

**ESTUDIO DE EXTRACCION DE POLIFENOLES DE THALASSIA
TESTUDINUM
POLYPHENOL EXTRACTION STUDY FROM THALASSIA TESTU-
DINUM**

Henry, Yb., López, Oa., Fernández, D**, Hernández, Y**, Esquijarrosa, J***.,
Laguna, A.****

*Laboratorios biológicos-farmacéuticos Labiofam, La Habana, Cuba

**Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Am-
bato, Ambato, Ecuador

***Facultad de Ingeniería Química, Instituto Superior Politécnico, José Antonio
Echeverría, La Habana, Cuba

****Centro de Bioactivos Marinos, La Habana, Cuba

Recibido: 29 de septiembre de 2021

Aceptado: 19 de marzo de 2021

Resumen

Un aspecto crucial en la evolución del hombre lo constituyó el aprender a curar sus enfermedades a partir de lo que le proporcionaba la naturaleza; dentro de esos elementos se destacan predominantemente los vegetales. Así, el uso de las plantas ha sido un contribuyente importante al desarrollo de la farmacoterapia moderna. Debido a las condiciones físicas y químicas del ambiente marino, casi la totalidad de los organismos que habitan los mares exhiben una variedad de moléculas con cualidades estructurales y químicas únicas, producto del desarrollo de mecanismos bioquímicos y fisiológicos, que incluyen la producción de compuestos bioactivos para propósitos tales como la reproducción, comunicación, protección contra depredación, infecciones y competencia [4]. El uso de organismos marinos, y en especial las algas, para la producción de cosméticos se encuentra en auge en muchos países. Existe una gran variedad de productos cosméticos a nivel mundial, por la evidencia de las propiedades beneficiosas de las algas como promotores de la síntesis de fibras colágenas, antioxidantes, antiirritantes [6]. Específicamente, el extracto obtenido a partir de la angiosperma *Thalassia testudinum* denominado BM-21, ha sido el más estudiado y plantea un gran interés por su acción dermorregeneradora y potente capacidad antioxidante. Actualmente, las condiciones de obtención del extracto son: relación de material vegetal-volumen de disolvente 1:10, disolvente etanol al 50 %, temperatura de extracción 60 °C, tiempo de extracción 4 h. Si bien el BM-21 como materia prima ha resultado excelente por sus propiedades, desde el punto de vista tecnológico se necesita mejorar la etapa de extracción del proceso de producción con el objetivo de lograr una mayor extracción del producto en el menor tiempo posible.

Palabras clave: pH, sólidos solubles, vitamina C, mohos y levaduras, análisis sensorial.

1. Introducción

Un aspecto crucial en la evolución del hombre lo constituyó el aprender a curar sus enfermedades a partir de los elementos que le proporcionaba la naturaleza. El uso de las plantas se instaló como un aspecto importante en la historia de la medicina, como contribuyente al desarrollo de la farmacoterapia moderna. Más allá de la gran diversidad biológica, en los mares se encuentra también una increíble diversidad química. Debido a las condiciones físicas y químicas del ambiente marino, casi la totalidad de los organismos que habitan los mares exhiben una variedad de moléculas con cualidades estructurales y químicas únicas, producto del desarrollo de mecanismos bioquímicos y fisiológicos, que incluyen la producción de compuestos bioactivos para propósitos tales como la reproducción, comunicación, protección contra depredación, infecciones y competencia [4].

El uso de organismos marinos, y en especial las plantas y algas, para la obtención de compuestos bioactivos se encuentra en auge en muchos países. Tomando en consideración las enormes posibilidades de utilización de estos organismos en la industria así como su abundancia en las costas, se han estudiado las potencialidades de uso de los extractos obtenidos a partir de diferentes variedades de plantas marinas y algas. El análisis global de los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* e *in vivo* permitió definir las especies promisorias por sus perspectivas de uso, específicamente, el extracto obtenido a partir de la angiosperma *Thalassia testudinum* ha sido el más estudiado y plantea un gran interés por su potente capacidad antioxidante atribuida a lo reportado en estudios

previos sobre la capacidad de esta planta marina de producir una amplia variedad de metabolitos de naturaleza fenólica[8] a los cuales se le atribuyen una gran diversidad de acciones farmacológicas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia de diferentes variables de operación sobre el proceso de extracción de los polifenoles de *Thalassia testudinum*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia prima

Fue colectado el material vegetal en el litoral norte de la isla de Cuba, este se separó del material extraño, constituido principalmente por *Syringodium filiforme*, *Penicilium sp.* y otras algas. Se sometió a secado en estufa a 40 °C por 48 horas. La materia prima seca se molió en un molino de cuchillas hasta un tamaño de partículas entre 4-10 mm. El almacenamiento se realizó en bolsas de polietileno negro, y se colocaron dentro de cajas en un lugar fresco y seco.

El disolvente utilizado fue etanol de 96° Merck

2.2. Metodología

2.2.1 Extracción del contenido total de polifenoles totales presentes en la *Thalassia testudinum*.

Se utilizó un extractor Soxhlet, empleando como disolvente etanol al 50 %, durante un tiempo de 16 horas. Se emplearon 10 g de material vegetal y 500 mL de disolvente.

2.2.2 Selección del mejor disolvente de extracción

Para la selección del mejor disolvente se pesaron en una balanza técnica 6,7 g de material vegetal los que corresponden a una relación material vegetal – volumen de disolvente de 1:15 con el objetivo de evitar la saturación del

disolvente [12,13] y se colocaron en tres erlenmeyer. Se le agregó al primero y al segundo una mezcla hidroalcohólica al 25 % y 50 % respectivamente y el último se preparó con agua destilada solamente. Posteriormente, se colocaron las muestras en una zaranda Gallenkamp a una temperatura de 60 °C, con una velocidad de agitación de 214 min⁻¹, durante 1h. Seguidamente, se separó el extracto del residuo vegetal mediante filtración bajo presión reducida, a través de un lienzo como medio filtrante. A las muestras obtenidas se les determinó el contenido de sólidos y polifenoles totales.

2.2.3 Estudio de la influencia de los parámetros de operación en el proceso de extracción

Para la evaluación de la influencia de los parámetros de operación, se utilizó un diseño factorial 32 de superficie de respuesta. Con este diseño se evaluó la influencia de la temperatura y la relación material vegetal-volumen de disolvente en la extracción de polifenoles y el contenido de sólidos. Se utilizaron tres relaciones diferentes de material vegetal-volumen de disolvente: 10 g (1:10), 6,7 g (1:15) y 5 g (1:20) y como disolvente etanol al 50%. Se mantuvo constante el tiempo del experimento y la velocidad de agitación. Como variables de respuesta se seleccionaron el contenido de sólidos totales (%) y de polifenoles (%). En las (Tablas 1 y 2) se muestran los niveles de las variables estudiadas y la matriz experimental del diseño.

2.2.4 Cinética del proceso de extracción

Una vez definida la mejor relación material vegetal-volumen de disolvente, así como la temperatura se procedió a determinar el tiempo de extracción,

tomando muestras a las 0,5; 1; 2; 3 y 4 h. para la determinación del contenido de polifenoles. Se utilizó un reactor de tipo tanque agitado con capacidad de 4 L, operado a 60 °C de temperatura, empleando como disolvente una mezcla hidroalcohólica al 50 %.

2.2.5 Secado de las muestras

Las muestras se concentraron en un rotoevaporador BUCHI R-124 hasta alcanzar un contenido de sólidos totales mayor al 10 %. El secado de las muestras se realizó en un secador por atomización de laboratorio modelo Büchi B 191, Flawil, Switzerland. La temperatura de entrada fue de 140 °C y la de salida de 80 °C, tomados de un trabajo anterior[2].

2.3 Técnicas analíticas utilizadas

2.3.1 Determinación del contenido de sólidos totales por un método gravimétrico

Se utilizó un método gravimétrico, se basa en la determinación de la variación de la masa, debido a la pérdida o eliminación de sustancias volátiles por la acción del calor, mediante un proceso de evaporación de la porción de ensayo y secado del residuo en un horno Heraeus UT 6060 estufa, hasta masa constante. Se pesan aproximadamente en Balanza analítica Sartorius R 200 D, 2 mL del extracto en una cápsula, previamente secada y tarada. Las muestras se secan a 105 °C en una estufa de aire recirculado aproximadamente 3 horas, seguidamente en una desecadora hasta que alcance la temperatura ambiente. Para obtener la masa constante entre una pesada y otra se realiza esta operación hasta que la diferencia de peso entre las dos últimas pesadas se encuentran dentro de la exactitud requerida ($\leq 0,2$ mg) lo que indica que se alcanzó el peso constante. El experi-

mento se realiza por triplicado. La cantidad de sólidos totales expresados en porcentaje (%) se calcula por la siguiente fórmula:

$$\%St = \frac{P_R - P}{V} * 100$$

Donde:

Pr: masa de la cápsula o pesafiltro más el residuo (g)

P: masa de la cápsula vacía (g)

V: Peso del volumen de líquido o del sólido si es polvo

100: factor para expresar el resultado en porcentaje

La cantidad de sólidos obtenidos a partir de la masa de material vegetal expresada en por ciento (%) es:

$$\% SE = \frac{\frac{\% St}{100} \cdot Vf \cdot \rho}{MV} \cdot 100$$

Donde:

% SE: Porcentaje de sólidos extraídos respecto al material vegetal (%)

% St: Sólidos totales (%)

Vf: Volumen final del extracto (mL)

100: Factor para expresar el resultado en porcentaje

ρ : Densidad del extracto (g/mL)

MV: Masa de material vegetal utilizada para la extracción (g).

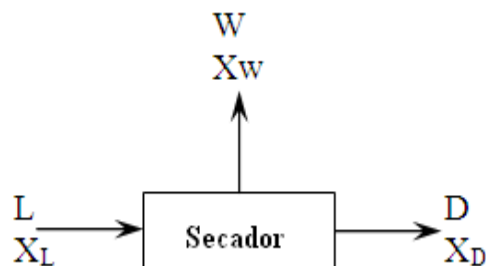
2.3.2 Determinación de polifenoles totales

El método se basa en la reacción entre los anillos aromáticos del grupo fenólico y el ácido fosfomolibdico – fosfotúngstico (reactivo de Folin – Ciocalteau). Se prepararon disoluciones estándar de diferentes concentraciones de pirogalol con agua destilada. A cada una de estas disoluciones se le agregaron 480 μ L de agua destilada, 48 μ L de reactivo de Folin- Ciocalteau y 576 μ L de una solución de carbonato de sodio al 29 % (p/v) para construir la curva de

calibración. Posteriormente se prepararon las muestras tomando 96 μ L del extracto y las mismas cantidades de agua destilada, reactivo de Folin – Ciocalteau y disolución de carbonato de sodio. Se realizó una dilución 1/5 en todos los casos, excepto en el extracto acuoso. Se dejó en reposo durante 30 minutos para que ocurra la reacción y se desarrolle el color del complejo y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV- visible, a 760 nm usando como blanco agua destilada.

2.3.3 Determinación del rendimiento de secado.

El rendimiento se determinó a partir del balance de materiales donde se considera que la masa de producto a la entrada debe ser igual a la de la salida, y que no existe acumulación de producto en el interior del equipo ni pérdidas al exterior.



Donde:

R: Rendimiento

L: Masa de la corriente de líquido que se alimenta al equipo

X_L : Composición de la corriente de líquido de alimentación

W: Masa de agua evaporada

X_w : Composición del producto en la corriente de agua evaporada

D: Masa de polvo obtenido

X_D : Composición del polvo obtenido

El balance de materiales global queda de la forma: $L = W + D$

El rendimiento se calcula por la relación entre la salida y la entrada.

$$\% R = \frac{D \cdot Xd}{L \cdot XI} \cdot 100$$

2.4 Análisis estadístico de los resultados

Los resultados fueron analizados estadísticamente con el Software STATGRAPHICS PLUS Versión 5.1 1994 – 2001 a partir del análisis de varianza, diagramas de Pareto y los gráficos de efectos principales y de interacciones.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Estudio de la influencia de las condiciones de extracción

3.1.1 Influencia de la concentración de disolvente

En la figura 1 se puede apreciar que entre los diferentes disolventes empleados al determinar el contenido de sólidos totales no existe diferencia significativa, no sucediendo lo mismo en el caso de los polifenoles que se extraen mucho mejor utilizando etanol al 50 %. Este resultado coincide con lo reportado por la literatura para otros productos naturales que poseen dentro de su composición polifenoles [40].

3.1.2 Influencia de la temperatura y la relación material vegetal-volumen de disolvente.

En la tabla 3 se muestran los resultados de las diferentes corridas del diseño experimental.

En la figura 2 a partir del diagrama de Pareto, el análisis de varianza, el gráfico de efectos principales para el contenido de polifenoles y el gráfico de Su-

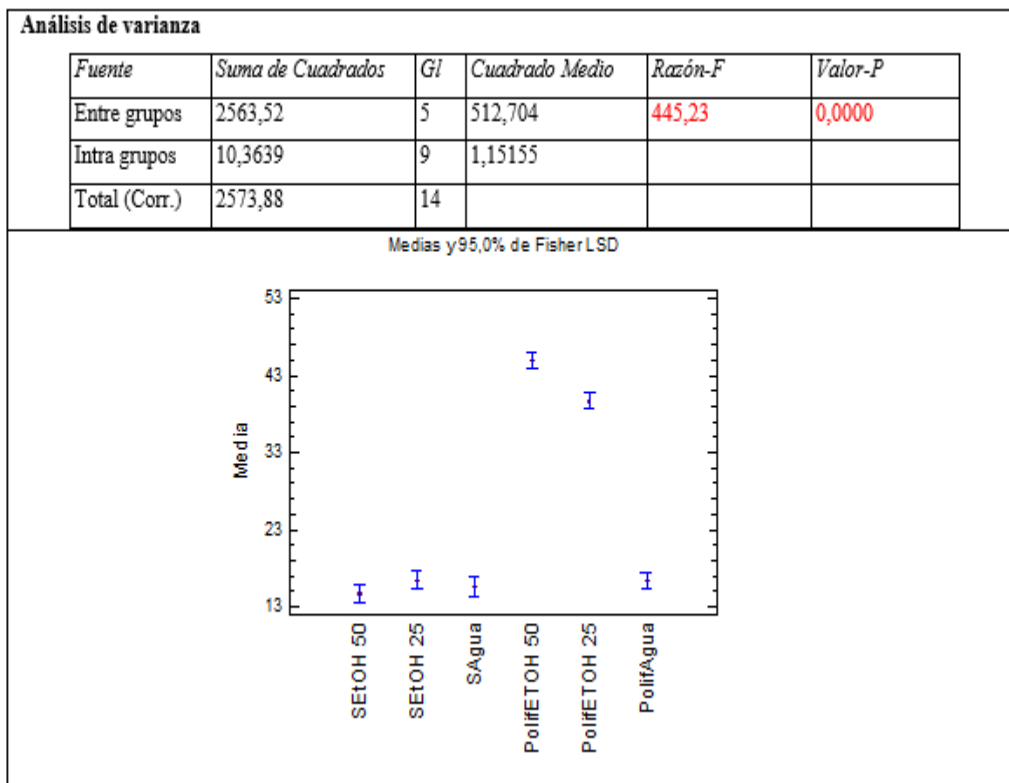


Fig. 1: Comparación de los diferentes disolventes

perficie de Respuesta Estimada se pueden determinar los parámetros óptimos en el proceso de obtención del extracto.

Teniendo en cuenta el análisis de varianza, se analizó que existen una influencia significativa de los parámetros estudiados. Se demostró que la interacción entre la relación material vegetal-disolvente y la temperatura influyen en el contenido final de polifenoles, evidenciándose por los valores de probabilidad menores que 0,05.

Al analizar el diagrama de Pareto, se observa que en primer lugar, la interacción entre la relación material vegetal-disolvente y la temperatura es el parámetro operacional que más influye sobre el contenido final de polifenoles. El segundo lugar lo ocupa la relación material vegetal-disolvente, demostrando que con una mayor relación se logrará una mayor extracción de estos

compuestos. En el gráfico de los efectos principales se puede apreciar que trabajando a una mayor relación material vegetal volumen de disolvente se puede obtener un mayor contenido final de polifenoles, pero en el caso de la temperatura se reportan valores cercanos entre 60 °C y 80 °C, por lo que se decide trabajar a una menor temperatura para ahorrar energía y evitar la degradación de los polifenoles.

Teniendo en cuenta la influencia que ejerce cada uno de los factores estudiados y según el gráfico de superficie de respuesta se seleccionó en el caso de la relación material vegetal-volumen de disolvente el nivel alto (1:20) y en el caso de la temperatura el nivel bajo (60 °C). Con estos niveles se alcanzó el mayor contenido final de polifenoles.

3.1.3 Cinética del proceso de extracción

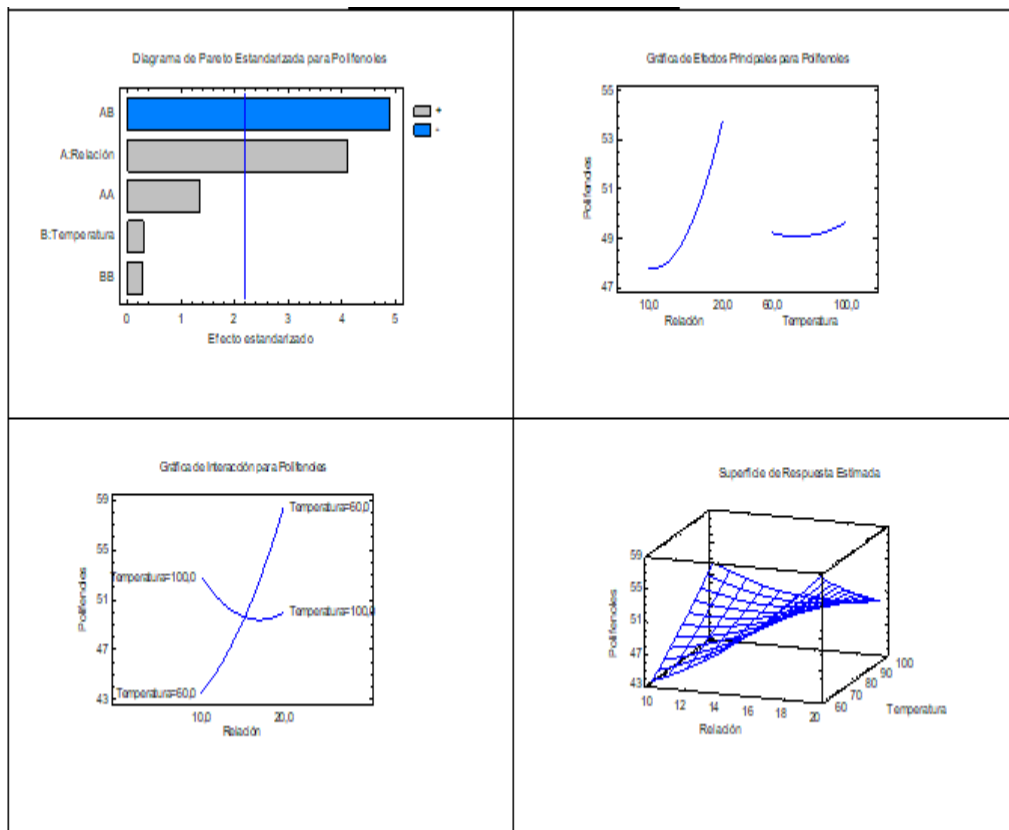


Fig. 2: Comportamiento del contenido de polifenoles totales

Los mayores valores del contenido de polifenoles fueron obtenidos entre la primera y segunda hora de extracción (Figura 3), lo cual indica que no es necesario mantener el proceso de extracción por un tiempo mayor. Además se corroboró que en este período de tiempo se recupera el contenido de

polifenoles posibles a extraer que en este caso se determinó por extracción con Soxhlet siendo de $44,75 \pm 2,66$ %. Por tanto como no se observa diferencia significativa en la cantidad de polifenoles extraídos entre la primera y segunda hora se puede fijar una hora como tiempo de extracción.

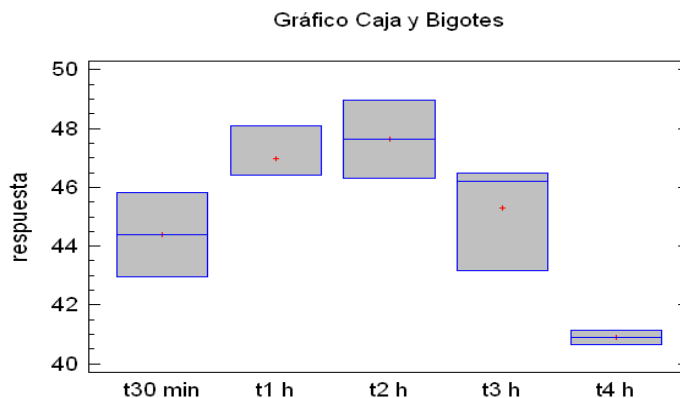


Fig. 3: Cinética del proceso de extracción de polifenoles

3.1.4 Evaluación del proceso de Secado por atomización

Los rendimientos del proceso de secado se encuentran entre un 80 y 90 % (Figura 4), lo que indica que con los parámetros de operación preestablecidos no ejercen una influencia negativa en el proceso de secado.

Se demostró que el mejor disolvente en el proceso de obtención del extracto de la planta marina *Thalassia testudinum* es el etanol a una concentración del 50 %, mediante el cual se logra extraer un contenido de polifenoles de un 46,28 %.

Las variables óptimas del proceso de obtención del extracto son: relación material vegetal-volumen de disolvente 1:20 y temperatura 60 °C, con las cuales se obtiene un contenido de polifenoles de un 52 %.

Trabajando con un tiempo de extracción de 1 h se alcanzaron valores de polifenoles de 48,08 %, siendo este valor muy cercano al obtenido en el extractor Soxhlet, de $44,75 \pm 2,66$ %.

4. Referencias bibliográficas

- Dubler, C.E. (1953). La “Materia Médica” de Dioscórides: transmisión medieval y renacentista. Barcelona. España
- Delgado, V. (2006). Estudio preliminar de secado por aspersion del extracto BM-21. Trabajo de diploma. CUJAE.
- Kijjoa, A.; Sawangwong, P. (2004). DRUGS and Cosmetics from the Sea. Vol. 2, 73-82.
- Faulkner, D. J. (1995). Chemical Riches from the Ocean. Chem. Brit. 680-684.
- Detres Y; Armstrong R.A; Connelly X.M. (2001). Ultraviolet-induced responses in two species of climax tropical

- marine macrophytes. *J Photochem Photobiol B*. Sep 1; 62(1-2). 55-66.
- Goldember P. (1995). Compounds from the sea. *Drug and Cosmetic Industry*. 7 (12). 56-61.
- Arnold T.M; Tanner C.E; Rothen M; Bullington J. (2008). Wound-induced accumulations of condensed tannins in turtlegrass, *Thalassia testudinum*. *Aquatic Botany* 89: 27-33.
- Regalado, EL; Rodríguez M; Menéndez R; Concepción AR; Nogueiras C y col. (2009) Repair of UVB-Damaged Skin by the Antioxidant Sulphated Flavone Glycoside Thalassiolin B Isolated from the Marine Plant *Thalassia testudinum* Banks ex König. *Mar Biotechnol* (NY); 11(1):74-80.
- Rodríguez, M; Aneiros, A; Valdés, O; Arteaga, F; Regalado, E.L y col. (2005). BM21: A product with beneficial properties for the care of skin obtained from a marine plant IMBC. Informe Técnico.
- Cuba: Medio Ambiente y Desarrollo; Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente Año 10, No.19, 2010 ISSN-1683-8904
- Aneiros, A; Concepción, A.R; Arteaga, F; Fernández, M.D; Llanio, M y col. (2003). Patente CU No. 22931.
- Salomón, S; López, O; García, C; González M.L; Fusté, Vy col. (2009). Desarrollo de una tecnología para la obtención de extracto acuoso de hojas de *Morinda citrifolia* L. (noni) *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Vol. 14 No. 2.
- Salomón, S; López, O; González, M.L, (2011). Desarrollo de una tecnología para la obtención de extracto acuoso de *Morinda charantia* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Vol. 16 No. 4.
- Narciso, S. (2001). XI Convención Zonal de Centros de Ciencias, XIII Festival Juvenil de la Ciencia (FJC-AsoVAC-Falcón).
- Hemminga, M.A ; Duarte L. (2000). *C.M. Seagrass Ecology*. Cambridge University. 2-7.
- Jiménez, C. (1990). Macroalgas y fanerógamas marinas de la macrolaguna del Golfo de Batabanó. El bentos de la macrolaguna del Golfo de Batabanó. Editorial Academia, La Habana. 14-17.
- Matínez, B; Jiménez, C; Alcolado, P. (1996). Prospección de los macrofilamentos de los fondos blandos del Archipiélago Sabana Camaguey. *Avicenia*, Cuba, 4/5. 77-88.
- Rubio, R; Loza, S; Martínez, B; Rodríguez, M; Valdés, O. (2005). Comportamiento estacional de la especie fanerógrama *Thalassia testudinum* Banks ex König, Informe Científico.
- Regalado, EL; Rodríguez, M; Menéndez, R; Concepción, AR; Nogueiras, C y col. (2009). Repair of UVB-Damaged Skin by the Antioxidant Sulphated Flavone Glycoside Thalassiolin B Isolated from the Marine Plant *Thalassia testudinum* Banks ex König. *Mar Biotechnol* (NY); 11(1):74-80.
- Fundora, S; Mata, M; Valdés, I; Valdés, O; Sánchez, A y col. (2009). Extracto de la planta marina *Thalassia* con actividad antienvjecimiento, antiinflamatoria y analgésica y su obtención. Solicitud de patente CU 22931.
- Rodríguez, M; Laguna, A; Regalado, E y col. (2010). Procedimiento de obtención de un producto de origen marino procedente de la planta marina *Thalassia testudinum*. Solicitud de patente.
- Fusetani, N. (2004). Biofouling and antifouling. *Nat. Prod. Rep.* 21, 94-104.
- Regalado, E; Valdés, O; Menéndez, R; Morales, R; Laguna, A y col (2010). Chemical analysis of BM-21, a bioactive extract rich in polyphenolic metabolites, from the sea grass *Thalassia testudinum*. Informe Técnico.
- Pino, J. A; Regalado, E. L. (2008). Volatile constituents of *Thalassia testudinum* Banks ex König Leaves. *J. Essential Oil Research*. Vol.22
- Rondina, R.V; Coussio, J.D. (1969). Estudio fitoquímico de plantas medicinales argentinas. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, INTA, Serien 2, Biología y Producción

- Vegetal, Buenos Aires, Argentina VI.
- Schabra, S.C; Ulso, M; Mshin, E.N. (1984). Phytochemical screening of Tanzanian medical plants. *J. Ethnopharmacol.* Vol. 11, 157-159.
- Pharmacopoeia, B. *British Pharmacopoeia.* (2007) Tannins in Herbal Drugs (Method 2.8.14). Appendix XI M. Volume I & II. Version 11.0 DataÒ System Simulation Ltd. The Stationary Office (TSO), Norwich.
- Aiyegoro, O.A; Okoh, A.I. (2010). Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. *BMC Complement. Altern. Med*10, 21.
- Fuleki, T; Francis, F.J. (1968). Quantitative methods for anthocyanins. *J. Food Sci.* 33, 78-83.
- Dubois, M; Gilles, K.A; Hamilton, J.K; Rebers, P.A; Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.* 28, 350-356.
- Bligh, E.G; Dyer, W.J, (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* Vol. 37, 911-917.
- Craigie, J.S; Leigh, C. (1978). Carrageenan and agars. In *Handbook of Phycological Methods* Press, Por Hellebust, J. A.; Craigie, J. S., Eds. Cambridge University: Cambridge; pp 109-131.
- Wrolstad, R; Acree, T; Decker, E; Penner, D; Schwartz y col. (2005). *Handbook of Food Analytical Chemistry* John Wiley & Sons: Hoboken (Eds); Vol. 39.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* Vol. 72, 248-254.
- Concepción, A; Fernández A; Del Vallín, Teresita. (2001). Evaluación de extractos de algas marinas, con actividad antioxidante y reorganizadora de la fibra colágena. *Rev. Cubana Invest Biomed.* 20(1): 6-11
- Arabshahi, S. (2007). Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. *Food Chemistry*, 100, 1100-1105.
- Acosta, J; Nuevas, L; Amaro, D; Álvarez, J. C. (2009). Estudio del Proceso de Lixiviación de la Corteza Vegetal de *Mangifera indica* L. *Lat. Am. J. Pharm.* 28 (1): 27-31.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de Tecnologías de Productos Fitoterapéuticos. Serie Ciencia y Tecnología, N 78; p.28, 35-40.
- Lafka, T. I; Sinanoglou, V; Lazos, E. S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104, 1206-1214.
- Spigno, G; Tramelli, L; De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81, 200-208