

¿ES HPTLC UNA ALTERNATIVA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS?: CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO EN ÁRBOLES SILVESTRES DE LA FAMILIA SALICACEAE UBICADOS EN EL ESTADO DE GUANAJUATO

Ávila Hernández César Alejandro (1), Molina Torres Jorge (2), Ramírez Chávez Enrique (3)

¹ [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [alejandrobmm19@gmail.com]

² [Bioquímica y Biotecnología, Laboratorio de Fitobioquímica, Irapuato, CINVESTAV] | [jmolina@ira.cinvestav.mx]

³ [Bioquímica y Biotecnología, Laboratorio de Fitobioquímica, Irapuato, CINVESTAV] | [echavez@ira.cinvestav.mx]

Resumen

La familia salicaceae ha sido de las más estudiadas durante los últimos años debido a sus aspectos etnomédicos, farmacológicos y fitoquímicos sin embargo, la información cualitativa y cuantitativa de las sustancias y compuestos bioactivos de árboles de esta familia, no se ha estudiado en géneros silvestres presentes en el Bajío guanajuatense. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar, cuantificar y estandarizar un método para determinar la presencia de salicósidos en 4 especies de la familia salicaceae así como determinar si los salicósidos presentes son los mismos en cada uno de los extractos etanólicos obtenidos a partir de partes aéreas (hojas, corteza y amentos) de árboles de *Salix humboldtiana*, *S. alba*, *Populus sp.* y *P. alba* colectadas en diferentes puntos del Bajío guanajuatense. El análisis se realizó mediante la técnica de Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC) y la cuantificación se realizó mediante una curva de calibración con la ayuda del software winCATS 2.0.15069.1 y de los diferentes instrumentos cromatográficos CAMAG. La presencia de ácido salicílico se observó en todas las muestras y no hubo diferencias significativas en el resto de los fitoquímicos de los extractos, obteniendo perfiles fitoquímicos similares en cada una de las especies estudiadas.

Abstract

The salicaceae family has been one of the most studied during the last years for its ethnomedical, pharmacological and phytochemical aspects. However, the qualitative and quantitative information of the bioactive substances and compounds of this family tree has not been studied in wild genera in the Bajío. Therefore, the objective of this work was to analyze, quantify and standardize a method by HPTLC to determine the presence of salicylic acid (salicylic acid) in 4 species of the family Salicaceae as well as to determine if the salicosides present are the same in each of the ethanolic extracts obtained from aerial parts (leaves, bark and branches) of *Salix humboldtiana*, *S. alba*, *Populus sp.* and *P. alba* collected in different points of the Bajío. The analysis was performed using the high resolution thin layer chromatography (HPTLC) technique and quantification was performed using a calibration curve with the help of winCATS software 2.0.15069.1 and the different CAMAG chromatographic instruments. The presence of salicylic acid was observed in all samples and there were no significant differences in the rest of the phytochemicals of the extracts, obtaining similar phytochemical profiles in each of the studied species.

Palabras Clave

HPTLC; salicaceae; salicósidos; perfil fitoquímico

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos y hasta la actualidad se han utilizado las plantas con fines curativos, siendo una práctica común entre hombres y mujeres de todo el mundo, los conocimientos sobre las propiedades curativas de las plantas se han transmitido de una manera empírica de una generación a otra sin conocer cuáles son los principios activos que actúan aliviando los malestares [1].

Las plantas contienen numerosos compuestos orgánicos denominados “metabolitos primarios”, entre los que se encuentran en primer término, los azúcares o carbohidratos, que se producen como resultado de la fotosíntesis. Por otra parte, sintetizan en muy pequeñas cantidades raramente más del 1% diferentes compuestos químicos denominados en general como “metabolitos secundarios”, dado que no intervienen directamente en su metabolismo, o al menos, se ignora su utilidad directa en la vida del vegetal. Ellos pertenecen a diferentes grupos como son: aceites esenciales, alcaloides, cumarinas, esteroides, fenoles, flavonoides, glucósidos, gomas, iridoides, lignanos, mucilagos, pectinas, quinonas, saponinas, taninos, terpenos, etc [2].

Entre las plantas que están siendo objeto de una creciente investigación científica durante los últimos años por la gran cantidad de metabolitos secundarios, se encuentra la familia Salicaceae que es una familia de dos géneros y más de 300 especies que constituyen un grupo de plantas muy interesante, por sus aspectos etnomédicos, farmacológicos y fitoquímicos [1]. La planta completa, especialmente la corteza, contiene múltiples metabolitos secundarios que son de interés humano como los salicósidos y heterósidos de fenoles sencillos, entre los que destaca la salicina, a nivel intestinal se descompone en saligenina o saligenol (alcohol salicílico) y glucosa, por acción de la enzima β -glicosidasa [3].

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es el método de elección para la mayoría de los

protocolos de análisis, identificación y cuantificación de metabolitos secundarios presentes en plantas con uso medicinal. Sin embargo, ya que se requiere analizar un gran número partes de plantas y por ende numerosas muestras, el empleo de esta técnica demanda un tiempo considerable y un alto costo. En el presente trabajo se valida y propone un método analítico por HPTLC para cuantificar ácido salicílico. Esta técnica posee importantes ventajas sobre otros métodos cromatográficos, pues no requiere de purificaciones exhaustivas, utiliza cantidades mínimas de solventes, es una metódica rápida y, además, por ser un sistema abierto, permite analizar distintas muestras y diferentes analitos en forma simultánea, lo que se traduce en economía de tiempo, materiales y reactivos [1, 2].

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de los reactivos y equipos

Todos los materiales y equipos utilizados en la presente investigación fueron proporcionados por el Laboratorio de Fitobioquímica CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato.

Material de laboratorio

Las placas utilizadas fueron grado HPTLC de sílice gel 60F₂₅₄ Merck Millipore base de vidrio, Balanza analítica de precisión (OHAUS Adventurer™AR0640), Unidad de extracción soxhlet (BUCHI E-816), Aparato de destilación rotatorio asociado a un Baño María (BUCHI 011).

Los solventes usados para la extracción y análisis HPTLC fueron de grado analítico alcohol Metílico (Kara® S.A de C.V), Acetato de Etilo (Fermont®), Ácido Sulfúrico (J.T Baker®), NaOH (Fermont), Hexanos (Kara® S.A de C.V) y Ácido 3,5-dinitrobenzoico (Sigma-Aldrich®).

Equipos HPTLC

Los equipos cromatográficos empleados durante el desarrollo del análisis son de la compañía Suiza CAMAG y fueron los siguientes:

- Automatic TLC Sampler 4
- Automatic Developing Chamber (ADC 2)
- Chromatogram Immersion Device.
- TLC Visualizer 2

Material vegetal

Para la presente investigación se utilizaron hojas, corteza y amentos de *Salix humboldtiana*, *S. alba*, *Populus L.* y *Populus alba*

Sitio de muestreo y preparación de extractos

El muestreo se realizó a la orilla de un arroyo ubicado en la Ciudad de Irapuato a 20°43'14.9"N 101°19'41.2"W, las plantas fueron herborizadas para su identificación con la ayuda de la base de datos del herbario Nacional de la UNAM y llevadas a analizar en el laboratorio de Fitobioquímica del Centro de Investigación de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Irapuato, el material fresco fue lavado, desecado a 50 °C por 7 días, pesado (10.4453 g de cada una de las partes a analizar) y pulverizado, una vez macerada la muestra se le adicionó metanol (1:20 W/V) y se calentó a 70 °C por un lapso de 10 minutos, la mezcla se dejó reposar durante 36 horas a una temperatura de 6 °C. El extracto se filtró con papel watchman® de tamaño de poro de 25 micras, el filtrado fue llevado a peso seco con rotavapor a 60 °C y 337 mbar y finalmente resuspendido en 4 mL de metanol JT Baker®.

Hidrólisis ácida de extractos

La hidrólisis ácida de los extractos se llevó a cabo con HCl 4N, incubando a 70 °C por 2 horas.

Fase móvil y estándares

La estandarización de la fase móvil para la detección ácido salicílico por TLC, fue establecida probando 4 fases móviles, acetato de etilo, metanol, agua (77:13:10) y (71:11:8) y Ciclohexano, cloroformo, ácido acético (60:5:5) y (55:10:10) buscando principalmente buena resolución entre las bandas de corrida y la movilidad del estándar de ácido salicílico. Para la preparación de los estándares 1 mg de ácido salicílico fue disuelto en 1 mL de metanol.

Análisis HPTLC

Los extractos metanólicos fueron aplicados sobre placas HPTLC con soporte de vidrio Merk Millipore sílice gel 60F₂₅₄(250 µm de espesor) de 10cm×10cm. Para este propósito se aplicaron sobre la placa los extractos de cada una de las especies a analizar, los volúmenes aplicados son mostrados en la tabla 1. Los extractos se aplicaron con la ayuda del CAMAG Automatic TLC Sampler 4. Las condiciones de operación fueron: velocidad de aplicación 10 µL/s, ancho de banda de 6mm, primera aplicación sobre el eje X a 8 mm, primera aplicación sobre el eje Y a 15 mm, distancia entre bandas de 8.4 mm. Las placas fueron desarrolladas usando una mezcla de Ciclo hexano, Cloroformo y Ácido acético (60:5:5; V/V) en el desarrollador automático ADC 2, secando la placa por 30 s seguido de una saturación de 20 min con la fase móvil a temperatura ambiente y finalmente, después del desarrollo un secado de 5 min. Las fotografías fueron tomadas a una longitud de onda de 366 nm con la ayuda de CAMAG TLC visualizer y del software winCATS 2.0.15069.1.

Curva de calibración

La curva de calibración para la cuantificación de ácido salicílico se realizó aplicando sobre una placa sílice gel 60F₂₅₄ Merck Millipore base de vidrio 5 muestras sucesivas de ácido salicílico en volumen crecientes de 0.2 a 3.2 µl y con la ayuda de software winCATS 2.0.15069.1. Se logró realizar la curva de calibración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La resolución entre las bandas y la movilidad de las muestras, fueron los criterios básicos para la elección de la fase móvil a utilizar en la cuantificación de ácido salicílico. El Rf correspondiente a ácido salicílico a partir de las fases móviles S1 y S2 con un frente de corrida de 80 mm, demuestra el exceso de afinidad entre el solvente y la muestra aplicada teniendo como resultado bandas de gran tamaño y no definidas. Reduciendo la polaridad de la fase móvil, se observó una mejor resolución y separación de las bandas. La determinación de la fase móvil fue realizada a partir de S3 y S4 siendo estos los solventes que mostraron mejor resolución entre las bandas de ácido salicílico. La fase móvil S3 (ciclohexano, cloroformo, ácido acético [60:5:5]) fue el mejor sistema de solventes para la movilidad del estándar de ácido salicílico, mostrando una buena separación de banda, una resolución adecuada y una fluorescencia clara como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Factor de retención (Rf) para cada fase móvil probada

Fase móvil	Frente de corrida	Frente de corrida
	70 mm	80 mm
	Rf	Rf
S1	0.93	-
S2	0.89	-
S3	0.20	0.22
S4	0.17	0.18

A continuación, se detallan los resultados obtenidos en los ensayos realizados para la caracterización de los extractos metanólicos de *Salix humboldtiana*, *Salix alba*, *Populus L.* y *Populus alba*.

Cromatografía en Capa Fina

En las cromatografías de las 4 especies analizadas se observó la presencia de ácido salicílico lo que indicó el éxito de la hidrólisis ácida. Se observó que el tiempo aproximado de corrida fue de 45 min y la visualización de las bandas se logró con luz UV (366 nm).

Las figuras 1 a 4 muestran los resultados obtenidos del análisis de los extractos de las 4 especies analizadas.

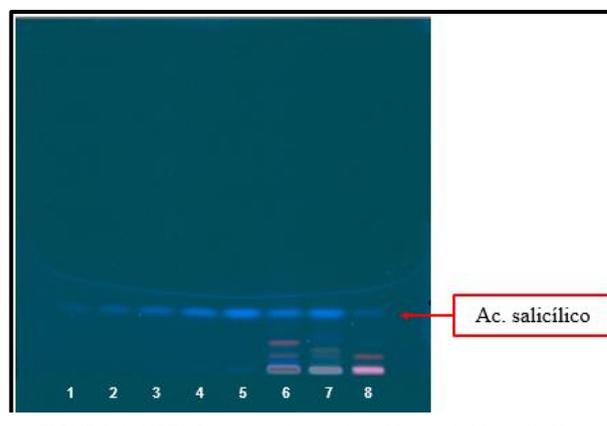


FIGURA 1: HPTLC para la determinación de ácido salicílico en *Salix humboldtiana*. Pista 1-6 ac. Salicílico 1 mg/ml; Pista 7 Corteza *S. humboldtiana*; Pista 8 hojas *S. humboldtiana*; Pista 9 amentos *S. humboldtiana*.

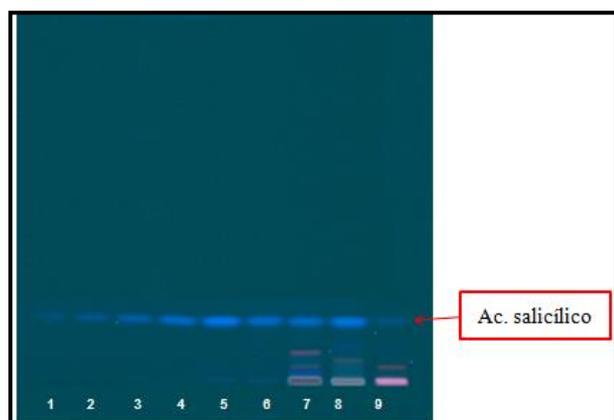


FIGURA 2: HPTLC para determinación de ácido salicílico en *Salix alba*. Pista 1-5 ac. Salicílico 1 mg/ml; Pista 6 Corteza *S. alba*; Pista 7 hojas *S. alba*; Pista 8 amentos *S. alba*.

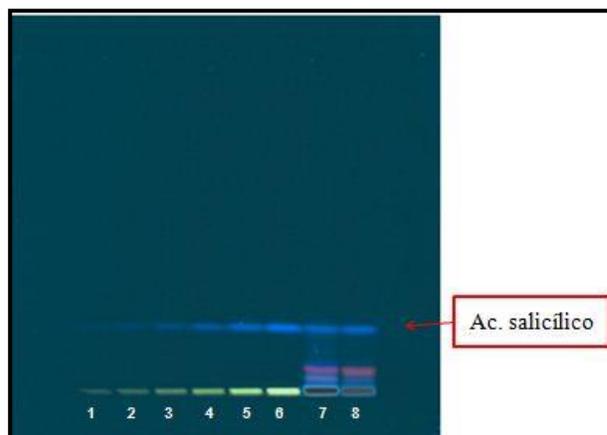


FIGURA 4: HPTLC para la determinación de ácido salicílico en *Populus alba*. Pista 1-6 ac. Salicílico 1 mg/ml; Pista 7 Corteza *P. alba*; Pista 8 hojas *P. alba*.

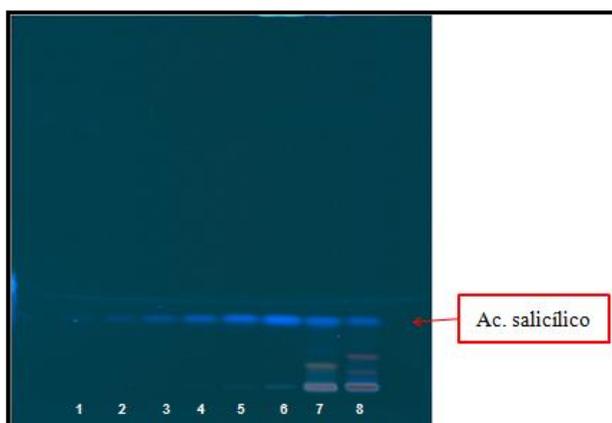


FIGURA 3: HPTLC para la determinación de ácido salicílico en *Populus L.* Pista 1-6 ac. Salicílico 1 mg/ml; Pista 7 Corteza *Populus L.*; Pista 8 hojas Corteza *Populus L.*

Cuantificación de ácido salicílico con VisionCat

Una vez verificada la presencia de ácido salicílico en los extractos, llevo a cabo la cuantificación del ácido salicílico presente en cada uno de los extractos para lo cual se realizó un análisis con el programa Vision Cat 2.0.15069.1.

Los resultados se describen en la tabla 1.

Tabla 1: Formato para tabla, este es un ejemplo de cómo debe presentarse la tabla

<i>Salix humboldtiana</i>	C. extracto (mg/ml)	M. cuantificado (ng/ml)
Corteza	47.800	400.100
Hojas	92.500	236.000
Amentos	93.500	70.390
<i>Salix alba</i>		
Corteza	89.300	222.900
Hojas	56.500	341.500
Amentos	86.500	32.660
<i>Populus L.</i>		
Corteza	44.700	405.00
Hojas	65.500	222.900
<i>Populus alba</i>		
Corteza	81.500	487.000
Hojas	55.250	1027.000

CONCLUSIONES

La fase móvil Ciclohexano: cloroformo: ácido acético (60:5:5) fue la mejor fase móvil para la detección y cuantificación de ácido salicílico, indicando así que la hidrólisis ácida se desarrolló con éxito, logrando un aporte importante para futuras investigaciones debido a que no existía una metodología para detectar y cuantificar ácido salicílico en plantas. Por lo que se puede concluir que HPTLC es una buena técnica para la identificación y cuantificación del metabolito secundario ácido salicílico que está presente en plantas de la familia salicaceae.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Dr. Jorge Molina Torres por aceptarme como parte de su equipo de investigación, por la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección, por su orientación, paciencia y sus consejos.

Al M. en C. Enrique Ramírez Chávez por la ayuda brindada durante la realización de mi proyecto de tesis de Licenciatura, por sus consejos y por la amistad otorgada.

REFERENCIAS

- [1] Cortes D, Andreu I, Bermejo A, Zafra-Polo MC. Los principios activos de las plantas medicinales. En: Vanclocha, B. Cañigual, S. (Eds.). Fitoterapia, Vademécum de prescripción. Barcelona, España: Masson. 2003.
- [2] Fonseca M, Diego-Pérez N. (Eds.) Flora de Guerrero: # 4. Salicaceae. Facultad de Ciencias. UNAM. México. En página web: <http://books.google.com/books>. accedido 5 mayo 2008.
- [3] Reiche C. Flora excursoria en el valle central de México. México: Editorial Politécnica. 1963.
- [4] Nedelcheva MA, Dogan Y, Guarrera MP. Plants traditionally used to make brooms in several European countries. J Ethnobiol Ethnomedicine. 2007; 3: 20.

[5] Pérez-Amador BCM, y Romo de Vivar RA. Fitoquímica. En: Waizel BJ. (Ed.) Las Plantas Medicinales y las Ciencias. Una Visión Multidisciplinaria. México: Instituto Politécnico Nacional. 2006.

[6] Uchytíl, RJ, 1991. «Salix drummondiana» *Fire Effects Information System*,. Online. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory (Producer). Consultado el 19 de Octubre de 2016.

[7] Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., Casanova, J., 2002. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L: oils from Sardinia and Corsica. *Flavour Fragrance J.* 17, 15–19.

[8] Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H., 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.* 53, 774

[9] CAMAG Laboratory, 2003. Quantitation of acetylsalicylic acid, salicylic acid, and salicyl amide by HPTLC.