

**EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS COLORANTES TIPO FLAVONOIDES,  
FLOR DEL POMO (*Syzygium jambos*). ZONA VERDE DEL IEAR.  
FLORENCIA CAQUETÁ.**

Norma Constanza Bonilla Ríos<sup>1</sup>; Flor Angela Varón<sup>2</sup>; Leidy Paola Garzón<sup>3</sup>

Recibido: 19 de agosto de 2014. Aceptado: 17 de septiembre de 2014

**Resumen**

La presente investigación fue desarrollada en el marco de la convocatoria de proyectos en la línea abierta del programa Ondas Colciencias liderado por la Universidad de la Amazonia de Florencia Caquetá. La investigación estuvo orientada a: la extracción de los pigmentos colorantes tipo flavonoides en medio metanólico, identificación a través de pruebas colorimétricas y cromatográficas y la cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales, presentes en la flor de pomo (*Syzygium jambos*) colectada en la zona verde de la sede San Juan Bosco de la IEAR ubicada en Florencia Caquetá. Los pigmentos colorantes tipo flavonoides identificados fueron: catequinas, antocianinas, leucoantocianidinas, calconas, flavanonas. Los flavonoides totales expresados como mg de catequinas por gramo de extracto seco fueron 3.580,8614.

**Palabras claves:** flavonoides, tamizaje fitoquímico, cromatografía, cuantificación de flavonoides totales.

**ABSTRACT**

This research was carried out in the framework of Colciencias call for projects in the open line of Ondas program led by Amazonia University in Florencia, Caquetá. The study was oriented to the extraction of coloring flavonoid pigments in methanolic medium, the identification - through chlorimetric and chromatographic tests and spectrophotometric quantification - of total flavonoids in the *Syzygium jambos*, the Pomo tree flower, gathered in the green area of San Juan Bosco, part of the IEAR (Antonio Ricaurte School) in Florencia, Caquetá. The flavonoid pigments identified were: catechins, anthocyanins, leucoanthocyanidins, chalcones, and flavanones. The total flavonoids expressed as mg of catechins per gram of dry extract was 3,580.8614.

---

<sup>1</sup> Licenciada en Química, MSc. en Docencia de la Química. Docente de Química en la IEAR. Florencia (Caquetá). Colombia

<sup>2</sup> Zootecnista. MSc en Pedagogía. Docente de Ciencias Naturales en la IEAR. Florencia (Caquetá). Colombia

<sup>3</sup> Ingeniera Agroecóloga. Docente de la Especialidad en Gestión Ambiental en la IEAR. Florencia (Caquetá). Colombia

---



**Key words:** falvonoids, phytochemical screening, chromatography, total flavonoid quantification

## Introducción

Los colorantes son definidos como: “Aquellas sustancias naturales que añaden o devuelven algún color; se encuentran presentes como pigmentos en plantas, hojas y frutos” (Cáceres, 1996, citado por Vázquez, p. 23 ). Por otra parte, Los colorantes se dividen en varios grupos, a saber: colorantes naturales, tintes naturales y pigmentos naturales. Los colorantes naturales son productos que se adicionan a los alimentos para proporcionarles un color específico y hacerlos más agradables a la vista. Los tintes naturales se usan para teñir telas, madera y cuero. Los pigmentos naturales son los compuestos responsables del color visible de una planta; además, son los utilizados por la industria farmacéutica.

Asimismo, los colorantes naturales pueden ser clasificados según su naturaleza química en diversos grupos. Como fuentes naturales de estos colorantes se pueden considerar las plantas superiores, las algas, hongos y líquenes, algunos insectos, así como algunos organismos marinos vertebrados.

Son muchas las plantas superiores que producen colorantes; sin embargo, a pesar de su universalidad no están suficientemente concentrados para permitir una rápida y económica extracción y, en consecuencia, son escasas las que tienen gran importancia comercial como fuente de colorantes. La Tabla 1 muestra una clasificación de colorantes naturales propuesta por Lock en 1997, la cual permite visualizar que los *flavonoides* son pigmentos vegetales que contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas.

Tabla 1. *Clasificación de colorantes naturales según composición química*

Naturaleza química	Algunos ejemplos	Color
Tetrapirroloe	Ficobilinas	Azul-verde
	Clorofila	Verde
Carotenoides	Carotenoides	Amarillo-anaranjado
<i>Flavonoides</i>	Flavonas	Blanco-crema
	Flavanoles	Amarillo-blanco
	Chalconas	Amarillo
	Auronas	Amarillo

	Antocianinas	Rojo-azul
Xantonas	Xantonas	Amarillo
Quinonas	Naftoquinonas	Rojo-azul-verde
Derivados indioides e índoles	Indio	Azul-rosado
	Betalainas	Amarillo-rojo
Pirimidinas sustituidas	Perinas	Blanco-amarillo
	Flavinas	Amarillo
	Fenoxanizinas	Amarillo-rojo
	Fenazinas	Amarillo-púrpura

Es importante aclarar que los flavonoides son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonado C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> designadas como A, B y C (Figura 1.). Dependiendo del grado de oxidación y de sustitución del anillo pirano central pueden subdividirse en flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, flavanos y antocianinas. El anillo pirano puede ser abierto (chalconas) y reciclado en un anillo furano (auronas).

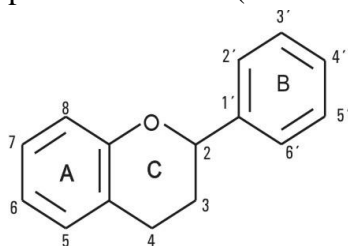


Figura 1. Estructura básica de un Flavonoide

Según estudios realizados los flavonoides poseen una gran importancia en la utilización de las plantas como colorantes naturales. Los flavonoides en forma natural se encuentran libres como glicósidos o derivados metilados en las células vivas de las plantas. Como glicósidos, uno o más grupos hidroxilos fenólicos están combinados con residuos de mono o disacáridos (Hurtado, Citado por Valencia, 1985).

Estos compuestos se encuentran en todas las plantas superiores, tanto en angiospermas como gimnospermas, dentro de las primeras se acumulan principalmente en los cromoplastos o vacuolas, otros se encuentran en una fracción lípido-soluble y están presentes en la superficie de las plantas en ceras de las hojas y exudados de los botones florales. Dicha combinación es importante debido a que se encuentran como glicósidos



en las células vivas, en el caso de pigmentos de flores, al proveer solubilidad, protección de la oxidación enzimática y estabilidad de la luz.

Por otra parte, una flor poco estudiada desde el punto de vista fitoquímico es la del pomo (*Syzygium jambos*). Sin embargo, existen muchas posibilidades que sus flores presenten un alto contenido de flavonoides. En la sede San Juan Bosco de la Institución Educativa de Florencia Caquetá abunda el árbol de pomo (*Syzygium jambos*), pero poco se sabe acerca de las propiedades fitoquímicas de sus flores. De ahí que el interrogante a resolver es cuáles son los pigmentos colorantes del tipo flavonoides contenidos en la flor del pomo proveniente de la zona verde de la San Juan Bosco, Institución Educativa Antonio Ricaurte?

Extraer a nivel de laboratorio los pigmentos colorantes de la flor de pomo a nivel escolar es una oportunidad para profundizar en el estudio de las funciones orgánicas, las técnicas de extracción, las técnicas de identificación colorimétricas, cromatográficas y espectrofotométricas características en los procesos de identificación y caracterización de compuestos orgánicos.

Se plantea como objetivo de la presente investigación, extraer los pigmentos colorantes del tipo flavonoides contenidos en la flor del pomo proveniente de la zona verde de esta Institución Educativa; identificarlos mediante pruebas colorimétrica y cromatográficas y cuantificar los flavonoides totales mediante espectrofotometría.

### **Materiales y Método.**

- *Material Vegetal.* Se colectaron las flores de Pomo en la zona verde de la Sede San Juan Bosco de la Institución Educativa Antonio Ricaurte del municipio de Florencia Caquetá, ubicada en la avenida Roberto Claros con avenida Uniamazonia esquina entre las coordenadas 1°37'10,38" de Latitud Norte y 75°36'23,07" de longitud Oeste con relación al meridiano de Greenwich. La extensión de la sede San Bosco es de 24.647 m<sup>2</sup> aproximadamente. Limita al norte con la Institución Educativa Jorge Eliecer Gaitán; al sur con el Instituto de Bienestar Familiar. En ella, se encuentra un área natural en ambiente urbano con cobertura de árboles y arbustos de importancia ecológica y/o económica, con un área aproximada de 612 m<sup>2</sup> donde se encuentran 59 árboles de pomo.
  - *Preparación del extracto vegetal de la flor de pomo.* El extracto se preparó a temperatura ambiente. Para la preparación del extracto en frío se pesó 20 g de la muestra y se agregó 175 ml de metanol. Se colocó en un frasco color ámbar por dos semanas. Luego se procedió a filtrar utilizando equipo de filtración al vacío y papel filtro Watmann 1. Se concentró el extracto metanólico en el rotaevaporador hasta completa evaporación del disolvente. Se procedió a realizar un tamizaje químico,
-

posteriormente cromatografía en capa fina y finalmente, determinación de flavonoides totales.

- *Tamizaje químico*. Para realizar este ensayo, se extrajeron alícuotas de 1 ml del extracto metanólico obtenido, realizando las reacciones específicas para este tipo de metabolito (flavonoides), a través de las reacciones colorimétricas correspondientes. Las reacciones químicas que se llevaron a cabo fueron las siguientes:
  - Ensayo de Shinoda. Se tomó una alícuota de 1 ml del extracto metanólico; se le añadió 1 ml de HCl(c) y unas virutas de Mg(s) y al terminar la reacción se le adicionó alcohol amílico y se agitó. Se dejaron separar las fases y se observó la coloración del alcohol amílico, siendo la evidencia positiva:
    - Flavonas: amarillo, naranja o rojo.
    - Flavonol o flavanonol: rojo a carmesí, rojo magenta.
    - Flavanonas: carmesí a magenta, rojo, magenta, violeta, azul.
    - Isoflavonas: amarillo.
    - Isoflavanonas, calconas y auronas: incoloras.
  - Ensayo con ácido sulfúrico concentrado. Se tomó una alícuota de 1 ml del extracto alcohólico; se concentró a sequedad; se añadió unas gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se observó la coloración, siendo la evidencia positiva una coloración diferente al carmelita claro:
    - Flavonas y flavonoles: amarillo intenso.
    - Flavanonas: anaranjado o guinda.
    - Calconas o auronas: rojo guinda o rojo azulado.
  - Ensayo con álcalis. Se tomó una alícuota de 1 ml del extracto metanólico y se basificó con hidróxido de sodio al 5 %, siendo la evidencia positiva:
    - Flavonas, flavanonol e isoflavonas: amarillo.
    - Flavanonas y flavonol: amarillo a naranja.
    - Calconas: naranja a rojo.
  - Ensayo de Rosenheim. Se tomó una alícuota de 1 ml del extracto metanólico y se le adicionó 1 ml de HCl(c) y se calentó durante 10 min; se enfrió y adicionó 1 ml de agua y 2 ml de alcohol amílico y se agitó; se dejó en reposo separándose las fases, y se observó la coloración de la fase amílica, siendo la evidencia positiva:
    - Leucoantocianidinas: rojo a marrón.
    - Antocianidinas: anaranjado o rojo azulado
  - Ensayo de catequinas. Se tomó una gota del extracto metanólico con ayuda del capilar en un papel de filtro. Sobre la mancha, se aplicó carbonato de sodio y se colocó bajo la luz UV. Una evidencia positiva es la aparición de una mancha verde carmelita.



-Determinación de la presencia de Antocianinas. Se tomó una alícuota de 1 ml del extracto metanólico, se elevó el pH de la solución a 9-10, coloración verde, castaño o azul representa la presencia de antocianinas.

- *Cromatografía en capa fina*

- Preparación de la fase móvil. Se mezcló por separado en tres beacker, en su respectivo orden; los siguientes sistemas de solventes:

I- Cloroformo-acetona-ácido fórmico (7,5: 1,65: 0,85)

II- Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-agua (8: 0,9: 0,9: 0,2)

III- Tolueno-cloroformo-acetona (4: 2,5: 3,5),

Se agitó cada mezcla durante 5 minutos con un agitador magnético (vortex) y al *beacker* que contiene cada una de las mezclas se le coloca un vidrio de reloj para taparlo. Pasados 5 minutos se trasladó cada mezcla a una cámara cromatográfica, la cual permaneció tapada.

- Preparación de las soluciones estándares. Se pesó 5 mg del estándar y se mezcló con 10 ml de metanol. Se agitó la solución para homogenizarla. Cada solución se preparó en un beacker para luego ser guardada en un recipiente sellado, debidamente identificado.

- Preparación de la placa cromatográfica. Se cortaron varias placas de aproximadamente: 2 cm x 10 cm de área de un cromatofolio de aluminio de sílice gel 60F254 y se realizaron los siguientes trazos: un centímetro arriba de la parte inferior de la placa se trazó una línea horizontal con lápiz, y a lo largo de esa línea se colocaron 2 puntos, separados uno de otro por 1 cm de distancia.

- Corrida de la placa cromatográfica. Se colocó 5  $\mu$ L del extracto metanólico en cada punto trazado en la placa cromatográfica, respectivamente, mediante el uso de capilares. Esto mismo se realizó con las soluciones estándares que se prepararon. Se colocó la placa en la cámara cromatográfica que contiene a la fase móvil. Se dejó que las líneas que aparecen con el tiempo llegaran a una distancia de 2 cm de la parte superior de la placa. Se retiraron las placas y se colocaron en la campana durante un corto tiempo con la finalidad de que se secase la fase móvil.

- Preparación de la solución reveladora. Para visualizar mejor las manchas que aparecieron en las placas, se colocaron en cámaras de cromatografía con yodo sublimado.

Las caracterizaciones parciales se realizaron utilizando la razón de recorrido (Rf), reportado por Harborne 1979, cuyos valores de Rf se calcularon según la ecuación:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

- *Contenido total de Flavonoides*

La mezcla de reacción consistió en 400  $\mu\text{L}$  de agua destilada, seguidamente se adicionó de 10 a 100  $\mu\text{L}$  de extracto (Completando a volumen de 500  $\mu\text{L}$ ), luego, se agregó 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  5% (Se esperó 5 min), luego 30  $\mu\text{L}$   $\text{AlCl}_3$  al 10% (Se esperó 5 min.), después se agregó 200  $\mu\text{L}$   $\text{NaOH}$  1M (Se esperó 15 min) y por último se adicionó 240  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Se guardó en la oscuridad y a temperatura ambiente, por 30 min. Se leyó, la Absorbancia a 510 nm (ZHISHEN *et al*, 1998). Se realizó una curva patrón usando como referencia (+)-catequina, con un rango de concentración (5-80  $\mu\text{g/ml}$ ), donde se obtuvo la siguiente ecuación lineal  $y = 0,0250x - 0,0578$ ,  $R^2 = 0,9981$ .

*Determinación de flavonoides en una muestra.* Se pesó 1 ml de extracto, se colocó en caja de Petri, se calentó hasta sequedad durante seis horas a una temperatura de 60 °C. Se dejó enfriar y se procedió a pesar el conjunto. Se determinó la masa del extracto seco. El proceso se replicó cinco veces.

## Resultados

En este estudio se utilizó como método de extracción, la percolación a temperatura ambiente (29 °C), teniendo en cuenta que si se aumentaba la temperatura era posible degradar o evaporar ciertos flavonoides volátiles que pudieran estar presentes en el extracto; empleando como solvente metanol (reactivo analítico), con el propósito de obtener el metabolito secundario de interés (flavonoides) en dicho solvente, en un período de tiempo de dos semanas.

- *Tamizaje químico.* Se realizó la determinación cualitativa preliminar de flavonoides en el extracto metanólico, a través de un tamizaje químico, de lo cual se obtuvo una evidencia positiva de flavonoides como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. *Resultados del tamizaje químico*

Metabolito	Ensayos	Evidencia	Tipo flavonoide	Color
Flavonoides	Shinoda	+	Flavanonas	Carmesí
	$\text{H}_2\text{SO}_4$ (conc.)	+	Calconas,	Rojo guinda
	Alcalis	+	Calconas	Rojo
	Rosenheim	+	leucoantocianidinas	marrón
	Catequinas	+	Catequinas	Verde



	Antocianinas	+	Antocianinas	verde
--	--------------	---	--------------	-------

En cuanto a la prueba de shinoda, se presentó el cambio de color de una solución amarilla a una solución carmesí. Con ello se demostró la presencia de flavanonas. La prueba de reacción con ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) presentó un cambio de color de una solución amarilla clara a una solución roja guinda. Con ello se demostró la presencia de calconas.

- *Análisis cromatográfico.* La caracterización cromatográfica del extracto metanólico en los sistemas de solventes evaluados, después de realizado el cromatograma y visualizados con yodo sublimado, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Evaluación cromatográfica del extracto metanólico

Solvente	Rf	Yodo
Fase I	0.15	Se observó mancha pegada a la línea de inicio.
Fase II	0,34	Se observó mancha ovalada difusa.
Fase III	0.06	Se observó mancha muy difusa.

En la corrida con el sistema de solvente I: cloroformo-acetona-ácido fórmico no se observó ningún cambio, al igual que con el sistema III: tolueno-cloroformo-acetona. En cambio, en el sistema de solvente II: acetato-ácido fórmico-ácido-agua, sí se observó separación de los pigmentos colorantes, atribuidos a antocianinas según el Rf calculado.

No obstante, la caracterización cromatográfica del extracto metanólico en los sistemas de solventes estudiados no resultó satisfactoria para la separación y detección de los compuestos flavonólicos, cuya respuesta positiva fue obtenida a través del tamizaje químico efectuado previamente, lo cual pudo estar relacionado con los efectos de polaridad de las fases estudiadas.

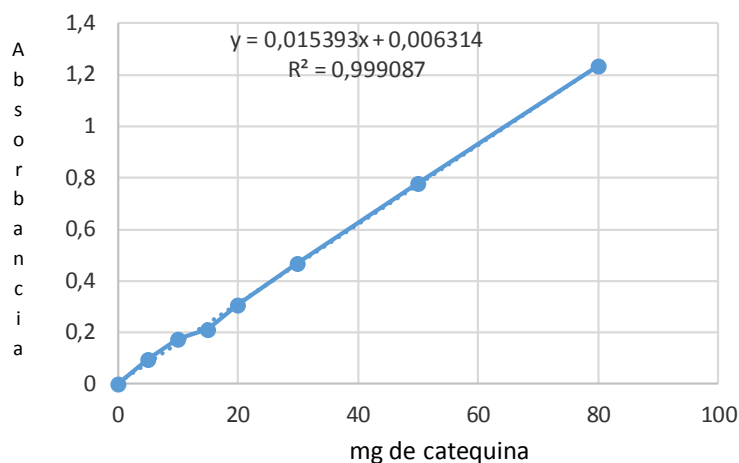
No se puede proponer un flavonoide específico porque las fases empleadas en este estudio son generales para determinar tipos de flavonoides. Además, la resolución de las manchas en las fases empleadas, no resultó satisfactoria, permitiendo solamente, definir el tipo de flavonoide. Para obtener un resultado concluyente, al respecto, se deben evaluar sistemas de solventes específicos para estos tipos de flavonoides.

- *Análisis de flavonoides totales.* La curva de calibración obtenida para este ensayo se presenta en la figura. 2. Teniendo en cuenta los datos de absorbancia para los extractos



preparados, se encontró que los flavonoides totales fueron 3.580,8614 mg de catequina por g de extracto seco de flor de pomo.

Figura 2. Curva de calibración utilizando catequina como estándar a 510 nm.



Sería adecuado seguir analizando con más detalle esta flor y sus efectos en relación con el hombre. Investigaciones revelan que los flavonoides son metabolitos secundarios que poseen propiedades antioxidantes, son tenidos en cuenta para el tratamiento de trastornos cardíacos y del sistema nervioso.

## Discusión

La flor de pomo contiene un alto contenido de flavonoides los cuales deben ser identificados a través de otras técnicas más específicas como la cromatografía líquida de alta resolución, HPLC. Con este trabajo queda abierto el espacio para futuras investigaciones que permita la caracterización de metabolitos secundarios distintos a los flavonoides y sus posibles aplicaciones.

## Conclusiones

Se puede concluir que, la presencia de pigmentos colorantes del tipo flavonoides en el extracto de flor de pomo se demostró mediante pruebas colorimétricas, cromatográficas y espectrofotométricas. Se realizaron 6 pruebas colorimétricas: la reacción de Shinoda, la reacción con ácido sulfúrico concentrado, reacción con álcalis, ensayo de Rosenheim, ensayo de catequinas, ensayo de Antocianinas (ver tabla 2). En todas las pruebas se presentaron cambios de colores, lo que demuestra la presencia de flavonoides, tales como: calconas, antocianinas, leucoantocianidinas, catequinas y flavanonas.

En la cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales expresados como mg de catequinas por g de extracto seco de flor de pomo fue de 3.580,8614.



### Agradecimientos

A la MSc. Paula Liliana Galeano, profesora de la Universidad de la Amazonia por la asesoría durante el desarrollo del presente proyecto de investigación.

A José Ramón. Químico de la Universidad de la Amazonia. Joven Investigador del programa Conciencias, quien apoyó de manera desinteresada y constante muchos de los ensayos fitoquímicos en los laboratorios de la Universidad de la Amazonia.

A la Química Marcela por facilitar las instalaciones de los laboratorios de la Universidad de la Amazonia , equipos y algunos de los reactivos requeridos para efectuar esta investigación que no se pudieron comprar con el recurso asignado al proyecto.

Al profesor Marco Correa por su apoyo en el proceso de caracterización taxonómica de la especie vegetal, (*Syzygium jambos*) y personal del Jardín Botánico y Herbario.

### Referencias Bibliográficas

Cáceres, A. (1996). *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria.

Lock, O. (1997). *Colorantes naturales*. Perú: Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

Lock, O. *Análisis Fitoquímico y Metabolitos Secundarios*. Pontificia Universidad Católica del Perú. [serie en Internet]. Disponible en: <http://www.macaperuana.com/analisis.htm>

Ruiz, S. (2008). *Determinación de la técnica de extracción de flavonoides totales de las hojas de Mangifera indica*. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo.

Valencia, C. (1985). *Los productos de las plantas: una visión integral*. México

Vásquez , H. (2004) y Cano Morales, T. *Extracción, a nivel de laboratorio, de los pigmentos colorantes del tipo flavonoides contenidos en la flor del subín (acacia farnesiana l. Willd) proveniente de un bosque silvestre guatemalteco*. Trabajo de grado. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química Guatemala. México.

---