

DETERMINACIÓN POR CLAR-UV-IEE-EM/EM DE FLAVONOIDES PRESENTES EN LOS PÉTALOS DE LAS FLORES DE *TALIPARITI ELATUM* S.W (FRYXELL)

José González^{1*}, Armando Cuéllar¹, Enmanuelle Nossin², Max Monan², Frantz François-Haugrin², Loïck Sylvius³, Frédéric Verdeau³

¹ Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana, Cuba.

² ARVARNAM (Asociación para la Investigación y Valorización de los Recursos Naturales de Martinica), Martinica.

³ Laboratorio de Química. Biosphères, Universidad de las Antillas, Martinica.

*e-mail: jgyaque@ifal.uh.cu

Resumen

El método de análisis cualitativo por cromatografía líquida de alta resolución utilizando el modo de detección de ion positivo se utilizó para registrar la presencia de gossypitrina, gossypetina y gossypetina-3'-O-glucósido en varios extractos de los pétalos de las flores de Majagua. Tres métodos de extracción se utilizaron en este estudio, los cuales fueron extracción por Soxhlet, extracción en Baño Ultrasónico y extracción por Percolación. El método de extracción por Baño Ultrasónico se emplea por vez primera para el análisis de los componentes químicos de los pétalos de las flores de Majagua. En el estudio, se establece el método de cromatografía líquida de alta resolución con un detector ultravioleta acoplado con un espectrómetro de masas con fuente de ionización por electroespray (CLAR-UV-EM/EM) para la identificación simultánea de flavonoides en los pétalos de las flores de *T. elatum* que crecen en Cuba y Martinica basado en sus tiempos de retención (t_R), y los espectros ultravioletas, infrarrojo y de masas. Estos resultados demuestran que el método desarrollado puede ser empleado como una técnica rápida y versátil para la identificación de los constituyentes químicos y el control de la calidad de muestras de Majagua.

Palabras clave: CLAR; *T. elatum*; flavonoides; espectrometría de masas; pétalos.

HPLC-UV-ESI-MS/MS of flavonoids in the petal of the flowers of *Talipariti elatum* S.W (Fryxell)

Abstract

The high-performance liquid chromatography—mass spectrometry (HPLC-MS) qualitative analysis method in positive mode of detection was used to record the presence of gossypitrin, gossypetin and gossypetin-3'-O-glucoside in several extracts from the petals of the flowers of Majagua. Three different extractive methods were used, Soxhlet extraction, Ultrasound extraction and Percolation. Ultrasound extraction was used for the first time to analyze the chemical components from the petals of the flowers of Majagua. In this study, high performance liquid chromatography with ultraviolet detector coupled with electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-UV-ESI-MS/MS) method was established for simultaneous identification of flavonoids in the petals of *T. elatum* growing in Cuba and Martinica based on chromatographic retention time (t_R), UV, IR and MS/MS spectra. The results demonstrate the developed method could be employed as a rapid and versatile analytical technique for identification of chemical constituents and quality control of Majagua samples.

Keywords: HPLC; *T. elatum*; flavonoids; mass spectrometry; petals.

Introducción

Las plantas medicinales utilizadas como terapia alternativa, se generalizan nuevamente de forma acelerada tanto en países subdesarrollados como desarrollados, no tanto por su eficacia, sino, por su

seguridad durante los tratamientos.

Aún se mantienen diversas patologías para las cuales no se tiene una terapia eficiente y entre ellas, el asma es una de las de mayor morbilidad en los países tropicales húmedos.

El asma se considera una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas en cuya patogenia intervienen múltiples células, en particular los eosinófilos, por lo que se describe como bronquitis crónica eosinófila descamativa. A nivel mundial se considera que su incidencia fluctúa entre el 4-10 % de la población y en Cuba se registra en alrededor del 10 % de la misma.

La majagua, está considerada como la segunda planta más utilizada popularmente para el tratamiento de las afecciones de las vías respiratorias superiores en áreas rurales de varios municipios camagüeyanos, y forma parte de la formulación IMEFASMA JARABE. Las flores de majagua constituyen un motivo de interés en relación con la estandarización de su extracto fluido⁽¹⁾.

Talipariti elatum S. w. es un árbol muy común en toda la isla que florece generalmente en dos períodos del año. Sus flores inicialmente amarillas, cambian su color a naranja y rojo antes de caer de la planta. Estas flores completas, se utilizan por la población en forma de decocción o fermentadas en forma de un vino con fines expectorantes y antiasmáticos⁽²⁾.

Natural de Jamaica y Cuba, donde en algunos lugares aparece formando colonias (majaguales) junto a los pantanos y márgenes de ríos; existe también en las demás islas de las Antillas, América tropical continental y en los trópicos del Viejo Mundo. Árbol de rápido crecimiento, que alcanza alturas de hasta 25 m, de corteza carmelitosa y algo fisurada cuando alcanza la adultez, mientras que la corteza de las ramas jóvenes es blanquecina; presenta hojas aovadas, de base acorazonada, largamente pecioladas, de haz verde brillante y envés gris tomentoso. Las flores son grandes, en forma de copa, de 5 pétalos de color rojo oscuro en la base, el resto de la lámina cambia de color con el día, rosado-amarillenta en la mañana y finalmente se toman rojas. Aunque en casi todo el año se observan flores, se producen picos en enero y en el período junio-agosto. El fruto es una cápsula globosa, dehiscente, que madura con abundancia de marzo a mayo y contiene numerosas semillas pequeñas⁽³⁾.

El objetivo de esta investigación fue analizar tres muestras de los pétalos de las flores de majagua procedentes de Cuba y Martinica, para determinar en las mismas la presencia de los componentes mayoritarios, a fin de encontrar si existen diferencias que pudieran repercutir en su apreciación comercial para elaborar fitomedicamentos.

Materiales y Métodos

2.1 Preparación de la muestra

Se obtuvieron tres muestras de pétalos de flores de majagua procedentes de Cuba y Martinica. Las muestras se recolectaron en el periodo de floración de las plantas (12/01/2015), y se utilizaron para ello, flores que caen de las plantas después de su maduración. Las mismas se sometieron a un proceso de secado que consistió en secado en estufa a 40 °C (muestra procedente de Cuba #1) durante cinco días, secado en estufa a 45 °C (muestra procedente de Martinica #2) durante cinco días y una muestra secada a la sombra a temperatura ambiente durante una semana (muestra procedente de Martinica #3).

Las muestras de *Talipariti elatum* se encuentran autenticadas en el Jardín Botánico Nacional de Cuba con el número de herbario **HAJB 82587**. A su vez, la muestra procedente de Martinica se encuentra registrada en la Farmacopea Francesa con el número de herbario **Fournet 1752 (4232 Guad)**. Ambas se encuentran registradas como *Hibiscus elatus* S. w.

2.2 Preparación de los extractos

Se realiza la preparación de los extractos utilizando las muestras 1, 2 y 3 de los pétalos de Majagua a través de diferentes métodos de extracción. De los mismos, el método de extracción por baño ultrasónico se utiliza por primera vez para estudiar la composición química de los pétalos de las flores de esta planta. Los procedimientos empleados fueron los siguientes:

Procedimiento # 1:

60 g de pétalos de las muestras 1 (de Cuba, secada en estufa a 40 °C) 2 (de Martinica, secada en estufa a 45 °C) y 3 (de Martinica, secada a la sombra) de *Talipariti elatum* S.w., secos y molidos, se colocaron en un cartucho de un equipo Soxhlet y se extrajeron durante 20 h con 675 mL (en el balón del equipo) de etanol al 95 %. Se filtró en caliente. Los líquidos orgánicos de extracción se concentraron por destilación en evaporador rotatorio hasta un volumen aproximado de 200 mL, a 120 rpm, con una temperatura de 70 °C y una presión de 500 mbar. El extracto concentrado se refrigeró hasta la aparición de un sólido amarillo-naranja abundante que se recuperó por filtración en frita de vidrio poroso # 3.⁽⁴⁾ Este procedimiento solamente se le realizó a la muestra de Cuba porque es el método que tradicionalmente se utiliza en el país con estos fines.

Procedimiento # 2:

60 g de pétalos de la muestra 3 de *Talipariti elatum* S.w., secos y molidos, procedente de Martinica secada a la sombra a temperatura ambiente, se colocaron en un cartucho de un equipo Soxhlet y se extrajeron durante 20 h con 675 mL (en el balón del equipo) de 1,2-dimetoxietano. Se filtró en caliente. Los líquidos orgánicos de extracción se concentraron por destilación en evaporador rotatorio hasta un volumen aproximado de 220 mL, a 120 rpm, con una temperatura de 70 °C y una presión de 500 mbar. El extracto concentrado se refrigeró hasta la aparición de un sólido amarillo-naranja abundante que se recuperó por filtración en frita de vidrio poroso # 3.⁽⁴⁾

Procedimiento # 3:

49,55 g de pétalos de la muestra 3 de *Talipariti elatum* S.w., secos y molidos, procedente de Martinica secada a la sombra a temperatura ambiente, se colocaron en un percolador con 300 mL de etanol al 95 %, según la metodología planteada por Miranda y Cuéllar en el 2000. Se filtró a temperatura ambiente. Los líquidos orgánicos de extracción se concentraron por destilación en evaporador rotatorio hasta un volumen aproximado de 270,6 mL, a 120 rpm, con una temperatura de 70 °C y una presión de 500 mbar. El extracto concentrado se refrigeró hasta la aparición de un sólido amarillo-naranja abundante que se recuperó por filtración en frita de vidrio poroso # 3.⁽⁴⁾

Procedimiento # 4:

38,49 g de pétalos de la muestra 3 de *Talipariti elatum* S.w., secos y molidos, procedente de Martinica secada a la sombra a temperatura ambiente, se humectaron previamente durante 20 horas con 80 mL de etanol al 95 % y posteriormente se colocaron en un baño ultrasónico con 155,1 mL de etanol al 95 % durante 3 horas. Los líquidos orgánicos de extracción se concentraron por destilación en evaporador rotatorio hasta un volumen aproximado de 80 mL, a 120 rpm, con una temperatura de 70 °C y una presión de 500 mbar. El extracto concentrado se refrigeró hasta la aparición de un sólido amarillo-naranja abundante que se recuperó por filtración en frita de vidrio poroso # 3.⁽⁴⁾

Procedimiento # 5:

60 g de pétalos de la muestra 2 de *Talipariti elatum* S.w., secos y molidos, procedente de Martinica y secada en estufa a 45 °C se colocaron en un cartucho de un equipo Soxhlet y se extrajeron durante 20 h con 675 mL (en el balón del equipo) de 1,2-dimetoxietano. Se filtró en caliente. Los líquidos orgánicos de extracción se concentraron por destilación en evaporador rotatorio hasta un volumen aproximado de 200 mL, a 120 rpm, con una temperatura de 70 °C y una presión de 500 mbar. El

extracto concentrado se refrigeró hasta la aparición de un sólido amarillo-naranja abundante que se recuperó por filtración en frita de vidrio poroso # 3.⁽⁴⁾

2.3 Análisis por CCD, UV e IR

La cromatografía de capa delgada (CCD) se realizó con placas pre-elaboradas sobre soporte de papel de aluminio con gel de sílice G.60 F-254 de la Merck, utilizando como disolvente de elución una mezcla (v/v/v) de n-butanol: ácido acético: agua 4:1:5, donde se corre el sólido recuperado (cristalizado).

La espectrometría UV se realizó en Metanol con un espectrofotómetro UV-VIS JENWAY UV Vis 6715 de fabricación Británica (UK), utilizando para la determinación un rango de escaneo de 200 a 500 nm de longitud de onda y una absorbancia de 0.000-3.000, todos en cubetas de cuarzo, con una banda espectral de 1.5 nm y una resolución espectral de 0.1 nm.

El registro de los espectros IR se realizó en un equipo Bruker IR modelo ALPHA de fabricación alemana (Germany) con un rango de escaneo entre 7500-360 cm⁻¹, sobre tabletas de bromuro de potasio (KBr), resolución de 2 cm⁻¹, con un diodo laser 850 nm (Laser Clase 1).

2.4 Análisis por CLAR-UV-EM/EM

La separación cromatográfica por CLAR/EM se realizó en un equipo VARIAN 500 MS (Ion Trap) con trampa iónica de fabricación USA, con detector UV a 280 nm. El método utilizado para la corrida de las muestras fue el de CLAR-IEE-EM/EM, con un modo de escaneo positivo (ion modo positivo), un flujo de 1 mL/min, el voltaje del capilar fue de 60 volts y de la aguja 5000 volts, y la muestra se corrió entre 100 y 2000 m/z. Para la fragmentación en ion modo positivo, el rango de energía de colisión utilizado fue de -5 V a -35 V. El programa utilizado fue el Varian MS Workstation Versión 6.9 y la columna fue una Pinnade DB C-18, 5 µm (i.d), y 250 x 4,6 mm de diámetro (Made in USA). Se realizó el análisis cromatográfico por CLAR/EM utilizando como eluyente A metanol y como eluyente B agua. Un gradiente de 15-85% de B durante 30 minutos a 1mL/min seguido por mantenimiento del gradiente, incrementando hasta 50 % A durante 10 minutos sostenidos, revirtiendo hasta 0 % de B durante 5 min, y reequilibrando durante 5 minutos.

Resultados

3.1. Composición de las muestras

Las tres muestras analizadas presentaron composiciones diferentes en cuanto a la cantidad de metabolitos. En la Tabla 1 se puede observar que el extracto obtenido a partir de los pétalos de las flores recolectadas en Cuba (muestra 1) es la que contiene un mayor número de componentes químicos, seguida por el extracto que se obtuvo a partir de los pétalos de las flores secados a la sombra (muestra 3), y por último el extracto secado a 45 °C (muestra 2).

Tabla 1. Cantidad de picos registrados por CLAR de las diferentes muestras de pétalos de *T. elatum* procedentes de Cuba y Martinica

Muestra (procedencia)	picos
Muestra 1 (Cuba)	78
Muestra 2 (Martinica)	42
Muestra 3 (Martinica)	67

3.2. CCD, UV e IR

El análisis por cromatografía de capa delgada, bajo las condiciones descritas anteriormente, muestra la presencia de tres manchas de color amarillo, típicas de compuestos tipo flavonoides^(5,6), que varían

en cuanto a tamaño y forma, siendo la mayor y más alargada la de la muestra # 3, seguida por la muestra # 2 y por último la muestra # 1. Todas cambian de color cuando se exponen bajo la luz UV a 254 nm, tomando una coloración verde-amarillenta y carmelita cuando se revelan con H₂SO₄ y calor (Fig. 1). Los valores de RF calculados fueron de 0,808; 0,807 y 0,780, respectivamente.

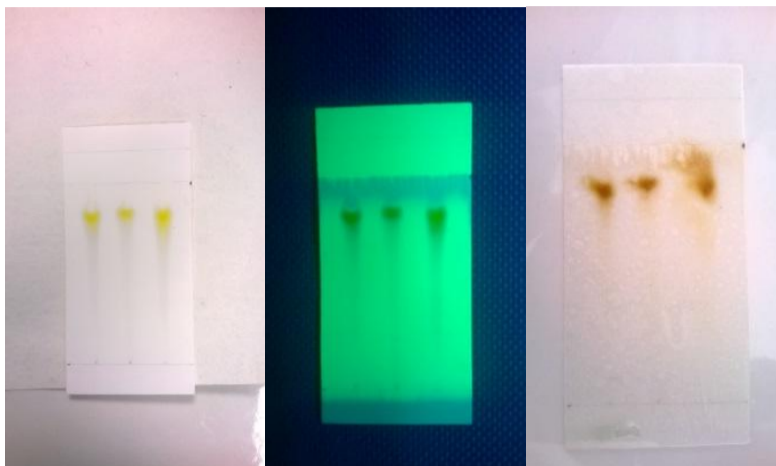


Fig. 1. Cromatografía de capa delgada de las muestras 1, 2 y 3 en MeOH (de izquierda a derecha), bajo la luz UV a 254 nm y reveladas con H₂SO₄ al 50 %.

En las figuras 2 y 3, se observan los resultados de los espectros UV e IR de todas las muestras cristalizadas.

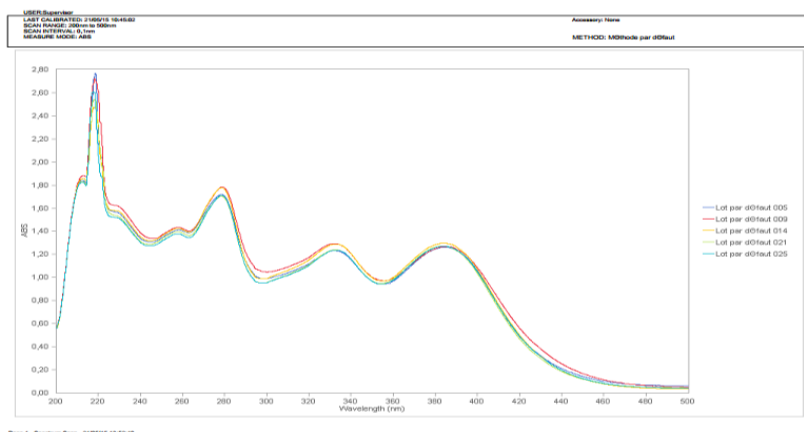


Figura 2. Espectros UV de las muestras cristalizadas a partir de los extractos obtenidos de los pétalos de las flores de *T.elatum*.

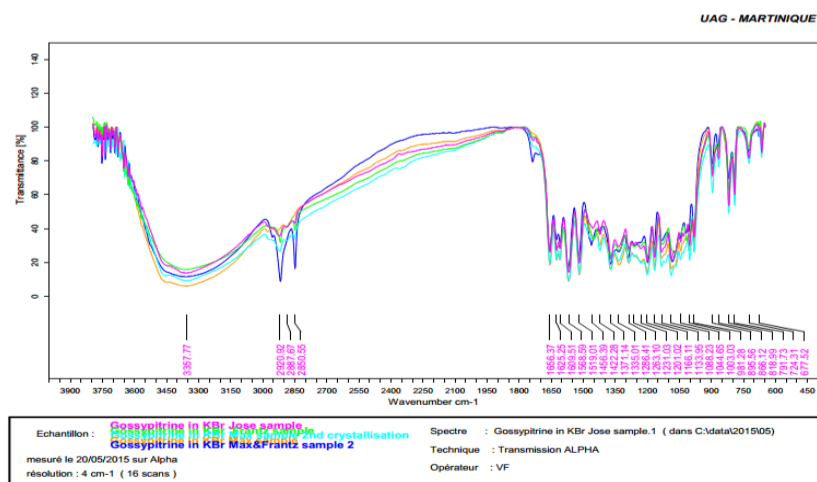


Figura 3. Espectros IR de las muestras cristalizadas a partir de los extractos obtenidos de los pétalos de las flores de *T.elatum*.

De los mismos se puede inferir que todas las muestras analizadas en el experimento presentan bandas características de flavonoides que consisten típicamente en dos máximos de absorción en los rangos de 240-285 nm (Banda II) y de 300-550 nm (Banda I). Para el caso específico de los flavonoles que presenten grupos 3-OH libres, este rango se reduce a valores de absorción de 250-280 para la Banda II y de 350-385 para la Banda I^(7,8).

El análisis del espectro IR muestra la existencia de hidroxilos, grupos alquílicos, grupo carbonilo y anillos aromáticos por la presencia de bandas a 3375, 3000-2980, 1656, 1610, 1600, 1569 y 1519 cm⁻¹.

3.3 CLAR-UV-IEE/EM

Los resultados obtenidos después de correr las muestras por el cromatógrafo líquido de alta resolución permitieron considerar que la muestra que presenta un valor mayor en cuanto a perfil cromatográfico es la de Cuba, seguida por la muestra obtenida de los pétalos de las flores secada a la sombra y por último la secada en estufa a 45 °C, ambas procedentes de Martinica. Los datos aparecen reflejados en la tabla No. 2.

Es válido señalar que en el caso de la extracción por baño ultrasónico la cantidad de componentes registrado en la corrida cromatográfica fue superior a la de las extracciones realizadas por percolación (muestra 3), Soxhlet con etanol al 95 % (muestra 2) y Soxhlet con 1,2-dimetoxietano (muestra 3), respectivamente, aún, cuando se considera por los diferentes investigadores que tiempos prolongados de extracción por este método en drogas vegetales puede causar destrucción o alteración en la composición química de los metabolitos presentes en dichas muestras vegetales.

Tabla 2. Cantidad de picos registrados por CLAR-UV-IEE-EM/EM de los diferentes tipos de extractos obtenidos de los pétalos de las flores de *T. elatum* que crece en Cuba y Martinica.

Muestra	Cuba	Martinica 1	Martinica 2	1,2-dimetoxietano	Ultrasonido	Percolación
Picos	78	42	67	29	57	48

Cuando se analiza cada muestra por separado y se realiza el filtrado del ion molecular con *m/z* 481, se observa que en todos los casos existen dos o tres compuestos que presentan la misma masa molecular en el pico base (*m/z*319), pero con diferencias entre los tiempos de retención que presentan los mismos para cada una de las muestras analizadas, a los cuales se les denominó Tiempos de retención de los compuestos 1 A, 2 A y 3A, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Tiempos de retención (T_R) de los componentes 1A, 2A y 3A presentes en los diferentes tipos de extractos obtenidos de los pétalos de las flores de *T. elatum*.

Muestra	Cuba	Martinica 1	Martinica 2	1,2-dimetoxietano	Ultrasonido	Percolación
1A	18.037 min	26.673 min	26.333 min	26.356 min	25.870 min	30.516 min
2A	26.638 min	27.211 min	27.042 min	26.671 min	26.626 min	
3A	26.826 min		28.034 min		27.176 min	

En el caso del método de extracción por percolación se registraron por el equipo dos compuestos con tiempo de retención de 31.865 min y 32.983 min, respectivamente, pero con una *m/z* de 303 unidades que pudieren tener relación con la quercetina aglicona o alguna de sus variantes, aspecto este que debe ser analizado con mayor profundidad.

Estos resultados se encuentran avalados cuando se realizó el análisis de las muestras cristalizadas obtenidas a partir de la purificación de los productos que precipitaron después de refrigerar los diferentes extractos elaborados. (Tabla 4). En la tabla se evidencia que solamente la extracción con baño ultrasónico fue el único proceso extractivo donde no se pudo recuperar un residuo sólido que permitiera su análisis por el equipo de CLAR-EM.

Tabla 4. Resultados de las corridas cromatográficas (T_R) de las muestras solidas cristalizadas después de la refrigeración de los extractos elaborados de las flores de *T.elatum*.

Muestra	Cuba	Martinica 1	Martinica 2	1,2dimetoxietano	Martinica 1*	Percolación
1A	26.014 min	26.354 min	26.325 min	25.761 min	26.037 min	27.768 min
2A	26.414 min	26.694 min	26.560 min	26.218 min	26.350 min	28.317 min

(Nota: Martinica 1 segunda cristalización)

3. Discusión

El método de secado utilizado pudo haber influido en los resultados alcanzados, ya que como se expone en la tabla 1, la muestra que menores cantidades de compuesto registro en los cromatogramas, fue la 2 procedente de Martinica, debido posiblemente al uso de una elevada temperatura al realizar el secado (45 °C).

Las extracciones permitieron aislar y cristalizar cinco muestras diferentes, denominadas en este estudio: 005 (procedente de la muestra 1); 009 (procedente de la muestra 2, extraída con 1,2-dimetoxietano); 014 (procedente de la muestra 3); 021 (procedente de la muestra 2, primera cristalización); 025 (procedente de la muestra 2, segunda cristalización).

Los resultados experimentales obtenidos en la espectrometría UV sugieren que las muestras analizadas se encuentran perfectamente vinculadas con este subgrupo de compuestos aunque con pequeñas variaciones en los valores de λ máxima (nm) y de absorbancia, y que de acuerdo con lo planteado por Cuéllar y González, 2010, y Márquez y col., 1999, el producto es un flavonol que presenta el grupo hidroxilo en 3 libre; esto lo apoya la existencia de una banda por encima de 350 nm en el espectro de la solución metanólica, presenta grupos catecólicos en el anillo B (preferentemente sustitución 3',4'), por la existencia de la banda a 277 nm y de una inflexión a 257 nm en el espectro de la solución metanólica, y tres posiciones oxigenadas sobre el anillo A, por la existencia de la banda a 277 nm en el espectro de solución metanólica.

El espectro IR presentó bandas características de flavonoides^(4,5) y permite detectar la presencia de un azúcar en la estructura, al existir bandas correspondientes a grupos alquílicos⁽⁹⁾. Se aprecia solamente una diferencia en la intensidad de las bandas que se registran por el equipo entre los 2920 y los 2850 cm⁻¹, respectivamente, para la muestra 009.

El análisis por CLAR-EM/EM permitió definir que estos compuestos tienen una masa molecular de m/z 481 que corresponde a un flavonoide hexahidroxilado, que soporta una molécula de una hexosa, con un pico base de 319 unidades. Se observan algunos picos de fragmentaciones típicas de flavonoides muy hidroxilados, como es la zona de 152–154 unidades de masas, que pueden corresponder indistintamente a los fragmentos que soportan el anillo A o B del esqueleto y en especial el pico 302 que sugiere tres sustituyentes oxigenados en el anillo A⁽⁶⁾.

La muestra de pétalos de flores de majagua procedente de Cuba registró un valor de 18.037 min (Tabla 3) que bien pudiera estar relacionada con la gossypetina como aglicón, mientras que los compuestos que eluyen a los 26.638 y 26.826 min respectivamente, pueden ser la gossypitrina y la gossypetina-3'-O-glucósido, aspecto éste que debe ser confirmado por RMN de ^1H y ^{13}C en todas sus variantes^(10,11).

Nótese que las extracciones realizadas con Soxhlet y el baño ultrasónico con etanol al 95 % como disolvente, fueron las que registraron la mayor presencia de los tres tipos de compuestos que se han informado por la literatura especializada que están presentes en la flores del género *Hibiscus* en general¹² (Al-Hashimi, 2012).

La Tabla 4 refleja que la muestra elaborada en Cuba es la que presenta menor tiempo de retención para los dos compuestos con valores de m/z de 319 unidades de masa de todos los extractos elaborados con etanol al 95 %, superado solamente por los valores registrados para la muestra obtenida a partir del extracto elaborado con 1,2-dimetoxietano.

Asimismo, se logró una segunda cristalización (Martinica 1*) a partir de la muestra elaborada con los pétalos de las flores secados en estufa a 45 °C que también presenta tiempos de retención inferiores a los de la primera cristalización (Martinica 1) elaborada con esa misma muestra.

La extracción con percolación fue la que presentó valores superiores al resto de los métodos de extracción empleados en la presente investigación.

Conclusiones

La utilización de varios métodos de extracción entre los que se encuentran la extracción con Soxhlet, la percolación y el baño ultrasónico, utilizando para ello diferentes disolventes permitió obtener muestras cristalizadas de compuestos químicos presentes en los extractos de los pétalos de las flores de *T.elatum* donde se evidencia la posible presencia de tres estructuras relacionadas con los flavonoides. Estos productos que han sido reportados en la bibliografía especializada como gossypetina aglicona, gossypitrina y gossypetina-3'-O-glucósido pudieran ser los principales responsables de la actividad antiasmática y expectorante que se le atribuyen a las flores de la especie tanto en Cuba como en el resto de los países del área del Caribe donde la planta se desarrolla. Debido a la alta sensibilidad del método, otros constituyentes minoritarios pudieran ser también identificados. Se hace necesaria la utilización de nuevos estudios tales como CLAR-UV-ESI-MS/MS con un gradiente y eluentes diferentes y RMN para la detección y caracterización estructural de estos y de otros compuestos minoritarios aún sin definir su elucidación estructural.

Referencias

1. Milanés Santana, R; Alonso Rodríguez, D y González Aguilar, G. Farmacognosia de la droga "flores de majagua" (*Hibiscus elatus* Sw., familia *Malvaceae*). IV. Estandarización del extracto fluido. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 1999;3 (3), 98-101.
2. Roig, J.T. Plantas Aromáticas, Venenosas y Medicinales de Cuba. 1988. Editorial Científico Técnica, Habana, Cuba.
3. Acosta de la Luz, L; Rodríguez Ferradá, C. A. Plantas medicinales. Bases para una producción sostenible. Agrinfor, Impresiones MINAG. 2006: 124-125.
4. Cuéllar, A; González Yaque, J. Obtención del glucósido flavonoide gossypitrina de los pétalos de las flores de *Talipariti elatum*S.w. y evaluación de su posible efecto antioxidante. Rev. Colombiana Cienc. Anim. 2010; 2 (2), 338-348.

5. Márquez, I, Cuellar Armando, Martínez Jorge, Alemán Alejandro, Lora Janette y Vélez Hermán. Estudio fitoquímico de la especie *Hibiscus elatus* S.w. Revista Cubana de Farmacia, 1999; 33(2), 127-131.
6. González Yaque, J.; Cuéllar, A. Estudio Fitoquímico de *Talipariti elatum* S.w. (Fryxell). Malvaceae. Revista Cubana de Química. 2004; 16 (3): 1084-1055.
7. Abad-García, B., Berrueta, L.A., Garmon-Lobato, S., Gallo, B., Vicente, F. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. J. Chromatogr. A 2009; 1216: 5398-5415.
8. Vukics, V., Guttman, A. Structural characterization of flavonoids glycosides by multi-stage mass spectrometry. Mass Spectrom. Rev. 2010; 29: 1-16.
9. Kutney, J. B. and Hall, J. E. Constituents from *Equisetum telmateia*: the structure of equisporoside and equisporol. Phytochem. 1971; 10: 3287-3289.
10. François-Haugrin F. Extraction et purification de la gossypitrine des pétales de fleurs de Mahot bleu (*Hibiscus elatus* Sw.), et évaluation de ses propriétés antioxydantes par différentes méthodes. Perspectives en agroalimentaire, en cosmétique et en santé (confidentiel). Mémoire de diplôme d'ingénieur CNAM. 2015. Paris. (In French).
11. González Yaque J., Cuéllar A., Massi L., Monan M., Nossin E., François-Haugrin F. 2016. Isolation and Characterization of flavonols by HPLC-UV-ESI-MS/MS from *Talipariti elatum* S.w. American Journal of Plant Sciences, 2016,7: 1198-1204.
12. Al-Hashimi Alaa G. Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extracts. African Journal of Food Science. 2012; 6 (21): 506-511.