azul intenso proporcional al número de grupos hidroxilo de la molécula.

Muchos analitos no absorbentes se pueden determinar haciéndolos reaccionar con reactivos cromóforos, originando compuestos que absorben intensamente en las regiones UV-VIS. El espectro de absorbancia de una molécula orgánica resulta de las interacciones de los fotones con los electrones que participan directamente en la formación de los enlaces y por tanto se asocian con más de un átomo, o con aquellos que están localizados alrededor de los átomos como oxígeno, azufre, nitrógeno y los halógenos (Skoog y col., 2001). Los fenoles son sustratos muy reactivos a la sustitución aromática electrofilia debido al grupo hidroxilo que es muy activo. Cuando estos compuestos reaccionan con el cloruro férrico (hierro III), este actúa como auxocromo al reaccionar con los grupos hidroxilo de los compuestos aromáticos, y forma complejos con propiedades cromógenas. Un auxocromo es un sustituyente que al unirse al cromóforo incrementa la intensidad y la λ (longitud de onda) de la absorción, los sustituyentes típicos son los grupos: metilo, hidroxilo, alcoxilo, amino y

halógenos. Poseen (salvo el metilo) pares de electrones solitarios que resuenan con el cromóforo (Pavia et al, 2001). En la siguiente reacción el Fe^{3+} reacciona con los grupos hidroxilo y forma complejo de color verde amarillo

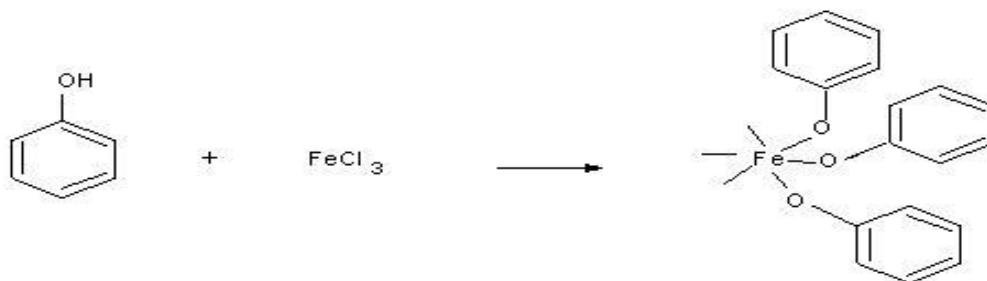


Figura 1.- Reacción para formar complejo de coordinación (cromóforo), el ion Fe^{+++} reacciona con los grupos hidroxilo OH^- de los compuestos fenólicos.

Como estos compuestos presentes en estos extractos no absorben radiaciones comprendidas en el rango UV-vis se propone otro método de cuantificación al crear derivados detectables con la formación de complejos de asociación iónica o cromóforos con el Fe^{+++} para medir su absorbancia, y mediante curvas de calibración determinar la concentración de compuestos fenólicos en una muestra de extracto de orégano. (*origanum vulgare*).

MATERIALES Y METODOS.

Equipo de destilación de arrastre de vapor.- Para la obtención de extracto acuoso de orégano se armó un equipo de vidrio de destilación con arrastre de vapor acoplado a un calentador como fuente térmica, y un recolector de agua para el refrigerante como condensador.

Muestra de análisis.- Se recolectaron del entorno ramas con hojas de orégano, se lavaron, se escurrió el agua. Se empleó el método de destilación con arrastre de vapor para obtener el extracto, y se separó de su mayor cantidad de agua con un embudo de decantación.

Estándar.- Se empleó un estándar de carvacrol (5-isopropil-2-methylphenol) al 99.7 % de concentración marca Merck.

Espectrofotómetro.- Los ensayos para la determinación de los compuestos fenólicos en el extracto de orégano fueron efectuados en un espectrofotómetro

visible UV marca Génova Plus de un solo haz del laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM MFL. Las muestras fueron analizadas a una longitud de onda de 320 nm seleccionada luego de un barrido en el espectro.

Micro pipetas y Materiales de vidrio.- Se emplearon dos micro pipetas con volúmenes de medición de 5ul – 200ul y 100 ul – 1000ul, embudos de separación de 250 ml, matraces enlennmeyer de 1000 ml, balones de dos bocas de 500 ml, matraces aforado de 10 ml, tubos de vidrio para el destilador, y cubetas de cuarzo para el espectro.

Preparación de los patrones de calibración.- A partir del estándar de carvacrol (5-isopropil-2-methylphenol) al 99.7 % Se diluyó con etanol al 95% una serie de cinco patrones de concentraciones conocidas (9.97 - 11 - 12 – 13 - 14 % v/v).

Formación del cromógeno.- Se preparó un auxocromo cloruro férrico al 1% p/v en solución etanólica al 95% p/v. A la disolución etanólica de (500 ul) en una cubeta de cuarzo, se agregó el extracto de origanum vulgare (10 ul) y cloruro férrico (10 ul), y dejó en reposo por 5 minutos.

Barridos espectrales.- Se realizaron barridos espectrales en el rango 200 – 500 nm del cromógeno (extracto de orégano + FeCl₃ empleando como blanco la solución etanòlica de cloruro férrico al 1%. Se emplea como longitud de onda 320 nm, y los complejos que contienen los patrones preparados del estándar con la muestra colocados en las cubetas de cuarzo, se miden las absorbancias mediante un espectrofotómetro.

Diseño estadístico.- Se aplicó un análisis de la varianza a través del tratamiento estadístico de regresión de los mínimos cuadrados. Empleando como variables la concentración y la absorbancia con un total de 45 repeticiones para el siguiente diseño.

. Procedimiento REG
Modelo: MODEL2
Variable dependiente: ly

Número de observaciones leídas 45

Número de observaciones usadas 45

Análisis de la varianza

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	1	29.58879	29.58879	46.64	<.0001
Error	43	27.28029	0.63443		
Total corregido	44	56.86907			

Raíz MSE	0.79651	R-cuadrado	0.5203
Media dependiente	-2.04418	R-Sq Ajust	0.5091
Coef Var	-38.96475		

Estimadores de parámetros

Variable	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr > t
Intercept	1	-8.88015	1.00800	-8.81	<.0001
x	1	0.56995	0.08346	6.83	<.0001

Para tener una buena exactitud y confiabilidad estadística para obtener los parámetros de la curva de calibrado, se empleó el método de los Mínimos Cuadrados.

Resultados.- Se obtuvo el extracto de orégano por destilación con arrastre de vapor, se separó por diferencia de densidad, se diluyeron los patrones con concentraciones de 9.97 %, 11%, 12%, 13%, y 14% a partir de un estándar de carvacrol al 99.7 % se formaron los cromóforos con FeCl_3 con una coloración verde amarilla indicando la presencia del complejo formado, con esto se logró absorción en el espectro, y observaron 45 ensayos en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 320 nm, los resultados indicaron concentraciones de 12, y 14 % de compuestos fenólicos para las muestras en observación.

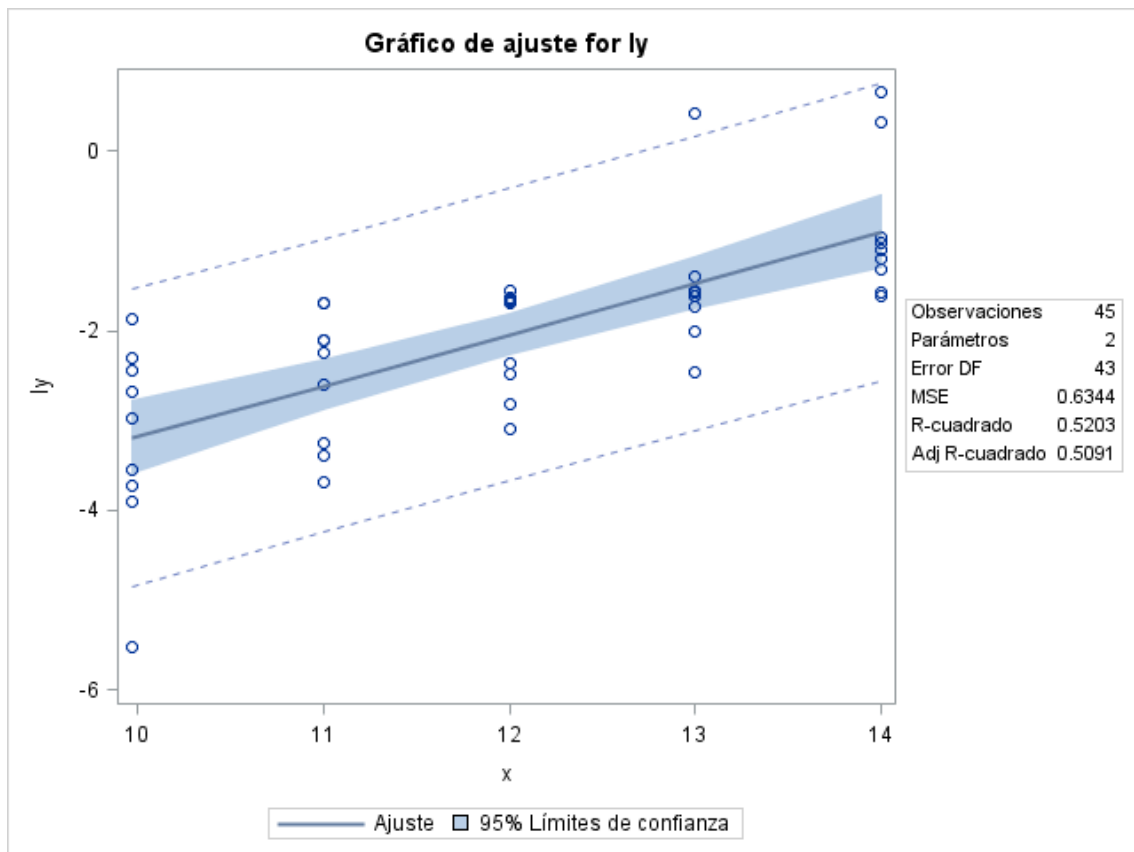


Figura 2.- Curva de calibración con n=5 para la concentraciones de los patrones y muestra versus la absorbancia.

La figura 1 muestra la curva de calibración donde todos los parámetros se encuentran dentro del intervalo especificado con 95 de límite de confianza. En la gráfica la ordenada (la variable independiente) con los datos de la respuesta del aparato y la abscisa (variable dependiente) en donde se colocó la concentración o el tanto por ciento del analito, la gráfica se aproxima a una línea recta.

La ecuación de la recta obtenida a partir del patrón de carvacrol fue $Y = 56.86907x + 0,63443$ con un coeficiente de variación de -38.96475 con una desviación estándar de 0.56995 (menor 5%).

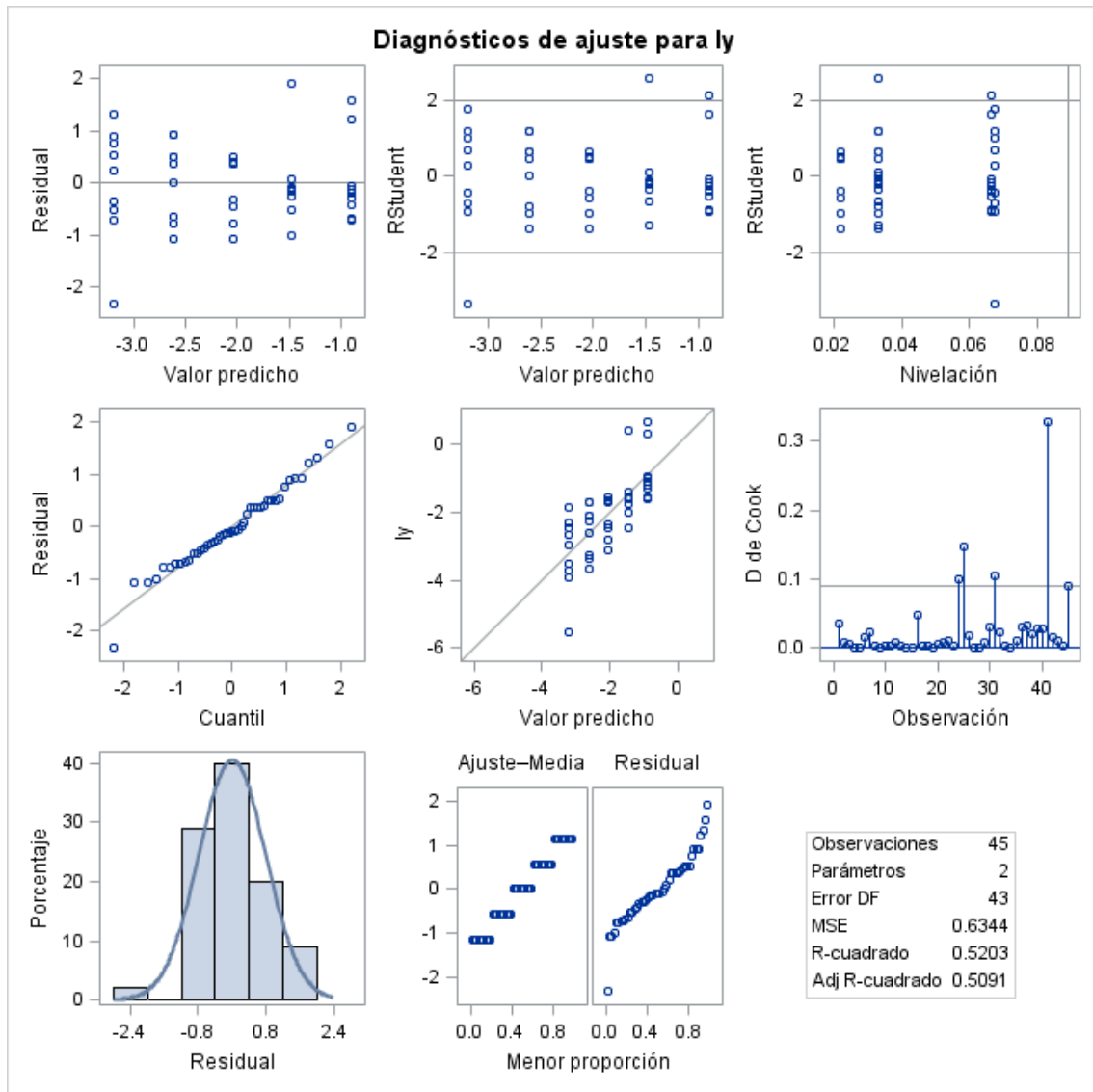


Figura 3.- Indica los diagnóstico de y de los ajustes de media y residual de las 45 observaciones.

Los resultados de las absorbancias medidas en el espectrofotómetro UV visible. En lado izquierdo están las absorbancias y en el lado derecho las concentraciones

Data

data regre;

input y x;

$X2=x*x$;

$ly=log(y)$;

$lx=log(x+0.00001)$;

cards;

0.087 9.97

0.122 11

0.213 12

0.207 13

0.363 14

0.069 9.97

0.184 11

0.19	12
0.2	13
0.333	14
0.051	9.97
0.122	11
0.195	12
0.21	13
0.38	14
0.1	9.97
0.105	11
0.189	12
0.198	13
0.3	14
0.029	9.97
0.039	11
0.084	12
1.532	13
1.941	14
0.024	9.97
0.075	11
0.095	12
0.135	13
0.2	14
0.153	9.97
0.183	11
0.186	12
0.248	13
0.269	14
0.02	9.97
0.025	11
0.045	12
0.085	13
0.208	14
0.004	9.97
0.034	11
0.06	12
0.177	13
1.384	14
;	
Proc reg;	
model y=X;	
model ly=x;	
model ly=lx;	
model y= x x2;	
Run;	

CONCLUSIONES.- Se determinó la concentración en % de compuestos fenólicos presentes en el extracto de orégano mediante espectrofotometría UV visible con una longitud de onda de 330 nm al crear grupos no saturados o cromóforos formando complejos de un color verde amarillo responsable de alcanzar absorbancias en el espectro UV.

BIBLIOGRAFIA.

Fuente: Instituto de Química UNAM, 2011-2012

D.Huang,B. Ou, R.L. Prior, The chemistry behind antioxidant capacity assays, J. agric. Food Chem., 53, 1841 (2005). J. agric. Food

D. Pavia, G. Lapman, G. Kriz, 2001. 3^o Edition. Introduction to Spectroscopy. 7. . 7.p.3759.

G.L. Peterson, Review of the Folin protein quantitation method of Lowry,

Rosebrough, Farr and Randall, Analytical biochemistry, Vol.100 No.2,

1979, 201-22.

Senasa Perú 2007 2017

Skoog D, Holler F, Nieman M, 2001, Principios de Análisis Instrumental. McGraw- Hill, Madrid (España).

Gutiérrez Y, Miranda M, y col. Validación de dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en Psidium guajava, L. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana 2003. 38 (1): 20-35

V. Gomez Yagues, 2008. Ensayos en cromatografía de gases. RUA. Universidad de Alicante.