



TLATEMOANI
Revista Académica de Investigación
Editada por Eumed.net
No. 11 – Diciembre 2012
España
ISSN: 19899300
revista.tlatemoani@uaslp.mx

Fecha de recepción: 9 de agosto de 2012
Fecha de aceptación: 30 de noviembre de 2012

SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DEL EXTRACTO DE *HAMELIA* *PATENS*

Jiménez-Suárez V.
Reyes-Munguía A.
Pérez-Berúmen C.
Alvarado-Sánchez B.
Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca
Universidad Autónoma de Coahuila
balvarado@uaslp.mx

RESUMEN

Hamelia patens es una planta medicinal ampliamente usada para tratar diferentes enfermedades debido a su efecto antiinflamatorio, la población la utiliza empíricamente para curar heridas y tratar la inflamación en el útero, sin embargo poco se conoce de su perfil fitoquímico. En este trabajo se realizaron extractos etanólicos y metanólicos de *H. patens* que fueron analizados a través de cromatografía en capa fina y en columna. Se encontraron las condiciones de fase estacionaria y fase móvil para obtener más de 100 fracciones de *H. patens* con dos fracciones puras. El perfil de composición fitoquímica de *H. patens* incluye la detección cualitativa de esteroides, saponinas, alcaloides, polifenoles y específicamente flavonoides, resultando positiva para todos estos.

PALABRAS CLAVE: fracciones, eluyentes, extracto de plantas, actividad biológica, columnas de separación, polifenoles, flavonoides

ABSTRACT

Hamelia patens is a medicinal plant widely used to treat different diseases because of their anti-inflammatory effect, the population uses it empirically to heal wounds and treat inflammation in the uterus, however little is known of its phytochemical profile. Ethanol and methanolic extracts of *H. patens* were analyzed by thin layer chromatography and column. We found the conditions of stationary and mobile phase for more than 100 fractions of *H. patens* with two pure fractions. The phytochemical composition of *H. patens* includes qualitative detection of steroids, saponins, alkaloids, polyphenols and flavonoids specifically, resulting positive for all these.

KEY WORDS: fractions, eluents, plant extracts, biological activity, separation columns, polyphenols, flavonoids.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos hasta la actualidad se han utilizado las plantas para fines curativos, siendo una práctica común entre las poblaciones. En base a la experiencia se ha encontrado que las plantas poseen propiedades medicinales para tratar diversas enfermedades. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las plantas medicinales como: "la planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos" (Farnsworth, *et. al.*, 1986). Las plantas medicinales se consideran un recurso para el tratamiento de diversas afecciones y puede suministrarse bajo diferentes formas: cápsulas, comprimidos, crema, infusión, jarabe, tintura, ungüento, etc. (Rates, 2001).

Las plantas medicinales se han empleado en el tratamiento de múltiples enfermedades que van desde las infecciosas hasta el cáncer, pasando por los padecimientos autoinmunes, alergias, enfermedades metabólicas, etc. Algunos

de estos padecimientos tienen como factor común la presencia de fenómenos inflamatorios, ya sean localizados o sistémicos, por lo que el estudio de sustancias que modifiquen la respuesta inflamatoria cobra relevancia.

Muchos desórdenes inflamatorios incluyendo sepsis, fenómenos autoinmunes e hipersensibilidad son asociados con un desbalance en las moléculas implicadas en el proceso inflamatorio y un exagerado influjo de células al sitio de inflamación. En este respecto, se ha encontrado que diversas plantas poseen efectos sobre el proceso inflamatorio. Varios extractos y algunos compuestos derivados de las plantas, como flavonoides, lignanos, terpenos poseen una acción anti-inflamatoria, se ha observado que interfieren con algunos eventos del proceso inflamatorio como en la vía metabólica del ácido araquidónico, la vía del óxido nítrico o interfieren con el Factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), así como también inhiben la síntesis o activación de citocinas pro-inflamatorias, moléculas de adhesión y quimiocinas (Calixto, *et. al.*, 2003; Calixto, *et. al.*, 2004 y Siriwatanametanon, *et. al.*, 2010).

Hamelia patens (Rubiaceae) es un arbusto ampliamente distribuido en áreas tropicales del continente Americano. Puede alcanzar los tres metros de altura, da frutos rojos y posee flores color naranja brillante, por lo que se le ha llamado comúnmente como “coralillo,” o “hierba coral.” Un gran número de aplicaciones medicinales son conocidas para esta planta. En México ha sido usada especialmente para detener sangrados, curar llagas y desórdenes menstruales. En el Estado de Veracruz, la hoja fresca se aplica para detener el sangrado de una herida; mientras que la raíz se utiliza para tratar la inflamación del útero (Leonti, *et. al.*, 2001). Se sabe que contiene principalmente alcaloides oxindoles pentacíclicos (Reyes-Chilpa, *et. al.*, 2004).

Diferentes partes de las plantas son la fuente de principios activos con innumerables beneficios para la salud. Las plantas medicinales también han tenido relevancia para la industria farmacéutica ya que muchos preparados naturales contienen el mismo principio activo o fármaco que los usados en la medicina convencional. El aislamiento y caracterización de compuestos activos de las plantas, es de gran importancia ya que conociendo su estructura se puede entender la interacción de estos compuestos con otras moléculas del cuerpo humano y si en realidad la planta tiene las propiedades que

popularmente se le adjudican. Es indispensable realizar este tipo de estudios ya que podría validar científicamente las propiedades medicinales de estas plantas y descubrir sustancias activas a partir de plantas no estudiadas previamente.

En particular, la investigación científica sobre los usos medicinales tradicionales de *Hamelia patens* es escasa (Chaudhurir, P.K. y Thakur, R.S., 1991; Sosa, *et. al.*, 2002; Mena-Rejon, *et. al.*, 2009 y Taylor, *et. al.*, 2012) y además poco se conoce de todas las propiedades y contenido de compuestos activos. Por lo que en esta investigación se plantea separar compuestos de *H. patens* que podrían presentar diferentes propiedades incluyendo efecto anti-inflamatorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracto etanólico de *Hamelia patens*

Las hojas frescas de *H. patens* fueron trituradas en un mortero, una vez trituradas fueron mantenidas en etanol absoluto (CTR) por 24 horas (1/8) para posteriormente evaporar el extracto etanólico a sequedad.

Cromatografía en capa fina del extracto etanólico

Se probaron diferentes mezclas de solventes para lograr la separación de los compuestos de *H. patens*. Las mezclas de solventes utilizadas fueron: Butanol-ácido acético-agua en diferentes proporciones (1:1:1, 3:2:1, 3:1:2) y se utilizó como fase estacionaria papel filtro de poro fino, papel cromatográfico y sílica (solamente en proporción 1:1:1) (Sigma Aldrich). Debido a que los compuestos del extracto etanólico de *H. patens* no se observaron completamente separados y definidos en ninguna de las mezclas de solventes ni en ninguno de los soportes empleados, se decidió realizar la cromatografía en capa fina en alúmina (Sigma Aldrich) probando nuevamente diferentes mezclas de solventes. Los solventes usados fueron: butanol-ácido acético-agua en diferentes proporciones (1:1:1, 1:2:1, 2:1:2, 2:1:1, 2:2:1, 2:1.5:1, 3:2:1 y 3:1:2), hexano-acetato de etilo (1:1 y 3:7), butanol solo y agua-butanol-acetona-

ácido acético (16:2:2:1). Los reactivos y materiales fueron obtenidos de J.T. Baker.

Extracto metanólico 24 horas

Las hojas de *H. patens* fueron secadas a temperatura ambiente y en oscuridad, posteriormente fueron pulverizadas en un molino tradicional (Pulvex) y desengrasadas con éter de petróleo (Productos químicos de Monterrey) por otras 24 horas. Después de una filtración y secado a temperatura ambiente, las hojas pulverizadas fueron mantenidas en metanol por 24 horas en constante agitación.

Extracto metanólico por ultrasonido

Las hojas de *H. patens* fueron secadas a temperatura ambiente y en oscuridad, posteriormente fueron pulverizadas en un molino y desengrasadas con éter de petróleo por otras 24 horas. Después de una filtración y secado, las hojas pulverizadas fueron sometidas a ultrasonido en metanol por 30 minutos. Los extractos metanólicos fueron mantenidos en refrigeración hasta su utilización.

Pruebas colorimétricas

Se realizaron diferentes pruebas colorimétricas cualitativas para determinar en los extractos etanólicos diferentes compuestos como: polifenoles totales, flavonoides, esteroides, saponinas, alcaloides y proteínas. Los polifenoles se determinaron a través del uso del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich), mientras que los flavonoides se determinaron por la reacción colorimétrica resultado de la reacción de nitrito de sodio, cloruro de aluminio e hidróxido de sodio (Fermont).

Determinación de esteroides: el extracto etanólico se mezcló con anhídrido acético más ácido sulfúrico (FagaLab). La coloración verde indica una reacción positiva.

Determinación de saponinas: el residuo de extracto etanólico se mezcló con vainillina más ácido sulfúrico (FagaLab). La coloración morada indica una reacción positiva.

Determinación de alcaloides: el residuo de extracto etanólico en ácido clorhídrico se mezcló con solución de Dragendorff (Nitrito de Bismuto, ácido acético glacial, yoduro de potasio)(Química dinámica, Monterrey). La formación de un precipitado indica una reacción positiva.

Determinación de proteínas: el extracto etanólico se mezcló con ninhidrina (Productos químicos de Monterrey). La coloración amarilla indica una reacción positiva.

Cromatografía en columna

Se realizaron 2 columnas: 1.- La primera columna fue empacada con alúmina como fase estacionaria y se utilizó Butanol-ácido acético-agua (3:2:1) como fase móvil. El extracto metanólico de 24 horas fue sometido a separación en esta columna. Las fracciones se analizaron por cromatografía en capa fina usando las mismas fases que en la columna. 2.- La segunda columna fue empacada con alúmina como fase estacionaria y se utilizó como eluyente hexano-acetato de etilo 7:3. El extracto metanólico de 24 horas fue sometido a separación en esta columna. Las fracciones se analizaron por cromatografía en capa fina usando las mismas fases que en la columna. Fracciones de compuestos similares fueron unidas y nuevamente analizadas por cromatografía en capa fina y posteriormente evaporadas a sequedad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cromatografía en capa fina:

La cromatografía de columna involucra la adsorción de un compuesto en una fase estacionaria y la elusión de este con disolventes de diferente polaridad. En la cromatografía en capa fina las condiciones de separación se eligieron en función de las características de la mezcla a separar.

Por cromatografía en capa fina se encontró que la mezcla con mejor separación de compuestos de extracto etanólico y metanólico de 24 horas fue butanol-ácido acético-agua en la proporción 3:2:1 utilizando alúmina como fase estacionaria.

Pruebas colorimétricas: con base a las pruebas colorimétricas el extracto etanólico presentó esteroides, saponinas, alcaloides, flavonoides y polifenoles (Tabla 1). La presencia cualitativa de alcaloides en *H. patens* concuerda con la encontrada por Chilpa y cols., (2004), quienes encontraron que el extracto metanólico de *H. patens* contiene alcaloides oxindoles: isopteropodina, rumberina, palmirina, maruquina y alcaloide A. Así mismo, Aquino y cols., (1990) encontraron 2 flavononas (Glycoside 5,7,2', 5'- tetrahydroxyflavanone 7-rutinoside y Narirutin) y un ácido fenólico (ácido rosmarínico). No se lograron determinar proteínas en el extracto debido a la falta de concentración del extracto usada para esta determinación, considerando que una concentración más alta presentaba color lo que impedía observar el cambio de coloración para una reacción positiva.

Tabla 1. Composición de extracto etanólico de *H. patens*

	Control negativo	Control positivo	Extracto etanólico
Proteínas	Negativo	Positivo	Negativo
Esteroides	Negativo	-----	Positivo
Saponinas	Negativo	-----	Positivo
Alcaloides	Negativo	-----	Positivo
Flavonoides	Negativo	-----	Positivo
Polifenoles	Negativo	-----	Positivo

Cromatografía en columna:

Con base en la cromatografía en capa fina se seleccionó el eluyente y la fase estacionaria a utilizar en la cromatografía en columna. En la primera columna empacada con alúmina se utilizó el extracto metanólico de 24 horas. El eluyente utilizado fue Butanol-ácido acético-agua (3:2:1). Se obtuvieron 17 fracciones, de las cuales se realizó cromatografía en capa fina en placas de alúmina usando como eluyente hexano-acetato de etilo 7:3. Solamente las fracciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 presentaron compuestos aunque ninguna fracción contenía solo un compuesto puro, los valores de factor de retención se

muestran en la tabla 2. Las fracciones de compuesto similares fueron unidas (1-3 y 4-6) y se trató de evaporar a sequedad aunque esto no se logró debido a los solventes con baja volatilidad utilizados. Debidos a la débil separación de compuestos se procedió a repetir la cromatografía en columna cambiando el solvente.

Tabla 2. Cromatografía en capa fina de fracciones obtenidas en la columna 1

1	2	3	4	5	6
0.8902	0.9024	0.9024			
0.7621	0.7560	0.7621			
0.6707	0.6829	0.6829	0.6790	0.6790	0.666
0.5853	0.6097	0.6097			
0.5487	0.5853	0.5731			
			0.3641	0.3441	0.3209

En la segunda columna se utilizó como eluyente hexano-acetato de etilo 7:3 y se obtuvieron 104 fracciones, a la fracción número 49 se le cambió la polaridad del solvente por hexano-acetato de etilo 1:1. En cada una de las fracciones se realizó cromatografía en capa fina para unir las fracciones de compuestos similares 1-2, 3-6, 7-11, 12-21, 22-25, 26-30, 31-36, 37-39, 40-44, 45-47, 48-53, 54-63, 64-65, 66, 67, 68-81, 82-87, 82-104. Las fracciones unidas fueron evaporadas a sequedad. Una vez agrupadas se realizó nuevamente cromatografía en capa fina, encontrando que solamente las fracciones 1-2, 12-21 presentaron un compuesto puro.

CONCLUSIÓN

El aislamiento de componentes mayoritarios a partir de extractos de *H. patens* se llevó a cabo por métodos cromatográficos de separación como cromatografía en capa fina y cromatografía en columna. Mediante estos

métodos se encontró la mezcla de eluyente adecuada para separar compuestos de *H. patens* fue hexano: acetato de etilo en la proporción 7:3 utilizando alúmina como fase estacionaria.

Las fracciones 1-2, 12-21 presentaron un compuesto puro, por lo que estos compuestos podrían posteriormente ser analizados por métodos espectroscópicos para su identificación, así como para determinar sus propiedades biológicas incluyendo en particular el efecto anti-inflamatorio en un modelo murino (cepa Balb/c) de inflamación inducida por carragenina.

BIBLIOGRAFÍA

Aquino, R., Ciavatta, L.M., De Simone, F., Pizza, C. 1990. "A flavanone glycoside from *Hamelia patens*". *Phytochemistry*. 29(7):2359-2360.

Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., Santos, A.R.S. 2004. "Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* 70(2): 93-103.

Calixto, J.B., Otuki, M.F., Santos, A.R. 2003. "Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB)". *Planta Med.* 69(11): 973-983.

Chaudhri, P.K., Thakur, R.S. 1991. "*Hamelia patens*: A new source of Ephedrine¹". *Planta Med.* 57(2):199.

Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z. 1986. "Place des plantes médicinales dans la thérapeutique". *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*. 64 (2) 159-175.

Leonti, M., Vibrans, H., Sticher, O, Heinrich, M. 2001. "Ethnopharmacology of the Popoluca, Mexico: an evaluation." *J Pharm Pharmacol.* 53(12):1653-1669.

Rates, S.M.K. 2001. "Plants as source of drugs". *Toxicon*.39: 603-613.

Mena-Rejon, G., Caamal-Fuentes, E., Cantillo-Ciau, Z., Cedillo-Rivera, R., Flores-Guido, J., Moo-Puc, R. 2009. "In vitro cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine" *J Ethnopharmacol.* 121(3):462-465.

Reyes-Chilpa, R., Rivera, J., Oropeza, M., Mendoza, P., Amekraz, B., Jankowski, C., Campos, M. 2004 "Methanol extracts of *Hamelia patens* containing oxindole alkaloids relax KCl-induced contraction in rat myometrium". *Biol Pharm Bull.* 27(10):1617-1620.

Siriwatanametanon, N., Fiebich B.L., Efferth, T., Prieto, J.M., Heinrich, M. 2010. "Traditionally used Thai medicinal plants: in vitro anti-inflammatory, anticancer and antioxidant activities". *J Ethnopharmacol.* 130(2):196-207.

Sosa, S., Balick, M.J., Arvigo, R., Esposito, R.G., Pizza, C., Altinier, G., Tubaro, A. 2002. "Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants". *J. Ethnopharmacol.* 81(2):211-215.

Taylor, P., Arsenak, M., Abad, M.J., Fernández, A., Milano, B., Gonto, R., Ruiz, M.C., Fraile, S., Taylor, S., Estrada, O., Michelangeli, F. 2012. "Screening of Venezuelan medicinal plants extracts for cytostatic and cytotoxic activity against tumor cell lines. *Phytother Res.* Doi: 10.1002/ptr.4752.