

Instituto de Farmacia y Alimentos  
Universidad de La Habana

## EVALUACIÓN FARMACOGNÓSTICA Y FITOQUÍMICA PRELIMINAR DE *PHYLLANTHUS ORBICULARIS* HBK

Yamilet Irene Gutiérrez Gaitén,<sup>1</sup> Migdalia Miranda Martínez,<sup>2</sup> Gloria del Barrio,<sup>3</sup> Noel Varona Torres<sup>4</sup> y José Luis Mayoral Jiménez<sup>5</sup>

### RESUMEN

Se realizó un estudio farmacognóstico y fitoquímico preliminar de *Phyllanthus orbicularis* HBK, donde se determinaron inicialmente las características macromorfológicas y micromorfológicas de las hojas y tallos de la especie. Se estandarizó la droga cruda, cuyos valores promedio obtenidos se encontraban dentro del rango permisible, cuando los comparamos con los de drogas oficiales. Se determinó la composición química general de la droga mediante ensayos de tamizaje fitoquímico, y se detectó la presencia de flavonoides, alcaloides, coumarinas, saponinas, aminoácidos, antocianidinas, mucílagos, triterpenos y/o esteroides, sustancias reductoras, taninos pirocatecólicos, principios amargos y astringentes, glicósidos y quinonas. También se cuantificaron algunos de estos metabolitos. Se procedió finalmente, a la extracción y fraccionamiento de flavonoides, obteniéndose fracciones muy simples con la presencia de dichos compuestos; además, se detecta rutina y quercetina, así como 2 compuestos cromatográficamente puros, que según los análisis efectuados se sospecha que sean flavonoides.

*Descriptores DeCS:* PLANTAS MEDICINALES; TALLOS DE PLANTAS; HOJAS DE PLANTAS.

Cuba, cuyos planes de salud abarcan las más recónditas zonas del país, posee una valiosa tradición en la utilización de las plantas medicinales y una flora muy diversa

que permite su explotación racional, con el objetivo de detectar la presencia y abundancia de principios activos en diversos campos industriales o de aplicación en la medicina.

<sup>1</sup> Master en Tecnología y Control de Medicamentos. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Aspirante a Investigadora.

<sup>2</sup> Doctora en Ciencias Químicas. Profesora Titular.

<sup>3</sup> Master en Ciencias. Licenciada en Ciencias Biológicas. Profesora Titular.

<sup>4</sup> Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Reserva Científica.

<sup>5</sup> Técnico en Química Industrial.

Dentro de esta riqueza florística y medicinal del país, se destaca la presencia de numerosas especies, algunas de ellas introducidas, pero que se han adaptado a nuestro ecosistema, y otras, de carácter endémico, como es el caso de *Phyllanthus orbicularis* HBK, que constituye otro valioso recurso medicinal del cual se conoce muy poco. Es por ello que nos dimos a la tarea de realizar un estudio farmacognóstico y fitoquímico preliminar que comprendiera los objetivos específicos siguientes: estudio macromorfológico y micromorfológico de las hojas y tallos de *Phyllanthus orbicularis* HBK; estandarización de la droga cruda de la misma especie, teniendo en cuenta los parámetros físico-químicos de control de la calidad; determinación de la composición química general de la droga mediante técnicas de tamizaje fitoquímico, y cuantificación de algunos metabolitos presentes en ella con posible acción antiviral; extracción y fraccionamiento de uno de los metabolitos presentes en la droga (flavonoides), con posible acción antiviral.

## MÉTODOS

La especie vegetal utilizada fue *Phyllanthus orbicularis* HBK, que fue recolectada en la provincia de Pinar del Río, en la zona conocida como Cajalbana, en agosto de 1997. De las colectas realizadas solo se emplearon hojas y tallos finos, los cuales fueron secados en estufa a 40 °C durante 72 h, con recirculación de aire; posteriormente se molinaron en un molino de aspa de 8 pulgadas, marca Christy & Norris LTD, con malla 2 mm.

El estudio macromorfológico de hojas y tallos de la especie se realizó a simple vista y con ayuda de un microscopio.

Para las hojas se tuvo en cuenta forma del limbo, borde, ápice, base, peciolo, venación, consistencia y color. También se les efectuaron mediciones de largo y ancho. En el estudio macromorfológico de los tallos se determinó la consistencia, forma de la pieza, superficie externa, superficie interna y color de la superficie interna.

En el estudio micromorfológico de hojas y tallos de la especie se realizaron cortes transversales, a los cuales se les observaron los caracteres anatómicos internos, así como algunos componentes químicos como el súber, lignina y celulosa, mediante la técnica de tinción triple descrita por Durand.<sup>1</sup> Se empleó para el análisis un microscopio.

En la estandarización de la droga cruda se determinaron los parámetros de calidad que reporta la Norma Ramal de Salud Pública 309:<sup>2</sup> materia orgánica e inorgánica extraña (%); humedad residual (%) por el método azeotrópico; sustancias solubles en agua, etanol al 30, 50 y 80 % (%); cenizas totales (%), cenizas solubles en agua (%) y cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10 %.

Los ensayos de tamizaje fitoquímico se le realizaron a la droga cruda de *Phyllanthus orbicularis* HBK según el procedimiento descrito en la Guía Metodológica para la Investigación Fitoquímica en Plantas Medicinales del MINSAP, 1995.

Se cuantificó taninos mediante el método espectrofotométrico del tungsto-fosfórico-molibdico (Miranda M. Manual de prácticas de laboratorio de análisis farmacognóstico. 1992). Para la determinación cuantitativa de flavonoides totales se empleó un método espectrofotométrico descrito por Méndez G (Estudio farmacognóstico y fitoquímico de *Cymbopogon citratus* (DC) stapf y sus

extractos. 1996). La concentración de alcaloides totales se determinó por un método volumétrico descrito por *Miranda M* (Manual de prácticas de laboratorio de análisis farmacognóstico. 1992).

Al extracto obtenido por el método de maceración durante 14 d, para lo cual se empleó como menstruo etanol al 80 % (para su posterior fraccionamiento de flavonoides) se le determinó los parámetros físico-químicos de control de la calidad que describe la Norma Ramal de Salud Pública 312:<sup>3</sup> características organolépticas olor y color, pH; sólidos totales (%); índice de refracción y densidad relativa.

En la extracción y fraccionamiento de flavonoides a partir de la droga cruda de *Phyllanthus orbicularis* HBK se utilizó el procedimiento descrito en la figura. En este estudio, el extracto hidroalcohólico total (EHT), la fracción etérea (FE), la hidroalcohólica (FH), que se separó en columna cromatográfica de celulosa para obtener después del paso sucesivo de las fases móviles cloroformo, butanol, ácido acético/agua (15:85) y agua, las fracciones clorofórmica (FC), butanólica (FB), acético/agua (FAA) y acuosa (FA), se analizaron mediante cromatografía en capa delgada, con la utilización de celulosa microgranular CC-41 y como fase móvil n-butanol-ácido acético-agua (BAW) (4:1:5). Para el revelado de las cromatoplasas se realizó un análisis a la luz visible antes y después de exponer el cromatograma a los vapores de  $\text{NH}_3$ ; análisis a la luz UV (366 nm) antes y después de exponer el cromatograma a los vapores de  $\text{NH}_3$ ; análisis después de asperjar con solución metanólica al 5 % de  $\text{AlCl}_3$ , primero al visible y después con luz UV (366 nm). Finalmente se aislaron 2 productos, uno a partir de FE y otro de

FB, a los cuales se les determinó el punto de fusión para tener idea de su pureza.

Todos los resultados se analizaron estadísticamente según el programa estadístico ESTATISTIC y ANOVA 1 para comparar valores medios. También se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación, así como los intervalos de confianza.

## RESULTADOS

En el estudio macromofológico de *Phyllanthus orbicularis* HBK se determinó inicialmente las características anatómicas externas de las hojas, donde se observó que éstas tenían una forma de limbo abovada-elíptica; borde ondulado-aserrado; ápice redondeado; base acorazonada-obtusa; peciolo corto; venación penninervia; consistencia coréacea y color verde rojizo, más oscuro por el haz que por el envés. Al realizar las mediciones obtuvimos un valor medio de 0,90 cm de largo y 0,83 cm de ancho. Por su parte, el tallo mostró una consistencia leñosa, forma cilíndrica, superficie externa rugosa de color rojiza verdosa y superficie interna de color crema claro con pequeñas estrías.

En el estudio micromofológico se pudo visualizar en las secciones transversales de la hoja la presencia de una epidermis superior e inferior con escasos pelos pluricelulares. En la epidermis superior se apreció una zona bien diferenciada de células muy agrupadas y alargadas correspondientes al colénquima. Se observó perfectamente el parénquima lagunar con abundantes espacios intercelulares, y los haces conductores xilema y floema dispuestos centralmente formando paquetes.

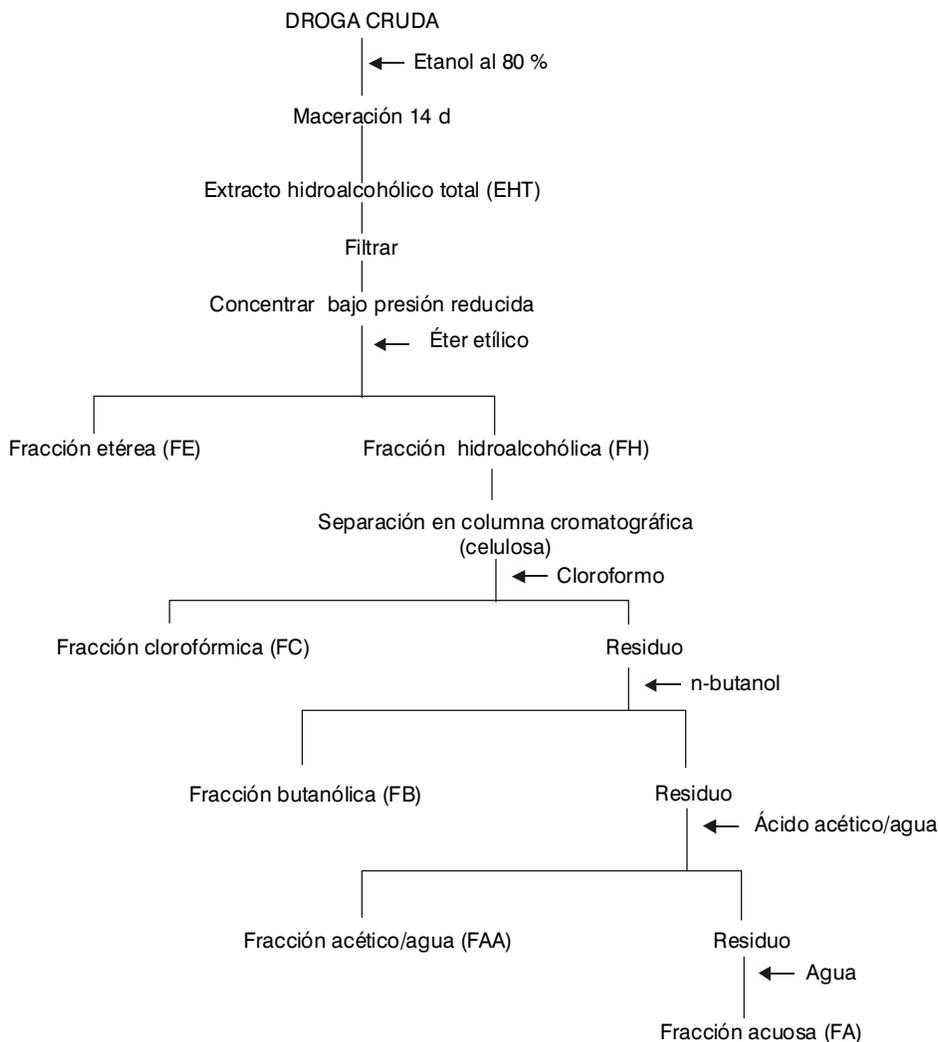


FIG. Propuesta para la extracción y fraccionamiento de flavonoides a partir de la droga cruda de *Phyllanthus orbicularis* HBK.

En el tallo se destacó la presencia de una epidermis de cutícula gruesa con pelos pluricelulares, a continuación se evidenció un anillo de varios estratos de células reforzadas correspondientes al colénquima; más al centro, un grupo de células más grandes con abundantes espacios intercelulares pertenecientes al parénquima, y los haces conductores

xilema y floema dispuestos centralmente formando anillos de células muy unidas.

También se pudo observar en ambos órganos, la presencia de lignina con un color rojo, dispuesta en zonas y campos muy visibles, el súber de color amarillo, localizado fundamentalmente en el tejido parenquimatoso, y la celulosa de color azul.

En la estandarización de la droga cruda se determinaron los índices numéricos que se muestran en la tabla, los cuales nos dan idea de la calidad del producto con que estamos trabajando.

Al efectuar los ensayos de tamizaje fitoquímico se detectó la presencia de flavonoides, alcaloides, coumarinas, saponinas, aminoácidos, antocianidinas, mucílagos, triterpenos y/o esteroides, sustancias reductoras, taninos pirocatecólicos, principios amargos y astringentes, glicósidos y quinonas. En el proceso de cuantificación de los compuestos con posible acción antiviral se obtuvo una concentración de 11,03 ( $\pm$  0,150) % de taninos, 4,75 ( $\pm$  0,103) % de flavonoides totales expresados como quercetina y 4,05 ( $\pm$  0,122) % de alcaloides totales.

El extracto obtenido de la droga cruda de *Phyllanthus orbicularis* HBK presentó una pigmentación de color pardo oscuro y un olor característico, un pH de 5,20 ( $\pm$  0,016); los sólidos totales brindaron un valor de 6,48 ( $\pm$  0,010) %; la densidad relativa fue de 0,891 ( $\pm$  0,015) y el índice de refracción de 1,367 ( $\pm$  0,013).

Con respecto al análisis cromatográfico efectuado al extracto hidroalcohólico total (EHT) y a las diferentes fracciones (FH, FE, FC, FB, FAA y FA), es necesario señalar que éstas reaccionaron positivamente frente a reveladores clásicos para flavonoides, así como a la reacción de Shinoda que también es específica para dichos compuestos. El EHT mostró a simple vista 7 manchas: carmelita oscuro de  $R_f=0,16$ ; amarilla carmelitosa intensa de  $R_f=0,30$ ; carmelita con  $R_f=0,46$ ; amarilla de  $R_f=0,63$ ; carmelita amarillenta con  $R_f=0,76$ ; amarilla con  $R_f=0,86$  y amarilla verdosa intensa que corrió con el frente del solvente. La fracción FH mostró 5 manchas, las cuales coincidieron en color y

valor de  $R_f$  con las 5 primeras manchas de EHT. Por su parte, la fracción FE mostró 2 manchas que coincidieron con las dos últimas de EHT y de ella se aisló un producto de color amarillo verdoso que corrió con el frente del solvente. La fracción FC mostró visiblemente 2 manchas: carmelita oscuro de  $R_f=0,13$  y 2 amarilla carmelitosa de  $R_f=0,22$ . En la fracción FB se obtuvieron 3 manchas: carmelita de  $R_f=0,36$ ; amarilla de  $R_f=0,63$  y carmelita amarillenta de  $R_f=0,75$ ; de esta fracción se aisló otro producto de color carmelita con  $R_f=0,36$ . Tanto la fracción FAA como la FA mostraron al visible 1 mancha de  $R_f=0,16$  de color carmelita claro, lo cual parece indicar, teniendo en cuenta la reacción frente a todas las condiciones de revelado, que se trata de un mismo producto.

También se analizaron cromatográficamente patrones de rutina y quercetina, detectándose la presencia del primero en la fracción FB y del segundo patrón en la fracción FE.

A los 2 productos aislados, para determinar su pureza, se les determinó el punto de fusión, obteniéndose como resultado un grado de pureza adecuado, pues la diferencia en el rango de fusión debe ser de 0 a 2 °C, lo cual corresponde con la experiencia realizada, o sea, 237-239 °C para el producto aislado de FE y 350-351 °C para el aislado de FB.

## DISCUSIÓN

En cuanto a las características macromorfológicas de las hojas y tallos de *Phyllanthus orbicularis* HBK, es necesario destacar que se correspondieron con las monografías que sobre la planta se describen en los compendios oficiales.

Al analizar los resultados de la estandarización de la droga cruda (tabla), se comprobó que ésta tiene un grado de pureza adecuado, pues los valores de materia orgánica e inorgánica extraña, así como los de cenizas, tienen valores muy bajos; el contenido de humedad residual se encuentra dentro de los límites establecidos para otras drogas (8-14 %). Al analizar los resultados de sustancias solubles en agua, etanol al 30, 50 y 80 %, podemos señalar que existe mayor cantidad de componentes de polaridad intermedia que de alta polaridad. Todos los valores medios de los índices numéricos determinados se compararon con los de drogas oficiales de las cuales sí existen referencias y se observó que los parámetros estaban dentro de los límites.

En el estudio químico de la especie se decidió cuantificar taninos, flavonoides totales expresados como quercetina y alcaloides totales, por ser metabolitos secundarios que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal con múltiples propiedades farmacológicas, entre ellas, la acción antiviral en la cual nos apoyamos para realizar este trabajo.

Los resultados obtenidos mediante el sistema de extracción y fraccionamiento demuestran bajo las condiciones ensayadas, la existencia de flavonoides en la droga cruda, ya que se logra remover éstos de la droga a las diferentes fracciones, que según los colores y valores de Rf de las manchas se puede plantear que presentan diferente composición, demostrándose además, un comportamiento cromatográfico típico en presencia de reveladores clásicos para estos compuestos.

De manera general, el estudio farmacognóstico y fitoquímico preliminar

nos permite llegar a las consideraciones siguientes:

Las características macromorfológicas determinadas a las hojas y tallos de *Phyllanthus orbicularis* HBK no difieren de la información reportada por la literatura.

En la determinación de los parámetros físico-químicos de control de la calidad de la droga cruda de *Phyllanthus orbicularis* HBK se comprobó que los valores medios obtenidos estaban dentro de los límites generales admitidos para drogas oficiales.

Según las técnicas de tamizaje fitoquímico, se sugiere para la droga cruda de dicha especie la presencia de flavonoides, alcaloides, coumarinas, saponinas, aminoácidos, antocianidinas, mucílagos, triterpenos y/o esteroides, sustancias reductoras, taninos pirocatecólicos, principios amargos y astringentes, glicósidos y quinonas.

Teniendo en cuenta los métodos de cuantificación empleados para conocer la concentración de algunos metabolitos con posible acción antiviral, se sugiere para la droga cruda, la presencia del 11,03 % de taninos, el 4,75 % de flavonoides totales expresados como quercetina y el 4,05 % de alcaloides totales.

El esquema propuesto para la extracción y fraccionamiento de flavonoides en la droga brindó resultados satisfactorios, pues se obtuvieron fracciones muy simples en las cuales estaban presentes dichos compuestos; además, se detectó la presencia de rutina y quercetina, así como 2 compuestos cromatográficamente puros que según los análisis efectuados se sospecha sean flavonoides.

TABLA. *Parámetros de calidad determinados a la droga cruda de Phyllanthus orbicularis HBK*

Parámetros	Resultados (%)
Materia orgánica extraña	0,09 (± 0,016)
Materia inorgánica extraña	0,10 (± 0,020)
Humedad residual	12,25 (± 0,019)
Sustancias solubles en agua	5,71 (± 0,023)
Sustancias solubles en EtOH al 30 %	7,27 (± 0,033)
Sustancias solubles en EtOH al 50 %	9,03 (± 0,020)
Sustancias solubles en EtOH al 80 %	9,01 (± 0,013)
Cenizas totales	2,82 (± 0,019)
Cenizas solubles en agua	1,01 (± 0,015)
Cenizas insolubles en HCl al 10 %	0,56 (± 0,017)

## SUMMARY

We performed a preliminary pharmacognosic and phytochemical study of *Phyllanthus orbicularis* HBK where the macro- and micromorphologic features of stems and leaves of this plant were initially determined. We standardized the raw drug whose average values were within the allowable range if compared to those of the official drugs. Through phytochemical sieving tests, we determined the general chemical composition of this drug in which the presence of flavonoids, alkaloids, coumarins, saponins, aminoacids, anthocyanidins, mucilages, triterpenes and or steroids, reducing substances, pyrocatecholic tannins, bitter and astringent principle, glycosides and quinones. Also some of these metabolites were quantified. Finally, we carried out the extraction and fractioning of flavonoids into very simple fractions having these compounds. Also rutin and quercetin were detected together with two chromatographically pure compounds which, according to the tests applied, are suspected to be flavonoids.

*Subject headings:* PLANTS, MEDICINAL; PLANT STEM; PLANT LEAVES.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Durand E, Miranda M, Cuéllar A. Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia. La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1986:48-50.
2. Norma Ramal. NRSP 309. Medicamentos de origen vegetal. Droga cruda. Métodos de ensayo, 1992:16-20.
3. Norma Ramal. NRSP 312. Medicamentos de origen vegetal. Extracto fluido y tinturas. Método de ensayo, 1992:15-19.

Recibido: 4 de octubre de 1999. Aprobado: 2 de noviembre de 1999.

Ms. *Yamilet Irene Gutiérrez Gaitén*. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Ave 23 No. 21422 entre 214 y 222, La Coronela, municipio La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.