

# EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CUMARINA MEDIANTE HPLC-UV EN EXTRACTOS HIDROETANOLICO DE SEMILLAS DE *Dipteryx odorata*

ALBERTO OLIVEROS-BASTIDAS<sup>a\*</sup>, INELBA CORDERO<sup>a</sup>, DANIEL PAREDES<sup>b</sup>, DAISY BUENDÍA<sup>a</sup> y FRANCISCO A. MACÍAS DOMÍNGUEZ<sup>b</sup>

(Received June 2010; Accepted August 2011)

## ABSTRACT

Three methods for extraction (infusion, maceration and maceration with ultrasound) for the preparation of ethanol extracts from seed and quantification of coumarin in Tonka bean seed, the active ingredient associated with medical applications of this plant were evaluated. The evaluation showed that the ultrasonic maceration gave the best results in terms of performance and time of the extraction. A method by High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) for the detection and quantification of coumarin in ethanol extracts of the seed of *D. odorata* is described. The separation was performed in isocratic mode with mobile phase 45% acetonitrile and 55% water, on a *Resolve* C18 column of 5  $\mu\text{m}$ . The mobile phase flow was 1.00 ml x min<sup>-1</sup>, with detection at 275 nm. The calibration and validation parameters ( $LOD = 0.07 \text{ mg x g}^{-1} \text{ seed}$ ,  $LOQ = 108 \text{ mg x g}^{-1} \text{ seed}$  in a linear range between  $LOQ$  to  $LOQ \times 30$ ; % RSD <5 for all calibration points proved a reproducible and sensitive method for the determination of coumarin in this matrix. [www.relaquim.com](http://www.relaquim.com)

**Keywords:** *Dipteryx odorata*, Coumarin; seed, High-performance liquid chromatography (HPLC), Extraction

## RESUMEN

En este trabajo se evaluaron tres métodos para la extracción (infusión, maceración y maceración con ultrasonido) para la preparación de extractos etanólicos a partir de la semilla y cuantificación de cumarina en semillas de *Dipteryx odorata*, el principio activo asociado a las aplicaciones medicas de esta planta. La evaluación mostró que la maceración con ultrasonido arrojó los mejores resultados en cuanto al rendimiento y tiempo de la extracción de cumarina. Para esta evaluación, se desarrolló un método por cromatografía líquida de alta resolución con detección en ultravioleta (HPLC-UV) para la detección y cuantificación de cumarina en los

<sup>a</sup>Universidad de Los Andes-Facultad de Ciencias-Departamento de Química-Grupo de Química Ecológica. Mérida-Estado Mérida. 5101-A. Venezuela.

<sup>b</sup>Universidad de Cádiz, Facultad de Ciencias. Departamento de Química Orgánica. Grupo de Alelopatía. Puerto Real 11510, Cádiz. España.

\*Autor para correspondencia: e-mail: [aloliver@ula.ve](mailto:aloliver@ula.ve). Teléfono: +58-274-2401386. Fax: +58-274-2401286.

extractos etanólicos de la semilla de *D. odorata*. La separación fue realizada en modo isocrático con fase móvil 45% acetonitrilo y 55% agua, sobre una columna Resolve C18 de 5  $\mu\text{m}$ . El flujo de la fase móvil fue de 1,00 ml x min<sup>-1</sup>, realizando la detección a 275 nm. Los parámetros de calibración y validación (LOD= 0,07 $\mu\text{g}$  x g<sup>-1</sup> de semilla; LOQ= 108  $\mu\text{g}$  x g<sup>-1</sup> de semilla; rango lineal entre LOQ a LOQ x30; %DSR < 5 para todos los puntos de calibración), demostraron un método reproducible y sensible para la determinación de cumarina en esta matriz. [www.relaquim.com](http://www.relaquim.com)

**Palabras claves:** *Dipteryx odorata*, Coumarin; semillas, Cromatografía Líquida (HPLC), Extracción.

## INTRODUCCION

Para una segura utilización folclórica o farmacológica de cualquier planta con propiedades terapéuticas como medicina alternativa, es necesario una estandarización cualitativa y cuantitativa de todos sus principio activos, o al menos aquellos responsables de atenuar las dolencias asociadas a su uso (Dubey y Guerra, 2002; Canter, *et al.* 2005; Acharya y Acharya, 2010; McChesney, 1999; Bajaj, 1998). La estandarización cualitativa hace referencia a determinar todas y cada una de las estructura de los metabolitos secundarios (MS) en los diferentes órganos de la planta, y la cuantitativa, hace referencia a conocer los niveles de concentración en que se encuentran en la planta y que factores pueden modular estos niveles (Morgana y Shanksb, 2001).

Debido a las exigencias de regulación en el uso de plantas en uso medicinal, la estandarización cuantitativa ha sido motivo de intensa investigación, desarrollándose diversos métodos de detección y cuantificación de estos MS (Who, 1977). De los diferentes métodos encontrados, los métodos cromatográficos han surgidos como los mas aplicados en el control de calidad de las plantas medicinales, principalmente debido a parámetros como alta eficiencia, velocidad y posibilidad de utilización en sistemas automatizados y acoplados a

sistemas de detección sensibles (Hellström y Mattila, 2008; Klejdus, *et al.*, 2007).

A nuestro conocimiento, no existen datos en la literatura de métodos sistemáticos de análisis del contenido de cumarina en las semillas de *Dipteryx odorata*. En algunas referencias es posible encontrar estimaciones del contenido de cumarina, donde se menciona un contenido entre 1-3% en peso de cumarina, y en casos muy raros, pueden alcanzarse concentraciones del 10% (Duke, 1985; Lewis y Elvin-Lewis, 1977), siendo este compuesto el constituyente mayoritario en las semillas. Almidón y ácidos grasos son otros constituyentes en la semilla, alcanzando tenores de hasta un 25% (Trease y Evans, 1978). El árbol de *D. odorata* pertenece a las Leguminosae, endémico del norte de América del Sur, especialmente Venezuela, Guayana y Brasil (Duke, 1985). Cumaru, uno de sus nombres folclóricos, es un árbol de la selva tropical de gran tamaño, que crece hasta 30 metros de altura en la Amazonía. Se puede encontrar en las selvas tropicales de Brasil, Venezuela y Guyana, es del el género *Dipteryx* que comprende 10 especies de arbustos y árboles sólo en la América tropical. Este enorme árbol del bosque lluvioso es muy frecuente en los estados brasileños de Amazonas y Pará. Para el aprovechamiento de la especie, la cual tiene explotación comercialmente, el fruto, de alta dureza, es abierto y sus semillas extraída, secada

y almacenada en barriles durante 24 h (Ehler *et al.*, 1995). Durante este tiempo, la semilla sufre un proceso de fermentación, el cual es detectado por la tonalidad negra que adquiere la semilla. Debido al alto contenido en cumarina y otros aromatizantes, como flavonoides, muchos usos han sido dados a las semillas de esta planta, que van desde la industria de la perfumería y del tabaco, hasta aplicaciones medicinales (Estévez-Braun y González, 1997; Bruneton, 1999; Keating y O'Kennedy, 1997). Desde el punto de vista folclórico, son diversas las dolencias tratadas con extractos acuoso, infusiones u extractos alcohólicos obtenidos de las semillas, siendo las actividades atidiuretico, hipoglicémico, antiinflamatorio, antiespasmódico, y más recientemente, acción anti cancerígena, especialmente en líneas cancerosas asociadas al cáncer de mama (Egan *et al.*, 1990; Lacy y O'Kennedy, 2004).

Debido a esta amplia variedad de efectos biológicos, el uso de bebidas a base de semillas de *D. odorata*, o su uso como aditivos en alimentos, ha crecido en los últimos tiempos, lo que ha incrementado la necesidad de controles basados en los niveles de cumarina que puedan estar presente, así como otros MS en las semillas. A pesar que en la literatura es posible encontrar un perfil fitoquímico general para las semillas, estos hacen referencia en especial a las especies encontradas en Brasil, siendo para el caso de Venezuela, nula la información encontrada, y sobre el contenido de cumarina, a nuestro conocimiento, no existe información sobre los niveles de este compuesto en las especies en esta zona. Con estos antecedentes, en este trabajo se tienen como objetivo desarrollar un método mediante cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de cumarina en semillas de *D. odorata*. Variables como composición del disolvente y método de extracción son optimizadas.

## MATERIALES Y METODOS

### Semillas

Las muestras de semillas de *Dipteryx odorata* (gramos/semilla =  $1,53 \pm 0,09$ ;  $n=30$ ) fueron obtenidas en mercados públicos en la región de los Llanos. Las semillas fueron extraídas de su fruto maduro y secadas a condiciones ambientales, protegidos de la humedad. Para su estudio, éstas fueron secadas a una temperatura de 40°C con ventilación forzada durante 4 días, tiempo necesario para llegar a un peso constante. Estas son luego pulverizadas y tamizadas, usando solo partículas menores a 0,6 mm para la extracción.

## PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

### Extracción mediante Maceración

Muestras de semillas tamizadas (1g) fueron maceradas con etanol:agua (EtOH:H<sub>2</sub>O; 1:1; v/v; 0,1g/L) a temperatura de laboratorio ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 4 días. El material fue filtrado ( $<45 \mu\text{m}$ ) y el extracto crudo así obtenido fue analizado directamente mediante HPLC-UV. Este procedimiento fue realizado por triplicado.

### Extracción mediante maceración bajo ultrasonido

Muestras de semillas tamizadas (1g) fueron mezcladas con etanol:agua (EtOH:H<sub>2</sub>O; 1:1; v/v; 0,1g/L) y maceradas bajo ultrasonido (BRONSON 5510); baño de agua, temperatura de laboratorio, 2 h. El material así obtenido fue filtrado ( $<45 \mu\text{m}$ ) y el extracto crudo así obtenido fue analizado directamente mediante HPLC-UV. El procedimiento fue realizado por triplicado.

## INFUSIÓN

Muestras de semillas tamizadas (1g) fueron agregadas en agua destilada y desionizada a ebullición (10 mL). El recipiente fue tapa-

do hasta alcanzar la temperatura de laboratorio ( $21\pm 2^\circ\text{C}$ ). El material resultante fue filtrado ( $<45\mu\text{m}$ ) y analizado directamente mediante HPLC-DAD. Este procedimiento se fue realizado por triplicado.

#### **DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE EXTRACCIÓN CON ULTRASONIDO**

Para determinar el tiempo optimo de la extracción en el baño de ultrasonido, muestras de 1 g de semillas tamizadas fueron sometidas a intervalos de tiempo de extracción con el disolvente ( $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ , 1:1 v/v, 0,1g/mL) de 5, 10, 60, 120, 160 y 180 min. El material resultante fue filtrado ( $<45\mu\text{m}$ ) y analizado mediante HPLC-UV. Este procedimiento se fue realizado por triplicado.

#### **Determinación de la eficiencia de la extracción con ultrasonido**

Para la determinación de la eficiencia de la extracción, muestras de 1 g de semillas tamizadas fueron extraídas bajo ultrasonido (BRONSON 5510; baño de agua, temperatura de laboratorio, 2 h. Esta secuencia fue realizada por tres ciclos de extracción. El material resultante fue filtrado ( $<45\mu\text{m}$ ) y analizado directamente mediante HPLC-UV. Este procedimiento fue realizado por triplicado.

#### **Determinación de la proporción ÓPTIMA del volumen de extracción**

Preparación de las muestras

Muestras de semillas tamizadas (1g) fueron mezcladas con etanol:agua (1:1, v/v) a las siguientes relaciones de g/mL: 0,5; 0,2; 0,1 y 0,06. Estas muestras fueron extraídas bajo ultrasonido (BRONSON 5510; baño de agua, temperatura de laboratorio, 2 h). El material resultante fue filtrado ( $<45\mu\text{m}$ ) y este extracto es el usado para el análisis cualitativo y cuantitativo de la eficiencia de la extracción.

#### **Análisis cualitativo (Cromatografía en capa fina-TLC)**

Del extracto obtenido luego de la extracción, se toman 3  $\mu\text{L}$  y son aplicados en la placa de TLC y fueron desarrolladas y examinadas como se indica en la siguiente sección.

#### **Análisis cuantitativo (HPLC)**

Los mismos extractos usados en el estudio por TLC son analizados mediante HPLC, según las condiciones mostradas más adelante, para el contenido de cumarina extraída.

### **MÉTODOS CROMATOGRÁFICO**

#### **Cromatografía en capa fina (TLC)**

Los análisis de cromatografía en capa fina (TLC) fueron realizados sobre silica gel 60 F254 (MERCK) de 0,25 mm de espesor preparada sobre láminas de aluminio. Como mezcla de eluyentes para la separación de cumarina se usó una mezcla de tolueno:éter etílico (1:1 v/v) con 1% de ácido acético (Sherma, 2004; Glowniak *et. al.*, 1986). Después de evaporación del solvente ( $T < 45^\circ\text{C}$ ) las láminas de TLC fueron examinadas bajo luz UV (MINERALIGHT® lamp MODEL UVGL-25) a 366 nm. Cumarina (SIGMA CHEMICALS Co) fue usada como estándar. Muestras de 3  $\mu\text{L}$  de cumarina estándar y de los extractos fueron aplicados sobre las láminas de TLC para su separación.

#### **Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), Waters 600E, Millipore, USA, con detector UV para HPLC, Shimadzu, con arreglo de diodos (DAD) fue usado para los análisis de cumarina en los extractos obtenidos. Se usó un inyector Waters U6K, Millipore. La separación se llevó a cabo sobre una columna radial de silica *Resolve C18* de 5 y 10  $\mu\text{m}$ , Waters, Millipore, USA; con su correspondiente Pre-columna *Waters Sentry*. La sepa-

ración fue realizada en modo isocrático con fase móvil 45% acetonitrilo y 55% agua. El flujo de la fase móvil fue de  $1,00 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ , realizando la detección a 275 nm.

## VALIDACION DEL MÉTODO

### Especificidad

Se analizaron los cromatogramas obtenidos de soluciones de extracto hidroetanolicos de semillas y los obtenidos de soluciones de estándares de cumarina patrón, usando como criterio el tiempo de retención y el espectro de ultravioleta.

### Repetitividad

Se evaluaron la repetitividad y precisión mediante el análisis en un mismo día y en tres días diferentes siete muestras a diferentes concentración (5, 10, 50, 100, 300, 500 y  $800 \mu\text{M}$  de cumarina).

### Estabilidad

La estabilidad de la cumarina en los estándares (a concentraciones de 10, 100 y  $500 \mu\text{M}$ ) y extractos de semilla obtenidas bajo las mejores condiciones de extracción, se evaluó analizando mediante HPLC por un período de 30 días.

### Análisis cualitativo

Para la detección e identificación de cumarina en los diferentes extractos generados, se usó la comparación del espectro ultravioleta, el tiempo de retención y la adición de estándar de cumarina a las muestras estudiadas.

## ANÁLISIS CUANTITATIVO

Para la construcción de una curva de calibración se preparó una solución madre (25 mL) de cumarina patrón de concentración  $1,9 \text{ mM}$ . Luego se tomaron volúmenes en forma creciente y se fueron añadiendo a matraces de 10 mL que luego fueron lle-

vados al aforo con el solvente. Así se construyeron soluciones patrón de cumarina de 5, 10, 50, 100, 300, 500, 800 y  $1000 \mu\text{M}$ . Se tomó directamente de estas soluciones patrones para analizar en el HPLC. Cada determinación se llevo a cabo por triplicado. Con estos datos se construye la curva de calibración, graficando área de pico frente a concentración. El límite de detección (LOD) fue definido como la concentración del estándar que corresponde a tres veces la relación señal/ruido ( $S/N=3$ ) y el límite de cuantificación (LOQ) fue definió a la concentración del estándar que corresponde a diez veces la relación señal/ruido ( $S/N=10$ ). Para la determinación de estos parámetros de calibración se aplico el software *Alamin* (Campana *et al.*, 1997). La linealidad del método cromatográficos fue evaluada fue analizada para cumarina en un intervalo de concentración de LOQ a LOQ x30.

## ESTUDIO DEL EFECTO DE LA MATRIZ

Para descartar el efecto de matriz, se construyeron curvas de calibración sencilla y de adición de estándar interno con patrón de cumarina (previa certificación de su pureza), construyendo los patrones en solución 90% metanol/agua. La curva de calibración sencilla se construyo en el rango de concentraciones de  $5 \mu\text{M}$  –  $800 \mu\text{M}$ . Se tomó directamente de estas soluciones patrones para analizar mediante HPLC. La curva de adición de estándar se construyo en el mismo rango de concentración que la curva de calibración sencilla, para esto se preparo un extracto según las mejores condiciones de extracción obtenidas anteriormente. Una vez obtenida el extracto hidroetanólico se prepararon los patrones a volúmenes crecientes de solución madre de cumarina patrón, la cual se preparó a una concentración. Se seleccionó la curva de calibración considerando si hubo o no efecto de la matriz vegetal para realizar la cuantificación. Esto se determinó usando la razón entre las pendientes de ambas curvas.



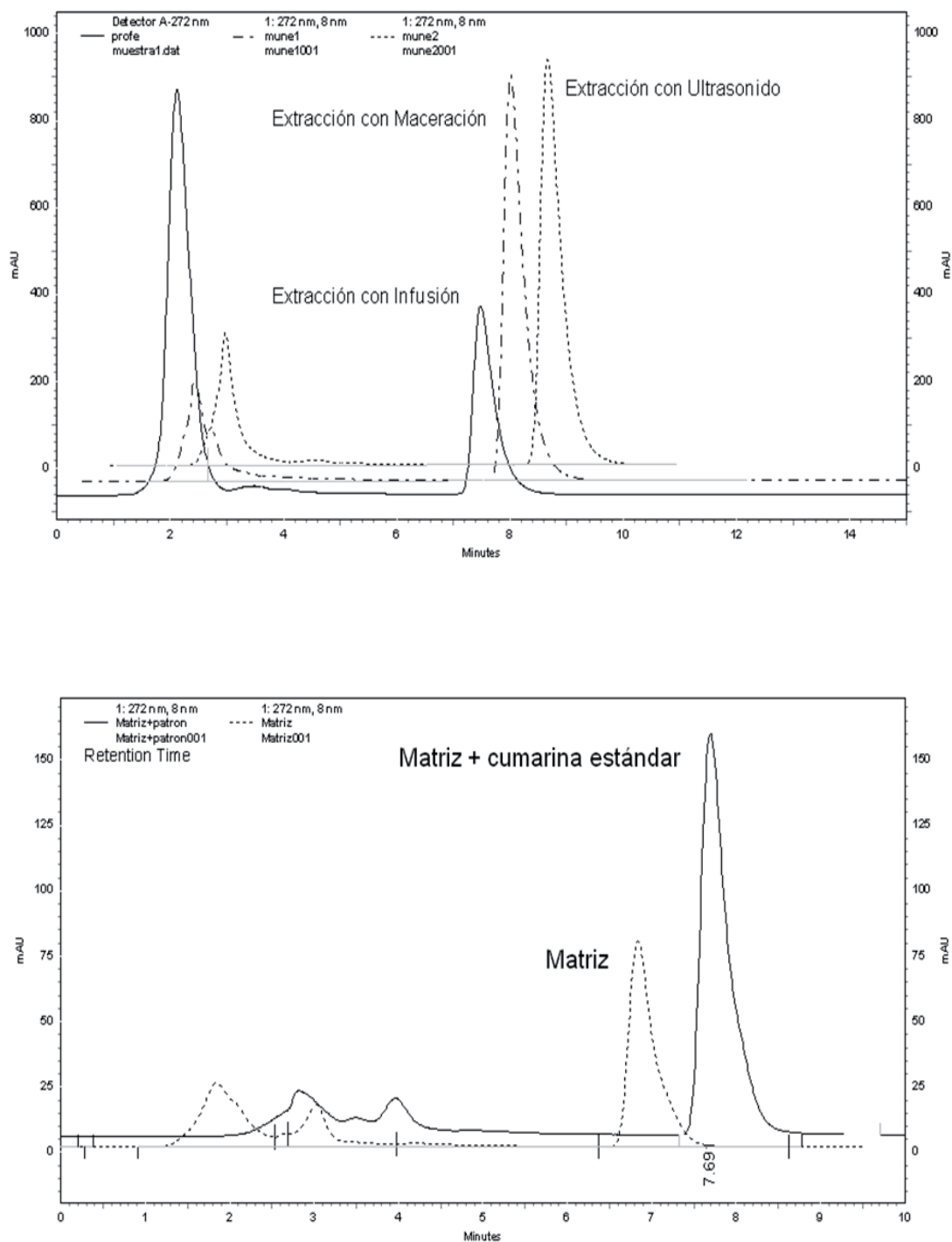


Figura 1. A) Cromatograma (HPLC-UV) de los extractos obtenidos a partir de los tres métodos de extracción de cumarina de semillas de *Dipteryx odorata*. Detección a  $\lambda = 272$  nm. B) Cromatograma (HPLC-UV) de extracto de semillas de *Diptera odorata* y extracto dopado con cumarina estándar.

## ESTUDIO DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

Para estimar el porcentaje de recuperación de cumarina, se toma un extracto preparado en las mejores condiciones de extracción. Este extracto se dividió en dos, adicionando a uno de ellos cumarina patrón. El experimento se llevó a cabo con tres diferentes cantidades de cumarina adicionada (50, 150 y 300  $\mu\text{g}$ ). Ambas soluciones se analizaron mediante HPLC en las condiciones ya optimizadas. Este procedimiento se realizó por triplicado. El porcentaje de recuperación se determinó a partir de los niveles encontrados en la muestra dopada y los niveles endógenos presentes en el extracto, según la ecuación:

$\% \text{Recuperación} = \Delta n / n \text{ cumarina patrón} \times 100$ ; donde  $n$  = número de  $\mu\text{moles}$ ,  $\Delta n_{\text{cum}} = n^{\circ}$  de  $\mu\text{moles}$  de cumarina en extracto + cumarina patrón –  $n^{\circ}$   $\mu\text{moles}$  de cumarina en extracto.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis de HPLC-UV

#### Optimización de las condiciones de separación Cromatográfica

Para una determinación cuantitativa de cualquier analito mediante HPLC, es esencial una adecuada separación de éste con otros interferentes propios de la muestra, para esto, es necesario estudiar todas las variables propias del método cromatográfico, tales como velocidad de flujo de los solventes, composición de la fase móvil y temperatura, entre otros. En este estudio en particular, sólo se optimizó la composición de la fase móvil (mezcla de agua y acetonitrilo), tanto en isocrático como en gradiente, velocidad de flujo de la fase móvil y el tamaño de partícula de la columna. La temperatura de la columna se mantuvo constante (temperatura de laboratorio). La mejor separación encontrada con la columna *Resolve C18* de 5  $\mu\text{m}$ , pues resultó la de mayor número de platos teóricos. El modo

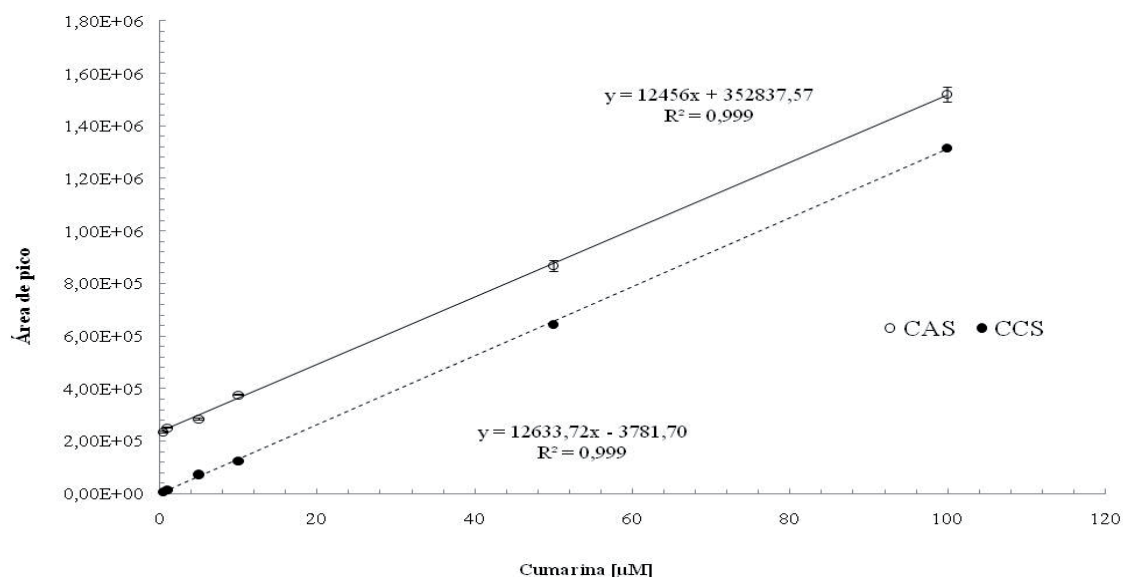


Figura 2. Curva de calibración sencilla (CCS) y de adición de estándar (CAS) para el método de HPLC-UV para la cuantificación de cumarina en semillas de *Dipteryx odorata*.

Cuadro 1. Precisión intra e inter diaria para la determinación de cumarina por HPLC-DAD.

Nominal ( $\mu\text{M}$ )	<i>Intra diaria</i>			<i>Inter diaria</i>		
	Promedio	DSR	Recuperación (%)	Promedio	DSR	Recuperación (%)
5	5,08	2,84	101,7	5,01	4,69	100,2
10	9,60	5,51	96,0	9,89	1,87	98,9
50	49,83	0,58	99,7	49,17	2,12	98,3
100	99,00	1,01	99,0	99,00	1,01	99,0
300	295,00	2,44	98,3	292,67	2,52	97,6
500	492,00	1,42	98,4	494,67	1,38	98,9
800	792,33	1,46	99,0	789,33	1,33	98,7

N=3, DSR: Desviación estándar residual

de elusión fue isocrático con composición de fase móvil 45% acetonitrilo y 55% agua. El flujo de la fase móvil fue de 1,00 ml/min, realizando la detección a 275 nm. El volumen de inyección se fijó en 20  $\mu\text{L}$ . Bajo estas condiciones, la cumarina muestra un tiempo de retención ( $T_r$ ) de  $7,66 \pm 0,09$  min, con un %DSR de 1,13; n=10. La cumarina en la muestra reales registra un  $T_r$  de  $7,65 \pm 0,06$  min; con un %DSR de 0,40; n=10. La figura 1 muestra los perfiles cromatográficos de los extractos obtenidos para los tres procesos de extracción, donde el pico correspondiente a la cumarina puede ser observado, eluyendo lejos de cualquier tipo de interferente.

### Calibración para el análisis cuantitativo de cumarina

La curva de calibración mostró una linealidad en el detector para cumarina en todas las concentraciones de patrón analizadas (5-1000  $\mu\text{M}$ , figura 2). El LOD fue estimado en 36,35  $\mu\text{M}$  (0,07  $\mu\text{g g}^{-1}$  de semilla). El LOQ para el detector HPLC-UV fue calculado en 108  $\mu\text{g g}^{-1}$  de semilla. El error estándar promedio para el área de pico de las réplicas de inyección estuvo entre 4,71% para una concentración de 5  $\mu\text{M}$  y un 0,69% para una concentración de 1000  $\mu\text{M}$ ; en todos los casos este error estuvo por debajo del 5%. Estos valores demuestran la buena repetitividad de la curva de calibración.

Cuadro 2. Parámetros de análisis de las curvas de calibración construidas en la determinación de cumarina en extractos hidroetanolicos de semillas de *D. odorata*.

Calibración	Pendiente (m)	Intercepto (b)	$r^2$	Sm	Sb	LOD ( $\mu\text{M}$ )	LOQ ( $\mu\text{M}$ )	LOL ( $\mu\text{M}$ )
adición de estándar	12456,12	352857,57	0,9997	71,64	0,39	17,87	59,55	> 800
sencilla	12633,72	3781,70	0,9998	62,30	0,51	10,95	36,49	≥ 1000

( $r^2$ = cuadrado del coeficiente de correlación lineal, Sm=desviación estándar de la pendiente, Sb=desviación estándar del corte, LOD= límite de detección, LOQ= límite de cuantificación y LOL= límite de linealidad).



Cuadro 3. Resultados del estudio de recuperación de cumarina en extractos de semillas de *D. odorata*.

Muestra	Cumarina Endógena ( $\mu\text{g}$ ) <b>A</b>	Cumarina Adicionada ( $\mu\text{g}$ ) <b>B</b>	Cumarina Total (A+B) ( $\mu\text{g}$ ) <b>C</b>	Cumarina Encontrada ( $\mu\text{g}$ ) <b>D</b>	% Recuperación <b>D/Cx100</b> Promedio
		50	550	531,7 $\pm$ 6,9	96,7 $\pm$ 1,3
<i>D. odorata</i>	500	150	650	636,7 $\pm$ 7,6	97,9 $\pm$ 1,2
		300	800	784,7 $\pm$ 4,5	98,1 $\pm$ 0,6

Promedio  $\pm$  DS., n=3

### Repetitividad

La reproducibilidad de las determinaciones (desviación estándar relativa-DSR) del método cromatográfico desarrollado en este estudio fue determinado en un período de intra e inter día (n=3), cuyo resultados son resumidos en el cuadro 1. Los valores de precisión intra diario e inter diario están entre 0,58-2,84 y 1,01-4,69 respectivamente, mientras que la recuperación (exactitud) estuvo entre 98,3-101,7 y 98,3-100,2; para los mismos periodos. Estos resultados revelan una buena precisión y exactitud del método de análisis.

### Estabilidad

La evaluación de la estabilidad de las soluciones estándares de cumarina bajo las condiciones de almacenamiento (obscuridad, 4°C, frasco ámbar), demostró que la misma es estable al menos hasta los 60 días después de su preparación.

### ESTUDIO DEL EFECTO DE LA MATRIZ

Las características de las curvas de calibración por adición de estándar y de calibración sencilla con el objetivo de estudiar si había o no efecto de la matriz se resumen en el cuadro 2. Usando como criterio, la razón de las pendientes entre las dos curvas para determinar si la matriz genera un efecto en la determinación de cumarina, de los datos de la tabla, es posible calcular un valor de 0,99 para esta razón de pendientes, con una DSR de 1,06%. La comparación de las pendientes

y el cálculo de la razón entre estas indican que el efecto del extracto obtenido en el proceso de extracción de cumarina a partir de semillas de *D. odorata* es despreciable (Miller y Miller, 2000), no evidenciándose presencia de aumento o disminución de la respuesta instrumental por la presencia del extracto hidroetanólico de semillas de *D. odorata*. De acuerdo a estos resultados se decidió trabajar usando la curva de calibración sencilla.

### ESTUDIO DE RECUPERACION

El estudio del porcentaje de recuperación en muestras de extractos dopadas con una cantidad conocida de cumarina, encontrando los porcentajes de recuperación mostrados en el cuadro 3. En general, un porcentaje de recuperación de un 97,5% es encontrado para el análisis de cumarina en los extractos de semilla de *D. odorata*.

### METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN

#### Comparación entre los diferentes métodos de extracción

En la extracción de productos naturales, el método generalmente usado es la extracción del material vegetal con solventes de diferente polaridad (Satyajit *et al.*, 2006). Generalmente el tratamiento con el solvente varía sustancialmente, siendo un tratamiento no agresivo, en el caso de infusiones y extracción de material cuticular, casos de

Cuadro 4. Contenido de cumarina medidas en los extractos obtenidos por diferentes métodos de extracción de muestras de semillas de *Dipteryx odora*.<sup>‡</sup>

Proceso de extracción	Cumarina $\pm$ DS (mg x g <sup>-1</sup> )	DSR (%)
Maceración	1,01 $\pm$ 0,09*	9,0
Infusión	0,87 $\pm$ 0,04*	4,5
Ultrasonido	20,47 $\pm$ 0,11	0,6

<sup>‡</sup> Para condiciones de extracción ver texto.

\* No existe diferencia significativa (Prueba t, p= 0,05, n=3)

tricomas glandulares (Gershenzon *et al.*, 1992). Extracción lenta y selectiva, como el caso de maceración en el tiempo, hasta extracción de todo el material vegetal, como es el caso de extracción con soxhlet (Bilia *et al.*, 2006), o trituración de todo el material vegetal en presencia del solvente extractor (Cannell 1998a, 1998b).

En este estudio usamos los métodos de extracción usualmente encontrados en el uso medicinal de estas semillas. Usualmente estos usos comprenden la preparación de infusiones a base de estas semillas, o su almacenamiento por días en soluciones acuosas o alcohólica (Duke, 1985; Martino *et al.*, 2006). De esta manera en este trabajo se cuantificó la cantidad de cumarina extraída en infusión con agua y almacenamiento (maceración) en solución hidroalcohólica. Igualmente se incluyó el método de extracción con ultrasonido para estimar el nivel cuantitativo de cumarina en las semillas.

En el Cuadro 4 se resumen los niveles de cumarina para los tres procesos de extracción, donde es de interés observar que aún en un proceso de extracción poco agresivo, como lo es la infusión, es posible detectar cantidades importantes de cumarina (854  $\mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$  de semilla). De los resultados, es interesante observar que la cantidad de cumarina extraída a partir de la semilla mediante infusión (agua como solvente) es comparable a aquella extraída con maceración durante 4 días (EtOH:H<sub>2</sub>O como solvente). Finalmente, el método que logra una extracción más eficiente de cumarina

es aplicando como solvente una mezcla de etanol:agua (1:1; v,v), bajo un baño de ultrasonido durante 2 h, a temperatura de laboratorio. Este resultado representa un 2,05% en peso de cumarina en las semillas de *Dipteryx odorata*.

## OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN BAJO ULTRASONIDO

Para la optimización de la extracción de cumarina usando EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) se estudió la optimización de la relación volumen de solvente a gramos de semilla, el tiempo de extracción en el baño de ultrasonido, así como el número de extracciones aplicada de manera sucesiva a la muestra, como algunos parámetros mas importantes en este tipo de técnica extractiva (Palma y Barroso, 2001).

## VOLUMEN DE SOLVENTE

Para el caso de la optimización del volumen de solvente, los diferentes extractos obtenidos usando diferentes volúmenes de disolvente en el proceso de extracción se analizaron mediante TLC (análisis cualitativo) y HPLC (análisis cuantitativo).

## ANÁLISIS CUALITATIVO

Para la optimización del volumen de disolvente según el análisis visual de las TLC re-

sultantes de de cada una de las relaciones estudiadas, reveló una relación óptima de  $0,1 \text{ g mL}^{-1}$  de semilla. Para estos análisis, la composición del solvente se fijó en una relación 1:1 de etanol en agua, el cual es referido como la composición optima en la extracción de cumarina y derivados, todo esto optimizado mediante TLC (Martino *et al.*, 2006; Sprolla *et al.*, 2008). A pesar de que esta técnica de análisis ha sido usado de manera exitosa para estimar la cantidad de cumarina en muestras, debido principalmente a sus característica de absorción en UV-Vis (Kovac-Besović y Durić, 2003), se estudio por HPLC el contenido de cumarina en estas mismas muestras.

### ANÁLISIS CUANTITATIVO

La figura 3 resumen el comportamiento encontrado en esta optimización del procedimiento de extracción de cumarina, donde una relación óptima de  $0,1 \text{ g mL}^{-1}$ . Este

resultado es consistente con los encontrados mediante el análisis de absorción de cumarina en placas de TLC, verificando la efectividad del análisis de TLC en estimaciones cuantitativa de cumarina. Los resultados demuestran que existe un compromiso importante al seleccionar el volumen de disolvente a emplear, pues en exceso o por defecto, puede afectar de manera significativa la cantidad de cumarina extraída. El empleo de un volumen de disolvente por defecto, problemas de solubilidad pueden limitar la cumarina extraída, pues puede ocasionar una saturación del mismo en cumarina, por el contrario, un aumento del volumen del disolvente, puede favorecer una transferencia masa solido al líquido excesivo, pero según los resultados, este aumento en la relación volumen/masa puede afectar la eficiencia de la extracción mediante ultrasonido, una alta dispersión (dilución) de las partículas en el disolvente, y una disminución de la energía de las ondas de choque con las partículas del material a extraer.

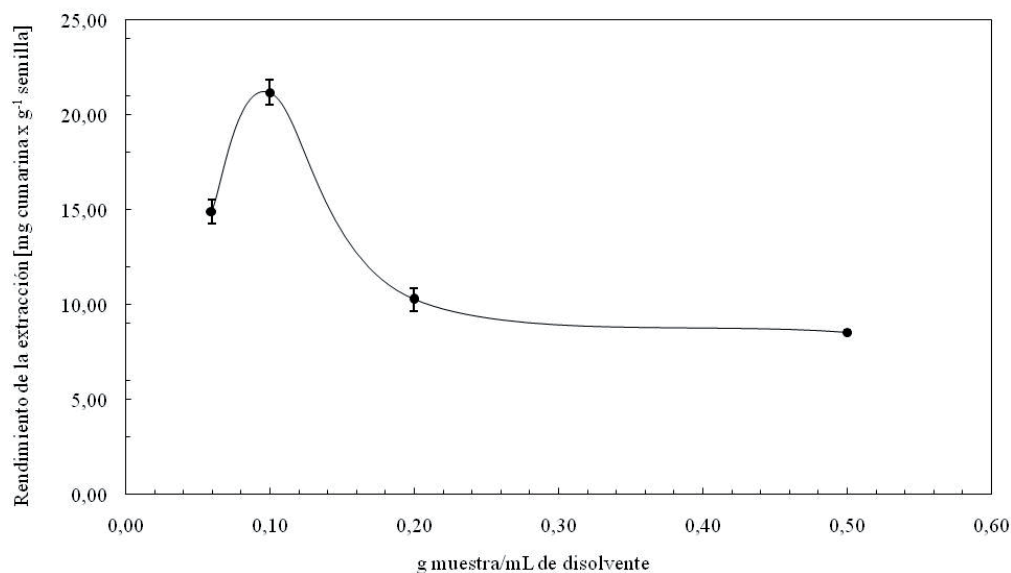


Figura 3. Optimización del volumen de extracción en la extracción de cumarina de semillas de *Dipteryx odorata*. Solvente EtOH:H<sub>2</sub>O= 1:1.

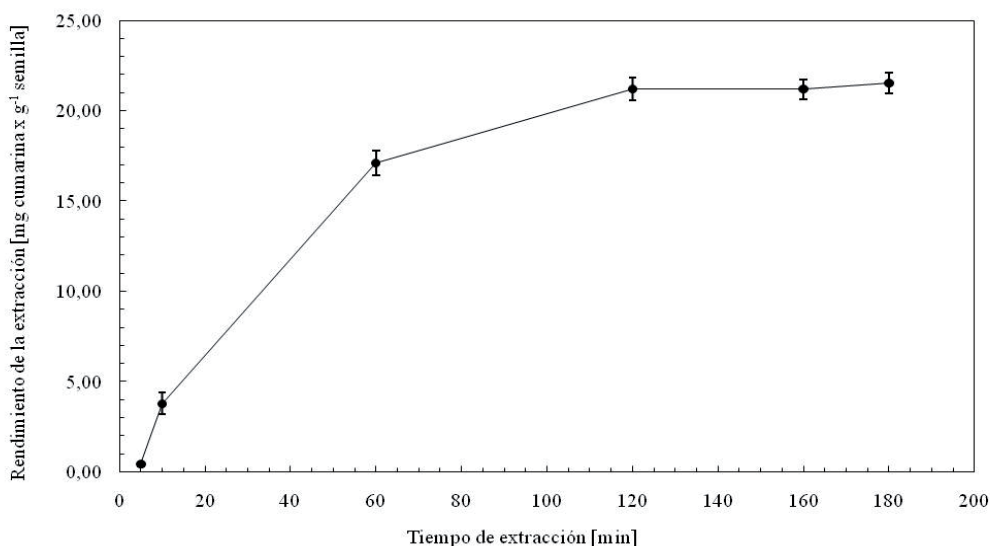


Figura 4. Rendimiento de la extracción de cumarina en función del tiempo, usando baño ultrasonido, de semillas de *Dipteryx odorata*.

### TIEMPO DE EXTRACCIÓN

Se optimizó el rendimiento de extracción de cumarina con el tiempo de permanencia en el baño ultrasonido, usando la mezcla EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v, 0,1 g mL<sup>-1</sup>). La Figura 4 muestra el rendimiento de extracción de cumarina hasta un tiempo de extracción de 180 min. Como se observa en la figura, existe una dependencia de la cantidad de cumarina extraída con el tiempo de extracción, registrándose un punto de inflexión de la curva a un tiempo de 120 min. Luego de este tiempo, no es posible extraer más cumarina de la muestra, así este tiempo fue el seleccionado como el tiempo de extracción óptimo.

### NÚMERO DE EXTRACCIONES SUCESIVAS

Desde un punto de vista cuantitativo, es necesario determinar el nivel de extracción que se alcanzan aplicando el mismo protocolo de extracción de manera secuencial a una misma muestra. Esto permite evaluar

la eficiencia de la extracción, y determinar la significancia de usar o no más de un proceso de extracción a la muestra. Así, se realizó una secuencia de extracciones a una muestra de semillas. El cuadro 5 resume los niveles de cumarina encontrados en tres extracciones secuenciales, donde se indica que cerca del 80% de la cumarina existente en la muestra es extraída en una sola extracción, mostrando una buena reproducibilidad del resultados, un %DSR < al 2%. Así, en el caso de análisis secuencial de muestras, no es necesario realizar más de una extracción, pues esto conllevaría a un aumento en el tiempo de análisis de muestras, así como gasto de solventes. Considerando esta extracción sucesiva, el contenido de cumarina en semillas asciende a un 2,45% en peso.

### CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo indican que la cromatografía líquida de alta resolución con detección en el ultravioleta

Cuadro 5. Rendimiento en la extracción de cumarina de semillas de *Dipteryx odorata* para tres extracciones sucesivas.\*

Muestra	Cumarina $\pm$ DS (mg $\times$ g <sup>-1</sup> )	DSR (%)	Rendimiento relativo de extracción
Semillas	19,56 $\pm$ 0,27	1,4	79,2
Semillas después de 1ra extracción	3,97 $\pm$ 0,13	3,4	16,1
Semillas después de 2da extracción	1,16 $\pm$ 0,10	4,7	8,2

\*Condiciones de extracción: ultrasonido, baño de agua, temperatura de laboratorio, 2h, EtOH:H<sub>2</sub>O (0,1 g  $\times$  mL<sup>-1</sup>, 1:1, v/v).

y visible (HPLC-UV), puede ser una herramienta eficiente para un control de calidad de los extractos etanólico provenientes de las semillas de *Dipteryx odorata*, hecho de interés debido a la extenso uso medicinal que se registra para bebidas a base de estas semillas. Los resultados de la validación del método cromatográfico demostraron que el mismo es selectivo y con excelente reproducibilidad para el análisis de cumarina, como principal principio activo, en los extractos de origen etanólico, que es el tratamiento normalmente aplicado a esta semilla para su uso en atenuar y/o aliviar diversas dolencias. Los requerimientos de la validación, como linealidad, precisión, exactitud y recuperación, convierten al método desarrollado en una herramienta aplicable para una rápida separación, identificación y cuantificación de cumarina en los extractos hidroetanólicos de semillas de *D. odorata*.

De los diferentes métodos de extracción considerados; maceración, infusión

y ultrasonidos; es este último quien arroja los mejores resultados en cuanto a la extracción de cumarina. Así, se optimizó la extracción de cumarina asistida por microondas, donde parámetros como el tiempo (120 h) y volumen de disolvente en la extracción (0,1 g mL<sup>-1</sup>) fueron estudiados para obtener la máxima extracción de cumarina del material sólido.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Fundación Gran Mariscal Ayacucho (**FUNDAYACUCHO-MPPCTII**) por la beca dada a **IC**. También se agradece a la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (**FAPEMIG-Brasil**) por el financiamiento dado a **AOB**. Trabajo presentado como proyecto especial para la asignatura Análisis Orgánico (Semestre A-2010, Prof. Cristóbal Lárez Velásquez/Universidad de Los Andes).

## REFERENCIAS

- Lacy, A., O'Kennedy, R. (2004) Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer *Current Pharmaceutical Design* **10**:3797-3811.
- Bajaj, Y. (1998) Biotechnology for the improvement of medicinal plants. *Acta Horticulture* **457**: 37-45.
- Bilia, A., Gabriele, C., Bergonzi, M., Melillo de Malgalhaes, P., Vincieri, F. (2006) Variation in Artemisinin and Flavonoid Content in Different Extracts of *Artemisia annua* L. *Natural Product Communications* **0**: 1-5.
- Bruneton, J. (1999) Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Second Edition, Hampshire UK, Intercept Ltd pp 263-277.

- Campana A, Rodríguez L, Barrero F, Ceba M, Fernández J. (1997). ALAMIN: a chemometric program to check analytical method performance and to assess the trueness by standard addition methodology *Trends in Analytical Chemistry* **16**:381-385.
- Cannell, R. J. P. (1998a). Follow-up of natural product isolation. *Methods Biotechnol.*, 4 (Natural Products Isolation), **4**:425-463.
- Cannell, R. J. P. (1998b). How to approach the isolation of a natural product. In R. J. P. Cannell (Ed.), *Methods in Biotechnology*, Vol. 4: Natural Products Isolation. Humana, Totowa, NJ, pp. 1-51.
- Canter, P., Thomas, H., Ernst, E. (2005) Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *TRENDS in Biotechnology* **23**:180-185.
- Dubey, T. Guerra, D. (2002) Use of biotechnology for growing medicinal plants *Recent Progress in Medicinal Plants* **5**: 47-61
- Duke, J. . CRC Handbook of Medicinal Herbs. Boca Raton, FL: CRC Press; 1985.
- Lewis, W., Elvin-Lewis, M. Medical Botany: Plants Affecting Man's Health. New York, NY: John Wiley & Sons; 1977.
- Egan D, O'Kennedy R, Moran E, Cox D, Prosser E, Thornes RD. (1990) The Pharmacology, Metabolism, Analysis and Applications of Coumarin and Coumarin-Related Compounds *Drug Metabolomic Review* **22**: 503-529.
- Estévez-Braun, A., González, A. (1997). Coumarins. *Natural Product Reports*. 465-475.
- Gershenzon, J., McKaskill, D., Rajaonarivony, J.I.M., Mihaliak, C., Karp, F., Croteau, R. (1992). Isolation of secretory cells from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and other gland products *Analytical Biochemistry* **200**:130-138.
- Głowniak, K., Matysik, G., Bieganska, M., Soczewinacuteski, E. (1986) Gradient thin-layer chromatography of coumarins and furocoumarins. *Chromatographia* **22**: 307-310.
- Hellström, J., Mattila, P. (2008). HPLC determination of extractable and unextractable
- Kamal Prasad Acharya1, y Mohan Acharya. (2010). Traditional knowledge on medicinal plants used for the treatment of livestock diseases in Sardikhola VDC, Kaski, Nepal *Journal of Medicinal Plants Research* **4**:235-239.
- Keating G, O'Kennedy R. (1997) The Chemistry and Occurrence of Coumarins. Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. (Eds: O'Kennedy R, Thornes RD), Chichester, John Wiley & Sons pp 23-66.
- Klejdus, B., Vacek, J., Benesová, L., Kopecký, J., Lapčík, O., Kubán, V. (2007) Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts *Analitical Bioanalysis Chemistry* **389**: 2277-2285
- Kovac-Besović EE, Durić K. (2003) Thin layer chromatography-application in qualitative analysis on presence of coumarins and flavonoids in plant material. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* **3**:19-26.
- Martino, M., Ramaiola, I., Urbano, M., Bracco, F., Collina, S. (2006) Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* **1125**: 147-151.
- McChesney, J. (1999) Quality of botanical preparations: environmental issues and methodology for detecting environmental contaminants. En *Botanical Medicine: Efficacy, quality assurance and regulation* (Eskinazi, D., ed.), pp. 127-131, Mary Ann Liebert, Inc publishers.
- Miller NM, Miller JC. Estadística y Quimiometría para Química Analítica, 4ª ed. Prentice Hall, Madrid, 2000.
- Morgan, J.; Shanks, J. (2002) Quantification of Metabolic Flux in Plant Secondary Metabolism by a Biogenetic Organizational Approach. *Metabolic Engineering* **4**: 257-262.



- proanthocyanidins in plant materials *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **56**: 7617-7624.
- Palma, M.; Barroso, C. (2001) "ultrasoundassisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products". *Analytica Chimica Acta* **458**: 119-130.
- Sarker, S., Latif, Z., Gray, A. (2006) *Products Isolation Natural Products Second Edition*. Human Press. New Jersey pp 27.
- Sherma, J. (2004) Planar Chromatography *Analytical Chemistry* **76**: 3251-3262.
- Sprolla, C., Rugea, W., Andlauera, C., Godelmanna, R., Lachenmeie, D. (2008) HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods *Food Chemistry* **109**: 462-469.
- Trease G, Evans W. (1978) *Pharmacognosy*. London: Bailliere Tindall; Ehler, D.; Pfister, M.; Bork, W-R.; Toffel-Naddny, P. (1995) HPLC analysis of tonka bean extract. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A. -Z. Lebens Unters Forsch-*. 201:278-282.
- WHO, (1977). *Resolution Promotion and Development of Training and Research in Traditional Medicine*. World Health Organization, Rome, Italy, pp: 49.