

Cuantificación del Fitoestrógeno Naringenina en Jugos de Pomelo y Naranja Comercializados en Argentina

Erica G. WILSON¹, Adriana BROUSSALIS¹, Haydeé BENENCIA² y Graciela E. FERRARO *

¹Cátedra de Farmacognosia, IQUIMEFA (UBA-CONICET) y

²Area Endocrinología, Depto. Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Junín 956 (1113), Buenos Aires, Argentina

RESUMEN. Las plantas contienen un gran número de compuestos importantes por su valor nutricional y/o farmacológico. Entre esos últimos compuestos, algunos flavonoides tienen actividad estrogénica. En este trabajo se informa la cuantificación de la naringenina contenida en diferentes jugos y preparaciones comerciales de pomelo y naranja. Se utilizó un método por HPLC simple e isocrático y todas las muestras fueron hidrolizadas previamente a su cuantificación. Los valores detectados son farmacológicamente significativos.

SUMMARY. "Quantification of Naringenin Phytoestrogens in Grapefruit and Orange Juice commercialized in Argentina". Plants contain a large number of compounds that have nutritional and/or pharmacological value. Among them, some flavonoids have shown properties similar to the natural hormone, estrogen. These phytoestrogens such as naringenin, are present in pharmacologically significant concentrations in some food such as grapefruit and orange juice. In this work the results of the quantitation of this flavanone (naringenin) in different commercial grapefruit and orange juices or preparations of grapefruit and orange juices is reported. All samples were hydrolysed and their naringenin content quantified using a simple, isocratic reversed-phase HPLC method.

INTRODUCCION

Se estima que alrededor del 2% de todo el carbono fotosintetizado por las plantas (1×10^9 toneladas por año) es convertido biosintéticamente por ellas en flavonoides. Los flavonoides constituyen, entonces, una familia de compuestos presentes en prácticamente todas las especies vegetales y dado que los vegetales constituyen una porción importante de la dieta humana habitual, los flavonoides están incorporados a ella.

Entre estos compuestos se pueden citar a los flavonoles quercetina y canferol y a la flavanona naringenina, que se encuentran principalmente en el jugo de pomelo, ya sea natural o comercial. Estos flavonoides pueden actuar como fitoestrógenos.

Trabajos recientes afirman que la naringenina y otros bioflavonoides poseen una débil acción biológica similar a la del estradiol, ya que

compite con él por la unión al receptor beta de estrógenos¹, pudiendo unirse a la globulina transportadora de esteroides sexuales (SHBG)². Estos compuestos naturales funcionan como moduladores selectivos del receptor de estrógenos, si bien poseen una potencia biológica inferior al 1% con respecto al estrógeno endógeno³. Estas propiedades, demostradas ahora científicamente, avalan su acción estrogénica conocida y utilizada empíricamente desde hace mucho tiempo.

Estos compuestos son considerados actualmente como complementos o suplementos del tratamiento del síndrome climatérico de la mujer postmenopáusica.

Por otra parte existe actualmente suficiente cuerpo de evidencia que demuestra que la naringenina actúa biológicamente alterando la farmacocinética de una variedad de drogas. Esta acción es debida a la inhibición del Citocromo

PALABRAS CLAVE: Cuantificación por HPLC, Fitoestrógenos, Jugos de Pomelo y Naranja, Naringenina.

KEY WORDS: Grapefruit and Orange juice, HPLC Quantitation, Phytoestrogens, Naringenin.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E mail: gferraro@ffyb.uba.ar

P₄₅₀3A4 (CYP3A4) ubicado en la pared del intestino delgado. La disminución o falta de esta enzima resulta en una disminución del primer paso metabólico, promoviendo una mayor biodisponibilidad de drogas y hormonas que actúan por ese mecanismo y dando lugar en consecuencia a un incremento de la concentración plasmática de las mismas ^{4,5}. Entre los fármacos con los que interactúa la naringenina se pueden citar la ciclosporina ^{6,7}, felodipina ⁸, nisoldipina ⁹, lovastatin ¹⁰, etc. Se sabe también que la ingestión del jugo de pomelo modifica la actividad biológica del estradiol exógeno ¹¹, como así también el metabolismo del cortisol por inhibición de la 11-β-hidroxiesteroide dehidrogenasa¹².

Para Ameer *et al.* ¹³ el contenido de naringenina en el jugo de pomelo procedente de Florida es de 241.1 mg/L, y para Schubert *et al.* ⁸ 450 mg/L, en jugos concentrados de la misma procedencia.

A partir de estos antecedentes, se proyectó estudiar el efecto de los jugos de pomelo y naranja comerciales sobre el metabolismo de estrógenos en mujeres postmenopáusicas bajo tratamiento hormonal de reemplazo.

Para ello, como paso inicial, se diseñó una metodología que permite detectar y cuantificar naringenina en los jugos existentes en nuestra plaza.

La naringenina (5,7,4'-trihidroxi flavanona) está presente en los jugos naturales y comerciales como aglicón y como glicósidos (mono y diglicósidos), siendo la porción biológicamente activa la aglucona, que también se produce por hidrólisis de los glicósidos en el estómago, por lo que se efectuó una hidrólisis ácida de todas las muestras para posteriormente cuantificar la cantidad total de naringenina presente.

MATERIALES Y METODOS

Los materiales empleados fueron productos comerciales que se encuentran en plaza: concentrados de jugo de pomelo y naranja en polvo para preparar soluciones para ingerir, concentrados líquidos de jugo de pomelo para la preparación de soluciones y jugos de pomelo y naranja listos para ingerir.

Para la detección del aglucon flavonoide naringenina los distintos tipos de materiales estudiados se prepararon como se indica a continuación.

Jugos de pomelo y naranja

Ocho ml del jugo previamente homogeneiza-

do por agitación se hidrolizaron con 10 ml de solución de HCl 2 N en metanol 50% por calentamiento a reflujo durante 2 horas. El hidrolizado se ajustó a pH a 6,8-7,0 con solución de NaOH 2N, llevando a 25 ml con etanol. La solución se filtró por membrana 0.45 μ y se inyectó.

Polvos para la preparación de jugos

Se reconstituyó el mismo de acuerdo a las instrucciones del fabricante: 1 g de polvo disuelto en 10 ml de agua destilada. La solución resultante se sometió al mismo tratamiento que el indicado para el jugo de pomelo.

Concentrados de jugo de pomelo

Quince ml de concentrado se diluyeron con 60 ml de agua destilada. Una vez homogeneizado, 5 ml de esa dilución se hidrolizaron con 6 ml de HCl 2 N/metanol 50% durante 2 horas (calentamiento a reflujo). Este hidrolizado se ajustó a pH 6,8-7,0 con NaOH 2N y se llevó a un volumen final de 20 ml, filtrado sobre membrana de 0.45 μ para su inyección.

Para efectuar la cuantificación se utilizó un cromatógrafo HPLC Varian serie 9000 con un sistema isocrático que emplea una columna de octadesilsilano (125 x 4,6 mm, 5 μ de diámetro de partícula) y una fase móvil de metanol - ácido acético 1% en agua (60:40). La detección se realizó a 287 nm con un detector UV/Vis Varian 9051 y el análisis de pureza y estructural con un detector con arreglo de diodos Varian 9064. El flujo fue de 1,3 ml/min y el volumen de inyección 20 ml.

Las muestras ya hidrolizadas se inyectaron, utilizando el método del estándar externo para el cálculo de naringenina contenida en la muestra.

El estándar utilizado fue naringenina (Sigma), en solución de 59 μg/ml en metanol, confirmando la pureza del pico y la eficacia de la hidrólisis (ausencia de glicósidos de naringenina) mediante el análisis del cromatograma con el detector con arreglo de diodos. El límite de cuantificación de la flavanona en las condiciones empleadas fue de 0,3 mg% (1 ppm). Todos los análisis se realizaron por quintuplicado presentando un RSD (Desviación Relativa Estandar) de 1,5%.

RESULTADOS

La concentración de naringenina en los jugos comerciales y los concentrados de pomelo rosado hallada se muestra en la Tabla 1.

	Concentración de naringenina (mg/ml)
<i>Polvos para preparar jugo de pomelo rosado</i>	
Marca 1	No detectable
Marca 2	No detectable
<i>Jugos de pomelo comerciales</i>	
Marca 3	82 ± 0,6
Marca 4	103 ± 0,8
<i>Concentrados de pomelo</i>	
Marca 5	24,5 ± 0,2
<i>Polvos para preparar jugos de naranja comerciales</i>	
Marca 3	No detectable
Marca 4	No detectable
<i>Jugos de naranja comerciales</i>	
Marca 5	No detectable

Tabla 1. Concentración de naringenina en jugos comerciales.

DISCUSION

No se detectó naringenina en jugos de naranja ni en polvos para preparar jugo de naranja.

En los polvos –semisintéticos– para preparar jugo de pomelo rosado tampoco se detectó naringenina.

Los resultados obtenidos (el máximo detectado es de 103 ± 0,2 mg/mL) indican que el contenido en naringenina de los productos líquidos provenientes de pomelo rosado entra dentro de la concentración farmacológicamente activa, aunque es inferior al encontrado en la literatura.

La concentración de naringenina en los distintos productos comerciales estudiados muestra una variación cuali y cuantitativa. Esa variabilidad puede deberse a varios factores edáficos y de manufactura o industrialización que pueden dar lugar a la degradación de los compuestos presentes en ellos.

Esos productos serán empleados en una posterior investigación sobre el efecto de la naringenina sobre el metabolismo de estradiol.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado en parte por el Subsidio SECYT-UBA TB 029 y por el CONICET.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Kuiper, G.G., J.G. Lemmen, B. Carlsson, J.C. Corton, S.H. Safe, P.T. Van der Saag, B. Van der Burg & J.A. Gustafsson (1998) *Endocrinology* **139**: 4252-63
2. D'Echard, H., C. Ravard, F. Claustra, A.B. de la Perrière & M. Pugeat (1999) *Steroids* **64**: 328-34
3. Fugh-Berman A. (1999) "Complementary medicine: herbs, phytoestrogens and other treatments", en "Treatment of the postmenopausal women. Basic and clinical aspects" (Rogerio A. Lobo, ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. 2da edición, página 453
4. Fuhr, U. & A.L. Kummert (1995) *Clin. Pharmacol. Ther.* **58**: 365-73
5. Fuhr, U. (1998) *Drug Saf.* **18**: 251-72
6. Bailey, D.G., J.M.O. Arnold & J.D. Spence (1994) *Clin. Pharmacokinet.* **26**: 91-8
7. Brunner L.J., L.Y. Munar, J. Vallian, M. Wolfson, D.J. Stennet, M.M. Meyer & Wm. Bennett (1998) *Pharmacotherapy* **18**: 23-9
8. Bailey, D.G., M.O. Arnold, C. Muñoz & J.D. Spence (1993) *Clin. Pharmacol. Ther.* **53**: 637-42
9. Bailey, D.G., J.M. Arnold, H.A. Strong, C. Muñoz & J.D. Spence (1993) *Clin. Pharmacol. Ther.* **54**: 589-94
10. Kantola, T, K.T. Kivistö & P.J. Neuvonen (1998) *Clin. Pharmacol. Ther.* **63**: 397-402
11. Schubert, W., G. Cullberg, B. Edgar & T. Hedner (1994) *Maturitas* **20**: 155-163
12. Lee, Y.S., B.J. Lorenzo, T. Koufis & M. Reidenberg (1996) *Clin. Pharmacol. Ther.* **59**: 63-71
13. Ameer, B, R.A. Weintraub, J.V. Johnson, R.A. Yost & R.L. Rouseff (1996) *Clin. Pharmacol. Ther.* **60**: 34-40