



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Contributions to the quality control of two crops of economic importance : hops and yerba mate

Wilson, E.G.

Citation

Wilson, E. G. (2012, September 5). *Contributions to the quality control of two crops of economic importance : hops and yerba mate*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/19742>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/19742>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19742> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Wilson, Erica Georgina

Title: Contributions to the quality control of two crops of economic importance: hops and yerba mate

Date: 2012-09-05

resumen

En esta tesis se describe el desarrollo de las soluciones para dos problemas relacionadas con el control de la calidad de dos materias primas, lúpulo y yerba mate, utilizadas en la manufactura de productos de consumo masivo, cerveza y mate. Para la fabricación de cerveza se utilizan diferentes tipos de productos elaborados con los estróbilos femeninos, conocidos también como "conos" de *Humulus lupulus* (Cannabinaceae) ya que le confiere el amargor característico y además cumplen un rol importante en la estabilización de la espuma. Estas actividades se deben a la presencia de los principios amargos conocidos como iso- α -ácidos que se forman durante la elaboración de la cerveza por isomerización de los denominados α -ácidos que se encuentran en el lúpulo -humulona, cohumulona y adhumulona- produciendo 3 pares de estereoisómeros, *trans/cis*-isohumulona, *trans/cis*-isocohumulona y *trans/cis*-isoadhumulona, respectivamente.

Si bien no hay ninguna duda acerca de la responsabilidad de estos compuestos en el amargor de la cerveza, no está claro si todos los isómeros contribuyen de igual manera a la misma y la única manera de evaluar esto es poder contar con cantidad suficiente de los compuestos puros en estado de alta pureza para poder someterlos a paneles de degustación. Sin embargo, estos compuestos no están disponibles en el mercado. Más aún, los únicos compuestos disponibles como sustancias de referencia son mezclas de las sales de los tres isómeros de los *trans*-iso- α -ácidos con dicitclohexilamina (DCHA), claramente inadecuados para pruebas sensoriales. Nos propusimos, por lo tanto, producir estos compuestos en un estado adecuado para su uso en ensayos con paneles de degustación.

Estos compuestos presentan una alta sensibilidad a la degradación por efectos de la luz y el oxígeno, características muy importantes a tener en cuenta en el diseño del método de obtención. Por otra parte, son compuestos ácidos, con diferencias leves en su pK_a e hidrofiliidad. Para la obtención de los compuestos combinamos separaciones cromatográficas preparativas utilizando una técnica líquida/líquida muy poderosa conocida como cromatografía de partición centrífuga (CPC), con métodos de precipitación selectiva de los isómeros. Nuestros primeros esfuerzos consistieron en la separación por CPC de los tres α -ácidos - humulona, cohumulona y adhumulona- utilizando un método desarrollado por Hermans-Lokkerbol et al. (1997) que luego se sometieron a una isomerización en medio alcalino catalizada con magnesio, siguiendo un procedimiento ligeramente modificado de la publicada por Koller (1968). La mezcla de

isómeros *cis/trans* se sometió a la precipitación con DCHA obteniéndose las sales de *trans*-iso- α -ácidos con DCHA (Thornton *et al.*, 1993). Esto permitió la separación de los seis isómeros, aunque con un rendimiento muy bajo, producto de los bajos niveles de recuperación obtenidos al regenerar los isómeros *trans*- de la sal que forman con el DCHA y la eliminación de todo vestigio de este compuesto tóxico y de características organolépticas sumamente desagradables. De todos modos, este método nos permitió obtener complejos o sales de DCHA de los isómeros *trans*- individuales, algo que no está disponible comercialmente. Sus contrapartes *cis*- también se podrían ofrecer en solución metanólica de concentración conocida para su utilización como sustancias de referencia ya que estos isómeros no son tan susceptibles a la oxidación como el caso de los isómeros *trans*- (Capítulo 3).

La segunda estrategia se basó mucho más en la separación por CPC. Como punto de partida se utilizó un extracto isomerizado de lúpulo o un extracto supercrítico de lúpulo que isomerizamos, que tratamos con DCHA, obteniendo una mezcla de los tres isómeros *cis*- y una mezcla de isómeros *trans*-. Estas mezclas se sometieron a CPC, obteniéndose la mejor separación con una aplicación especial conocida como "pH-zone refining", especialmente adecuada para separar mezclas de ácidos o bases al trabajar con la relación entre la ionización de los distintos componentes de acuerdo a sus valores de pK_b o pK_a y el pH tanto de la fase móvil como la fase estacionaria, ambos líquidos. En este caso la mejor separación se logró con un sistema bifásico formado por n-hexano: metanol: agua (10:5:5). La fase orgánica superior se utilizó como fase estacionaria, agregándose un 2% de ácido trifluoroacético y 0.05 % de hidróxido de amonio a la fase acuosa inferior. Luego de 1,5 horas de elución, se duplicó la concentración de hidróxido de amonio. Los compuestos se eluyeron con un flujo de 2.0 ml/min, una velocidad de rotación de 900 rpm y se detectaron a 270 nm. En este caso el DCHA se eliminó durante la separación y se obtuvieron los isómeros puros. Se aplicó el mismo método a un extracto de lúpulo isomerizado y se obtuvieron 3 de los 6 isómeros en un estado de pureza aceptable (>95%): *cis*-isohumulona, *cis*-isoadhumulona y *trans*-isohumulona. No se pudo obtener *trans*-adhumulona por su bajo porcentaje la *trans*-isohumulona eluyó durante una hora contaminando y bajando el rendimiento de otros compuestos tales como la *trans*-isocohumulona y la *cis*-isocohumulona (Capítulo 4).

El método que resultó claramente mejor se basó en la separación por CPC de un extracto CO₂ supercrítico, seguido de la isomerización en medio alcalino catalizado por magnesio de los α -ácidos y la formación de un complejo de inclusión con β -ciclodextrina exclusivo con isómeros *trans*-iso- α -ácidos. Los isómeros *cis*- se

encuentran solubilizados en el sobrenadante de la mezcla precipitante del cual se pueden extraer con un solvente no polar y mantener en solución etanólica. El complejo sólido formado entre la β -ciclodextrina y los *trans*-iso- α -ácidos resultó muy estable. Más aún, cuando este método se aplicó a un extracto isomerizado, fue posible obtener un extracto que tiene los isómeros *cis*- solamente. Las condiciones utilizadas para la formación del complejo fueron las siguientes: se preparó una solución de β -CD disolviendo 1-8 g (equivalente a $1,58 \times 10^{-3}$ moles) de β -CD en 18 ml de etanol: agua (1:2, v/v) calentando a 50°C. Las muestras se prepararon disolviendo aproximadamente 0.5 g de iso- α -ácidos (equivalente a $1,57 \times 10^{-3}$ moles, considerando un PM=326 da en 6.5 ml de etanol. Esta solución se agrega en forma de gota a 18 ml de la solución de β -CD, mientras se agita continuamente a 50°C durante 30 minutos. La mezcla se deja a 4°C durante 3 días en ausencia de la luz después de lo cual se observa un precipitado blanquecino correspondiente al complejo con β -CD quedando un sobrenadante traslúcido incoloro donde están los isómeros *cis*- (Capítulo 5). Este sólido es sumamente estable a la luz y el oxígeno, aunque no así sus soluciones acuosas. Esta reacción también permitió preparar un extracto isomerizado de lúpulo que contiene sólo los isómeros *cis*- que son notablemente más estables que los isómeros *trans*-.

La segunda parte de la tesis se trata de un estudio realizado sobre *Ilex paraguariensis*, una planta utilizada para preparar un té sumamente popular en S. América, la yerba mate. En el capítulo 6 se discute su relevancia económica local y la velocidad a la cual se extiende su uso, especialmente en Argentina, Paraguay y Uruguay. El hecho de que la industrialización de la yerba mate sea relativamente reciente, explica la necesidad que existe de mejorar parámetros de calidad que podrían contribuir a mejorar los procesos de producción para asegurar un producto final más seguro y con atributos sensoriales más consistentes a través del tiempo. Por otra parte, hay un gran interés en promover la yerba mate a la categoría de alimento funcional, lo cual aumenta la exigencia en cuanto a lograr una calidad consistente.

El capítulo 7 es una revisión de la composición química y de las bioactividades del *I. paraguariensis* y de la yerba mate. Los metabolitos secundarios más importantes son metilxantinas, principalmente cafeína y cantidades menores de teobromina, derivados cafeoilquínicos, entre los cuales los mayoritarios son los ácidos neoclorogénico y clorogénico y saponinas. La mayor parte de las investigaciones realizadas sobre las especies de *Ilex* se remontan a los años '80, pero aún cuando son relativamente recientes, se caracterizan por tener una gran inconsistencia. Las variaciones en el contenido de xantinas son notables pero tal vez explicables por la

diversidad del origen y condiciones de recolección y/o tratamiento de las muestras analizadas, pero las dudas sobre la presencia de teofilina en algunas especies e inclusive la detección por algún grupo de investigadores de xantinas en otras especies cogenéricas de *I. paraguariensis* son verdaderamente llamativas. También existen dudas acerca del contenido de ciertos polifenoles, inclusive hay una controversia sobre la presencia luteolina o canferol. Esto, tal vez, se pueda explicar por las limitaciones del instrumental utilizado en estas determinaciones, en general, por HPLC o inclusive TLC, en los cuales los compuestos se identificaron solamente en base a sus tiempos de retención o a lo sumo por su espectro UV. El empleo de métodos tales como LC/MS y ¹HNMR están posibilitando el esclarecimiento de muchas de estas controversias, de manera que se debería reevaluar la utilidad de gran parte de los trabajos realizados anteriormente. En el caso de las bioactividades, si bien es innegable que tanto el *I. paraguariensis* como la yerba mate son productos con actividades farmacológicas interesantes, también está claro que muchos de los estudios realizados se deberían reeinterpretar más objetivamente y aplicando un estándar más riguroso, ya que muchas de las actividades informadas se observan a dosis o niveles que no se consideran como activas- esto se observa especialmente en el caso de estudios de actividad antimicrobiana por ejemplo. Todos estos temas son de gran importancia ya que la Yerba mate y sus derivados se utilizan con fines medicinales, estando incluidas en las Farmacopeas Argentina, Brasilera, como así también en la Pharmacopee Francaise y la DAB. Hay asimismo, una monografía de Comunidad Europea titulada *Mate folium*.

Como se discute en el capítulo 7, todas las especies de *Ilex* tienen una composición química cualitativamente semejante, y mientras *I. paraguariensis* se diferencia por su contenido en xantinas, las demás especies tienen grupos fitoquímicos semejantes. En el capítulo 8 describimos una posible solución para uno de los tantos temas que afectan la calidad de esta infusión herbaria, es decir, la implementación de un método que permita detectar la adulteración de las hojas de yerba mate con especies cogenéricas de *Ilex*. La aplicación de métodos típicos de control de calidad basados en la detección de ciertos compuestos o marcadores resultaron inútiles para esto. Decidimos por lo tanto utilizar otro enfoque más holístico, implementando un método que permitiera la detección de la mayor cantidad de metabolitos posible. Se realizó un análisis metabolómico basado en ¹HNMR sobre 11 especies de *Ilex*: *I. paraguariensis*, *I. dumosa*, *I. argentina*, *I. taubertiana*, *I. pseudobuxus*, *I. microdonta*, *I. theezans*, *I. brasiliensis*, *I. dumosa* var *dumosa*, e *I. integerrima*, que permitió su discriminación. Los principales metabolitos discriminantes resultaron ser polifenoles y saponinas. Al obtener los espectros ¹HRMN se detectó la presencia de arbutina en cantidades

significativas (entre 2.23 y 10.60% (peso seco) en algunas de estas especies. La arbutina, un glicósido de la p-hidroquinona que se hidroliza antes de su absorción en el tracto gastrointestinal para dar hidroquinona, es un antiséptico urinario potente que se encuentra como principio activo de la *Uva ursi*, por ejemplo, con cantidades similares a lo detectado por nosotros en *I. brasiliensis*. No había ningún informe anterior sobre la presencia de arbutina en estas especies de *Ilex*.

Estos resultados se confirmaron por HPLC utilizando un método que consiste en una columna C18 ((Inertsil ODS-3 (4.6 x 250 mm-5 μ)) con elución isocrática durante 4 minutos con AcOH/H₂O 1%: AcOH/MeOH 1% (90:10), y un gradiente lineal hasta 30:70 en 26 minutos con un flujo de 1.0 ml/min a 2.83. La arbutina se detecta a 282 nm con un tiempo de retención de 4.83 \pm 0.5min. Se describe el método y su validación en el Capítulo 9.