

## Análisis de flavonoides en una fracción butanólica obtenida de *Phyllanthus orbicularis* HBK

### Flavonoids analysis of a butanol fraction obtained from *Phyllanthus orbicularis* HBK

Yamilet Irene Gutiérrez Gaitén<sup>I</sup>; Migdalia Miranda Martínez<sup>II</sup>; Amelia Teresina Henriques<sup>III</sup>; Gloria del Barrio Alonso<sup>IV</sup>

<sup>I</sup>Máster en Tecnología y Control de Medicamentos. Investigadora Auxiliar. Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

<sup>II</sup>Doctora en Ciencias Químicas. Profesora Titular. IFAL. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

<sup>III</sup>Doctora en Ciencias Físico-Químicas. Profesora Titular. Facultad de Farmacia. Universidad Federal de Rio Grande del Sur. Porto Alegre, Brasil.

<sup>IV</sup>Doctora en Ciencias Biológicas. Profesora Titular. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

El presente trabajo comprende el análisis por cromatografía líquida de alta resolución de flavonoides presentes en una fracción butanólica activa frente al virus del herpes simple tipo 1, la cual fue obtenida tras un proceso de extracción y fraccionamiento realizado a la especie *Phyllanthus orbicularis* HBK. Según los resultados del estudio se puede sugerir por medio de la comparación de los tiempos de retención y espectros ultravioletas de los diferentes picos mostrados con el de los patrones ensayados, la presencia de rutina, quercetina y kaempferol en dicha fracción.

**Palabras clave:** *Phyllanthus orbicularis* HBK, flavonoides, cromatografía líquida de alta resolución.

---

#### ABSTRACT

Present paper includes the analysis of high performance liquid chromatography of flavonoids present in an active butanol fraction versus type 1 obtained after extraction and fractionation process performed in HBK *Phyllanthus orbicularis* species. According to study results it is possible to suggest by comparison of retention times and ultraviolet spectra of different peaks showed and assayed patterns, the rutin, quercetin and kaempferol presence in such fraction.

**Key words:** *Phyllanthus orbicularis* HBK, flavonoids, high performance liquid chromatography.

## INTRODUCCIÓN

En Cuba, más de 60 especies de *Phyllanthus* han sido reportadas como endémicas,<sup>1</sup> entre ellas, la especie objeto de estudio *Phyllanthus orbicularis* HBK, conocida vulgarmente con el nombre de alegría y que presenta grandes perspectivas desde el punto de vista terapéutico pues ha demostrado tener en estudios *in vitro*, actividad antiviral contra los virus de la hepatitis B, el herpes simple tipo 2, el herpes bovino tipo 1.<sup>2</sup> Cualidades antigenotóxica, antimutagénica y antioxidante.<sup>3,4</sup> También se pueden referir los resultados contra el herpes simple tipo 1 de fracciones butanólica y acético/acuosa obtenidas de la planta con muy buena actividad y su posible acción sobre los pasos tempranos del ciclo replicativo de dicho virus,<sup>5</sup> destacando además los estudios "in vitro" contra el mismo virus a extractos acuosos de la planta.<sup>6</sup>

Con el propósito de conocer algunos componentes químicos de la fracción butanólica obtenida, la especie se encaminó el trabajo hacia el estudio de flavonoides por cromatografía líquida de alta resolución.

## MÉTODOS

Para el estudio se utilizó como material vegetal la especie *Phyllanthus orbicularis* HBK, colectada en la Cajalbana, provincia de Pinar del Río y herborizada en el Jardín Botánico Nacional con número de herbario 7-220 HAJB, de esta solo se emplearon las hojas y tallos finos.

La droga cruda se sometió a un proceso de extracción y fraccionamiento con una batería de disolventes de polaridad creciente (éter dietílico, cloroformo y butanol), para obtener las correspondientes fracciones etérea, clorofórmica y butanólica, siendo esta última motivo del estudio.

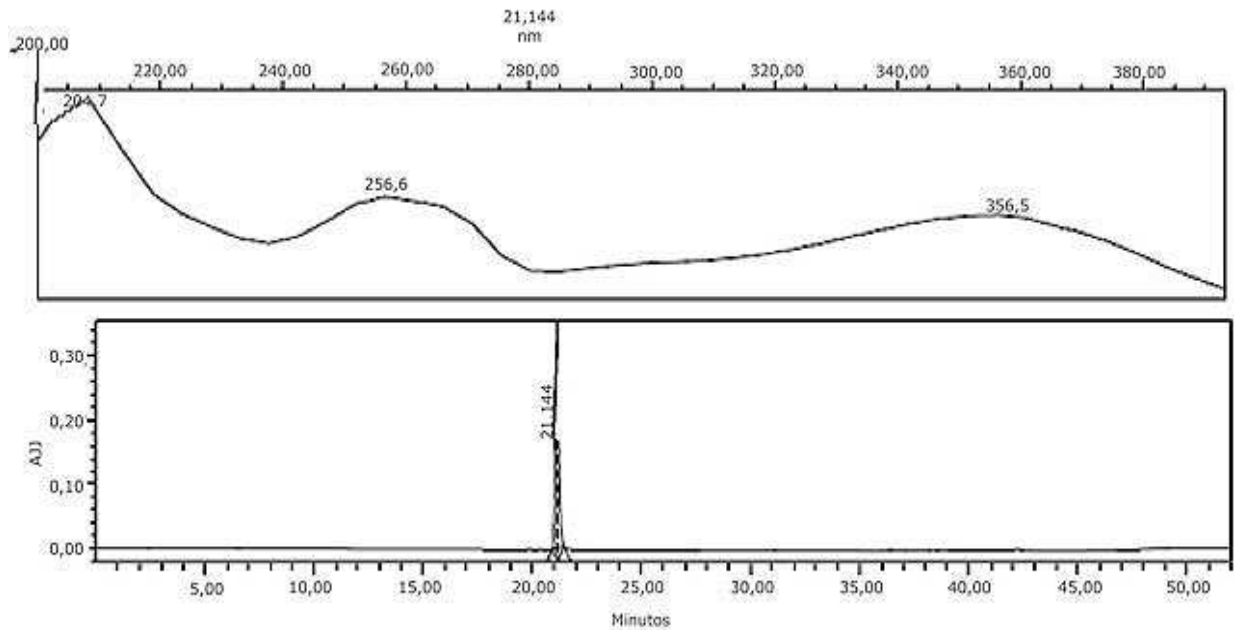
Una porción de la fracción butanólica fue solubilizada en metanol y filtrada a través de membrana hidrofílica de fluoruro de polivilideno (Millipore 0,45 µm; 13 mm); posteriormente fue analizada por cromatografía líquida de alta resolución en un cromatógrafo Waters Alliance modelo 2690 con inyector automático, detector de fotiododo, registrador Empower Software, utilizando una columna de acero inoxidable Nova Pak con sílica octadecilsilanizada (3,0 x 150,0 mm, DI), con 4 µm de tamaño de partícula acoplada a una pre-columna 10 x 4 mm, Bondapack Waters (37-55 µm de tamaño de partícula). La fase móvil estuvo constituida por dos sistemas de disolvente: agua:ácido trifluoracético (100:0,1) y acetonitrilo:ácido trifluoracético (100:0,1) con un flujo de 0,6 mL/min y gradiente lineal. El volumen de inyección fue de 6 µL.

Fueron inyectados patrones de flavonoides: rutina, quercetina y kaempferol.

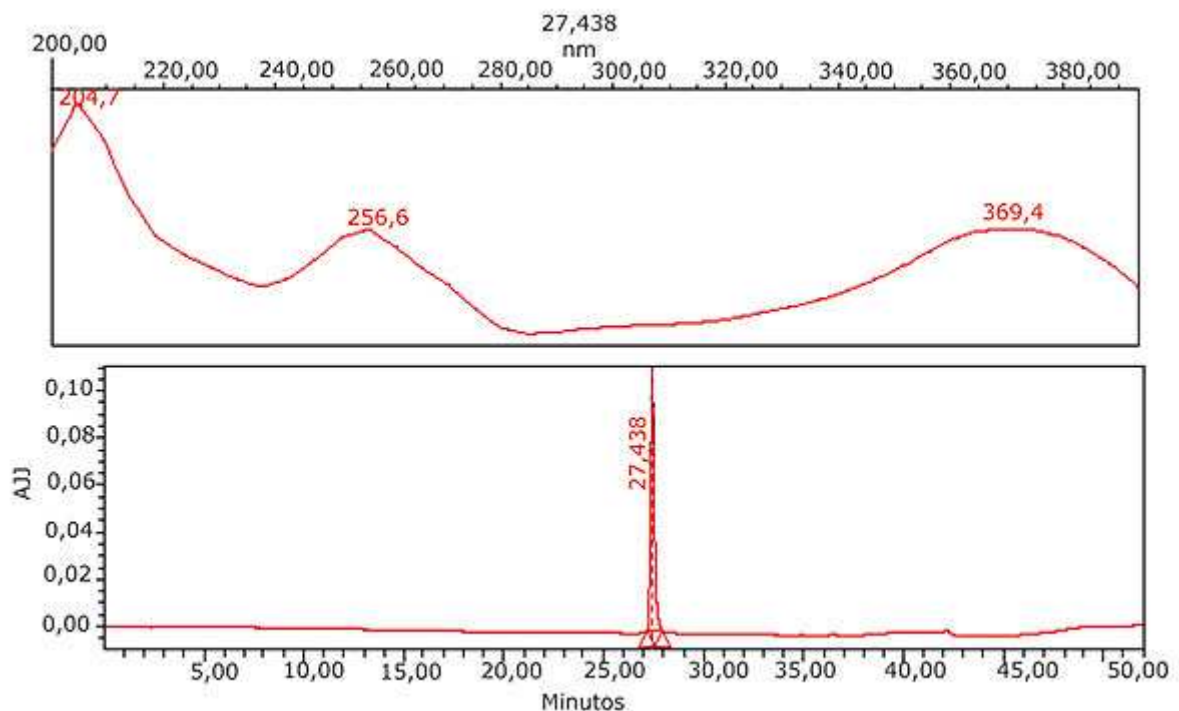
Para la identificación de los picos obtenidos en la fracción se comparó el tiempo de retención de estos y espectro ultravioleta visible (UV/visible) con el de los patrones ensayados, y para confirmación de los picos se realizó una coinyección de la muestra con los patrones que dieron positiva su presencia en la fracción.

## RESULTADOS

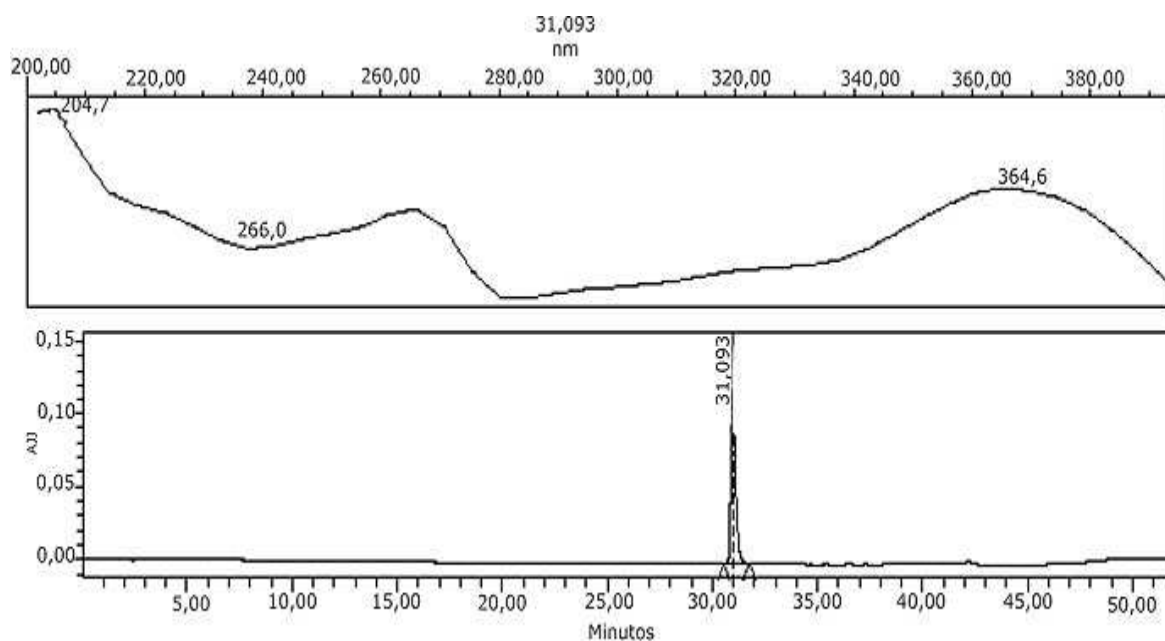
En la prueba de detección cualitativa por cromatografía líquida de alta resolución se inyectaron primeramente los estándares con el propósito de establecer los tiempos de retención. En las figuras 1, 2 y 3 se visualizan los cromatogramas y espectros UV obtenidos para la rutina, quercetina y kaempferol por ser los compuestos identificados en la fracción. Los tiempos de retención establecidos fueron de 21,14, 27,43 y 31,09 min respectivamente; los espectros UV de estos mostraron máximos de absorción a 256 y 356 nm para la rutina, 256 y 369 nm para la quercetina y 266 y 364 nm para el kaempferol.



**Fig. 1.** Cromatograma obtenido para el patrón de rutina y su espectro UV.



**Fig. 2.** Cromatograma obtenido para el patrón de quercetina y su espectro UV.



**Fig. 3.** Cromatograma obtenido para el patrón de kaempferol con su espectro UV.

Como resultado del estudio de la fracción butanólica se pudo constatar la presencia de rutina, quercetina y kaempferol; la figura 4 muestra los flavonoides que pudieron ser identificados con sus tiempos de retención y espectros UV de los picos.

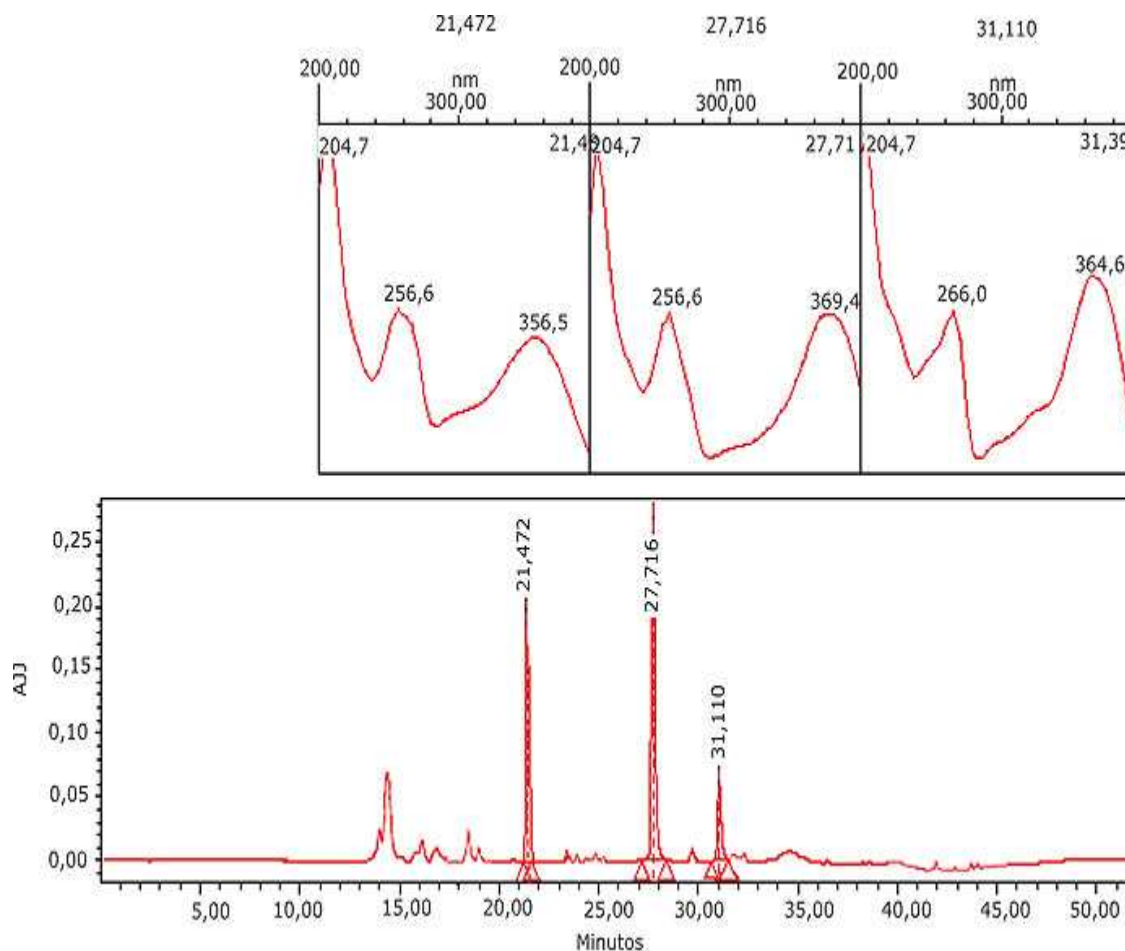


Fig. 4. Cromatograma obtenido para la fracción butanólica y espectro UV de los picos.

Para corroborar la presencia de dichos compuestos en la fracción se efectuó una coinyección de esta con los estándares, evidenciándose un incremento en los valores de áreas según se aprecia en la tabla.

## DISCUSIÓN

La cromatografía líquida de alta resolución ha tenido una creciente difusión y hoy en día representa una de las herramientas más empleadas en los laboratorios analíticos modernos, ya sea dedicado al análisis de productos farmacéuticos, biomoleculares, polímeros y muchos compuestos orgánicos e iónicos. Esta técnica separativa ha sido empleada últimamente en el análisis de flavonoides brindando resultados satisfactorios. En esta se emplean columnas de fase reversa y variadas fases móviles que abarcan diferentes polaridades y sistemas tanto isocráticos como de gradiente, así como diferentes longitudes de onda para la detección.

El análisis por cromatografía líquida de alta resolución se realizó con el objetivo de identificar cualitativamente flavonoides, por ser metabolitos secundarios con acción farmacológica intensa, entre ellas la actividad antiviral, considerando además los antecedentes químicos desde otras especies de *Phyllanthus*.<sup>7-9</sup>

Por su parte el estudio fue dirigido hacia la fracción butanólica por tener esta una marcada actividad antiviral *in vitro* frente al virus del herpes simples tipo 1.<sup>5</sup>

Al inyectar la fracción butanólica se pudo constatar la presencia de rutina (tr= 21,47 min), quercetina (27,71 min) y kaempferol (31,11 min), así mismo se observaron espectros UV con los mismos máximos de absorción que los patrones ensayados. Muchos flavonoides, especialmente flavonas y flavonoles, exhiben 2 bandas de absorción en la región del UV/visible; la banda I representativa del anillo A de estos compuestos aparece en un rango de los 320 a 385 nm y la banda II correspondiente al anillo B ente los 250 y 285 nm,<sup>10,11</sup> todo lo cual está en correspondencia con los resultados obtenidos para cada uno de los compuestos identificados.

Para corroborar la presencia de dichos compuestos en la fracción se efectuó una coinyección de la fracción con los estándares, evidenciándose un incremento en los valores de áreas, según se aprecia en la [tabla](#).

En conclusión, el método de cromatografía líquida de alta resolución desarrollado bajo las condiciones ensayadas proporcionó una separación adecuada de los componentes en la fracción butanólica obtenida de la especie *Phyllanthus orbicularis* HBK, pudiendo sugerir por medio de la comparación de los tiempos de retención y espectro UV de los estándares utilizados, la presencia de rutina, quercetina y kaemferol.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hermano L, Hermano A. Flora de Cuba. Tomo III. La Habana: Imp. P. Fernández y Cía; 1953. p. 50.
2. Del Barrio G, Parra F. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. J Ethnopharmacol. 2000;72:317-22.
3. Ferrer M, Cristófol C, Sánchez A, Fuentes J, Barbé J, Llagostera M. Modulation of rat and human cytochromes P450 involved in PhIP and 4-ABP activation by an aqueous extract of *Phyllanthus orbicularis*. J Ethnopharmacol. 2004;90:273-7.
4. Sánchez AL, Fuentes JL, Fonseca G, Cápiro N, Ferrer M, Alonzo A, et al. Assessment of the potential genotoxic risk of *Phyllanthus orbicularis* HBK aqueous extract using *in vitro* and *in vivo* assays. Toxicol Lett. 2002;136:87-96.
5. Fernández J, Del Barrio G, Romeo B, Gutiérrez Y, Valdés S, Parra F. In vitro antiviral activity of *Phyllanthus orbicularis* extract againts herpes simplex type 1. Phytother Res. 2003;17:980-2.
6. Valdés S, Del Barrio G, Gutiérrez Y, Morier L. Evaluación preliminar de la actividad del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* frente al virus VHS-1. Revista Cubana Med Trop. 2003;55(3):169-73.
7. Calixto JB, Adair RS, Valdir CF, Rosendo AY. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: Their chemistry, pharmacology and therapeutic potential. Med Res Rev. 1998;18(4):225-58.
8. Ham I, Wang T, Cho E, Cho H, Whang W. *Phenolic compounds from Phyllanthus ussuriensis*. Yakhak Hoechi. 2001;45(3):237-44.
9. Shakil N, Pankaj, Kumar J, Pandey R, Saxena D. Nematicidal prenylated flavanones from *Phyllanthus niruri*. Phytochemistry. 2008;69(3):759-64.

---

10. Lock O. Investigación fitoquímica. Métodos para el estudio de los productos naturales. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988. p. 58-87.

11. Markham KR. Flavones, flavonols and their glycosides. Petone: Chemistry Division, DSIR; 1989. p. 205-7.

Recibido: 8 de abril de 2010.

Aprobado: 17 de mayo de 2010.

M. C. *Yamilet Irene Gutiérrez Gaitén*. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. Ave 23 # 21 425 e/ 214 y 222, La Coronela, La Lisa, CP 13 600, La Habana, Cuba. Correo electrónico: [ygutierrez@infomed.sld.cu](mailto:ygutierrez@infomed.sld.cu)