

## Trabajo científico

# Análisis de ácido elágico en algunas plantas del semidesierto Mexicano

## Determination of ellagic acid in native plants from the Mexican semi-desert

Juan Alberto Ascacio-Valdés,<sup>1</sup> Antonio Aguilera-Carbó,<sup>2</sup> Raúl Rodríguez-Herrera,<sup>1</sup>  
Cristóbal Aguilar-González<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila

<sup>2</sup>Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

---

### Resumen

Este trabajo se desarrolló para evaluar el potencial de plantas del semidesierto mexicano, la gobernadora (*Larrea tridentata* Cov.), candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.), hojasén (*Flourensia cernua* D.C.), cáscara de granada (*Punica granatum* L.) en diferentes estados de maduración y sangre de drago (*Jatropha dioica* Cerv.), usando éstas, como fuentes de obtención de ácido elágico para su aplicación en la industria farmacéutica. Este estudio demostró la presencia de elagitaninos y ácido elágico en las plantas mencionadas. La cuantificación de ácido elágico se realizó con las metodologías reportadas por Wilson-Hagerman y Lei. Los resultados obtenidos mostraron la cáscara de granada y la candelilla fueron las fuentes con mayor contenido de elagitaninos. Los estudios sobre extracción de elagitaninos y ácido elágico de plantas del semidesierto son escasos, por esto, el presente estudio es relevante en este tópico.

---

### Abstract

This work has been developed to evaluate the Coahuila semi-desert plants potential such as gobernadora (*Larrea tridentata* Cov.), candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.), hojasén (*Flourensia cernua* D.C.), pomegranate husk (*Punica granatum* L.) in different ripening stages and dragon's blood (*Jatropha dioica* Cerv.), using them as ellagic acid sources to use it in food and pharmaceutical industries. This study showed ellagitannins and ellagic acid presence in the plants before mentioned. Ellagic acid quantification was carried out by Wilson-Hagerman & Lei methods. The results showed that the pomegranate husk and candelilla were the best sources of ellagitannins. The studies about the ellagic acid extraction from semi-desert plants are scarce, by this reason, this work is relevant in the matter.

---

**Palabras clave:** plantas del semidesierto, ácido elágico, elagitaninos.

**Key words:** semi-desert plants, ellagic acid, ellagitannins.

---

### Correspondencia:

Dr. Juan Alberto Ascacio Valdés  
Departamento de Investigación en Alimentos  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de Coahuila  
Blvd Venustiano Carranza y José Cárdenas Valdés, CP.  
25280, Saltillo Coahuila, México.  
Tel: 844 416 12 38. Fax: 844 415 95 34  
e-mail: alberto\_ascaciovaldes@uadec.edu.mx

Fecha de recepción: 29 de octubre de 2012

Fecha de recepción de modificaciones:

21 de marzo de 2013

Fecha de aceptación: 9 de mayo de 2013

## Introducción

El ácido elágico es una molécula de naturaleza fenólica que puede estar presente en forma libre en algunas especies vegetales como producto del metabolismo de las mismas, o bien puede encontrarse a partir de sus precursores, los elagitaninos.<sup>1</sup> El subgrupo de los elagitaninos pertenece a un gran grupo de compuestos polifenólicos conocidos como taninos, que también provienen del metabolismo secundario de los vegetales.<sup>2</sup> Los elagitaninos poseen en su estructura un grupo conocido como HHDP (6'6 dicarbonil 3'3, 4'4, 5'5 hexahidroxidifénico o bien, ácido hexahidroxidifénico),<sup>3</sup> el cuál es característico de los elagitaninos, y que cuando se encuentran en presencia de ácidos o bases fuertes se hidroliza y se libera el ácido HHDP de los elagitaninos, el cual, sufre una reacción de lactonización espontánea que da origen a la molécula conocida como ácido elágico.<sup>3</sup> (Figura 1)

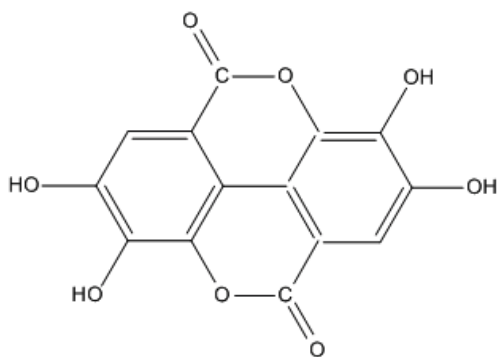


Figura 1. Estructura química del ácido elágico.

El ácido elágico es una molécula muy estable (tiene un punto de fusión de 350°) y por su naturaleza fenólica tiende a reaccionar formando complejos con otras moléculas como proteínas, alcaloides y polisacáridos. En vista de éstas propiedades que posee el ácido elágico con el paso del tiempo se han realizado distintos trabajos de investigación, trabajos como el de Huang y colaboradores,<sup>4</sup> Vattem y Shetty<sup>5</sup> en los cuales se han evaluado dichas propiedades y los resultados reportados y publicados han sido realmente interesantes. Se ha encontrado que el ácido elágico posee propiedades que actúan en contra de agentes que pueden resultar nocivos para la salud, como lo son los radicales libres<sup>6</sup> que son los responsables de procesos como la oxidación que se puede representar como el proceso de envejecimiento de las células del organismo, la presencia de radicales libres también representa un riesgo en la formación tumores y distintas formas de cáncer,<sup>7</sup> el ácido elágico se ha reportado como un producto efectivo en contra de estos agentes.

En vista de lo anterior, la presente investigación busca satisfacer las necesidades de obtención de ácido elágico mediante el

empleo de especies vegetales que son nativas de nuestra región lo que implica que no se necesitan inversiones para su producción, además de proporcionarles un valor agregado, son accesibles, fáciles de procesar y de adquirir, por lo cual se seleccionaron especies vegetales como el hojásén, la gobernadora, la candelilla, la cáscara de granada y sangre de drago, que pueden resultar altamente atractivas como fuentes de obtención de ácido elágico.

## Materiales y métodos

### Materiales.

Se emplearon como fuentes vegetales muestras de plantas nativas el semidesierto mexicano como gobernadora (*Larrea tridentata* Cov.), la candelilla (*Euphorbia antisiphilitica* Zucc), el hojásén (*Fluorencia cernua* D.C.), la cáscara de granada (*Punica granatum* L.) en diferentes estadios de maduración y finalmente sangre de drago (*Jatropha dioica* Cerv.). Las plantas de gobernadora, candelilla, hojásén y sangre de drago fueron recolectados en el ejido el Forlón, en el kilómetro 66 de la carretera Saltillo-Monclova, Coahuila, México. Los frutos de granada fueron recolectados en una huerta en el municipio de Sabinas, Coahuila, México.

### Métodos.

Las determinaciones de ácido elágico en las muestras vegetales se llevaron a cabo mediante el uso de dos metodologías reportadas en la literatura.<sup>8,9</sup>

### Determinación cuantitativa de ácido elágico con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N<sup>8</sup>

Para llevar a cabo ésta determinación se pesaron 10 mg de muestra seca y molida de cada una de las plantas a analizar y se pasaron a un tubo Eppendorf de 1.5 mL de capacidad, cada muestra por triplicado, después se les adicionaron 1 mL de ácido sulfúrico 2N y se llevaron a una estufa de calentamiento a una temperatura de 70° C por un periodo de 30 horas para llevar a cabo la hidrólisis de los taninos hidrolizables presentes en las muestras. Después de que el tiempo de hidrólisis transcurrió, las muestras en los tubos fueron filtradas a un tubo de ensaye empleando filtros Whatman número 40. Al filtrado de cada muestra se le agregaron 9 mL de piridina para obtener así una dilución 1:10 en donde el ácido elágico se encuentra cristalizado. De éstas diluciones se tomó 1mL y se pasó a otros tubo de ensaye y después se adicionaron 1.1 mL de piridina y posteriormente se llevaron a un baño de hielo por 5 minutos en donde fueron agregados 0.1 mL de HCl concentrado a cada tubo, se incubaron rápidamente en un baño maría a 30° C por 5 minutos. Después de la incubación se les agregó a cada tubo 0.1 mL de nitrito de sodio 1% (p/v) y se registró rápidamente la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro (BioMate, modelo 3) a 538 nm.

Después de que se registró ésta lectura los tubos se llevaron nuevamente a incubar en un baño maría a 30° C por 36 minutos y se registró nuevamente la lectura de absorbancia. Finalmente se obtuvo la diferencia entre la lectura final (36 minutos) y la lectura inicial (5 minutos), la diferencia entre las lecturas que se obtuvieron a los dos tiempos de incubación es proporcional a la concentración de ácido elágico presente en las muestras.

#### Determinación cuantitativa de ácido elágico con ácido clorhídrico metanólico<sup>9</sup>

Para llevar a cabo ésta determinación, se pesaron 30 mg de material vegetal seco y molido y se colocaron en tubos de ensaye con tapón de rosca y empaque para evitar la evaporación de los disolventes utilizados en ésta técnica. Se adicionaron 1.5 mL de ácido clorhídrico metanólico (éste reactivo se prepara adicionando 0.190 mL de cloruro de acetilo al 98% por cada mL de metanol que se requiera), la adición de éste reactivo se llevó a cabo en un congelador a -20° C, después los tubos cerrados herméticamente se colocaron en una estufa de calentamiento por 30 horas a una temperatura de 70° C, luego las muestras fueron destapadas y puestas de nuevo en la estufa de calentamiento bajo las mismas condiciones, para evaporar los disolventes que se utilizaron para realizar la hidrólisis de las muestras. Luego de que los disolventes fueron evaporados a cada tubo se le adicionaron 1.5 mL de agua y se pasaron a tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad y se sometieron a centrifugación a 6000 rpm por 30 minutos (centrífuga Sigma modelo 1-14), esto para eliminar los compuestos hidrosolubles presentes en las muestras. Después de la centrifugación de las muestras, los sobrenadantes fueron descartados y a los precipitados se les adicionaron 1.5 mL de etanol, luego las muestras se sometieron a vibración sónica por 20 minutos (sonicador Branson modelo 2510). Después de éste protocolo de extracción de ácido elágico, se tomaron 0.75 mL de cada muestra, se filtraron por membranas de 0.45 µm y se colocaron en viales de vidrio de 1.8 mL de capacidad y a cada vial se les agregaron 0.75 mL de etanol, el cual también se filtró por membranas de 0.45 µm para obtener así una dilución 1:2 de cada muestra en los viales que después fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para determinar la concentración de ácido elágico en las muestras se preparó una curva de calibración a partir de una solución madre de ácido elágico de 0 a 500 ppm. Para este análisis se utilizó un equipo para HPLC Varian ProStar 430 (Palo Alto, California, U.S.A.), con una bomba trifásica, un automuestreador modelo 410, y un detector UV-vis con arreglo de diodos, la columna que se empleó para el análisis fue una Varian Pursuit XR<sub>s</sub> c18, 4.6 mm x 250 mm, un flujo de 1 mL/min y un volumen de inyección de 10 µL por muestra. Las fases móviles de análisis fueron A= metanol (fase de lavado), B= Acetonitrilo y C= Ácido acético 3%, son los siguientes gradientes de elución 0-10 min 100% C, 10-20 min 20% B 80% C, 20-25 min 30% B 70%

C, 25-26 min 60% B 40% C, 26-31 min 30% B 70% C, 31-40 min 100% C.

## Resultados y discusión

Se trabajaron y evaluaron cinco fuentes vegetales recolectadas del semidesierto mexicano para la determinación de ácido elágico mediante el empleo de hidrólisis química ácida. Los resultados obtenidos son presentados a continuación.

#### Determinación cuantitativa de ácido elágico con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N

Una vez que se llevó a cabo la hidrólisis de los materiales vegetales a evaluar con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N a una temperatura de 70° C por 30 h, se obtuvieron concentraciones de ácido elágico (mgg-1), las cuales se presentan en la tabla 1.

**Tabla 1. Concentración de ácido elágico obtenida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.**

Planta	AE (mg/g planta).
Jatropha dioica.	7.9 ±0.76
Larrea tridentata.	10.3 ±1.82
Fluorencia cernua.	11.8 ±0.05
Euphorbia antisiphilitica.	20.2 ±1.23
Punica granatum (verde).	61.1 ±3.35
Punica granatum (roja).	85.8 ±1.00
Punica granatum (turnning)	83.2 ±3.06

Las cantidades de ácido elágico encontradas en algunas fuentes vegetales evaluadas son bastante importantes, Wilson y Hagerman<sup>8</sup> reportaron, empleando el método desarrollado por ellos, que encontraron concentraciones de 1.02 % de ácido elágico por peso seco de hojas de roble blanco (*Quercus alba*), y en este trabajo se reportó que para la cáscara de granada en estado maduro (cáscara roja) se obtuvo una concentración de 85.5 mg/g de ácido elágico lo que representado en porcentaje equivale a un 8.5% de ácido elágico por gramo de cáscara, lo demuestra que en el caso de la granada resulta una fuente de obtención de ácido elágico y que el método reportado por ellos es también un buen método de cuantificación de ácido elágico, Seeram y colaboradores,<sup>10</sup> reportaron valores de 85% de elagitaninos de polifenoles totales de cáscara de granada y 1.3% de ácido elágico. Las otras fuentes vegetales evaluadas en este trabajo también superan las cantidades reportadas por éste equipo de investigación.

#### Determinación cuantitativa de ácido elágico con ácido clorhídrico metanólico

Se realizó una hidrólisis química de los materiales vegetales a estudiar utilizando ácido clorhídrico metanólico a una temperatura de 70° C por un período de tiempo de 30 horas, las concentraciones obtenidas de ácido elágico por gramo de planta empleada (mg/g) son reportadas a continuación en la tabla 2.

**Tabla 2. Concentración de ácido elágico obtenida con ácido clorhídrico metanólico**

Planta.	AE (mg/g planta).
<i>Jatropha dioica</i> .	8.3 ±5.19
<i>Larrea tridentata</i> .	16.4 ±21.01
<i>Flouencia cernua</i> .	20.9 ±15.34
<i>Euphorbia antisiphilitica</i> .	28.7 ±28.63
<i>Punica granatum</i> (verde).	145.8 ±32.74
<i>Punica granatum</i> (roja).	132.0 ±22.47
<i>Punica granatum</i> (turning).	121.7 ±16.41

Zhentian Lei y colaboradores<sup>9</sup> reportaron bajo la técnica que ellos desarrollaron, que después de haber tratado muestras de roble blanco y castaña obtuvieron concentraciones de ácido elágico de 0.37% para roble blanco y 1.04% para el árbol de la castaña, en este trabajo se obtuvo para la cáscara de granada (cáscara verde) un resultado de 145.8 mg de ácido elágico por gramo de planta, lo que representado en porcentaje equivale a un 14.5% de ácido elágico por gramo de planta, sin embargo ésta no fue la única fuente vegetal evaluada de la que se obtuvo ácido elágico, las otras fuentes que se analizaron en este trabajo también superan claramente a los resultados reportados por Lei y colaboradores.

En cuanto al contenido de ácido elágico en las fuentes vegetales tratadas, para el caso de la cáscara de granada (*Punica granatum* L.), que resultó la fuente de obtención de ácido elágico mas importante en el presente trabajo, las concentraciones de ácido elágico obtenidas fueron distintas, esto debido a que se utilizaron cáscaras de granada en diferentes estadios de maduración (verde, turning y roja), lo que deja de manifiesto que el estado de maduración de la granada juega un papel muy importante en cuanto al contenido de elagitaninos y de ácido elágico.

Cabe mencionar que las muestras tratadas en este trabajo son buenas fuentes para la obtención de ácido elágico, también es importante mencionar que los resultados obtenidos en el trabajo mostraron que algunas de las muestras evaluadas no registraron buenos títulos de ácido elágico, como en el caso de la *Jatropha dioica* en la cual, se registraron las concentraciones de ácido elágico más bajas por los dos métodos empleados para el presente trabajo (7.9 mg/g de ácido elágico para el método espectrofotométrico y 8.3 mg/g de ácido elágico para el método cromatográfico), esto debido a que el contenido de elagitaninos en esta especie vegetal no es muy elevado y por ende la concentración de ácido elágico también es baja.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede decir que los métodos empleados para llevar a cabo la hidrólisis química del material vegetal son confiables (de acuerdo con el análisis de correlación que se realizó sobre las

metodologías empleadas en el presente trabajo), sin embargo, en el caso del método de Lei y colaboradores,<sup>8</sup> los resultados arrojaron mayores rendimientos en cuanto a concentración de ácido elágico, incluso que con el empleo del método de Wilson y Hagerman,<sup>9</sup> esto puede ser debido a que el agente hidrolizante que se empleó en el método de Lei (HCl metanólico) sea más fuerte que el empleado para el método de Wilson y Hagerman (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) y por lo tanto la liberación de ácido elágico registrada fue mayor. También se puede hablar de una sensibilidad mayor en la determinación de la concentración de ácido elágico en el método de Lei ya que la determinación de ácido elágico, en este caso, se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución.

Las metodologías empleadas en este trabajo permitieron una obtención de ácido elágico bastante significativa (tomando en cuenta las concentraciones de ácido elágico reportadas), y a pesar de que son dos métodos diferentes se puede decir que son confiables para la determinación de ácido elágico.

La relevancia de proponer fuentes alternativas para la recuperación de ácido elágico ha ganado gran importancia actualmente, ya que se ha demostrado que este compuesto de origen fenólico posee importantes propiedades biológicas con potencial aplicación en la industria farmacéutica, porque se ha demostrado que el ácido elágico posee actividad como antioxidante, antimicrobiana y antitumoral. Se menciona que el ácido elágico reacciona con un típico carcinogénico, el benzo[a]pireno-7,8-diol-9,10-epoxido (BPDE), reacción en la cual el ácido elágico actúa como un quimioprotector contra cánceres provocados por compuestos aromáticos policíclicos,<sup>7</sup> inhibiendo la mutación de células sanas, paso inicial en el desarrollo del cáncer. El ácido elágico ha sido evaluado como agente farmacéutico en pruebas de reducción de multiplicidad de tumores en vejiga de ratón por administración oral en la dieta.<sup>11</sup>

El ácido elágico ha sido reportado como antimicrobiano, debido a su efecto sobre bacterias, hongos y parásitos. Se ha encontrado que algunos extractos de la planta *Pteleopsis hylodendron*, principalmente derivados del ácido elágico, presentan actividad contra determinadas bacterias patógenas, tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Salmonella pyogenes*.<sup>12</sup> De la planta *Punica granatum* L.<sup>13</sup> se obtuvieron extractos los cuales mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* en concentraciones de 70 mg/mL.

En general el potencial biológico del ácido elágico ha sido evaluado y demostrado, lo cual potencializa su aplicación en distintas ramas de la industria, como por ejemplo, la industria farmacéutica.

## Conclusiones

Se puede concluir que la mejor fuente de obtención de ácido elágico es la cáscara de granada en sus diferentes estadios de maduración, siendo este factor determinante en la concentración de ácido elágico. A su vez, se puede mencionar que la candelilla es la mejor fuente no convencional de ácido elágico y la fuente con la menor concentración de ácido elágico es la sangre de drago. En general, los materiales vegetales que se encuentran en el semidesierto Coahuilense son una fuente confiable de ácido elágico, fuentes que pueden ser explotadas de una manera sustentable para obtener compuestos de alto valor agregado y brindarles una aplicación.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo brindado para la realización del presente estudio.

## Referencias

1. Carretero-Accame ME. Compuestos fenólicos: Taninos. *Panorama Actual Med.* 2000; (235): 633-636.
2. Bala I, Bhardway V, Hariharan S, Kumar MNVR. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *J Pharm biomed anal.* 2006; (40): 206-210.
3. Khanbabaee K and van Ree T. Tannins : Classification and definition. *Nat Prod Rep.* 2001; (18): 641-649.
4. Huang W, Ni J and Borthwick A. Biosynthesis of tannin hidrolase and hydrolysis of valonia tannin to ellagic acid by *Aspergillus SHL* 6. *Process Biochem.* 2005; (40): 1245-1249.
5. Vatterm DA and Shetty K. Solid-state production of phenolics antioxidants from cranberry pomace by *Rizhopus oligosporus*. *Food Biotechnology.* 2003; (3): 189-210.
6. Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H. Free Radical Studies of Ellagic Acid, a Natural Phenolic Antioxidant. *J Agric Food Chem.* 2002; (50): 2200-2260.
7. Huetz P, Mavaddat N and Mavri J. Reaction between Ellagic Acid and an Ultimate Carcinogen. *J Chem Inf Model.* 2005; (45): 1564-1570.
8. Wilson TC and Hagerman A. Quantitative determination of ellagic acid. *J Agric Food Chem.* 1990; (38): 1678-1683.
9. Lei Z, Jervis J y Helm RF. Use of methanolysis for the determination of total ellagic and gallic acid contents of woods and food products. *J Agric Food Chem.* 2001; (49): 1165-1168.
10. Seeram N, Lee R y Herber D. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Sep Purif Technology.* 2005; (41): 49-55.
11. Kellof GJ, Boone CW, Crowell JA, Steele VE, Lubert R, Sigman CC. Chemopreventive drug development: perspectives and progress. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; (3): 85-98.
12. Atta-Ur-Rahman NFN, Choudhary MI, Malik S, Makhmoor T, Nur-E-Alam, Zareen S, Lontsi D, Ayafor JF, Sondengam BL. New antioxidant and antimicrobial ellagic acid derivatives from *Pteleopsis hylodendron*. *Plant Med.* 2001; (67): 335-339.
13. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol.* 2000; (31): 247-256.