

## Información técnica

Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos (CENCEC)  
Laboratorio Farmacéutico “Roberto Escudero”

## Desarrollo de una técnica analítica para cuantificar las antraquinonas presentes en la *Senna alata* (L.) Roxb. (Guacamaya francesa)

Lic. Yinet Barrese Pérez,<sup>1</sup> MSc. María Elena Hernández Jiménez<sup>2</sup> y MSc. Oscar García Pulpeiro<sup>3</sup>

### Resumen

En el presente trabajo se expone una técnica analítica cuantitativa que permite determinar la concentración de quinonas presentes en la droga cruda y en el extracto fluido de la *Senna alata* (L.) Roxb., conocida popularmente como Guacamaya francesa. Se modificaron algunos aspectos del procedimiento analítico como fueron el tiempo de reflujo, tiempo de desarrollo de color y la forma en que se trabajó con las fases etéreas. Se estudiaron 3 métodos de cuantificación, todos mostraron buena linealidad, exactitud y precisión pero se seleccionó aquel que redujo en mayor porcentaje las interferencias debidas a los productos de degradación y fue el método de espectrofotometría diferencial, que además, mostró mayor especificidad y un menor porcentaje de error. Se empleó una solución de referencia de  $\text{CoCl}_2$ . Las modificaciones introducidas en el procedimiento analítico permitieron disponer de una técnica rápida y sencilla, ideal para ser realizada en un centro de producción farmacéutica.

**Palabras clave:** *Senna alata* (L.) Roxb., droga cruda, extracto fluido, reflujo, fases etéreas.

Actualmente en el mundo y muy especialmente en Cuba se encuentra en auge la Medicina Tradicional Herbolaria. *Senna alata* (L.) Roxb. o *Cassia alata* L. perteneciente a la familia Caesalpinacea y conocida como Guacamaya francesa tiene un amplio uso popular como antiherpético, diurético, anticatarral y contra afecciones cutáneas.<sup>1-4</sup> Investigadores cubanos han comprobado algunas de las propiedades terapéuticas y antimicrobiana de esta planta (Sardiña CR y otros. Uso de la Guacamaya francesa en el tratamiento de micosis superficiales dermatológicas. La Habana, Facultad de Ciencias Médicas “Julio Trigo López”, Departamento de Ciencias Clínicas; 1995) (Guerra Ordóñez M. Guacamaya francesa. Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro*. Informe de Investigación, CIDEM, Mayo 1995) (Ortega E y otros. Estudio de la actividad antimicrobiana *in vitro* de extracto de *Senna alata* frente a cepas de interés en dermatología, Colón, Matanzas, 1994). Su demostrada propiedad antimicótica se debe a las antraquinonas presentes en la composición química de esta planta originaria de América Tropical, de ahí la importancia de desarrollar una técnica analítica, rápida y sencilla, para cuantificar este principio activo con la intención de contribuir al desarrollo de nuevos fármacos.

### Métodos

Se desarrolló una técnica analítica basada en la reacción de *Borntrager* que es el fundamento teórico de los procedimientos descritos en la literatura para cuantificar antraquinonas totales,<sup>1-4,5-7</sup> entre ellos, el método colorimétrico de *Anterhoff* y *Ball*<sup>5-7</sup> empleado en este trabajo. Otra referencia que recoge estos procedimientos es la siguiente: Wall ME, J Am Pharm Assoc Sci. Ed. 43,1. 1954; citado por Domínguez Xarge en Métodos de Investigación Fotoquímica.

México: Editorial Limusa; 1973.p. 281.

La parte de la planta que se empleó para obtener la droga cruda fueron las hojas recolectadas de una planta florecida en época de primavera, cultivada en los terrenos de una residencia sita en calle 80 en el municipio Marianao, La Habana. Estas hojas fueron identificadas por el Dr. *Víctor Fuentes Fiallo* del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT) y depositadas en su herbario con el número 488.

Las hojas fueron extendidas en bandejas perforadas para ser secadas a la sombra a temperatura ambiente y volteadas diariamente durante 7 días. Pasado ese tiempo, fueron pulverizadas hasta polvo fino (0,250 mm) en un molino de cuchilla y martillo marca Dietzmotoren KG de procedencia alemana.

### **Procedimiento técnico**

Se pesaron, en balanza analítica, 5g de droga cruda y se procedió a la hidrólisis y extracción de las antraquinonas mediante la adición de 100 mL de agua y reflujo de la mezcla obtenida en baño de agua hirviendo durante 15 min. Transcurrido este tiempo se logró una solución de la que se extrajeron 2 porciones de 20 mL, a una de estas se le adicionaron 20 mL de ácido clorhídrico 0,1 mol/L y 1,2g de tricloruro férrico (solución I), a la otra porción sólo se le añadieron los 20 ml de ácido clorhídrico 0,1 mol/L (solución II).

Las soluciones I y II fueron refluadas durante 1 h, posteriormente se le realizaron 3 extracciones sucesivas con éter. Las fases etéreas fueron lavadas 2 veces con agua (10 mL) y evaporadas, los residuos fueron redisolueltos con 100 mL de una solución de hidróxido de potasio 1 mol/L, obteniéndose así las soluciones I<sup>I</sup> y II<sup>I</sup>.

De estas soluciones fueron pipeteados 20 mL respectivamente, a cada porción se le añadieron 5 gotas de solución de permanganato de potasio al 5 %, calentando sobre baño de agua luego de cada adición. Este proceder se repitió hasta no observarse decoloración del agente oxidante.

Una vez concluido este proceso degradativo, las fracciones de las soluciones I<sup>I</sup> y II<sup>I</sup> fueron extraídas con 3 porciones de 25 mL de éter en cada caso, las fases etéreas respectivas fueron lavadas 2 veces con 10 mL de agua en cada ocasión y finalmente se evaporaron. El residuo se redisolvió en 20 mL de la solución de hidróxido de potasio 1 mol/L para obtener, respectivamente, las soluciones I<sup>II</sup> y II<sup>II</sup>.

Las soluciones I<sup>I</sup>, II<sup>I</sup>, I<sup>II</sup> y II<sup>II</sup> se sometieron a 30 min de calor en baño para propiciar el desarrollo del color rosado o rojo característico de las oxiantraquinonas en medio alcalino. Los volúmenes respectivos fueron corregidos una vez enfriadas las mismas.

Para precisar el porcentaje a que se podían reducir las interferencias debidas a los productos de degradación que interfieren en las determinaciones del principio activo, se emplearon 3 métodos de cuantificación que se aplicaron por separado a las soluciones I<sup>I</sup>, II<sup>I</sup>, I<sup>II</sup>, y II<sup>II</sup> en las que estaban contenidos los productos de oxidación y las antraquinonas, respectivamente. Finalmente, los porcentajes fueron hallados determinando las relaciones entre los valores obtenidos para las soluciones que contenían las antraquinonas y los respectivos productos de degradación, es decir, se relacionó I<sup>I</sup> con II<sup>I</sup> y I<sup>II</sup> con II<sup>II</sup>.

Los métodos empleados fueron:

- Espectrofotometría directa

Donde la concentración de antraquinonas se obtuvo por comparación con una solución de referencia de  $\text{CoCl}_2$  a través de la siguiente fórmula:

$C_m = A_m \cdot C_r / A_r$  con Absorbancia proporcional a la concentración ( $A \propto C$ ).

$C_m$  es la concentración de antraquinonas.

$A_m$  es la absorbancia de la muestra.

$C_r$  es la concentración de la solución de referencia.

$A_r$  es la absorbancia de la solución de referencia.

### ● Espectrofotometría diferencial

Con este método se elimina la absorción irrelevante cuando la misma se mantiene constante en un rango de longitudes de onda. Se emplea una fórmula similar a la espectrofotometría directa, pero sustituyendo  $A$  por  $\Delta A$ :

$C_m = \Delta A_m \cdot C_r / \Delta A_r$  con  $\Delta A \propto C$

### ● Espectrofotometría de la segunda diferencial de la absorbancia con relación a la longitud de onda.

Permite la eliminación de la absorción irrelevante cuando esta es lineal en un rango de longitudes de onda (pendiente igual o diferente de cero). Se determina la absorbancia a 3 longitudes de onda equidistantes entre sí, la longitud de onda intermedia debe coincidir con el máximo de absorción del compuesto a determinar.

Si se tiene que el polinomio  $A\lambda^1 - 2A\lambda^2 + A\lambda^3$  es proporcional a la concentración del fármaco se puede calcular esta última de forma similar a la descrita en los 2 métodos anteriores, pero sustituyendo  $A$  y  $\Delta A$  por el valor del polinomio.

A dichas variantes de cuantificación empleadas se les realizó una validación preliminar en cuanto a linealidad, precisión y exactitud, para seleccionar la más apropiada para realizar el control de la calidad y los estudios de estabilidad del extracto fluido.

Finalmente se evaluaron las influencias de modificaciones de la técnica sobre los resultados obtenidos con el extracto fluido, para ello se mejoraron condiciones tales como: el tiempo de reflujo, el tiempo para desarrollar el color y el procedimiento a seguir durante el trabajo con la fase etérea (tabla 1 y 2).

Se prepararon 3 replicas de 3 muestras a diferentes concentraciones en relación con el porcentaje nominal promedio en el extracto, es decir, al 50, 100 y 150 % respectivamente, la del 100 % se tomó como referencia debido a la carencia de un patrón específico para antraquinonas, lo que permitió realizar un estimado del porcentaje de recobro (R) (figura 1).

Tabla 1. Absorbancias de las muestras obtenidas a distintos tiempos de reflujo

$\lambda$ (nm)	Muestras			
	R-1h	R-2h	R-3h	R-4h
400	0,69	0,64	0,73	0,82
500	0,375	0,33	0,425	0,42
525	0,325	0,28	0,36	0,36
600	0,095	0,065	0,07	0,10

Tabla 2. Absorbancias de las muestras obtenidas a los distintos tiempos del desarrollo del color

$\lambda$ (nm)	Muestras			
	30' de calor	60' de calor	90' de calor	120' de calor
400	0,40	0,38	0,38	0,38
420	0,335	0,325	0,32	0,33
440	0,285	0,275	0,275	0,28
460	0,26	0,255	0,255	0,265
480	0,275	0,27	0,27	0,28
500	0,285	0,285	0,28	0,29
520	0,265	0,26	0,26	0,27
525	0,255	0,225	0,25	0,255
540	0,21	0,205	0,205	0,205
560	0,14	0,14	0,13	0,13
580	0,08	0,085	0,075	0,0075
600	0,055	0,055	0,045	0,045

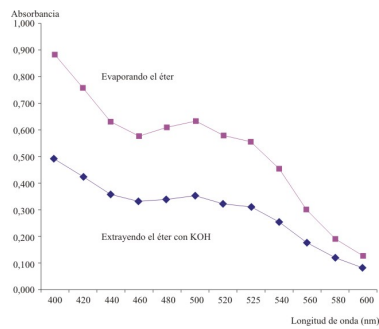
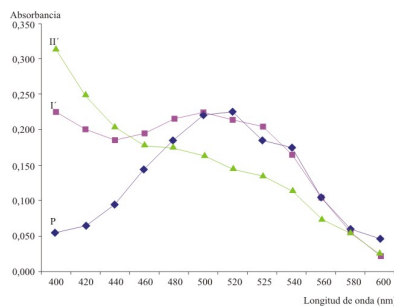


Fig .1. Absorbancias de las muestras obtenidas en la evaporación y extracción del éter.

## Resultados

Se obtuvieron los espectros de absorción exhibidos por las muestras I<sup>I</sup> y II<sup>I</sup> en el rango entre los 400 y 600 nm (figura 2) y los espectros de las soluciones donde se encontraban contenidos los productos de oxidación (figura 3).

Fig. 2. Absorbancias de las muestras I' y II' y del patrón de  $\text{CoCl}_2$ .

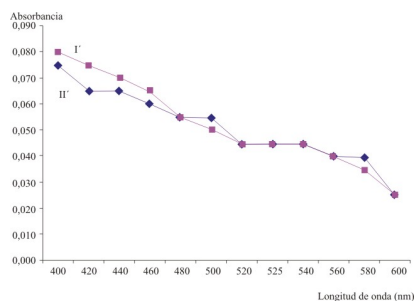


Fig.3. Absorbancias de las muestras I' y II''.

Al aplicarse las variantes matemáticas de cuantificación descritas en los métodos se obtuvieron los siguientes resultados:

#### Espectrofotometría directa

- Hidrólisis en presencia de tricloruro férrico: 21,55 %.
- Hidrólisis en ausencia de tricloruro férrico: 33,3 %.

#### Espectrometría diferencial

- Hidrólisis en presencia de tricloruro férrico: 12,2 %.
- Hidrólisis en ausencia de tricloruro férrico: 21,4%.

#### Espectrometría de la segunda diferencial

- Hidrólisis en presencia de tricloruro férrico: 2,44 %.
- Hidrólisis en ausencia de tricloruro férrico: 100 %.

Los valores de absorción obtenidos de las muestras de extracto fluido cuando se realizó la técnica con las condiciones mejoradas, se muestran en el espectro de la figura 3 y las tablas 1 y 2.

## Discusión

Los espectros de absorción exhibidos por las muestras I<sup>I</sup> y II<sup>I</sup> en el rango entre los 400 y 600nm (figura 1) permitieron inferir que el mayor contenido antraquinónico fue obtenido en el ensayo donde la hidrólisis se había realizado en presencia de tricloruro férrico (solución I<sup>I</sup>), ya que la presencia de este facilita la ruptura del enlace del carbono glicosídico y por tanto, la obtención de quinonas libres y quinonas unidas en forma de glicósidos. Esto se comprobó ya que la solución I<sup>I</sup> fue la que presentó mayores valores de absorbancia y un comportamiento similar al de la solución de referencia, principalmente en el rango de los 520 y 600 nm.

El análisis de los espectros de las soluciones donde se encontraban contenidos los productos de oxidación, soluciones II<sup>II</sup> y II<sup>II</sup>, (figura 3) permitió predecir que estos productos eran capaces de causar interferencias en las determinaciones de antraquinonas.

Con el objetivo de cuantificar a que porcentaje se podían reducir tales interferencias se aplicaron las variantes matemáticas descritas en el acápite de métodos. Se pudo apreciar que en los casos en que la hidrólisis se realizó en ausencia de tricloruro férrico los porcentajes de interferencias fueron mayores. El método matemático escogido como idóneo fue la espectrofotometría diferencial, ya que fue, para ambos procesos hidrolíticos la variante que redujo en mayor grado las interferencias y además porque al hacer las pruebas estadística de estas variantes ( prueba t de 2 colas y un nivel de significación ( $\alpha$ ) de 0,05), fue el método que presentó un valor de recobro cercano al 100 %, lo que es indicio de una buena exactitud.

Durante la selección de los requisitos (condiciones mejoradas) bajo los cuales se debía aplicar la técnica analítica al extracto fluido se alcanzaron los siguientes resultados, que se discuten a continuación:

- Tiempo de reflujo: la observación de las absorbancias para cada muestra obtenida (tabla 1) permitió comprobar que con sólo 1h de reflujo se obtenían altos valores de absorbancias que sólo mostraron un incremento muy ligero al aumentar el tiempo de tratamiento. Esto favorece la rapidez de la técnica, existe una menor degradación de los productos de interés, por calentamiento y por tanto la formación de productos de degradación que interfieran en la técnica.
- Evaporación o extracción del éter: el análisis de la figura 1 permitió seleccionar para la aplicación de la técnica la evaporación del éter, porque la señal registrada para este caso se correspondió con mayores valores de absorbancia. Los valores más bajos correspondieron al proceso de la extracción pues durante su realización existe la posibilidad de que ocurra la pérdida de antraquinonas.
- Tiempo del desarrollo de color: las absorbancias registradas a las muestras resultantes del desarrollo de color a distintos tiempos (tabla 2), demostraron que para lograr el color característico de las oxiantraquinonas en medio alcalino era suficiente aplicar calor por sólo 30 min, puesto que a partir de ese período los valores de absorbancias se mantenían constantes.

Finalmente se puede concluir que se desarrolló una técnica analítica que permitió cuantificar las antraquinonas presentes en la *Senna alata*, técnica a la que se le introdujeron modificaciones que la convierten en un procedimiento rápido y sencillo; ideal para realizar este análisis en un centro de producción farmacéutica.

## Summary

### Analytical technique to quantify the anthraquinones present in *Senna alata* (L.) Roxb. (Guacamaya francesa)

An analytical quantitative technique that allows to determine the concentration of quinones present in the crude drug and in the fluid extract of *Senna alata* (L.) Roxb., popularly known as “Guacamaya francesa”, is exposed. Some aspects of the analytical procedure, such as the reflux time, the color development time and the way in which the ethereal phases were worked with, were modified. 3 methods of quantification were studied. All of them showed a good lineality, exactness and precision, but the differential spectrophotometry method was selected since it reduced in a higher percentage the interferences due to the degradation products, and it also had the highest specificity and the lowest percentage of error. A reference solution of  $\text{CoCl}_2$  was used. The modifications introduced in the analytical procedure allowed to have a fast and simple technique to be applied in a pharmaceutical production center.

**Key words:** *Senna alata* (L.) Roxb., crude drug, fluid extract, reflux, ethereal phases.

## Referencias bibliográficas

1. Fuentes V, Granda M. Conozca las plantas medicinales. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1997.
2. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. 2da ed. T1. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1988.
3. Cuba. Ministerio de Salud Pública. NRSP No. 312. Medicamentos de origen vegetal: extractos fluidos y tinturas. Métodos de ensayos. La Habana: MINSAP; 1992.
4. USP XXIII Pharmacopeia National Formulary. The United Pharmacopeia Convention Inc. Pp. 42, 1995.
5. Larinova M, González-Quevedo Rodríguez M, Corral A, Fuesté V. Estudio comparativo de las hojas y de los extractos de *Aloe arborescens* y *Aloe barbadensis*. Parte 1. Actividad cicatrizante y compuestos antraquinónicos. Rev Cubana Farm. 1989; 23(3):270-7.
6. Rivero Martínez R, Rodríguez Leyes EA, Menéndez Castillo R, Fernández Romero J A, del Barrio Alonso G, González Sanabria ML. Obtención y caracterización preliminar de un extracto de *Aloe vera* L. con actividad antiviral. Rev Cubana Plant Med. 2002;7(1):32-8
7. Gutiérrez R, Roa ML. Determinación de algunos compuestos químicos en cuatro plantas arbóreas forrajeras. Rev Col Cienc Pec. 2003; 16: 2.

Recibido: 12 de septiembre de 2005. Aprobado: 6 de diciembre de 2005.

Lic. *Yinet Barrese Pérez*. Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos. Calle 200 esquina 21, Atabey, Playa. La Habana, Cuba. Telef: 271-8308ext. 121, 122 y 123 e-mail: [yinet@cencec.sld.cu](mailto:yinet@cencec.sld.cu)

<sup>1</sup> **Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Aspirante a Investigador.**

<sup>2</sup> **Máster en Química Farmacéuticas. Especialista A en el control de medicamentos.**

<sup>3</sup> **Máster en Tecnología y Control de Medicamentos. Especialista en Tecnología Farmacéutica.**