



Wilman A. Delgado^{1,*}, Luis E. Cuca S.¹

¹Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Productos Naturales Vegetales.

*Autor para correspondencia: wadelgadoa@unal.edu.co

Recibido: 9 de Febrero de 2016. Aceptado: 10 de Marzo de 2016.

Clasificación de extractos etanólicos de especies de la familia Lauraceae por cromatografía en capa fina bidimensional y análisis estadístico multivariado CCD-2D/ PCA-cluster

Resumen

Se caracterizaron los extractos etanólicos de hojas y cortezas de 13 especies de la familia Lauraceae mediante cromatografía en capa fina de dos dimensiones (2D-CCD). Los datos posteriores se analizaron mediante técnicas de análisis estadístico multivariado (cluster y análisis de componentes principales (PCA)). Lo anterior permitió hacer una distinción entre los extractos obtenidos de diferentes partes de la planta (hojas y cortezas). Se observó, además, que la metodología usada es capaz de diferenciar entre extractos obtenidos a partir de especies de Lauraceae y los de otras familias de plantas.

Palabras clave: cromatografía en placa delgada bidimensional (CCD-2D), PCA, conglomerados, Lauraceae, perfil metabólico, diversidad química.

Classification of ethanolic extracts from Lauraceae species by two-dimensional thin layer chromatography and multivariate statistical analyses 2D-TLC/PCA-cluster

Abstract

Leaves and barks ethanolic extracts from 13 Lauraceae species were characterized through two-dimensional thin layer chromatography (2D-TLC). The subsequent data was analyzed through multivariate statistical analysis techniques (cluster analysis and principal components analysis (PCA)). This allowed to do a distinction between extracts obtained from different parts of the plant (leaves and bark). In addition, it was observed that the implemented methodology is able to differentiate between extracts obtained from Lauraceae species and some obtained from other plant families.

Keywords: two-dimensional thin layer chromatography (TLC-2D), principal components analysis (PCA), Lauraceae, metabolic profile, chemical diversity.

Classificação de extratos etanólicos de espécies da família Lauraceae utilizando cromatografia em placa fina bidimensional e estatística multivariada CCD-2D/PCA-cluster

Resumo

Caracterizaram-se os extratos etanólicos de folhas e casca obtidos a partir de espécies da família Lauraceae por cromatografia em camada fina em duas dimensões (2D-CCF). Os dados obtidos foram analisados utilizando técnicas de análise estatística multivariada tipo análise de cluster e análise de componentes principais (PCA). As técnicas estadísticas permitiram fazer uma distinção entre os extratos obtidos a partir de diferentes partes da planta (folhas e casca). Além disso, observou-se que o método utilizado é capaz de diferenciar entre os extratos provenientes de espécies de Lauraceae daqueles obtidos a partir de outras famílias de plantas.

Palavras-Chave: cromatografia em camada fina em duas dimensões (2D-CCF), análise de componentes principais (PCA), Lauraceae, perfil metabólico, diversidade química.

Introducción

La familia Lauraceae está conformada por 2500 a 3500 especies, distribuida en alrededor de 50 géneros (1). Esta familia se constituye como una de las familias más grandes y diversas de angiospermas basales (2). Tal diversidad y cantidad plantea un reto desde el punto de vista sistemático, de ahí que muchos especímenes permanezcan en los herbarios sin ser totalmente determinados o incluso con determinación incorrecta (3). Cuando no se cuenta con una plena identificación de los especímenes, plantear estudios de tipo fitoquímico de especies de esta familia puede presentar varios problemas (duplicación de trabajos o resultados poco relevantes y novedosos).

Por tanto, es necesario contar con métodos rápidos y económicos que permitan hacer clasificaciones confiables de extractos antes de iniciar estudios fitoquímicos profundos. Por ello, se escogió la cromatografía en placa delgada bidimensional en el tiempo fuera de línea (CCD-2D *in time off line*) para la obtención y clasificación de perfiles metabólicos de extractos etanólicos de cortezas y hojas obtenidos de diferentes especies y géneros de la familia Lauraceae.

La cromatografía en dos dimensiones tuvo un renacer a mediados de la década de los ochenta cuando se demostró que esta técnica posee un alto número de *spot* que incluso puede superar al HPLC convencional (4).

Para que un proceso cromatográfico pueda ser considerado bidimensional o multidimensional, debe cumplir con dos condiciones:

1. Los mecanismos de separación aplicados deben ser ortogonales.
2. La resolución obtenida en la primera dimensión no se debe perder en las siguientes dimensiones (5).

La cromatografía 2D en el espacio corresponde a la técnica que físicamente es desarrollada en dos dimensiones (6, 7). La Figura 1, muestra de forma resumida las diferentes divisiones que se pueden tener de la cromatografía bidimensional.

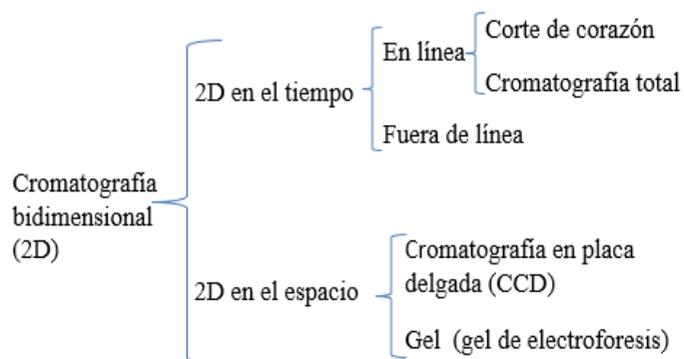


Figura 1. Clasificación de la cromatografía bidimensional

Es evidente que la cromatografía bidimensional con todas sus variantes se convierte en una poderosa herramienta de separación de mezclas complejas cuyas ventajas podemos enumerar a continuación:

- La CCD-2D es, realmente, la única cromatografía en dos dimensiones.
- En la segunda dimensión existe un número ilimitado de lugares o puntos (*spots*) para desarrollar el segundo proceso de separación.

- Todos los compuestos separados en la primera dimensión son necesariamente sometidos a una segunda separación en la segunda dimensión (cromatografía total).
- La metodología puede ser simple, no necesariamente requiere de equipos sofisticados y costosos.
- Los platos se emplean solo una vez y no se necesitan tediosos procesos de limpieza (*Clean-up*).
- Las placas desarrolladas pueden ser archivadas de forma permanente para futuras revisiones y análisis.
- Los componentes de la fase móvil empleados en la primera dimensión se evaporan y no interfieren en el segundo proceso de separación.
- Se emplean múltiples sistemas de detección (químicos, físicos y biológicos) que pueden ser universales o altamente específicos.
- Los resultados visuales son fácilmente presentados.

En general, la cromatografía en placa delgada bidimensional se ha empleado para realizar *screening* de extractos de plantas, hacer chequeo de estabilidad de los compuestos durante el proceso cromatográfico, separar mezclas complejas que pueden contaminar columnas, investigar la presencia de adulterantes y para el reconocimiento de especies de plantas (quimiotaxonomía) (8).

Materiales y métodos

Material vegetal

Los extractos fueron obtenidos por maceración de cortezas y hojas secas y molidas (80-100 g) con 3 x 250 mL etanol del 96% v/v de diferentes especies y géneros pertenecientes a la familia Lauraceae, las muestras vegetales fueron tomadas de individuos (árboles) adultos en diferentes regiones de la geografía colombiana entre los años 2010 y 2012. En la Tabla 1, se detallan los tipos de extractos y especies que se incluyeron en este estudio.

Cromatografía CCD-2D *in time off line*

Cada extracto libre de solvente (10 mg) fue solubilizado en una mezcla CHCl₃: MeOH (1:1) (1 mL); alícuotas de 5 µL de estas soluciones fueron sembradas en una esquina (a 1 cm de cada lado) de un cromatofolio (sílica gel 60 F 254, 366 Merck como fase estacionaria) cuadrado de 10 cm de lado. Una vez evaporado el solvente se realizó el desarrollo de la cromatografía en la primera dimensión, empleando como fase móvil diclorometano:acetona (95:5). Posteriormente se dejó evaporar la fase móvil y se realizó el desarrollo en la segunda dimensión empleando como fase móvil hexano:acetona de etilo (50:50). Al finalizar el desarrollo en la segunda dimensión, se dejó evaporar el solvente y las placas fueron observadas bajo luz UV (254 y 365 nm) con el fin de determinar la fluorescencia que produjeron los diferentes compuestos separados e indicar su presencia con una marca. Posteriormente, estas mismas placas fueron reveladas con vapores de I₂ y se marcaron las manchas observadas. La Figura 2 ilustra mediante fotografías el procedimiento seguido.

Tabla 1. Lista de extractos incluidos en el presente estudio

| No. Extracto-código | Especie | Lugar de colecta | Coordenadas |
|---------------------|--|--------------------------|-----------------------------------|
| 1- WD 123H | <i>Aniba robusta</i> | La Vega, Cundinamarca | N 04° 55' 49,9'' W 74° 19' 13,8'' |
| 2- WD 123C | <i>Aniba robusta</i> | La Vega, Cundinamarca | N 04° 55' 49,9'' W 74° 19' 13,8'' |
| 3- WD 116H | <i>Ocotea longifolia</i> | Leticia, Amazonas | S 04° 11' 37,0'' W 69° 56' 24,0'' |
| 4- WD 116C | <i>Ocotea longifolia</i> | Leticia, Amazonas | S 04° 11' 37,0'' W 69° 56' 24,0'' |
| 5- WD 67H | <i>Endlicheria paniculata</i> | Santa Bárbara, Santander | N 06° 56' 28,6'' W 72° 54' 24,5'' |
| 6- WD 67C | <i>Endlicheria paniculata</i> | Santa Bárbara, Santander | N 06° 56' 28,6'' W 72° 54' 24,5'' |
| 7- WD 100H | <i>Persea perseiphylla</i> | Puerto López, Meta | N 04° 05' 19,9'' W 73° 04' 04,9'' |
| 8- WD 100C | <i>Persea perseiphylla</i> | Puerto López, Meta | N 04° 05' 19,9'' W 73° 04' 04,9'' |
| 9- WD 73H | <i>Nectandra membranacea</i> | Nocaima, Cundinamarca | N 05° 02' 35,5'' W 74° 22' 25,7'' |
| 10- WD 73C | <i>Nectandra membranacea</i> | Nocaima, Cundinamarca | N 05° 02' 35,5'' W 74° 22' 25,7'' |
| 11- WD 120H | <i>Ocotea heterochroma</i> | Tenjo, Cundinamarca | N 04° 48' 27,3'' W 74° 07' 57,8'' |
| 12- WD 120C | <i>Ocotea heterochroma</i> | Tenjo, Cundinamarca | N 04° 48' 27,3'' W 74° 07' 57,8'' |
| 13- WD 60H | <i>Cinnamomun triplinerve</i> | Santa Bárbara, Santander | N 06° 58' 07,9'' W 72° 55' 00,2'' |
| 14- WD 60C | <i>Cinnamomun triplinerve</i> | Santa Bárbara, Santander | N 06° 58' 07,9'' W 72° 55' 00,2'' |
| 15- WD 66H | <i>Cinnamomun cinnamomifolium</i> | Santa Bárbara, Santander | N 06° 56' 28,5'' W 72° 54' 23,8'' |
| 16- WD 66C | <i>Cinnamomun cinnamomifolium</i> | Santa Bárbara, Santander | N 06° 56' 28,5'' W 72° 54' 23,8'' |
| 17- WD 99H | <i>Nectandra reticulata</i> | Puerto López, Meta | N 04° 05' 19,9'' W 73° 04' 04,9'' |
| 18- WD 99C | <i>Nectandra reticulata</i> | Puerto López, Meta | N 04° 05' 19,9'' W 73° 04' 04,9'' |
| 19- WD 93H | <i>Rhodostemonodaphne laxa</i> | Acacias, Meta | N 03° 58' 14,8'' W 73° 46' 23,0'' |
| 20- WD 93C | <i>Rhodostemonodaphne laxa</i> | Acacias, Meta | N 03° 58' 14,8'' W 73° 46' 23,0'' |
| 21- WD 63H | <i>Nectandra sp.</i> | Santa Bárbara | N 06° 57' 40,5'' W 72° 54' 47,1'' |
| 22- WD 63C | <i>Nectandra sp.</i> | Santa Bárbara | N 06° 57' 40,5'' W 72° 54' 47,1'' |
| 23- WD 56H | <i>Endlicheria arenosa</i> | Leticia, Amazonas | S 04° 11' 37,0'' W 69° 56' 24,2'' |
| 24- WD 56C | <i>Endlicheria arenosa</i> | Leticia, Amazonas | S 04° 11' 37,0'' W 69° 56' 24,2'' |
| 25- WD 64H | <i>Endlicheria oreocola</i> | Santa Bárbara, Santander | N 06° 57' 40,3'' W 72° 54' 46,9'' |
| 26- WD 64C | <i>Endlicheria oreocola</i> | Santa Bárbara, Santander | N 06° 57' 40,3'' W 72° 54' 46,9'' |
| 27- WD 67C-2 | <i>Endlicheria paniculata</i> (segundo muestreo) | Santa Bárbara, Santander | N 06° 56' 28,6'' W 72° 54' 24,5'' |
| 28- WD 126 | <i>Piper sp.</i> (muestra control) | Nocaima, Cundinamarca | N 05° 02' 35,5'' W 72° 22' 25,7'' |

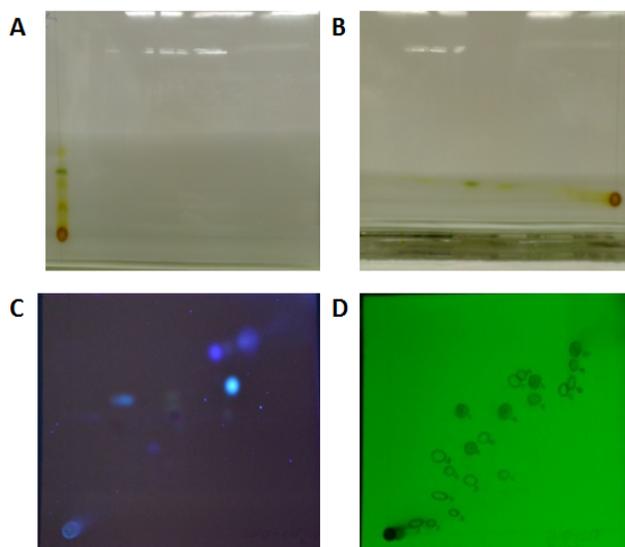


Figura 2. Proceso (CCD-2D) de los extractos etanólicos de corteza y hojas de Lauraceae. A Desarrollo en la primera dimensión. B Desarrollo en la segunda dimensión. C Fluorescencia observada a 254 nm. D Placa con marcas de las manchas observadas a 254 y 366 nm y vapores de I₂

Registro de datos

Las placas fueron divididas en una cuadrícula de 18 x 18, asignando a cada casilla un código. Cuando se encontró en la casilla una marca con los revelados (UV o I₂), se asignó un valor de uno; a las casillas sin manchas se les asignó un valor de cero. En el caso de que una mancha quedara en la intersección de dos o más casillas, se asignó el valor de uno a cada una de las casillas comprometidas, y si sobre una misma casilla se identificaban dos manchas se asignó el valor de dos.

Tratamiento y análisis de datos

Con los datos obtenidos a partir de la cuadrícula se construyó una matriz que incluía como variable independiente la especie y como variables dependientes cada uno de los códigos con los que fueron identificadas las casillas de la cuadrícula. De esta forma, resultó una matriz de 28 x 109. Aunque las placas fueron divididas en 324 casillas solo se tuvieron en cuenta las casillas en las que se detectaron manchas. Esta matriz fue sometida a análisis estadístico multivariado (PCA y conglomerados) empleando el software Minitab 16.

Resultados y discusión

La Figura 3 muestra el análisis PCA de los datos obtenidos. En este gráfico es posible observar el agrupamiento de los extractos de hojas al lado izquierdo y los extractos de corteza al lado derecho; las muestras identificadas como WD 67C y WD 67C-2 se ubican muy cerca una de la otra y la muestra control WD 126 se ubica alejada de las demás en la parte superior del gráfico. Para este análisis, el 67,7 % de la varianza está explicada por las cinco primeras componentes calculadas.

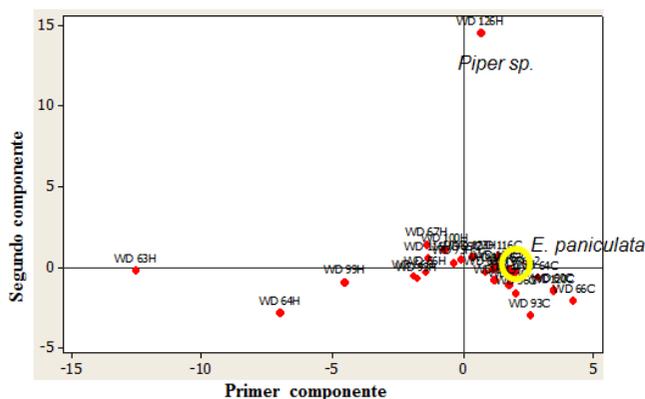


Figura 3. Biplot obtenido del análisis de componentes principales (PCA) a partir de los datos obtenidos por el método de cuadrícula

En el análisis de conglomerado, empleando método de agrupación única y distancia euclídeana, (Figura 4) es aún más clara la separación entre muestras identificadas con números pares e impares (corteza y hojas). También se observa cómo las muestras 6 y 27 forman un conglomerado que tiene el mayor grado de similitud entre todas las muestras analizadas (alrededor del 80%) y la muestra 28 correspondiente a WD 126, forma un único grupo, que aunque no es la más disímil de todas, tiene una similitud con las demás muy baja entre 0 y 10% aproximadamente.

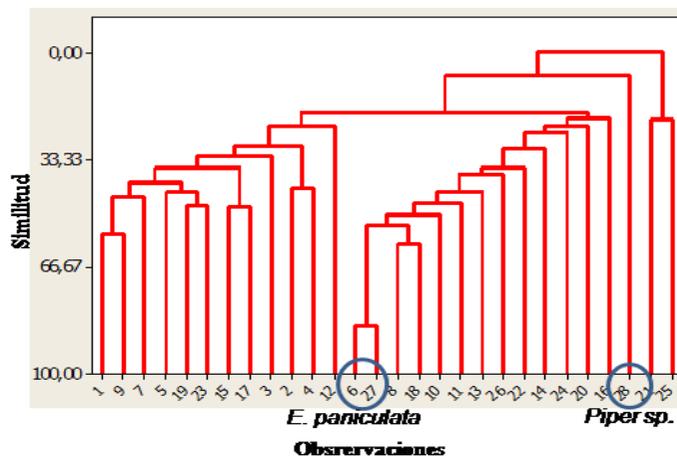


Figura 4. Análisis de conglomerados de extractos etanólicos de especies de la familia Lauraceae empleando el método de cuadrícula

La separación observada entre los extractos de hojas y corteza en la mayoría de las especies incluidas en este estudio, justifica la realización de estudios fitoquímicos por separado, sobre todo para estos dos organelos. El hecho de que los extractos de corteza de la misma especie (*E. paniculata*), colectados en diferentes ocasiones, no tengan una similitud del 100% indica que existe variación de los metabolitos en función del tiempo de colecta, probablemente debido a cambios ambientales o estados de fenológicos de las plantas. De aquí que al plantear estudios fitoquímicos de una especie se deben proponer repeticiones en el tiempo de los respectivos muestreos.

El método de análisis de datos implementado permite hacer una clasificación de los extractos en función del organelo del cual se obtiene el extracto. La relativamente baja resolución observada en los resultados de los análisis estadísticos puede estar influenciada por el hecho de que la información analizada fue únicamente de tipo cualitativo (caracterización de un extracto en un espacio bidimensional) y no se incluyó información de tipo cuantitativo.

Conclusiones

La caracterización de extractos mediante cromatografía en placa delgada en dos dimensiones permite obtener perfiles metabólicos con información útil para hacer aproximaciones metabólicas. También funciona como criterio de selección de extractos para realización de estudios fitoquímicos profundos o de actividad biológica.

Los bajos valores de similitud encontrados pueden ser interpretados como altos valores de diversidad química, lo cual seguramente es a su vez reflejo de la diversidad biológica de la familia Lauraceae, acontecimiento que ha sido bien aprovechado con el propósito de hacer aproximaciones quimiosistemáticas de esta familia vegetal (9). Esta diversidad, justifica la realización de estudios fitoquímicos profundos de los extractos obtenidos de cada una de las especies incluidas en este trabajo.

La posibilidad que ofrece la cromatografía multidimensional, de ser acoplada con técnicas de espectrometría de masas, puede hacer esta combinación tan popular en trabajos de metabolómica como lo es la cromatografía de gases o líquida acoplada a espectrometría de masas (10).

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al Departamento de Química de la Universidad, Nacional de Colombia, al profesor Massuo Jorge Kato del Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo.

Referencias

- Chanderbali, A.S.; van der Werff, H.; Renner S.S.. Phylogeny and historical biogeography of Lauraceae: Evidence from the chloroplast and nuclear genomes. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **2001**, *88*, 104–134. DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/2666133>.
- Franco Zanon, M.M.; Goldenberg, R.; Rodrigues de Moraes, P.L. O género *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae) no Estado do Paraná, Brasil. *Acta bot. bras.* **2009**, *23* (1), 22-35. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-33062009000100004>.
- Madriñan, S. Lauraceae Columbiana. Universidad de los Andes; 2014 Disponible en: <https://botanica.uniandes.edu.co/investigacion/lauraceae.htm> [Consultado el 23 de junio de 2016].
- Poole, C.F.; Poole, S.K. Multidimensionality in planar chromatography. *J. Chromatogr A* **1995**, *703*, 573-612. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)01286-n](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(94)01286-n).
- Giddings, J.C. *Multidimensional Chromatography*; Cortes, H.J. (Ed.); Marcel Dekker: New York, 1990; pp 1-28.
- Evans, C.R.; Jorgenson, J. W. Multidimensional LC-LC and LC-CE for high-resolution separations of biological molecules. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1952-1961. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-004-2516-2>.
- Cieśła, L.; Waksmundzka-Hajnos. M. Two-dimensional thin-layer chromatography in the analysis of secondary plant metabolites. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 1035-1052. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.057>.
- Komsta, L.; Cieśła, L.; Bogucka-Kocka, A.; Józefefczyk, A.; Kryszewski, J.; Waksmundzka-Hajnos, M. The start-to-end chemometric image processing of 2D thin-layer videoscans. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 2820-2825. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.004>.
- Gottlieb, O.R. Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1537-1570. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(72\)85001-5](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(72)85001-5).
- Halket, J.M.; Waterman, D.; Przyborowska, A.M.; Patel, R.K.P.; Fraser, P.D.; Bramley, P.M. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *J. Exp. Bot.* **2004**, *56* (410), 219-243. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eri069>.

Article citation:

Delgado, W. A.; Cuca, L. E. Clasificación de extractos etanólicos de especies de la familia Lauraceae por cromatografía en capa fina bidimensional y análisis estadísticos multivariado CCD-2D/ PCA-cluster. *Rev. Colomb. Quim.* **2016**, *45* (1), 10-14.
DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n1.58608>