 Recibido: 8 de mar. 2016 - Aceptado: 18 de jun.2016

ANÁLISIS POR CLAR DEL EXTRACTO TOTAL Y LA GOSSYPITRINA AISLADA DE LOS PÉTALOS DE*TALIPARITI ELATUM*S.W.

José González[1*], Jacqueline A. Romero[2], Armando Cuéllar[1]

[1]Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana (IFAL-UH), Cuba.
[2]Centro de Investigación y Desarrollo de los Medicamentos (CIDEM), La Habana, Cuba.

*e-mail: jgyaque@ifal.uh.cu

Resumen

Talipariti elatum (S.w) Fryxell (Malvaceae) es un árbol del Caribe tropical con un amplio rango de propiedades medicinales reportadas tales como, aperitivo, emoliente, sudorífico, antiasmático y excelente expectorante combinado con las flores de *Hibiscus rosa-sinensis.*En el presente estudio, un extracto de los pétalos de *T. elatum*recolectado en Cubafue analizado para determinar la composición química utilizando un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con una columna cromatográfica de fase reversa RP-18, metanol (A) y agua (B) como eluentes y gossypitrina como patrón de referencia. Estos resultados proporcionan apoyo científico para el uso empírico de los extractos de *T. elatum* como medicamento antiasmático.

Palabras clave: Talipariti elatum; antiasmático; pétalos; CLAR; composición química.

Hplc analysis of total extract and gossypitrin isolated from the petals of taliparti elatum s.w.

Abstract

Talipariti elatum (S.w) Fryxell (Malvaceae) is a tropical Caribbean tree with a reported wide range of healing properties such as appetitive, emollient, sudorific, antasthmatic and excellent expectorant combined with the flowers of *Hibiscus rosa-sinensis.* In the present study, an extract from the petals of *T. elatum* collected in Cuba was analyzed to determine the chemical composition using an HPLC equipment with RP-18 flash chromatographic column, MeOH (A) and H_2O (B) as eluents and gossypitrin as standard. These results provide scientific support for the empirical use of *T. elatum* extracts as an antasthmatic medicine.

Keywords: Talipariti elatum; antasthmatic; petals; HPLC; chemical composition.

Introducción

Talipariti elatum (S.w) Fryxell (Malvaceae) esun árbol con una amplia distribución en Cuba y Jamaica que crece en todo tipo de suelos, particularmente en los cenagosos, con un amplio rango de

propiedades medicinales reportadas tales como aperitivo, emoliente, sudorífico, antiasmática y un excelente expectorante. Alcanza alrededor de 25 metros de altura y sus hojas tienen forma acorazonada en la base y son pecioladas (Acosta y Rodríguez, 2006).

En Cuba, esta especie es conocida como Majagua, Majagua común y Majagua macho. En Jamaica es conocida como Majó, Blue Mahoe, Cuba Bark y Mountain Mahoe. Mezclada con las flores de *Hibiscus rosa-sinensis* es utilizada en la medicina tradicional como expectorante y antiasmática (Roig, 1974).

Se reconoce que los compuestos hidrocarbonados, los ácidos grasos, los ácidos orgánicos y la gossypitrina pueden ser los responsables de las propiedades expectorantes y antiasmáticas de los extractos de las flores de esta planta (González y Cuéllar, 2010). La gossypitrina es hasta el presente, el glucósido flavonoide de mayor presencia en los pétalos de las flores. La actividad antiasmática y antioxidante de la gossypitrina se ve incrementada por la formación de complejos con metales de transición (Cuéllar y González, 2010).

Existe un creciente interés en los efectos biológicos de los bioflavonoides, miembros de un amplio grupo de polifenoles producidos por las plantas. Debido al carácter aromático de estos compuestos, los mismos han sido analizados por varios métodos cromatográficos. En el caso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, ellos han sido detectados por su absorbancia ultravioleta o sus propiedades electroquímicas (Valls y col., 2009).

Existe gran evidencia de que los bioflavonoides son sometidos a un metabolismo extensivo durante su ingestión en la dieta y su distribución en el organismo acumulándose en tejidos específicos. En adición, los productos de los radicales libres en los sitios del proceso inflamatorio reaccionan con los bioflavonoides y sus metabolitos, generando una cantidad importante de nuevos compuestos con propiedades desconocidas hasta ahora. Por estas razones, se requiere de un examen cuidadoso de la naturaleza química de los bioflavonoides y sus productos en los sistemas biológicos (Lambert y Elias, 2010; Ablajan, 2011).

La combinación de la espectrometría de masa con varios métodos cromatográficos ha probado ser altamente exitosa en este sentido. Numerosas técnicas analíticas han sido utilizadas para evaluar el metabolismo y la biodisponibilidad de los flavonoides in vitro e in vivo (Pinheiro y Justino, 2012). Estos métodos incluyen la cromatografía gaseosa (CG), la cromatografía liquida de alta resolución (CLAR), y la electroforesis capilar (EC) en combinación con la absorción UV, fluorescencia, detección electroquímica, y espectrometría de masa (EM) (Vukics y Guttman, 2010). El objetivo del presente estudio fue evaluar la cantidad de componentes químicos de un extracto elaborado de los pétalos de las flores de *Talipariti elatum*.

Materiales y Métodos

Material vegetal

El material vegetal (pétalos de las flores)se recolectó en enero de 2013 en los jardines de la Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Salvador Allende"en La Habana, y se encuentra identificada y depositada una muestra de la especie con el no. HAJB 82587 en el herbario del Jardín Botánico Nacional.

Reactivos

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de calidad para análisis. El MeOH, EtOH, $CHCl_3$ y el metanol con calidad para CLAR se obtuvieron de la firma Merck (Darmstadt, Alemania), igualmentela sílica gel para columna cromatográfica de fase reversa, la columna cromatográfica de fase reversa RP-18y la placa de sílica gel para cromatografía de capa delgada (CCD) con indicador fluorescente a 254 nm sobre soporte de aluminio (grosor de capa 0,2 mm) (10x20 cm) DC-KARTEN SI F y sílica gel 60 para columna cromatográfica 0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM) se obtuvieron de la misma firma mencionada anteriormente. Todos los materiales fueron utilizados sin purificación previa.

Preparación de extractos

Los pétalos fueron separados del resto de los componentes de las flores y secados en una estufa con temperatura controlada a 30 ^{0}C durante cuatro días. Los extractos fueron elaborados con etanol durante diez días por el método de maceración. Para la purificación, se tomó un 1 gramo de sólido, se disolvió en 25 mL de éter dietílico, completado el volumen hasta 100 mL con etanol. La muestra fue refrigerada hasta que apareció un sólido abundante que fue recuperado por filtración en frita de vidrio poroso # 3. Este proceso se repitió dos veces más, hasta obtener un sólido de color verde-amarillento que fue monitoreado por CCD sobre placas de sílica gel con indicador fluorescente a 254 nm sobre soporte de aluminio (grosor de capa 0,2 mm) (10x20 cm) DC-KARTEN SI F utilizando como eluente una mezcla recién preparada de n-butanol: ácido acético: agua (4:1:5 v/v/v).

Aislamiento y determinación por CLAR de la gossypitrina

Los 100 mL del extracto se evaporaron a temperatura ambiente hasta obtener un residuo sólido de 6.4 gramos. Una porción de ese extracto (1mL) se disolvió en 50 mL de MeOH y se separó sobre una columna cromatográfica de fase reversa (C-18, 60 Ǻ, 5 µm, 250 x 4 mm, Eurospher), utilizando como eluente A MeOH y como eluente B H_2O. Un gradiente de 15-85% B durante 30 min con un flujo de 1mL/min seguido por mantenimiento del gradiente, incrementando hasta 50 % A durante 10 min, sostenido 10 min, revirtiendo hasta 0 % B durante 5 min, y reequilibrando por 5 min. La determinación de la gossypitrina se corrió también a partir del residuo sólido disuelto en 50 mL de MeOH utilizando el procedimiento descrito anteriormente. El análisis por CCD del extracto total y del residuo sólido se realizó sobre sílica gel normal con indicador fluorescente a 254 nm sobre soporte de aluminio (grosor de capa 0,2 mm) (10x20 cm). Los experimentos se corrieron en un espectrómetro marca KNAUER

(Alemania) equipado con un detector UV a 280 nm de longitud de onda.

50 mL del extracto total se eluyeron sobre una columna cromatográfica de fase reversa utilizando como eluente 200 mL de una mezcla de n-butanol: ácido acético: agua (4:1:5) hasta recuperar una fracción de 1 mL la cual se corrió en 50 mL de MeOH, utilizando el procedimiento descrito anteriormente.

Una porción del residuo sólido (1.5 g) se eluyó sobre una columna cromatográfica de fase reversa utilizando 200 mL de la misma mezcla de elusión empleada en la CCD, hasta recuperar 5 fracciones de 1 mL cada una. Las fracciones fueron monitoreadas para determinar su composición sobre las mismas placas pre elaboradas sobre papel de aluminio y corridas con la misma mezcla de elusión descrita anteriormente.

Los experimentos de espectrometría UV fueron corridos sobre un espectrómetro ultravioleta-visible marca JASCO de fabricación japonesa. El rango de escaneo estuvo entre los 200-500 nm, la absorbancia entre 0 y 2.5 y las muestras analizadas se disolvieron en metanol en cubetas de cuarzo, comparando el espectro UV obtenido con el espectro original de la gossypitrina. El diámetro interno de las cubetas fue de 1 cm.

Resultados

Las dos primeras fracciones de 1 mL cada una, denominadas F_1 y F_2, estaban compuestas principalmente por componentes químicos incluyendo gossypitrina, como indicó el revelado con $H_2SO_4/CeSO_4$ y calor al realizar la cromatografía de capa delgada (Fig. 1).

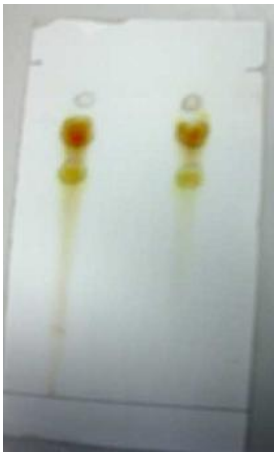

Fig. 1. Cromatoplaca con las fracciones F_1 y F_2 reveladas con $H_2SO_4/CeSO_4$ y calor.

El análisis cromatografico de los extractos totales de los pétalos de las flores de *T. elatum*por CLAR permitió la identificación de 48 constituyentes químicos diferentes (Fig.2), incluyendo a la gossypitrina, el glucósido flavonoide presente en los pétalos de las flores de *Talipariti elatum* y en el

residuo sólido.

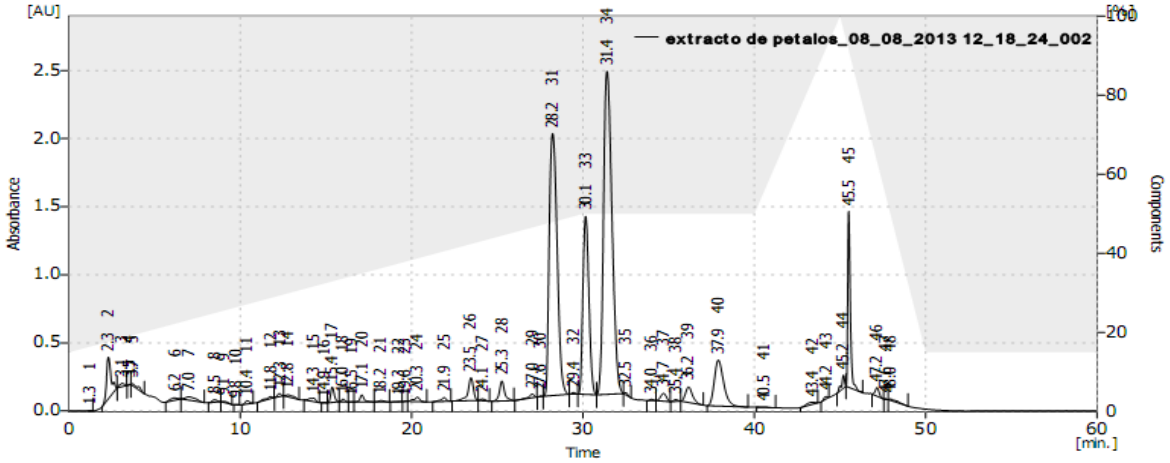

Fig. 2. Cromatograma de los constituyentes químicos en el extracto total de los pétalos de las flores de *T. elatum*.

El análisis cromatográfico de 50 mL del extracto total después de eluirlo con 50 mL de MeOH (Fig. 3) mostró al menos 29 picos cromatográficos diferentes, con una reducción remarcada en la cantidad de constituyentes químicos.

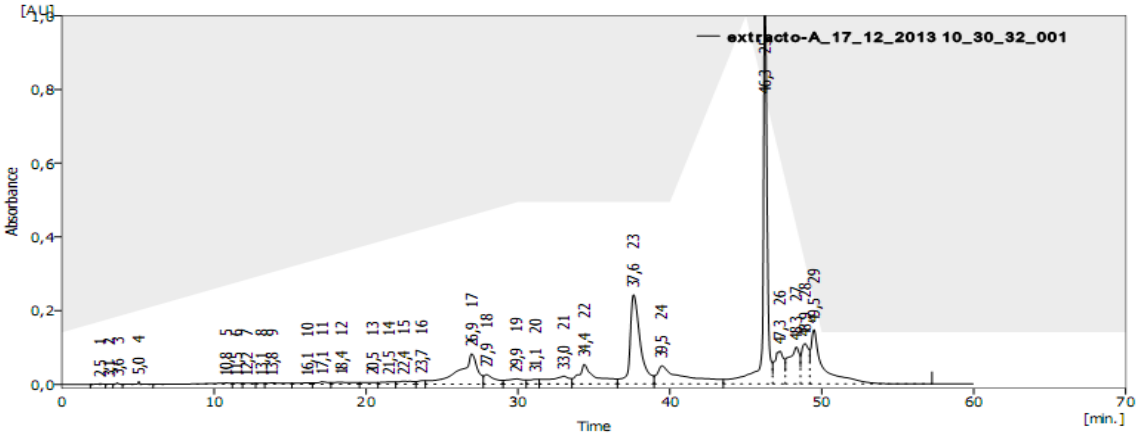

Fig. 3. Cromatograma de los constituyentes químicos en el extracto total de los pétalos de las flores de *T. elatum* después de su elusión sobre una columna cromatográfica de fase reversa.

El análisis cromatográfico del residuo sólido mostró la presencia de al menos 15 tipos de componentes químicos diferentes, una cantidad menor que la del resultado previo, indicando la efectividad del método de aislamiento (Fig. 4).

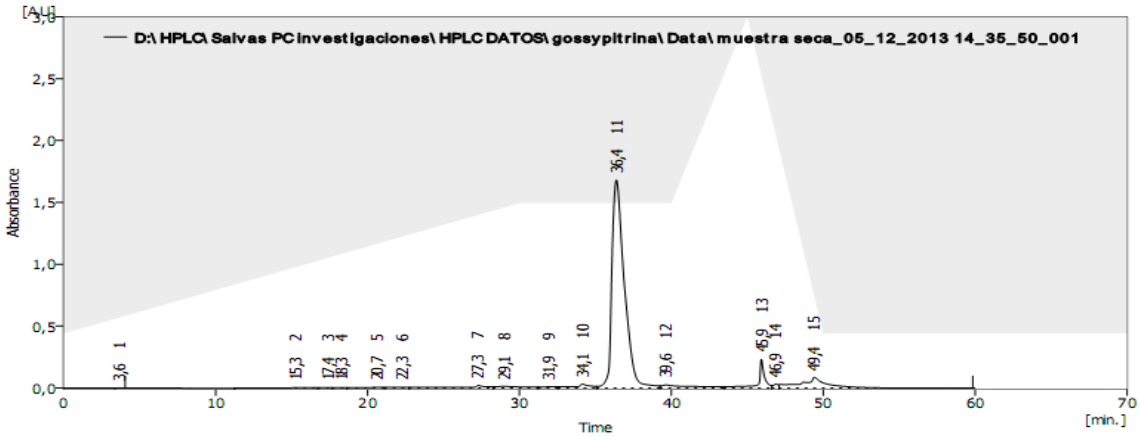

Fig. 4. Cromatograma de los componentes químicos del residuo sólido obtenido de los pétalos de las flores de *T. elatum*.

Discusión

Por primera vez, los resultados mostraron que los extractos y el residuo sólido de *T. elatum* exhibieron un alto contenido de metabolitos después de realizar el análisis por CLAR sobre una columna cromatográfica RP-18. Las fracciones de MeOH/H_2O y MeOH revelaron la presencia de mezclas complejas de constituyentes químicos como indicó el análisis por CCD y UV. El análisis por CCD sobre sílica gel con indicador fluorescente a 254 nm sobre soporte de aluminio (grosor de capa 0,2 mm) (10x20 cm), reveló al menos la presencia de cinco clases de compuestos químicos diferentes. En el caso del residuo sólido, se evidencia la presencia de al menos cuatro tipos de compuestos químicos diferentes, utilizando n-butanol: ácido acético: agua (4:1:5) como disolvente de elusión.

La CLAR del residuo sólido indicó la presencia de 15 componentes químicos diferentes, y la gossypitrina mostró tiempos de retención de 37,9 minutos (Fig. 2), 37,6 minutos (Fig. 3) y 36,4 minutos (Fig. 4), respectivamente. Este resultado fue corroborado cuando el pico correspondiente a la gossypitrina fue colectado después de la corrida sobre un cromatógrafo KNAUER y la muestra analizada sobre un espectrómetro UV marca JASCO. El espectro UV mostró que el flavonoide tiene tres bandas características a 278, 332 y 382 nm (Márquez y col., 1999).

Existe una gran diferencia entre estos resultados y los encontrados en la investigación realizada a los extractos de los pétalos de las flores de la especie utilizando la técnica de CG acoplada a EM, relacionado con la cantidad de constituyentes químicos. Esta fue solamente de 16 para los extractos crudos de los pétalos utilizando tolueno y etanol como disolventes (González, 2007). Esta diferencia puede deberse a la alta sensibilidad del método de CLAR comparado con la CG, o por la posibilidad de encontrar más o menos cantidad de metabolitos secundarios debido a la diferencia en el tiempo de recolección de las flores de la planta (hora, día de la semana, etc.). Quizás la diferencia en el área de

crecimiento o las condicione del cultivo de la plantación de *Talipariti elatum* (zona geográfica, tipo de suelos, humedad residual, nutrientes, etc.) provoquen diferencias en la dinámica de acumulación de los metabolitos en las flores.

Los resultados de la presente investigación sugieren que la actividad antiasmática atribuida en Cuba por la medicina tradicional, y reconocida por el MINSAP, pudiera ser explicada, al menos en parte, por la actividad antioxidante y quelante de metales de transición de la gossypitrina. Estos resultados permiten el desarrollo de una fitoformulación segura y eficiente.

Agradecimientos

Los autores le agradecen al Centro de Investigaciones y Desarrollo de los Medicamentos (CIDEM) por el apoyo tecnológico y experimental para la realización de este trabajo.

Referencias

1) Ablajan, K. A study of characteristic fragmentation of isoflavonoids by using negative ion ESI-MSn. Journal of Mass Spectrometry. 2011,46, 1, 77-84.

2) Acosta de la Luz, L. L.; Rodríguez Ferradá, C. A. Plantas medicinales. Bases para una producción sostenible. Agrinfor, Impresiones MINAG, 2006: 124-125.

3) Cuéllar, A.; González, J.,Obtención del glucósido flavonoide gossypitrina de los pétalos de las flores de Talipariti elatum S: W y evaluación de su posible efecto antioxidante. Revista Colombiana de Ciencia Animal. 2010; 2 (2) ISSN 2027-4297.

4) González, J.; Cuéllar, A., Biological activities of Gossypitrin isolated from the flowers of *Talipariti elatum* S.W. Revista CNIC. Ciencias Biológicas. 2010; 41 Número Especial. ISSN: 0253-568.

5) González Yaque, J. Resultados de la extracción de las diferentes partes constitutivas de las flores de Talipariti elatum S.W. (Fryxell). Revista Electrónica Pedagogía Profesional, 2007 (5) Disponible en URL: www.pedagogiaprofesional.rimed.cu/

6) Lambert, J.D. & Elias, R.j. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010, 501, 1, 65-72.

7) Márquez, I., Cuéllar, A., Martínez J., Alemán A., Lora J., Castro H. Estudio fitoquímico de la especie *Hibiscus elatus S.w*. Revista Cubana de Farmacia. 1999: 33 (2), 127 – 131.

8) Pedro F. Pinheiro y Gonçalo C. Justino. Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds -A Review of Spectroscopic Applications, Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition andHealth, 2012. DrVenketeshwerRao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0

9) Roig, J. T. Plantas Medicinales Aromáticas y Venenosas de Cuba. Editorial Científico Técnica, 1974. La Habana.

10) Valls, J.; Millán, S.; Martí, M.P.; Borràs, E. & Arola, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216, 43, 7143-7172.

11) Vukics, V. & Guttman, A. Structural Characterization of Flavonoid Glycosides by Multi-Stage Mass Spectrometry. Mass Spectrometry Reviews, 2010; 29 (1): 1-16.