

## Evaluación preliminar de cuatro métodos de extracción en hojas de *byrsonima crassifolia*

D. R. Alatríste Kurzel<sup>1</sup>, M.A. Guillen Poot<sup>2</sup>, R. Aburto-Amar<sup>3</sup>, J. Vergara Galicia<sup>2</sup>, F. J. Prado Prado<sup>2</sup>, F. J. Aguirre Crespo<sup>2\*</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Chetumal, Av. Insurgentes No. 330, C.P. 77013, Col. David Gustavo Gtz. Chetumal, Quintana Roo.

<sup>2</sup>División de Ciencias de la Salud, Universidad de Quintana Roo Boulevard Bahía s/n, Col. Del Bosque, C.P. 77019, Chetumal Quintana Roo, México.

<sup>3</sup>Universidad de la Cañada, Carretera Teotitlán-San Antonio Nanahuatipán Km 1.7 s/n. Paraje Titlacuattitla. C.P. 68540, Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca. México.

\*E-mail: jaguirre@uqroo.edu.mx

Recibido 16 de enero de 2014, Aceptado 16 de mayo de 2014

### Resumen

Hojas de *Byrsonima crassifolia* fueron sometidas a extracción vía maceración, percolación, soxhlet, sonicación y se caracterizaron a través del análisis de la extracción acumulativa y la estimación del contenido de clorofilas por espectrofotometría. Bajo las condiciones experimentales empleadas, la eficacia de extracción para cada método fue superior al 99%. El mejor rendimiento neto se registró por Soxhlet ( $7.29 \pm 0.21\%$ ), la mejor velocidad de extracción por sonicación ( $m: 0.032 \pm 0.004$ ;  $r^2: 0.96 \pm 0.02$ ) y la maceración registró menor variación en la estimación de clorofilas *a* y *b*. En su conjunto, se registran cambios en el contenido metabólico de los extractos crudos de *B. crassifolia*, hecho probablemente relacionado a los cambios de temperatura en los sistemas de extracción empleados.

**Palabras clave:** *Byrsonima crassifolia*, maceración, clorofila.

### Abstract

*Byrsonima crassifolia* leaves were extracted via maceration, percolation, soxhlet and sonication. Spectrophotometric estimation of chlorophylls and analysis of cumulative extraction allowed the characterization of the extraction process. Under these experimental conditions, the extraction efficiency for each method was greater than 99%. The best yield was recorded by Soxhlet ( $7.29 \pm 0.21\%$ ), the best extraction rate was by sonication ( $m: 0.032 \pm 0.004$ ;  $r^2: 0.96 \pm 0.02$ ) and maceration showed less variations in the estimation of chlorophyll *a* and *b*. These results indicated that according to the extraction method there are variations in the metabolic content of the extracts from *B. crassifolia*, probably due to temperature changes in the extraction systems.

**Keywords:** *Byrsonima crassifolia*, maceration, chlorophyll

### 1. Introducción.

Las actuales investigaciones científicas han comprobado la efectividad de diversos fármacos obtenidos de fuentes naturales, siendo en algunos casos, productos líderes en el tratamiento de enfermedades de alta prevalencia en el mundo, es por ello que los productos naturales son una importante fuente para la búsqueda de moléculas bioactivas y el desarrollo de fitomedicamentos[1].

En México existen numerosas especies con usos medicinales, las familias Anacardiaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Burseraceae, Cactaceae aportan un gran número de ellas[2]. De manera particular, el estado de Quintana Roo cuenta con una amplia variabilidad biológica[3] y según reportes etnomédicos, diversas especies vegetales silvestres son empleadas en la medicina tradicional[4].

*Byrsonima crassifolia* (L.) KUNT (1822), (Malpighiaceae) *chi* (I. maya, Yucatán), nance; es un árbol perennifolio distribuido ampliamente en el sureste de México; en la medicina tradicional se describen usos como astringente, antidiarreico, disenteria y dolor estomacal[2,5,6,7]; estudios previos indican propiedades antimicrobianas [3, 5, 6, 8] ,

antiparasitarias[9], antimicóticas[10], acciones a nivel central[11], antidepresivas[12], antihiper glucémicas y antihiperlipidémicas[13], antiinflamatorias[14] y espasmolíticas[15]. Estudios químicos han permitido identificar metabolitos secundarios de tipo polifenólico, taninos hidrolizables, flavanoles, proantocianidinas[16]. Estudios basados en la corteza de *B. crassifolia* han permitido identificar los siguientes compuestos: ácido 5-O-galoilquinico, ácido 3-O-galoilquinico, ácido 3,4-di-O-galoilquinico, ácido 3,5-di-O-galoilquinico, ácido 3,4,5-tri-O-galoilquinico, (+)-epicatequina-3-galato, (+)-catequina y (+)-epicatequina[17]. Estudios en la fruta ha permitido la identificación de compuestos volátiles entre los que se destacan el etanol (28.3%), etil-hexanoato (25.2%), metil-butarato (2.8%) y los ácidos butanóico (5.1%) y hexanoico (5.1%)[18].

Estudios farmacológicos a *B. crassifolia* ha permitido identificar efectos benéficos sobre la hiperlipidemia, hipoinsulinemia y el estrés oxidativo, por lo que se le identifica como una fuente de moléculas con potencial acción contra la diabetes[13]. Por otro lado, se reportan actividades antiinflamatorias[14], efectos a nivel central al modificar la actividad locomotora, la conducta exploratoria y la temperatura rectal[11]. Finalmente, se

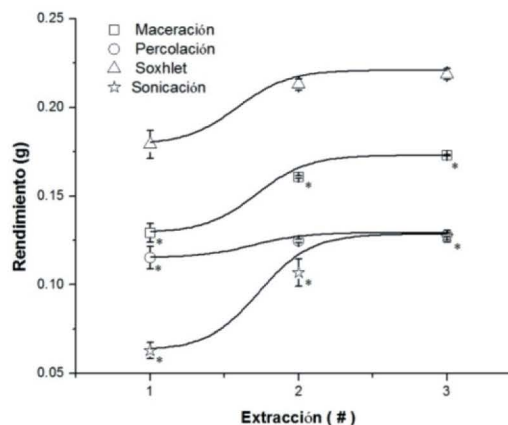
reportan un efecto antidepresivo inducido por el extracto metanólico (500 mg/kg) en el modelo FST (*Forced Swimming Test*) y se propone a la quercetina 3-O-xilosido (12 mg/kg), rutina (4,4 mg/kg), quercetina (1,4 mg/kg) y hesperidina (0,7 mg/kg) como metabolitos secundarios asociados en los efectos antidepresivos[12]. Bajo este contexto etnomédico, fitoquímico y farmacológico, el presente trabajo tiene como objetivo documentar la variación en el contenido metabólico a través de la estimación del contenido de clorofilas según el método de extracción aplicado a hojas de *Byrsonima crassifolia*.

## 2. Parte experimental

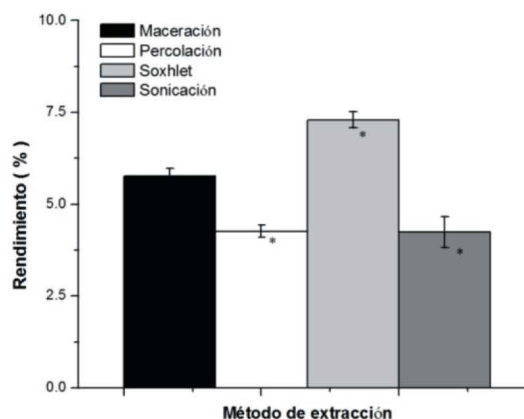
Hojas de *B. crassifolia* fueron colectadas en las inmediaciones de la ciudad de Felipe Carrillo Puerto, Quintana Roo en Enero de 2011; se secó (T: 25°C; Ohaus35®), se molió (Ika Works®) y se almacenó de acuerdo a la FHEUM[19]. A partir de material seco y molido (1 g) así como el empleo de MeOH como disolvente (20 ml) se realizaron tres extracciones consecutivas vía Soxhlet (T: 54°C; 7 ciclos), Percolación (Q: 1 ml/min; 0.5 cm d.i.), Maceración (t: 24 h T: 25°C) y Sonicación (Cole Parmer®; t: 10 min). Con la finalidad de documentar variaciones en el contenido metabólico, extractos crudos (200 mg) y de material seco y molido de *B. crassifolia* (1g) se aplicó el método de Hansmann (3 ml acetona 90%; t: 24 h; T: 5°C) para la extracción de clorofilas[20], posteriormente se estimó el contenido de clorofilas a partir de las propuestas de Pearson y Strickland[21] y de Hager y Betenrath[22]. Los resultados de los procesos de extracción y la estimación de clorofilas son expresados como el promedio de tres experimentos  $\pm$  desviación estándar. Los gráficos fueron contruidos mediante el software ORIGIN 10.0. El análisis estadístico fue desarrollado por un análisis de varianza (ANOVA). Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## 3. Resultados y discusión

Bajo las condiciones experimentales empleadas, la velocidad de extracción es mayor vía sonicación ( $m$ :  $0.032 \pm 0.004$ ;  $r^2$ :  $0.96 \pm 0.02$ ) respecto a la extracción por maceración ( $m$ :  $0.022 \pm 0.001$ ;  $r^2$ :  $0.94 \pm 0.004$ ), soxhlet ( $m$ :  $0.012 \pm 0.003$ ;  $r^2$ :  $0.84 \pm 0.05$ ) y percolación ( $m$ :  $0.006 \pm 0.001$ ;  $r^2$ :  $0.92 \pm 0.02$ ). La extracción acumulativa permite identificar que en todos los casos la eficiencia de extracción fue superior al 99% (Gráfica 1); en este sentido, se registra un rendimiento neto de  $7.29 \pm 0.21$ ,  $5.77 \pm 0.2$ ,  $4.27 \pm 0.16$  y  $4.24 \pm 0.42\%$  de extracción a partir de hojas de *B. crassifolia* vía Soxhlet, Maceración, Percolación y Sonicación, respectivamente (Gráfica 2).



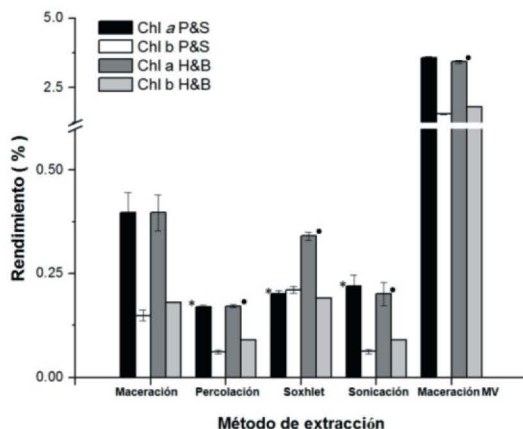
**Gráfica 1.** Dinámica de extracción de hojas de *B. crassifolia* según el método de extracción empleado. Los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos (\*  $p < 0.05$  vs. Soxhlet).



**Gráfica 2.** Rendimiento de extracción neto de hojas de *B. crassifolia* según el método empleado. Los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos (\*  $p < 0.05$  vs. Maceración).

Por otro lado, mediante la propuesta de Pearson y Strickland se estima un mejor contenido de clorofila  $-a$  y  $-b$  en extractos obtenidos vía Maceración ( $0.4 \pm 0.05$  y  $0.15 \pm 0.01\%$ ) respecto a la vía Soxhlet ( $0.2 \pm 0.01$  y  $0.21 \pm 0.01\%$ ), Percolación ( $0.17 \pm 0.01$  y  $0.06 \pm 0.005\%$ ) y Sonicación ( $0.22 \pm 0.03$  y  $0.06 \pm 0.005\%$ ). El empleo de la ecuación de Hager y Betenrath permite estimar un contenido de clorofila  $-a$  y  $-b$  de ( $0.4 \pm 0.04$  y  $0.18 \pm 0.02\%$ ) para Maceración; ( $0.34 \pm 0.01$  y  $0.19 \pm 0.01\%$ ) en Soxhlet; ( $0.17 \pm 0.001$  y  $0.09 \pm 0.01\%$ ) Percolación y ( $0.2 \pm 0.03$  y  $0.09 \pm 0.01\%$ ) para Sonicación. La extracción a partir del método de Hansmann permite una estimación de  $3.57 \pm 0.05$  y  $1.56 \pm 0.02\%$  así como de  $3.42 \pm 0.04$  y  $1.81 \pm 0.02\%$  para clorofila  $-a$  y  $-b$  por ambos métodos, respectivamente (Gráfica 3).





**Grafica 3.** Estimación de clorofila *a* (Chl *a*) y *b* (Chl *b*) presentes en hojas de *B. crassifolia* estimadas por el método de Pearson y Strickland (P&S) y Hager y Betenrath (H&B) en extractos obtenidos por diferentes métodos de extracción. Los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos (\*,  $p < 0.05$  vs. Maceración).

Los métodos de extracción empleados en farmacognosia están ampliamente documentados y sus procedimientos puede estar en función al tamaño de partícula, temperatura, disolvente, tiempo de contacto material vegetal/disolvente, entre otros factores[23]. Por otra parte, los metabolitos secundarios contenidos en los extractos muestran diferencias fisicoquímicas relacionadas con el proceso de extracción[24]. Bajo las condiciones empleadas, la extracción consecutiva de hojas de *B. crassifolia* y el ajuste a un modelo no lineal indica contrastes en la dinámica de extracción así como en el rendimiento neto de extracción. Estas diferencias en los rendimientos obtenidos podrían estar relacionadas con la aplicación de energía al sistema de extracción. Se ha reportado que la temperatura juega un papel crucial en la solubilidad, la viscosidad y densidad de extractos de productos naturales[25]. El incremento de la temperatura favorece la energía cinética de las moléculas[26] presentes en el material vegetal así como en el disolvente empleado, hecho que podría estar favoreciendo un aumento en la cantidad y en la diversidad de los metabolitos secundarios presentes en los extractos.

La determinación de clorofilas presentes en un organismo fotosintético es una medida importante en sí misma al ser un indicador del estado fisiológico de la especie vegetal[27], de hecho, se reporta que existen diferentes métodos, procedimientos y modelos matemáticos para la estimación de clorofilas[28]. Con la finalidad de contar con una aproximación a las potenciales variaciones en el contenido y en la cantidad de metabolitos secundarios presentes en las diferentes preparaciones, la estimación de clorofilas permitió registrar las modificaciones en la cantidad y en la relación clorofila *a/b* estimada al método de extracción empleado. La menor variación en la estimación de clorofilas se registra en la extracción por maceración (2.7/1 y 2.2/1), por otro lado, la vía soxhlet registra grandes cambios en la estimación de clorofilas (0.9/1 y

1.8/1), hechos que podrían estar relacionado con la temperatura aplicada al sistema de extracción.

#### 4. Conclusiones

Factores como la temperatura, el tiempo, disolvente, método de extracción, entre otros factores, influyen en la cantidad y diversidad de metabolitos secundarios contenidos en los extractos de *B. crassifolia*. La estimación de clorofilas a partir de ecuaciones di- y tricromáticas permite estimar la variabilidad del contenido metabólico presente en los extractos derivados de hojas de *B. crassifolia* obtenidos por diferentes métodos de extracción. Se requieren de métodos analíticos de mayor sensibilidad para cuantificar y corroborar las variaciones identificadas y por otro lado, documentar si existen cambios en la actividad farmacológica inducida por los extractos.

#### 5. Agradecimientos

Los autores agradecen al M.C. Joaquín Herrera Chí por su apoyo técnico en la realización de este trabajo. D. Alatríste-Kurzel agradece el apoyo a COQCYT 2013 por el programa Asistente de Investigador y F. Aguirre-Crespo agradece el apoyo por parte del proyecto Fortalecimiento de Cuerpos Académicos SEP-PROMEP 2013.

#### 6. Referencias

- Newman, D.J.; Gordon, M.C.; Kenneth, M.S. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022-1037.
- Monroy, C.; Castillo, P. *Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos*. 2da ed. Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2007; pp 3-8.
- Pozo, C.; Armijo-Canto, N. y Calmé, S. *Riqueza Biológica de Quintana Roo. Un análisis para su conservación, Tomo II*. ECOSUR-CONABIO, Gobierno del Estado de Quintana Roo y Programa de Pequeñas Donaciones (ppd); 2011; pp 46-81.
- Anderson, E.N.; Cauich-Canul, J.; Dzib, A.; Islebe, G.; Medina-Tzuc, F.; Sánchez-Sánchez, O.; Valdéz-Chale P. *Las plantas de los mayas, Etnobotánica en Quintana Roo, México*. CONABIO-ECOSUR; 2005; pp 1-4.
- Cáceres, A.; Cano, O.; Samayoa, B.; Aguilar, L. *J Ethnopharmacol.* **1990**, 30, 55-73.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. [www.conabio.gob.mx/conocimiento/info.../35-malpil.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info.../35-malpil.pdf) (accesado el 27 de Octubre de 2013).
- Leonti, M.; Vibrans, H.; Sticher, O.; Heinrich, M. *J Pharm Pharmacol.* **2001**, 53, 1653-69.
- Martínez-Vázquez, M.; González-Esquinca, A.R.; Cazares-Luna, L.; Moreno-Gutiérrez, M.N.; García-Argáez, A.N. *J Ethnopharmacol.* **1999**, 66, 79-82.
- Berger, I.; Barrientos, A.C.; Cáceres, A.; Hernández, M.; Rastrelli, L.; Passreiter, C.M.; Kubelka, W. *J Ethnopharmacol.* **1998**, 62, 107-15.

10. Cáceres, A.; López, B.R.; Girón, M.A.; Logemann, H. *J Ethnopharmacol.* **1991**, 31, 263-76.
11. Morales-Cifuentes, C.; Gómez-Serranillos, M.P.; Iglesias, I.; Villar del Fresno, A.M.; Morales, C.; Paredes, M.E.; Cáceres, A. *J Ethnopharmacol.* **2001**, 76, 223-8.
12. Herrera-Ruiz, M.; Zamilpa, A.; González-Cortazar, M.; Reyes-Chilpa, R.; León, E.; García, M.P.; Tortoriello, J.; Huerta-Reyes, M. *Phytomedicine.* **2011**, 18, 1255-61.
13. Pérez-Gutierrez, R.M.; Muñoz-Ramírez, A.; Gómez, Y.G.; Ramírez, E.B. *Plant Foods Hum Nutr.* **2010**, 65, 350-7.
14. Maldini, M.; Sosa, S.; Montoro, P.; Giangaspero, A.; Balick, M.J.; Pizza, C.; Della-Loggia, R.. *J Ethnopharmacol.* **2009**, 122, 430-3.
15. Bejar, E.; Malone, M.H. *J Ethnopharmacol.* **1993**, 39, 141-58.
16. Gordon, A.; Jungfer, E.; Da Silva, B.A.; Maia, J.G.; Marx, F. *J Agric Food Chem.* **2011**, 59, 7688-99.
17. [17]Maldini, M.; Montoro, P.; Pizza, C. *J Pharm Biomed Anal.* **2011**, 56, 1-6.
18. Alves, G.L.; Franco, M.R. *J Chromatogr A.* 2003, 985, 297-301.
19. Secretaría de Salud. *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. México, D.F, **2001**; pp 19-31.
20. Hansmann, E. Pigment analysis. En: Stein, J.R. *Handbook of phycological methods, culture methods and growth measurements*. London. **1973** Cambridge University Press, pp 359-368.
21. Pearson H. W. "Estimation of Chlorophyll a as a measure of Algal Biomass in Waste Stabilization Ponds". **1986**. En: *Proceedings of the Regional Seminar on Waste Stabilization Ponds Research. PanAmerican Center for Sanitary Engineering Environmental Sciences*. Lima, Perú; pp. 158-170.
22. Hager, A.; Meyer-Bertenrath, T. *Planta.* 69, Berlín, **1966**, pp. 198-217.
23. Kuklinski, C. *Métodos Generales en la obtención de los principios activos*. En: *Farmacognosia, Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Ediciones Omega, Barcelona, **2000**; pp 32-42.
24. Richter, J.; Schellenberg, I. *Anal Bioanal Chem.* **2007**, 387, 2207-2217.
25. Cepeda, E.; Villarán, M. C. *J. Food Eng.* **1999**, 41, 103.
26. Atkins, P.W.; De Paula, J. *Atkins Physical Chemistry*, 8a ed; New York, 2006, pp 745-909.
27. Pinto, A.; Von-Sperling, E.; Moreira, R. *Water Res.* **2001**, 35, 3977-3981 American Public Health Association (APHA). *Standards Methods for examination of water and wastewater*, 20th ed.; American Public Health Association Inc, Washington DC, 1998, pp 455- 461.