

Caracterización de la composición de carbohidratos en extractos acuosos de la corteza de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.)

Characterization of carbohydrate composition of aqueous extracts from red mangrove bark (*Rhizophora mangle* L.)

Recepción del artículo: 05/06/2024 • Aceptación para publicación: 22/08/2024 • Publicación: 01/09/2024

● <https://doi.org/10.32870/e-cucba.vi23.361>

Mario Noa-Pérez*,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4639-0123>
Luis Eduardo Segura-García
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4158-4490>
Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
Departamento de Salud Pública. Zapopan, Jalisco, México.
Ramón Reynoso Orozco
Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
Departamento de Biología Celular y Molecular.
Zapopan, Jalisco, México.
mario.noa@academicos.udg.mx

Resumen

El mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) es una planta muy utilizada en la herbolaria con numerosas propiedades farmacológicas, con alto contenido de compuestos fenólicos, los cuales le proporcionan propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antimutagénicas, citotóxicas y antiulcerosas. La composición de compuestos no fenólicos, como los carbohidratos presentes en extractos acuosos de corteza de *R. mangle* fueron caracterizados en este estudio utilizando los métodos de análisis de carbohidratos como trimetilsilil derivados (TMS) y derivados de acetato de alditol (AA) como método de confirmación, ambos mediante cromatografía de gases. El total de azúcares en el liofilizado representó un 17.5%, en el que debe considerarse la presencia del componente mayoritario que representa el 14.8% y solo el 2.7% representa las estructuras carbohidricas. La composición de los carbohidratos de la corteza de *R. mangle* fue del 17.5% en peso, y la composición cualitativa identificó ramnosa, arabinosa, xilosa y fucosa (56.94, 13.33, 12.62 y 12.35% respectivamente) y ribosa (4.75%). En ambos métodos de derivación utilizados persiste la detección de un compuesto no carbohidrico mayoritario, posiblemente derivado de un polifenol co- extraído, que alcanzó a derivatizarse conjuntamente con los carbohidratos.

Palabras clave: Composición carbohidrica, mangle rojo, compuestos fenólicos.

Abstract

Red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) is widely used in herbal medicine due to its numerous pharmacological properties, primarily attributed to its high content of phenolic compounds. These compounds provide antioxidant, antimicrobial, antimutagenic, cytotoxic, and antiulcer properties. The composition of carbohydrates in the aqueous extract of red mangrove bark (*R. mangle*) was characterized using trimethylsilyl (TMS) derivatives of carbohydrates and confirmed with alditol acetate (AA) derivatives. Total sugars in the freeze-dried product represented 17.5%, with the major component accounting for 14.8%, and carbohydrate structures representing only 2.7%. The carbohydrate composition of *R. mangle* bark included rhamnose, arabinose, xylose, and fucose (56.94%, 13.33%, 12.62%, and 12.35%, respectively) and ribose (4.75%). Both derivatization methods revealed the presence of a major non-carbohydric compound, possibly a polyphenol co-extracted and analyzed with the carbohydrates.

Keywords: Rainfall, temperature, drought, relative humidity, wind.

Introducción

Mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) es una especie vegetal que posee diferentes aplicaciones etnobotánicas (Regalado *et al.*, 2016), constituyendo el extracto acuoso de sus cortezas la base activa en la obtención de varios medicamentos ya registrados para su uso veterinario y humano en países tropicales y sub-tropicales, basados en sus propiedades antimicrobianas y cicatrizantes (Regalado *et al.*, 2016), e hipoglicemiantes (Andrade-Cetto *et al.*, 2017). El efecto antimicrobiano está ligado en muchos casos con la capacidad antioxidante de las moléculas presentes en los extractos acuosos de *R. mangle* (Damm *et al.*, 2023) aunque también los antioxidantes están relacionados con la capacidad antimutagénica o anticancerígena que se le han atribuido a los extractos de esta planta (Malini *et al.*, 2010). También han sido estudiados extractos crudos y etanólicos del fruto, en los que se han encontrado propiedades antimicrobianas y actividad citotóxica contra células HT1080 de fibrosarcoma humano (Hicks *et al.*, 2011). Además de las aplicaciones empíricas, derivadas casi siempre de la medicina tradicional, se han descubierto nuevas propiedades farmacológicas de esta planta (Damm *et al.*, 2023), dentro de las que destaca el efecto antiulceroso (Regalado *et al.*, 2016).

El extracto acuoso de las cortezas de *R. mangle* presenta como componentes mayoritarios estructuras polifenólicas (Sánchez *et al.*, 2008), sin embargo, coexisten otras estructuras no fenólicas representadas en una elevada proporción en el extracto (45.22%) que contribuyen sin duda a los efectos biológicos de la planta. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar la composición de los carbohidratos contenidos en el extracto acuoso de *R. mangle*.

Materiales y métodos

Determinación de carbohidratos por el método de trimetilsilil derivados (TMS)

La corteza de *Rhizophora mangle* fue colectada en cinco regiones de la costa norte de Cuba. Esta luego se molió hasta un tamaño de partícula de 0.4 mm, y se almacenó en bolsas de polietileno en un lugar fresco con una temperatura media de 25°C y una humedad relativa del 50%. La corteza pulverizada se procesó mediante cocción en agua destilada (1:7 m/v) durante 30 minutos a 95°C sin agitación, en un reactor vitrificado con capacidad de 250 L. El extracto acuoso se filtró y centrifugó para eliminar partículas mayores a 1 mm, usando una centrifuga de flujo continuo. Luego se concentró el extracto hasta una concentración de 24 mg de materia seca/mL en un reactor de acero inoxidable determinada mediante un equipo de

equilibrio IR, produciendo un residuo seco que oscilaba entre 30 y 40 mg/ml a pH 4- 6. Se ha demostrado que esta concentración garantiza la actividad farmacológica del extracto, y en este caso los extractos concentrados se liofilizaron. Se analizaron y promediaron los extractos obtenidos de las cinco diferentes zonas costeras.

El método de análisis utilizado para la determinación de carbohidratos aprovecha la liberación de los carbohidratos libres y enlazados a compuestos fenólicos mediante el propio efecto del medio alcalino proporcionado por la piridina, en la conversión de los azúcares a sus correspondientes oximas y su posterior derivación a trimetil-silil-ésteres para ser analizados por Cromatografía Gas-Líquido (CGL) (Drozd, 1981). La identificación se llevó a cabo mediante los tiempos de retención y los espectros de masas correspondientes.

Las muestras fueron procesadas como sigue: a 25 mg del extracto acuoso de *R. mangle* liofilizado o en su caso, y como estándares de carbohidratos se utilizaron 1 mg de xilosa, arabinosa; fructosa; manosa y Sacarosa, con inositol como estándar interno. Seguidamente se adicionó 1 mL de la solución de clorhidrato de hidroxilamina a 25 mg/mL en piridina, y ésta se calentó a 75- 80°C durante 30 minutos en baño de agua con agitación ocasional en Vortex. Posteriormente se enfrió hasta temperatura ambiente y una alícuota de 50 µL se derivatizó en un tubo de ensayo de 1 mL añadiendo 150 µL de hexametildisilazano (HMDS), agitando brevemente. Seguidamente se adicionaron 100µL de ácido trifluoroacético (TFA) agitando brevemente, y se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente antes de inyectarse en CGL. Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases GC-MS JEOL Model JMS-DX 300 (JEOL, Tokyo, Japan) en la modalidad de impacto electrónico (EI) utilizando una columna capilar DB-1 de 25 m x 0,32 i.d. x 0,25 µm. El programa de temperaturas fue de 80- 280° C a 8°C/ min; el inyector, y la Fuente se mantuvieron a 280°C; el flujo de gas acarreador (helio) a 1 mL/min y el detector EI operó a 70 eV.

Determinación de carbohidratos por el método de acetato de alditol (AA)

La hidrólisis de los polifenoles conteniendo carbohidratos en las estructuras complejas se realizó de la siguiente manera: una alícuota de 1- 2 mg del extracto de *R. mangle* liofilizado se hidrolizó a 100°C en estufa, durante 1 hora en 2 mL de HCL 2N, en un tubo con tapa de rosca. Una vez enfriada la mezcla de agliconas, se extrajo tres veces con porciones de 2 mL de alcohol amílico. Ambas fases separadas se evaporaron a sequedad en evaporador rotatorio de vacío a 30°C. La fase acuosa, conteniendo los carbohidratos se derivó para identificar y cuantificar los carbohidratos como AA por CGL empleando el procedimiento descrito por

por Ruiz Matute et al, 2011, ligeramente modificado, como sigue:

Para la reducción de los azúcares se añadió a la fase acuosa 1 mL de una solución de borohidruro de sodio (NaBH₄) al 0.5 M en amoníaco 2 M; se calentó a 60°C por 1 hora. Al cabo de este tiempo se le añadió 0.5 mL de acetona para evaporar el exceso de NaBH₄, llevando a sequedad en rotoevaporador a 30°C.

Para la derivación, a la muestra reducida se le añadieron 0.2 mL de ácido acético glacial, 1 mL de acetato de etilo y 3 mL de anhídrido acético, seguidos de 100 µL de ácido perclórico y se enfrió, añadiendo 10 mL de agua y 1 mL de diclorometano. El diclorometano se separó y se inyectó en un cromatógrafo de gases Pye Unicam GCD, equipado con detector de ionización de flama (FID). Las condiciones cromatográficas de la separación fueron: Columna de vidrio de 1.5 m x 4 mm d.i., rellena con SP-2340 al 3% sobre Supelcoport 100- 120 mallas (0.125- 0.149 mm), las temperaturas de análisis fueron columna 215°C (isotérmica), inyector: 250°C, detector: 300°C, flujo de gas acarreador (nitrógeno): 35 mL/min.

La determinación cuantitativa de los azúcares se realizó mediante el uso de m-inositol como estándar interno.

Resultados y discusión

Determinación de carbohidratos por el método de trimetilsilil derivados (TMS)

Fue necesario utilizar ambos métodos de forma paralela para generar derivados volátiles de los carbohidratos: la producción de acetatos de alditol o la trimetilsililación (TMS). Debido a que los monosacáridos permanecen en la forma de anillo en la metanólisis, una mezcla de las formas furanosa y piranosa, así como de los anómeros α y β de cada monosacárido; son generados en la derivación. Los diversos picos producen un patrón característico que permite la identificación mediante los tiempos de retención. Aún más, el método TMS facilita la identificación simultánea de carbohidratos neutros y amino azúcares, así como azúcares ácidos.

La determinación de los carbohidratos en forma de TMS derivados de la hidrólisis de los polifenoles enlazados a carbohidratos (hidrolizables) la proporciona el medio alcalino piridina en la conversión de los azúcares a sus correspondientes oximas. En la figura 1 se representa el cromatograma de la muestra de *R. mangle* obtenido de la muestra analizada.

El procedimiento de análisis de TMS tiene la ventaja de permitir el análisis tanto de monosacáridos como disacáridos, incluyendo las cetosas, que no pueden ser analizadas por otros métodos como los AA. En el Cuadro 1 se muestran los resultados de los tiempos de retención de los picos que se obtuvieron después de analizar la muestra.

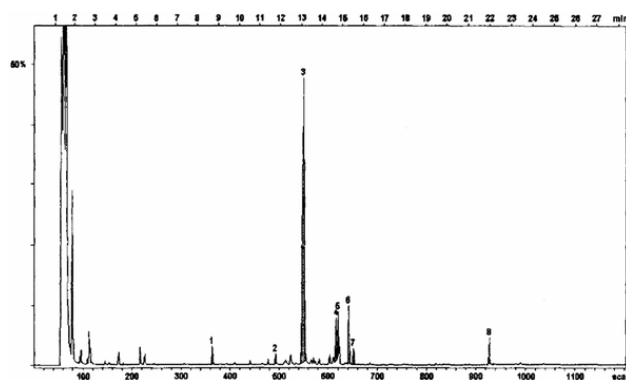


Figura 1. Cromatograma de TMS derivados de azúcares en corteza de *R. mangle*:

1: Desconocido; 2: Xilosa/arabinosa; 3: Desconocido; 4 y 5: Fructosa; 6 y 7: Manosa; 8: Sacarosa.

Cuadro 1. Composición de carbohidratos en el extracto acuoso de cortezas de *R. mangle* por el método de TMS derivados.

Nº de pico	tr (min.)	PORCENTAJE RELATIVO	Compuesto
2	12.04	4.67	Xilosa/ arabinosa
4	16.25	22.12	Fructosa
5	17.25	22.07	Fructosa
6	17.46	29.81	Manosa
7	19.00	8.86	Manosa
8	19.45	12.48	Sacarosa

El hecho de encontrarse varios picos correspondientes a las diferentes formas tautoméricas de algunos monosacáridos indica que la formación de la oxima de los azúcares no se alcanzó completamente en nuestras muestras.

Como se aprecia, las muestras presentan picos no coincidentes con los estándares empleados, pero en especial el pico mayoritario posee un tiempo de retención (tr) de 13.08 minutos (Fig. 1), lo cual fue como desconocido entre los estándares reportados para TMS-oximas de carbohidratos. Este compuesto mostró un pico base de 217, mientras que los carbohidratos comúnmente poseen picos bases a m/e 73 ó 103 (Figura 1). Por ello fue necesario la aplicación de la derivación con el método de AA, para tratar de elucidar la identidad de estos picos, así como el uso de diferentes condiciones cromatográficas y cambio de columna con los derivados TMS para aclarar estas incertidumbres.

Determinación de carbohidratos por el método de AA

El objetivo fundamental para la realización de este método, fue la confirmación del compuesto aparentemente carbohidrico, mediante su derivado AA, mucho más selectivo para azúcares. Por lo que la muestra derivada fue sometida a iguales condiciones cromatográficas (CG/EM) que los derivados trimetilsililados, resultando que el pico mayoritario no corresponde a un espectro de masas de un AA derivado de azúcar.

En el Cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos representados en los porcentajes relativos de cada uno de los azúcares, mientras que en la Figura 2 se muestran los cromatogramas de AA de la muestra y estándares utilizados.

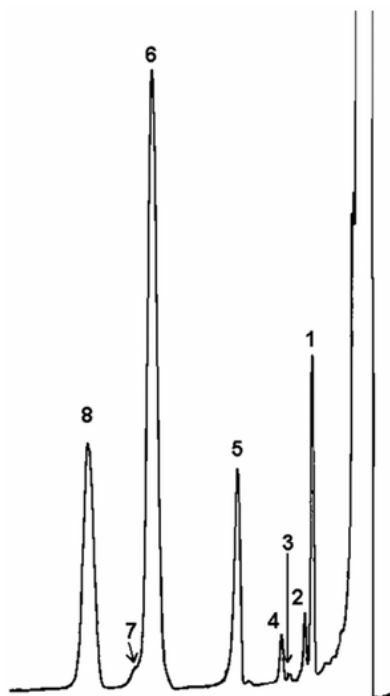


Figura 2. Cromatograma de AA de extracto de corteza de *R. mangle*: 1: Ramnosa; 2: Fucosa; 3: Ribosa; 4: Arabinosa; 5: Xilosa; 5: Glucosa; 6: Desconocido mayoritario; 7: Desconocido*; 8: m- inositol (estándar interno).

Cuadro 2. Composición de carbohidratos en el extracto acuoso de cortezas de *R. mangle* por el método de AA.

Nº de pico	tr (min.)	PORCENTAJE RELATIVO	Compuesto
1	2.87	56.94	Ramnosa
2	3.09	12.35	Fucosa
3	4.26	4.75	Ribosa
4	4.69	13.33	Arabinosa
5	7.22	12.62	Xilosa
9	15.8	--	m- inositol (Estándar Interno)

Como se observa en la Figura 2, el componente no identificado representa el mayor porcentaje del total de los azúcares, por lo que se determinó el porcentaje relativo solamente de los azúcares identificados y se obtuvo que los más abundantes en orden decreciente fueron ramnosa, arabinosa, xilosa y fucosa (56.94, 13.33, 12.62 y 12.35% respectivamente). El otro azúcar presente en este extracto acuoso fue la ribosa (4.75%) siendo el menos abundante. El espectro de masas obtenido del compuesto desconocido efectivamente no corresponde con el de un derivado acetilado de carbohidrato (Fig. 3), por lo que sólo se puede suponer que se trate de una estructura fenólica co- extraída, que pasó de igual forma el paso de la derivación de AA, y no pudo ser identificada.

En general, el método de AA en este caso particular resultó menos potente en la identificación de los carbohidratos, que el de TMS derivados, pero éste a su vez, a pesar de haber sido utilizado exitosamente en muestras de alimentos de naturaleza compleja, no resultó tampoco lo suficientemente específico para el análisis de *R. mangle*.

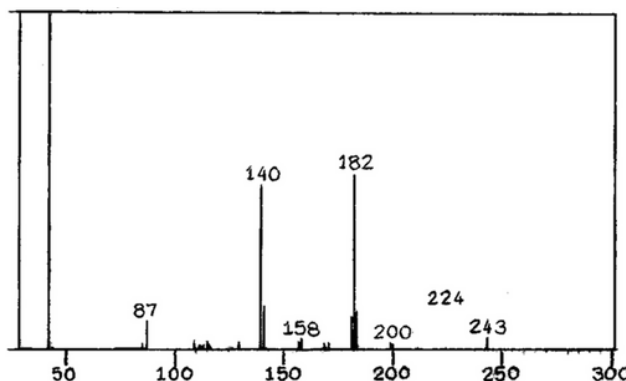


Figura 3. Espectro de Masas del compuesto desconocido mayoritario detectado con el método de AA.

El total de azúcares en el liofilizado representó un 17.5%, en el que debe considerarse la presencia del componente mayoritario que representa el 14.8% y solo el 2.7% representa las estructuras carbohidricas.

El patrón de carbohidratos obtenido en esta especie vegetal coincide en lo general con Streit y Fengel quienes en 1994 reportaron la presencia de glucosa, xilosa, arabinosa, ramnosa, glucosa y ácido gálico como producto de la hidrólisis ácida vinculado con los taninos de *Quebracho colorado*.

Los monosacáridos neutros encontrados en las cortezas de *R. mangle* coinciden con los reportados para raíces de esta especie vegetal por Moers *et al.* (1990) en las que la mayor proporción la representa la glucosa, determinados por el método de AA con m- inositol como estándar interno mediante CG/EM en condiciones similares. El compuesto mayoritario encontrado en el presente análisis de carbohidratos fue denominado como desconocido: no aparece en el reporte antes citado, su tiempo de retención no coincide tampoco con los azúcares minoritarios reportados (alosa, altrosa, tetrosas, mono-O-metil-aldosas); lo que se sugiere que se trata de una estructura no carbohidrica; considerando que las reacciones de derivación aplicadas no son específicas para carbohidratos, por lo que puede detectarse otras estructuras, relacionadas con moléculas polifenólicas.

Se han reportado diversos compuestos de este tipo en *R. mangle*. Kandil *et al.*, 2004 determinaron que el 23% del extracto seco se hojas de *R. mangle* correspondía a polifenoles, siendo 7 flavonoides glicosilados y 5 derivados de quercetina, además de diglucósidos de miricetina y kaempferol en menor concentración.

Los flavonoides encontrados estaban acomplejados con una mezcla de taninos, y compuestos glucosilados de catequina y epicatequina, por lo que los polifenoles y los carbohidratos están relacionados y acomplejados.

La aplicación de ambos métodos de derivación utilizados en este estudio para la determinación de carbohidratos permitió conocer el perfil completo de estos elementos, tanto monosacáridos como disacáridos.

Conclusión

La composición de los carbohidratos de *R. mangle* fue del 17.5% en peso, y la composición cualitativa identificó ramnosa, arabinosa, xilosa y fucosa (56.94, 13.33, 12.62 y 12.35% respectivamente) y ribosa (4.75%).

En ambos procedimientos de derivación persiste la aparición de un compuesto no carbohidrico mayoritario, posiblemente derivado de un polifenol co- extraído y analizado con los azúcares.

Literatura citada

- Andrade-Cetto, A., Escandón-Rivera, Gerado, S., Mata Torres-Valle, G. y Quijano, L. (2017): Phytochemical composition and chronic hypoglycemic effect of *Rhizophora mangle* cortex on STZ-NA-induced diabetic rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27, 744-750. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.09.007>
- Damm, B., Schaffel, I., dos Santos, G., Azevedo, L., Ferreira, R. y de Moura, P. (2023): Antioxidant Capacity of *Rhizophora mangle* Bark Extracts: A Contextualized Approach in the Teaching of Analytical Chemistry. *Journal of Chemical Education* 2023 100 (11), 4449-4455.
- Drozd, J. (1981). Chemical derivatization in gas chromatography. *Journal of chromatography library*, 19, 53- 72.
- Hicks, M., Bailey, M., Thiagarajan, T., Troyer, T. y Huggins, L. (2011). Antibacterial and cytotoxic effects of red mangrove (*Rhizophora mangle* L. Rhizophoraceae) fruit extract. *European Journal of Scientific Research*, 63(3), 439-446. <https://www.researchgate.net/publication/288470651>
- Kandil, F., Grace, M., Seigler, D y Cheeseman, J. (2004). Polyphenolics in *Rhizophora mangle* L. leaves and their changes during leaf development and senescence. *Trees*, 18(1), 518-528. <https://doi.org/10.1007/s00468-004-0337-8>
- Malini, M., Marin-Morales, M., Montovani, S., Jamal, C., Nati, N., da Silva-Passos, T. y Matsumo, S. (2010). Determination of the antimutagenicity of aqueous extracto of *Rizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test system. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 176-181. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000106>
- Moers, M., Baas, M., De Leeuw, J., Boon, J y Schenck, P. (1990). Occurrence and origin of carbohydrates in peat samples from a red mangrove environment as reflect by abundances of neutral monosaccharides. *Geochimica e Cosmochimica Acta*, 54(9), 2463-2472. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(90\)90233-B](https://doi.org/10.1016/0016-7037(90)90233-B)
- Regalado, A., Sánchez, L. y Mancebo, B. (2016): *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo): Una especie con potencialidades de uso terapéutico. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 4,(1), 1-17. <http://jppres.com/jppres>
- Ruiz-Matute, A., Hernández-Hernández, O., Rodríguez-Sánchez, S., Sanz, M. y Martínez-Castro, I. (2011). Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 879, 1226-1240. doi:10.1016/j.jchromb.2010.11.013
- Sánchez, M., Melchor, G., Alvarez, S. y Bulnes, C. (1998). Caracterización química y toxicológica de una formulación cicatrizante de *Rhizophora mangle* L. *Rev. Salud Anim*, 20(2), 69-72.
- Sánchez, L., Valcárcel, L., Escobar, A. y Noa, M. (2008). Polyphenol and Phytosterol Composition in an Antibacterial Extract from *Rhizophora mangle* L. bark. *J Herbal Pharmacotherapy*, 7(3-4), 107-128. <https://doi.org/10.1080/15228940802142720>
- Streit, W. y Fengel, D. (1994). Purified tannins from a Quebracho colorado. *Phytochemistry*, 36(2), 481-484. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97100-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97100-0)