

Determinación de cumarinas con actividad antioxidante por cromatografía de líquidos de alta resolución

Nava Álvarez Raquel, Juárez Juárez Minerva, Bolaños Valerio Emma,
Morales Jaimes Marbella

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Departamento de Ciencias Básicas. Alumna BEIFI.
Av. Acueducto de Guadalupe s/n, Gustavo A. Madero, Barrio la Laguna Ticomán, México, D.F, CP
07340.

rnavaa@ipn.mx

Fecha de aceptación: 18 de julio de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

Las enfermedades crónicas degenerativas, las enfermedades cardíacas y otros padecimientos como la diabetes, cáncer e incluso enfermedades tumorales, han sido la causa del incrementado en la tasa de mortalidad en México, las causas de estas enfermedades se relacionan con la producción de varios compuestos oxidantes y radicales libres, así pues, durante las últimas décadas las industrias farmacéuticas han puesto un creciente interés por la producción de sustancias antioxidantes. Los compuestos derivados de la acetocumarinas que han sido sintetizados mostraron tener una actividad antioxidante significativa en comparación con el 5-asa y el resveratrol, que son compuestos utilizados mayoritariamente en la industria farmacéutica como antioxidantes (Portocarrero, 2013). Estos compuestos han presentado tener cierta actividad antioxidante y para llevar a cabo la cuantificación de estos, es necesario contar con métodos analíticos como la cromatografía de líquidos de alta resolución (VARIAN 9010), que permitan determinar su concentración; para ello se utilizaron las propiedades intrínsecas de la molécula en estudio (polaridad, solubilidad).

Palabras clave: HPLC, cumarinas, antioxidantes.

ABSTRACT

Chronic degenerative diseases, heart disease and other ailments like diabetes, cancer and even tumor diseases have been the cause of increased mortality in México, the causes of these diseases are related to the production of various oxidants compounds and free radicals, thus, in recent decades the pharmaceutical industries have a growing interest in the production of antioxidants. Compounds acetocumarinas derivatives which have been synthesized have demonstrated significant antioxidant activity compared with 5-ASA and resveratrol, which are compounds used in the pharmaceutical industry primarily as antioxidants (Portocarrero, 2013). These compounds have presented have some antioxidant activity and to perform the quantification of these, there is a need for analytical methods such as liquid chromatography of high resolution (VARIAN 9010), for determining the concentration; for that the intrinsic properties of the molecule under study (polarity, solubility) were used.

Key words: HPLC, cumarinas, antioxidants.

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existen metabolitos que cuentan como las cumarinas que son metabolitos típicos de plantas superiores y de algunos microorganismos, se ha reportado que poseen diversas actividades biológicas entre las que se incluyen acciones antimicrobianas, efectos antiinflamatorios, efectos antioxidantes; son lactonas insaturadas poseen un sustituyente oxigenado en posición 7, ya sea hidroxilado como sucede en la umbelifrona o combinado (metilo, azúcares, etc.) (Portocarrero, 2013; Martínez, 2008).

La investigación de las cumarinas como posibles antioxidantes no fue estudiada hasta finales del siglo XX, al observar que la tasa de enfermedades crónicas degenerativas causadas por el impacto de las cumarinas se comenzaba a incrementar considerablemente, sin embargo, en los últimos 5 años, las investigaciones de las cumarinas como posibles antioxidantes es un tema prácticamente poco común, aunque las cumarinas son una de las familias de compuestos más investigadas, se le han atribuido propiedades como antibióticos de amplio espectro, anticancerígenos, entre otras pero no como antioxidantes. Cabe señalar, que las cumarinas ya han sido utilizadas para obtener compuestos polifenólicos que tienen una alta actividad antioxidante (Portocarrero, 2013; Kunh et al, 2006).

Un antioxidante es una molécula existente en determinados alimentos, plantas e incluso fármacos cuya principal función es proteger al organismo frente a los radicales libres, causantes de los procesos de envejecimiento y de algunas otras enfermedades crónicas (Leoney, 2009).

Los antioxidantes anteriormente mencionados, son utilizados para inhibir a ciertos radicales libres, los antioxidantes generalmente tienen la propiedad química de ceder un electrón para estabilizar a los radicales libres, los grupos fenólicos, tienden a deslocalizar su sistema aromático por medio de estructuras de resonancia, siendo capaces de donar un electrón para estabilizar los radicales libres y de ésta forma evitar el aumento del estrés oxidativo.

Para llevar a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo de estos antioxidantes, es necesario contar con métodos analíticos capaces de detectar bajas concentraciones del analito a analizar, para ello se emplea la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), la cual es una técnica capaz de detectar concentraciones del orden de ppm; en general esta técnica se basa en la separación, identificación y determinación de los componentes químicos de mezclas complejas.

El uso de sistemas cromatográficos ha sido de gran interés, tanto en la industria como en el área de investigación, debido a su alta eficacia a la hora de reproducir datos. Sin embargo se necesita validar estos métodos para cumplir con las normas establecidas y así asegurar la fiabilidad de estos métodos establecidos, ya que la validación no es únicamente un recurso gubernamental, sino que es un aspecto vital en cualquier laboratorio analítico (Skoog, 2000).

En este trabajo se llevó a cabo:

- La determinación de la solubilidad de los compuestos para su posterior análisis por HPLC
- La obtención del espectro de absorción (UV) de la molécula en estudio con la finalidad de determinar la longitud de onda máxima de absorción del compuesto a analizar.
- La identificación y cuantificación de los derivados cumarínicos análogos al resveratrol por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

METODOLOGÍA

Se empleó un espectrofotómetro lambda 25 en la determinación del espectro de absorción y la longitud de onda máxima a la que se analizarán las muestras en el estudio cromatográfico, por otro lado, se determinó la máxima concentración a la que se llevarán a cabo los análisis por cromatografía de líquidos.

Como se puede observar en la tabla 1, la solubilidad es un factor importante para la caracterización de nuevas moléculas y en específico para la cuantificación mediante diversos métodos analíticos. Por lo que, en este trabajo se llevó a cabo un estudio de solubilidad y para ello se utilizaron diferentes proporciones metanol-agua (tabla 1) a las cuales se le agregaron 5 mg de la molécula en estudio y se aforaron a 5mL (1mg/mL) se agitan los tubos y se observa si existe o no solubilidad total o parcial.

Para el análisis cromatográfico el equipo utilizado fue un HPLC Varian 9010 con un detector de UV-Vis; columna C-18 fase reversa de 25cm de longitud, 4.6 mm de diam, 5 micras de tamaño de partícula; la separación cromatográfica fue realizada a temperatura ambiente. La elución empleada fue del tipo isocrática, con un caudal para la molécula en estudio de un 1.0 mL/min empleando diferentes fases móviles en proporciones de 70:30, 80:20, 90:10 metanol/agua respectivamente, con la finalidad de encontrar la mejor proporción de fase móvil para llevar a cabo el análisis cromatográfico.

A partir de una concentración de 1mg/mL se prepararon diluciones hasta obtener concentraciones de: 0.001, 0.0015, 0.0020, 0.0025, 0.0030, 0.01, 0.015, 0.020, 0.025, 0.030 mg/mL empleando como fase móvil metanol/agua en una proporción 80:20, ya que el estudio de solubilidad arroja que dicha mezcla de disolventes es la adecuada para el análisis de las cumarinas en estudio; las soluciones preparadas anteriormente se filtran mediante membranas de nylon de 0.45 μ m y se inyectan al cromatografo (50 μ L) y se emplea una longitud de onda 300 nm, obteniéndose un tiempo de elución de 5 minutos. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos del análisis cromatográfico para la molécula en estudio y en la figura 2, se presenta la curva estándar de dicha molécula.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Estudio de solubilidad

Mezcla disolventes	Solubilidad de la cumarina
50:50	Soluble
60:40	Soluble
70:30	Soluble
80:20	Soluble
90:10	Poco soluble
100% metanol	Muy soluble
100% agua	Insoluble
pH	4
Longitud de onda max (UV)	300 nm

Tabla 2. Concentraciones inyectadas en el HPLC

Concentración (mg/mL)	Área bajo la curva
0.005	16.0835
0.007	30.278
0.01	39.878
0.013	58.051
0.015	60.912
0.02	86.4295

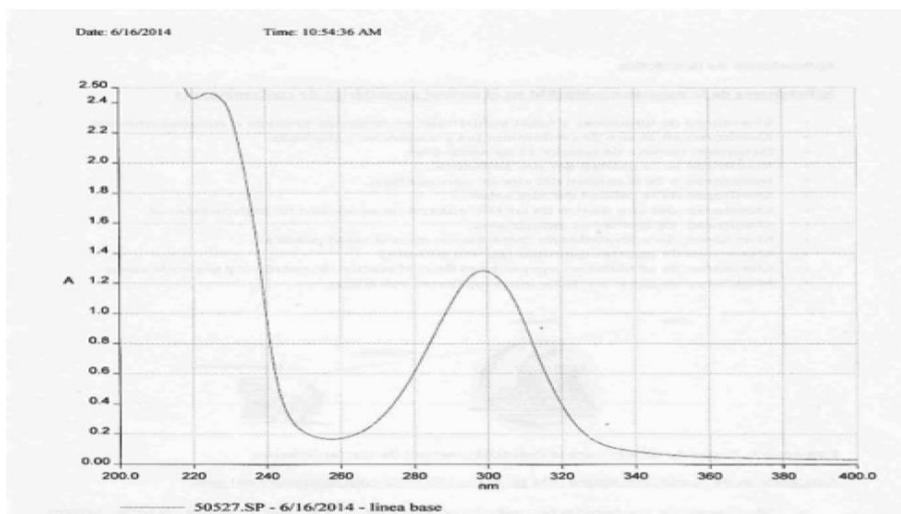


Figura 1. Espectro de absorción de la cumarina en estudio

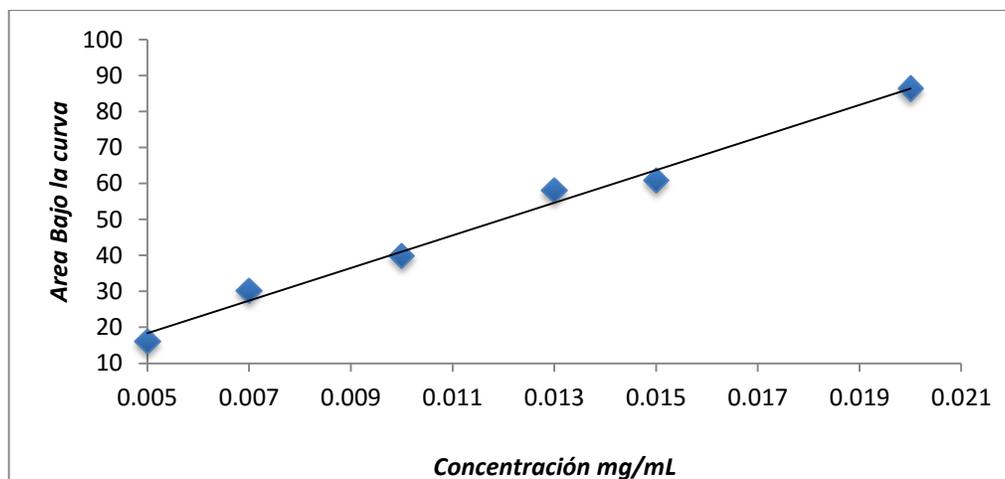


Figura 2. Curva tipo de la cumarina. Área Bajo la curva = 4531 [mg/mL] – 4.2572, $R^2= 0.9891$ (n= 18)

Las propiedades intrínsecas de las moléculas a estudiar son la base para utilizar diferentes métodos analíticos, por eso en este trabajo se utilizó la cromatografía ya que es un método que permite determinar concentraciones hasta de ppm o ppb.

En la tabla 2 se observa que una vez realizado el estudio de solubilidad es posible llevar a cabo el análisis cuantitativo, para lo cual se preparan diferentes concentraciones de la cumarina en estudio y se analizan a 300 nm mediante cromatografía de líquidos. En la fig 1 se presenta su espectro de absorción para determinar la máxima absorción que posteriormente se utilizó en el análisis cromatográfico HPLC (UV-Vis) y en la Fig 2 se presenta la curva tipo obtenida del análisis cuantitativo, así como el coeficiente de correlación que nos indica la linealidad de la curva y la posibilidad de llevar a cabo un estudio cuantitativo de muestras que contengan el analito.

CONCLUSIONES

La solubilidad es un factor determinante para cualquier estudio analítico, ya que si la muestra no se encuentra soluble sería imposible llevar a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo por cromatografía de líquidos; en este trabajo se determinó que la mejor mezcla de disolventes es el metanol-agua en una proporción 80:20, por otro lado, la mínima concentración para llevar a cabo este estudio es de 5 ppm, ya que a menores concentraciones la curva pierde linealidad, así como, a altas concentraciones (mayores a 20ppm).

La cromatografía de líquidos de alta resolución es un método que permite identificar y cuantificar diferentes analitos, ya que, mediante el análisis cuantitativo es posible llevar a cabo la cuantificación de la cumarina en diferentes muestras mediante el uso de la curva tipo determinada, por otro lado, esta técnica arroja resultados confiables cuando el método es validado.

REFERENCIAS

Kunh L. J., Revy S.W., Goodwin D. C. (2006). Antioxidant Problems in Global Scale, *J. Biol. Chem.* 276: 22908-23409.

Leoney, K., Sharma P. (2009). The Molecular comparison between a free radical and an antioxidant compound, *Med. Chem.*, 117-119.

Martínez, T. A. (2008). Síntesis y caracterización de compuestos de acetoamidocumarinas y cicloadición 2+4 vía diels-alder, derivados de 3-carboxicumarinas. Tesis licenciatura, UPIBI-IPN.

Portocarrero, H. L. (2013). Síntesis, caracterización y evaluación de compuestos antioxidantes derivados de 3-Acetamidocumarinas 6- Sustituidas por hidrólisis ácida e irradiación de microondas. Tesis Licenciatura, UPIBI-IPN.

Skoog D. A, West D.M, Holler F.J, Crouch S.R. (2000). *Fundamentos de Química Analítica*. 8a edición, pag 931-953.