

**UNIVERSIDAD DE LA HABANA
INSTITUTO DE FARMACIA Y ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA**

**Estudio Farmacognóstico de
Phyllanthus orbicularis HBK,
especie endémica de Cuba**

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor
en Ciencias Farmacéuticas**

Autora: MC. Yamilet I. Gutiérrez Gaitén

**Tutores: Dr C. Adonis Bello Alarcón
Dra C. Migdalia Miranda Martínez**

**Asesores: Dr C. Mariano Martínez Vázquez
Dr. Jose L. Figueroa Hernández**

Colaborador: MC. Rodney Montes de Oca

**La Habana
2011**

**UNIVERSIDAD DE LA HABANA
INSTITUTO DE FARMACIA Y ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA**



Estudio Farmacognóstico de *Phyllanthus orbicularis* HBK, especie endémica de Cuba

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor
en Ciencias Farmacéuticas**

Autora: MC. Yamilet I. Gutiérrez Gaitén

**Tutores: Dr C. Adonis Bello Alarcón
Dra C. Migdalia Miranda Martínez**

**Asesores: Dr C. Mariano Martínez Vázquez
Dr. Jose L. Figueroa Hernández**

Colaborador: MC. Rodney Montes de Oca

**La Habana
2011**

DEDICATORIA

A mi madre: María

*Por ser mi gran apoyo, mi ejemplo, mi mejor consejera
y mi mayor tesoro*

A mi padre: Alejo

Por ser mi guía

A mi esposo: Noel

Por su comprensión

A mis hermanos: Yoitsis y Enrique

Mis consejeros



AGRADECIMIENTOS

El camino recorrido para cumplir este anhelado sueño no ha sido fácil, muchas horas de desvelo, estrés y sufrimiento lo han acompañado, pero al fin llegué a la meta, gracias a mi perseverancia y el apoyo de muchas personas que permitieron que este trabajo llegara a feliz término.

Agradezco en primer lugar a mi familia, en especial a mi madre y esposo por su apoyo constante y sacrificio sin esperar nada a cambio, por enseñarme que si se puede y que no importa el camino que haya que recorrer cuando uno quiere alcanzar un objetivo, gracias por estar siempre a mi lado.

Mi gratitud a mi segunda madre Dra. Migdalia Miranda Martínez, por su valiosa tutoría, certera dirección y orientación del trabajo, por no escatimar esfuerzo ni hora de descanso para brindarme su apoyo, gracias por estar ahí cuando te necesité.

Agradezco a mi otro tutor Dr. Adonis Bello Alarcón por sus oportunos argumentos acerca del trabajo y dirección del mismo.

Especial agradecimiento al Instituto de Química de la Universidad Autónoma de México (UNAM), en particular a mis asesores Dr. C. Mariano Martínez Vázquez y al Dr. Jose Luis Figueroa Hernández por su valiosa asesoría, amistad, solidaridad, sin los cuales no hubiera sido posible alcanzar gran parte de los resultados de este trabajo. Igualmente agradezco a los compañeros del laboratorio 1-4 por su apoyo y comprensión.

Mil gracias al MC. Rodny Montes de Oca por su valiosa colaboración, gran parte de estos resultados te los debo a ti.

Deseo destacar el apoyo brindado del Dr. Oscar Ros, Dr. Juan A Payrol, Elda Díaz, los cuales de una forma u otra se han ocupado y preocupado por mi superación, brindándome además el apoyo material necesario para la confección

del documento final. Agradezco además, a Mayrita, Nassandy y Tania por su valiosa y desinteresada ayuda.

Agradezco a todos mis compañeros del Departamento de Farmacia, al Dr. Osmany Cuesta, Dr. Armando Cuéllar, al MC. Ramón Scull, a las Doctoras Mercy, Ingrid y Viviana por sus certeros criterios y argumentos, a Regli, Eva, Raisa, por su preocupación. Con mucha gratitud y cariño deseo destacar el apoyo incondicional de mis compañeros de la Farmacia experimental, los que han estado a mi lado en las buenas y en las malas, a Gladys, Celita, Midalita, Mary, Enrique, Margarita, a la viejuca Candina, a mi querido amigo Jose Luis Mayoral, a Isis y Gledys, gracias por su preocupación y espero contar siempre con ustedes. También agradezco a los compañeros de Control Biológico, del Dpto. de Tecnología y Control de medicamentos, particularmente a la Dra. Olga Maria Nieto, y a las siempre dispuestas muchachas del Dpto. de Alimento.

Sinceros agradecimientos al Dr. Marco Antonio Dehesa, a la MC. Saely Verona y a la Dra. Amelia Teresina Henriques de la Universidad Federal de Río Grande del Sur de Brasil, por contribuir con los primeros hallazgos de mi tesis.

Quisiera agradecer a los oponentes, tanto del acto de predefensa como de la defensa, por el tiempo dedicado, así como por los señalamientos realizados y sugerencias.

A todos los que de una forma u otra han contribuido a que este sueño se haya hecho realidad.

Muchísimas gracias

ABREVIATURAS Y SIGLAS

- AcOEt:** Acetato de etilo
- δ :** Corrimiento químico
- CC:** Cromatografía en columna
- CCD:** Cromatografía en Capa Delgada
- CDCl₃:** Cloroformo deuterado
- CD₃OD:** Metanol deuterado
- CD₃COCD₃:** Acetona deuterada
- DMSO-D₆:** Dimetilsulfóxido deuterado
- CG/EM:** Cromatografía Gaseosa/ Espectrometría de Masas
- CLAR:** Cromatografía Líquida de Alta Resolución
- DEPT:** Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Desacoplamiento por transferencia de polarización)
- D₂O:** Agua deuterada
- DO:** Densidad óptica
- EDTA:** Etilen-diamin-tetra acético
- FRAP:** Ferric Reduction Antioxidant Power (Potencial de Reducción Total)
- IR:** Espectrometría de infrarrojo
- Min.:** Minutos
- P-PO:** Pirogalol-pirogalol oxidado
- RMN:** Resonancia magnética nuclear.
- RMN-¹³C:** Resonancia magnética nuclear de carbono 13.
- RMN-¹H:** Resonancia magnética nuclear de protones.
- SOD:** Superóxido dismutasa
- TMS:** Tetrametilsilano
- TPA:** 13-acetato de 12-O-tetradecailforbol
- Tr:** Tiempo de retención
- Tris:** (Hidroximetil)-aminometano
- UV:** Ultravioleta
- VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

Se realizó por primera vez el estudio farmacognóstico de *Phyllanthus orbicularis* HBK pudiendo establecer las características micromorfológicas de las hojas, los tallos y la droga en polvo, así como el secado, almacenamiento y la influencia de los principales parámetros físico-químicos, contenido de fenoles totales y del flavonoide rutina en función de la época de recolección.

El estudio farmacognóstico permitió establecer las especificaciones de calidad de la droga cruda *P. orbicularis* HBK, indispensables para la confección de las futuras Normas de Control de la Calidad de la especie como posible droga medicinal.

El método de extracción y fraccionamiento aplicado al material vegetal para el estudio fitoquímico, posibilitó la obtención de extractos de diferentes polaridades (hexánicos, acetato de etilo y metanólicos), los que fueron caracterizados químicamente en función de la época de recolección. Se identificaron por CG-EM en los extractos apolares, 51 posibles nuevos componentes para la especie, de ellos, nueve reportes para el género *Phyllanthus*, conjuntamente se aislaron y caracterizaron por métodos espectroscópicos (IR, RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT) cuatro flavonoides en el extracto polar (apigenina, rutina, quercetina y kaempferol), informándose por primera vez para el género y la especie la apigenina en forma de aglicón.

Se evaluaron de forma preliminar algunas propiedades farmacológicas, donde se notifica para los extractos metanólicos y los flavonoides aislados (rutina y quercetina), el efecto antioxidante. Se demostró por primera vez, que los extractos de *P. orbicularis* HBK presentan actividad antiinflamatoria por vía tópica al menos en el modelo de inducción de edema por TPA, así como sus propiedades citotóxicas en diferentes líneas celulares de cáncer humano. La transformación química de los flavonoides mayoritarios de la planta (rutina y quercetina), así como del extracto que les dio origen, mediante una reacción de acetilación, contribuyó en gran medida a potenciar las actividades antiinflamatorias y citotóxicas, no siendo así para los ensayos antioxidantes.

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
I.1. Familia <i>Phyllanthaceae</i> . Generalidades.....	6
I.2. Género <i>Phyllanthus</i>	6
I.2.1. Aspectos generales.....	6
I.2.2. Usos en medicina tradicional.....	7
I.2.3. Composición química.....	8
I.2.4. Actividad biológica.....	9
I.2.5. Relación grupo químico-actividad farmacológica.....	12
I.3. <i>Phyllanthus orbicularis</i> HBK.....	13
I.3.1. Clasificación taxonómica y descripción botánica.....	13
I.3.2. Habitat y distribución.....	14
I.3.3. Usos atribuidos tradicionalmente.....	14
I.3.4. Composición química.....	14
I.3.5. Actividad biológica y toxicidad.....	15
I.4. Consideraciones generales sobre el control de calidad de materias primas de origen vegetal.....	16
I.5. Algunas consideraciones sobre métodos de extracción, separación y caracterización de productos naturales.....	18
I.5.1. Métodos de extracción.....	18
I.5.2. Métodos de separación y caracterización.....	19
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	21
II.1. Estudio farmacognóstico de <i>Phyllanthus orbicularis</i>	21
II.1.1. Recolección y selección del material vegetal.....	21
II.1.2. Caracterización botánica de la especie.....	21
II.1.2.1. Evaluación macromorfológica de hojas y tallos.....	21
II.1.2.2. Evaluación micromorfológica de hojas y tallos.....	22
II.1.3. Secado.....	22
II.1.4. Almacenamiento.....	23
II.1.5. Parámetros físico-químicos.....	23

II.1.5.1. Materia orgánica extraña e inorganica extraña.....	23
II.1.5.2. Humedad residual.....	24
II.1.5.3. Sustancias solubles o extraíbles.....	24
II.1.5.4. Cenizas totales, cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico al 10%.....	25
II.1.6. Identificación de metabolitos secundarios por tamizaje fitoquímico.....	26
II.1.7. Cuantificación de fenoles totales y determinación cualitativa y cuantitativa del flavonoide rutina.....	27
II.2. Estudio fitoquímico de <i>Phyllanthus orbicularis</i> HBK.	28
II.2.1. Extracción y fraccionamiento del material vegetal.....	28
II.2.2. Análisis por cromatografía en capa delgada de los extractos.....	28
II.2.3 Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).....	29
II.2.4. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).....	30
II.2.5. Fraccionamiento en columna cromatográfica.....	31
II.2.6. Reacción de acetilación.....	31
II.2.7. Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos aislados y sus derivados acetilados.....	32
II.2.7.1. Punto de fusión.....	32
II.2.7.2. Espectroscopía de infrarrojo	32
II.2.7.3. Resonancia magnética nuclear	32
II.3. Algunas evaluaciones biológicas preliminares realizadas a los extractos y compuestos aislados de <i>Phyllanthus orbicularis</i> HBK.	33
II.3.1. Actividad antioxidante.....	33
II.3.1.1. Determinación del potencial de reducción total.....	33
II.3.1.2. Determinación de la actividad secuestradora de radicales superóxido.....	34
II. 3. 2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	35
II. 3. 3. Evaluación de la actividad citotóxica.....	36
II. 4. Análisis estadístico.....	37

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
III. ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO DE <i>Phyllanthus orbicularis</i> HBK.....	38
III.1. Caracterización botánica de la especie.....	38
III.1.1. Evaluación macromorfológica de las hojas y tallos.....	38
III.1.2. Evaluación micromorfológica de las hojas y tallos.....	39
III.2. Estudio de secado.....	42
III.3. Estudio de almacenamiento.....	43
III.4. Parámetros físico-químicos determinados al material vegetal.....	45
III.4.1. Contenido de materia orgánica e inorgánica extraña.....	45
III.4.2. Humedad residual.....	45
III.4.3. Sustancias solubles o extraíbles.....	46
III.4.4. Cenizas totales, cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10%.....	47
III.5. Identificación de metabolitos secundarios por tamizaje fitoquímico...	48
III.6. Cuantificación de fenoles totales y determinación cualitativa y cuantitativa del flavonoide rutina.....	48
III.7. Consideraciones generales del estudio farmacognóstico.....	50
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
IV. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE <i>Phyllanthus orbicularis</i> HBK.....	52
IV.1. Extracción y fraccionamiento del material vegetal.....	52
IV.2. Análisis por cromatografía en capa delgada de los extractos.....	52
IV.3. Análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).....	54
IV.3.1. Análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas de los extractos hexánicos.....	55
IV.3.2. Análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas de los extractos de acetato de etilo.....	61
IV.4. Análisis de los extractos metabólicos.....	69
IV.4.1. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución.....	70
IV.4.2. Fraccionamiento en columna cromatográfica.....	72
IV.4.3. Reacción de acetilación.....	74
IV.5. Análisis de los compuestos aislados.....	74
IV.5.1. Compuesto 1.....	75

IV.5.2. Compuestos 2 y 4.....	76
IV.5.3. Compuestos 3 y 6.....	77
IV.5.4. Compuesto 5.....	77
IV.5.5. Compuestos 7 y 9.....	78
IV.5.6. Compuestos 8 y 10.....	79
IV.6. Consideraciones generales del estudio fotoquímico.....	82
CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	83
V. ALGUNAS EVALUACIONES BIOLÓGICAS PRELIMINARES REALIZADAS A LOS EXTRACTOS Y COMPUESTOS AISLADOS DE <i>Phyllanthus orbicularis</i> HBK.....	83
V.1. Actividad antioxidante.....	83
V.1.1. Determinación de la capacidad antioxidante con carácter reductor.....	83
V.1.2. Determinación de la actividad secuestradora de radicales superóxidos.....	84
V.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	85
V.3. Evaluación de la actividad citotóxica.....	86
V.4. Consideraciones generales del estudio biológico.....	88
DISCUSION GENERAL.....	90
CONCLUSIONES.....	95
RECOMENDACIONES.....	97
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

La *Farmacognosia* es la más antigua de las Ciencias Médicas, ya que el hombre primitivo tuvo que aprender a distinguir los productos que le servían de alimento y los curativos, de los tóxicos. *Dentro de las Ciencias Farmacéuticas es la rama que se ocupa del estudio de las drogas de origen natural, ya sea vegetal o animal.*

Esta ciencia tiene diversos objetivos que comprenden la clasificación taxonómica, botánica, métodos óptimos de producción tanto a pequeña como a gran escala, que incluyen el cultivo, mejora, recolección y conservación. También tiene como propósitos, la extracción de los principios activos, establecer la composición química desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo, controlar la calidad de una droga desarrollando métodos de análisis para estos fines y entre otros, corroborar la actividad farmacológica atribuida.

La Farmacognosia de principios de la segunda mitad del siglo XX no es la misma de los albores del siglo XXI, siendo significativa la transformación ocurrida en las dos últimas décadas del siglo XX, ya que en sus inicios esta ciencia estaba dedicada a ser una materia de descripción botánica con componentes en química y biología. En la actualidad, ha tomado relevancia debido a la introducción de nuevas metodologías experimentales y al crecimiento del uso de fitoterapéuticos en la práctica farmacéutica moderna. El término ha sido recientemente definido como *una Ciencia Molecular que explora las relaciones de estructura-actividad que ocurren naturalmente con una droga potencial* (Verpoorte, 2000; Kinghorn, 2001, 2002, Evans, 2002).

Se diferencia de la Fitoquímica en que no solo busca la nueva estructura, sino la influencia que puede tener sobre la misma las condiciones ecológico-geográficas, el método de secado, de almacenamiento, la edad, y entre otras cuestiones, buscar alternativas terapéuticas que no siempre impliquen el principio activo aislado.

Las plantas medicinales y aromáticas son una parte fundamental de los sistemas de medicina tradicional y una importante fuente de material de estudio de la Farmacognosia. A pesar de su amplio uso en países iberoamericanos, se han

estudiado pocas con la profundidad que se requiere para la aplicación médica; los datos de seguridad y eficacia están dispersos y disponibles solo para un número reducido de ellas en algunas farmacopeas, muchas carecen de una metodología que garantice su calidad, lo cual limita el desarrollo, producción y comercialización de fitomedicamentos, tanto en los mercados nacionales como internacionales.

Por consiguiente, para contar con una alternativa terapéutica de fuente vegetal, que reúna los requisitos de calidad, seguridad y eficacia, es indispensable demostrar sobre bases científicas, la utilidad de una planta medicinal y cumplir con todo lo establecido en los lineamientos internacionales para la evaluación y control de los medicamentos herbarios (WHO, 2000a, 2000b). Un aspecto vital para lograr este propósito es la determinación de parámetros farmacognósticos, los que constituyen una garantía de que la materia prima proveniente de los campos de cultivos ha sido procesada adecuadamente (Acosta y Rodríguez, 2006), así como la extracción, aislamiento e identificación de constituyentes de las drogas vegetales, lo cual fundamenta en gran medida el uso de las mismas (Dohadwalla, 1985; Bruhn, 1989; Alberson, 1990).

Entre las especies ampliamente utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de diversas afecciones como trastornos del aparato genitourinario, infecciones intestinales, ictericia, diabetes, enfermedades virales, etcétera, se encuentran las correspondientes al género ***Phyllanthus* (Phyllanthaceae)**; éstas se localizan en regiones tropicales, subtropicales, en Asia y África (Calixto y cols., 1997, 1998). En Cuba han sido reportadas como endémicas más de 60 especies de ***Phyllanthus*** no totalmente estudiadas (Hermano L. y Hermano A., 1953), entre ellas, ***Phyllanthus orbicularis* HBK**, conocida con el nombre trivial de Alegría y que ofrece grandes perspectivas desde el punto de vista terapéutico. Investigadores cubanos han demostrado para el extracto acuoso, actividad antiviral contra los virus de la Hepatitis B, el Herpes Simple tipo 1 y 2, el Herpes Bovino tipo 1 (Del Barrio y Parra, 2000; Fernández y cols., 2003; Valdés y cols., 2003), cualidades antígenotóxicas, antimutagénicas, antioxidantes, entre otras (Ferrer y cols., 2002; Sánchez y cols., 2002).

Sin embargo, desde el punto de vista fitoquímico los reportes sobre esta especie son escasos, destacando el de Berazaín y cols. (2007a, 2007b) quienes refieren que en los tejidos de tallos y hojas de la planta se acumula níquel y los de Álvarez y cols. (2009), que revelan la presencia de quercetina, rutina, procianidina, catequina, epicatequina, ácido protocatéquico y derivados del ácido gálico en el extracto acuoso.

PROBLEMA CIENTÍFICO

La especie *P. orbicularis* HBK ha demostrado tener potencialidad farmacológica fundamentalmente como antiviral, sin embargo, son escasos los estudios fitoquímicos y carece de otros que permitan establecer su calidad, aspectos importantes a tener en cuenta para su registro como droga vegetal y posible introducción en la terapéutica. Teniendo en cuenta estos antecedentes se plantea la siguiente hipótesis.

HIPÓTESIS

El estudio farmacognóstico y fitoquímico de *P. orbicularis* HBK permite establecer las especificaciones de calidad de la droga e identificar los principales metabolitos secundarios presentes en la misma.

Para demostrar dicha hipótesis se proponen como objetivos de trabajo:

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar desde el punto de vista farmacognóstico y fitoquímico a la especie *P. orbicularis* HBK.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ❖ Establecer las características morfoanatómicas, tanto microscópicas y macroscópicas, como organolépticas, que posibiliten su caracterización.
- ❖ Determinar los principales parámetros farmacognósticos de la especie que permitan establecer su calidad como droga vegetal en función de la época de recolección.
- ❖ Aplicar un método de extracción y fraccionamiento para el estudio de su composición química.

- ❖ Identificar por métodos espectroscópicos los principales metabolitos presentes en cada uno de los extractos obtenidos de la planta.
- ❖ Determinar de forma preliminar algunas propiedades farmacológicas no evaluadas para la especie.

La novedad científica está determinada por los siguientes resultados:

- ❖ Se informa por primera vez la caracterización farmacognóstica de la planta, siendo trascendental la determinación de las características micromorfológicas de hojas y tallos de la especie, así como sus parámetros físico-químicos de calidad.
- ❖ Se identifican por Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masas en los extractos apolares 51 posibles nuevos componentes para la especie, de ellos nueve reportes para el género *Phyllanthus*.
- ❖ Se aísla e identifica en el extracto polar la apigenina en forma de aglicón, informándose por primera vez para el género y la especie.
- ❖ Se notifica para el extracto metanólico el efecto antioxidante. Se determina por primera vez, que los extractos de *P. orbicularis* HBK presentan actividad antiinflamatoria por vía tópica al menos en el modelo de inducción de edema por TPA, y las propiedades citotóxicas en diferentes líneas de cáncer humano.

La originalidad del trabajo está dada en que por vez primera se realiza en el país un estudio farmacognóstico integral de una especie endémica, que comprende la caracterización micromorfológica, el estudio de secado, el almacenamiento, la influencia de parámetros físico-químicos y la composición química en función de la época de recolección, aplicando métodos modernos de análisis estructural y la valoración farmacológica de la especie.

Aporte práctico y social

La especie estudiada pudiera constituir un recurso potencial en el campo de los productos fitoterapéuticos, ampliando el conocimiento químico-farmacognóstico de la rica flora cubana.

Por otra parte, los resultados obtenidos pueden contribuir en gran medida al desarrollo de las normas de control de la calidad de la especie y por ende al registro de la misma como posible droga vegetal medicinal, sentando las bases para otros estudios químicos y biológicos.

El reportar datos de caracterización de compuestos presentes en la planta, posibilita continuar investigaciones fitoquímicas, que unidas a tamizajes farmacológicos pudieran definir la real potencialidad terapéutica de la especie.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1. FAMILIA *PHYLLANTHACEA*. GENERALIDADES

La familia *Phyllanthaceae* de las Angiospermas es reconocida por el actual sistema de clasificación APG III (2009) e incluye géneros que anteriormente formaban parte de la familia *Euphorbiaceae* (Hoffmann y cols., 2006). Se extiende por todos los continentes del planeta, localizándose principalmente en regiones pantropicales. Abarca 59 géneros (dentro de los cuales se encuentran *Actephila*, *Aerisilvaea*, *Amanoa*, *Baccaurea*, *Bischofia*, *Bridelia*, *Celianella*, *Chascotheca*, *Discocarpus*, *Hymenocardia*, *Phyllansea*, *Phyllanthus*, *Reverchonia*, *Spondianthus*, *Thecacoris*, *Uapaca*, *Wielandia*, *Zimmermannia*, entre otros) y 1745 especies (Stevens, 2001; Hoffmann y cols., 2006; Dhandayuthapani y cols., 2011).

Está constituida por plantas herbáceas o leñosas, encontrando árboles o arbustos que en ocasiones presentan látex. Las hojas por lo general tienen una venación pinnada y márgenes enteros. Las flores son pequeñas y de forma variable (Hoffmann y cols., 2006; Kathriarachchi y cols., 2006).

I.2. GÉNERO *PHYLLANTHUS*

I.2.1. ASPECTOS GENERALES

El género *Phyllanthus* es el más amplio de la *Phyllanthaceae* y fue descrito por primera vez en 1737 por Linneus. Está compuesto aproximadamente por 750-1200 especies, subdivididas entre 10 y 11 subgéneros, entre los que se pueden citar: *Isocladus*, *Kirganelia*, *Cicca*, *Emblica*, *Conani*, *Gomphidium*, *Phyllanthodendron*, *Xylophylla*, *Bothyanthus*, *Ericocus* y *Phyllanthus* (Kathriarachchi y cols., 2005; 2006). Alrededor de 200 especies se encuentran ampliamente distribuidas en las Américas, principalmente en el Caribe y en Brasil (Webster, 1967; Unander y cols., 1990; 1991; 1992; 1995; Calixto y cols., 1997; 1998). En Cuba se encuentran aproximadamente 60 especies, muchas de ellas endémicas (Hermano L. y Hermano A., 1953).

I.2.2. USOS EN MEDICINA TRADICIONAL

Las especies del género *Phyllanthus* han sido utilizadas tradicionalmente como remedios antipiréticos, laxantes, tónicos, antibacterianos, antiespasmódicos, antidiabéticos, para el tratamiento de infecciones intestinales y urinarias, como antivirales, etcétera (Petti y cols., 1988; Mensah, 1990; Calixto y cols., 1997; 1998) en lugares como Cuba (Roig, 1974), el Caribe (Weniger y Robineau, 1988), en la parte sur y central de América, China, Nigeria, Filipinas y África (Thyagarajan y cols., 1982; Unander y cols., 1990, 1995).

En Cuba, en la provincia de Pinar del Río se emplea el cocimiento de la planta entera de *P. niruri* contra las fiebres palúdicas y la hidropesía. Las raíces, hojas y ramitas son consideradas como desobstruyentes, diuréticas y a la vez fortificantes (Roig, 1974).

Según Roig (1974), en la India las especies de este género se usaban contra afecciones venéreas. Las raíces, después de raspada o molinada en leche de vaca, han sido utilizadas con éxito para curar la ictericia, como tónico, antidiabética y contra cólicos nefríticos. Específicamente los frutos de *P. emblica* son empleados como purgantes, en otros casos como remedio refrescante en las afecciones biliosas, en las náuseas y en infusiones contra la fiebre y la diabetes.

En Brasil estas plantas son conocidas popularmente como “quebra pedra”, “erva pombinha”, “arrebenta pedra”, etcétera. Las infusiones de hojas, tallos y raíces de *P. niruri*, *P. urinaria*, *P. corcovadensis*, *P. amarus*, *P. tenellus*, *P. caroliniensis* y *P. sellowianus*, son utilizadas para el tratamiento de disfunciones renales y urinarias, infecciones intestinales, diabetes y hepatitis B (Morton, 1981; Oliver, 1983; Unander y cols., 1990; 1991; 1992; 1995; Calixto y cols., 1997; 1998).

En Haití se emplea la decocción de las hojas de muchas especies (*P. niruri*, *P. amarus*, *P. stipulatus*, entre otros) en baños para combatir la fiebre (Weniger y Robineau, 1988). *P. amarus* es conocido en la Cuenca del Caribe como antidiabético, diurético, estomacal y vermífugo (Morton, 1981).

La decocción de algunas plantas del género, en América Central y las Antillas se utiliza como depurativa y diurética. En el caso particular de *P. acidus*, las hojas son consideradas sudoríficas, diaforéticas, las semillas son catárticas y la raíz es un purgante violento (Manfred, 1947; Roig, 1974; Morton, 1981).

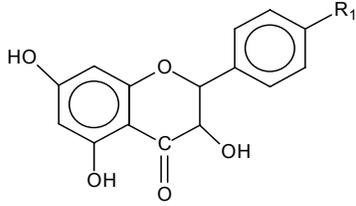
I.2.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Las especies del género *Phyllanthus* han sido extensamente estudiadas desde el punto de vista fitoquímico, conduciendo la investigación al aislamiento y caracterización de muchas clases de compuestos orgánicos tales como flavonoides (figura 1), triterpenos (figura 2), ácidos fenólicos (figura 3), taninos (figura 4), alcaloides (figura 5), lignanos (figura 6), glicósidos (figura 7), coumarinas, entre otros (Jiménez y Bernal, 1989; Calixto, 1997; 1998). En la tabla I se resumen los principales metabolitos reportados por algunos autores para diferentes especies del género *Phyllanthus*.

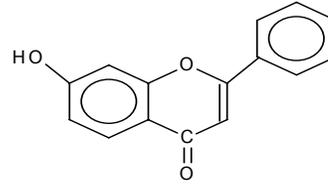
Es de notar en la mencionada tabla que los terpenos, lignanos y fenoles han sido los compuestos más identificados, pudiendo destacar dentro del primer grupo a los triterpenoides pentacíclicos lupeol y filantol (derivado del ursano), sin restarle importancia a los esteroides β -sitosterol y estigmasterol, presentes también en muchas especies y muy abundantes en la naturaleza.

Del grupo de los lignanos se destacan la filantina, un secolignano miembro de la clase de los diarilbutanos (Satyanarayana y cols., 1988) y la hipofilantina; los mismos han sido identificados por cromatografía líquida de alta resolución en especies como *P. amarus*, *P. fraternus*, *P. niruri*, *P. urinaria*, *P. maderaspatensis*, *P. virgatus* y se consideran marcadores químicos del género (Dhalwal y cols., 2006; Khatoon y cols., 2006; Murugaiyah y cols., 2007; Srivastava y cols., 2006).

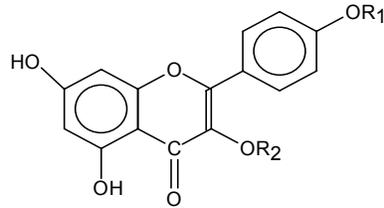
La detección de compuestos de naturaleza fenólica, especialmente flavonoides ha sido importante, destacando a la rutina y quercetina dentro de este grupo, los cuales son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal, con acción farmacológica importante.



R₁ = 0- α -L-(-)Ramnosa
Kaempferol-4'-ramnopiranosido



7- hidroxiflavona



R₁ = OH; R₂ = H

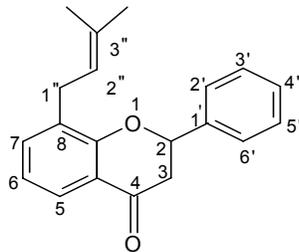
R₁ = OH; R₂ = Glucosa-Ramnosa

R₁ = H; R₂ = Glucosa

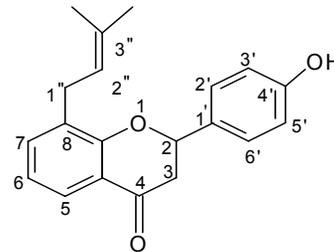
Quercetina

Rutina

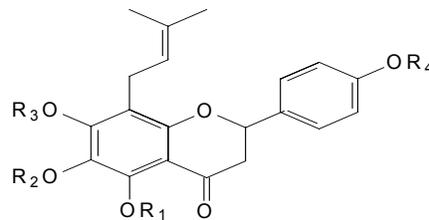
Astragalina



2-(fenil)-8-(3-metil-but-2-enil)-croman-4-ona



2-(4-hidroxifenil)-8-(3-metil-but-2-enil)-croman-4-ona

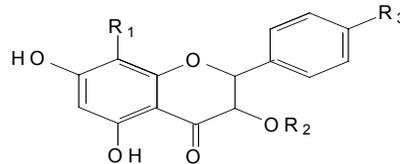


1-) R₁ = Ramnoglicosil; R₂; R₃; R₄ = H

2-) R₁; R₂; R₃; R₄ = H

5,6,7,4'-trihidroxi-8-(3-metilbut-2-enil) flavanona-5-O-rutinósido

5,6,7,4'-tetrahidroxi-8-(3-metilbut-2-enil)-flavanona

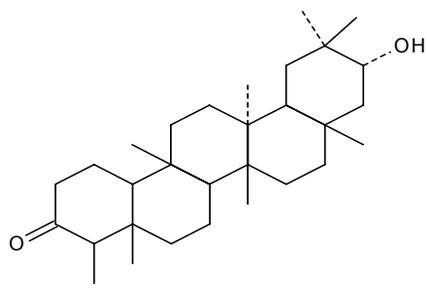


Galangin-8-sulfonato: R₁=SO₃Na, R₂=H, R₃=H

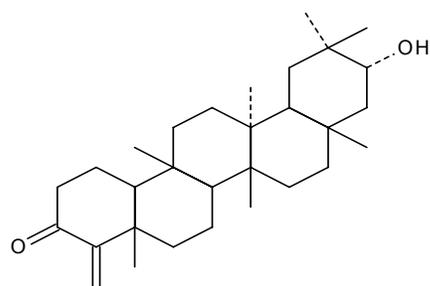
Galangin-3-O- β -D-glucósido-8-sulfonato: R₁=SO₃Na, R₂=glucosil, R₃=H

Kaempferol-8-sulfonato: R₁=SO₃Na, R₂=H, R₃=OH

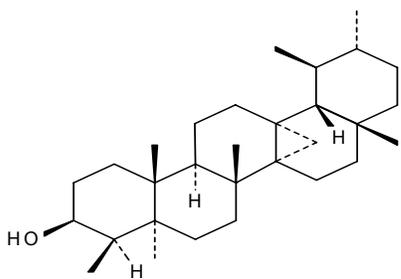
Figura 1. Flavonoides aislados de especies de *Phyllanthus*



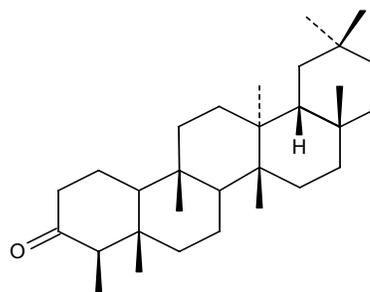
21-α-hidroxifriedelan-3-ona



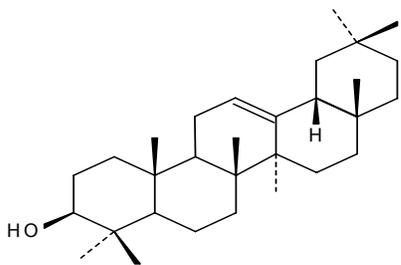
21-α-hidroxifriedel-4(23)-en-3-ona



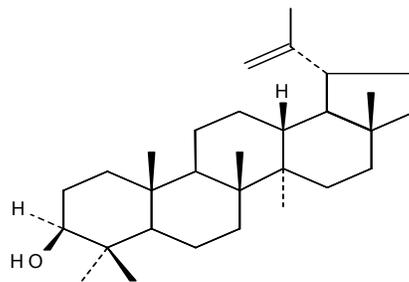
Filantol



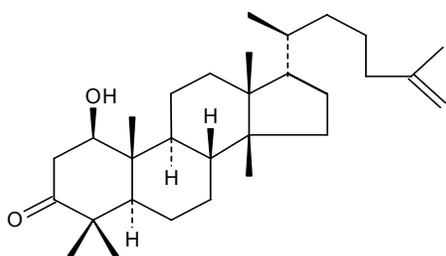
Friedelina



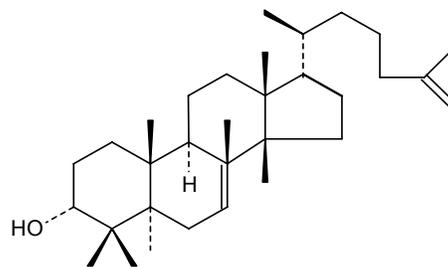
β-amirina



Lupeol

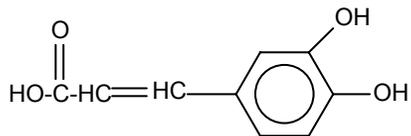


Filantenol

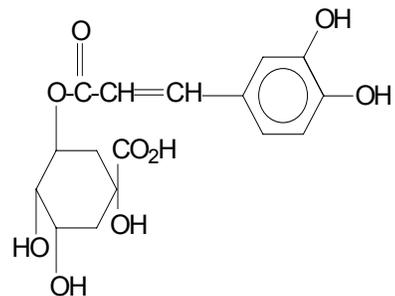


Filanteol

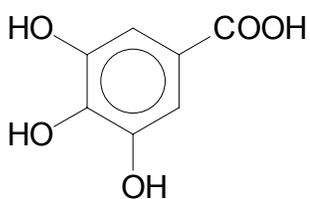
Figura 2. Triterpenos aislados de diferentes especies de *Phyllanthus*



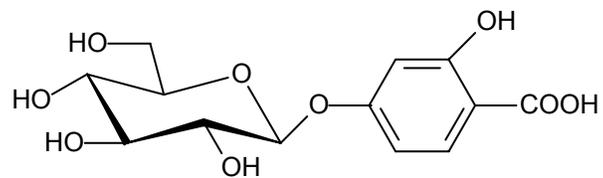
Ácido cafeico



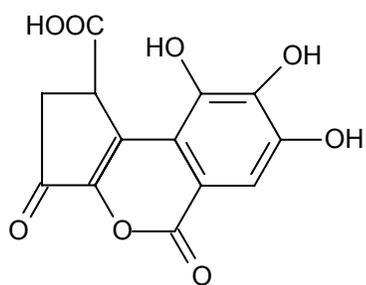
Ácido clorogénico



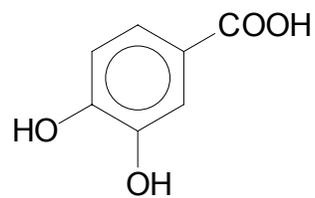
Ácido gálico



Ácido genticico-4-O-β-D-glucopiranosido

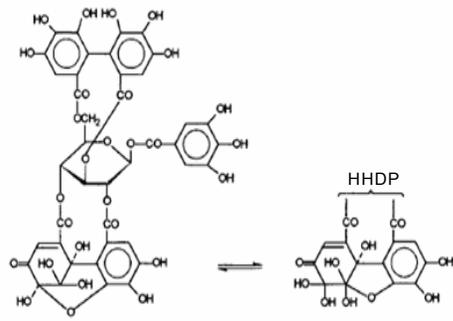


Ácido brevifolinicarboxílico

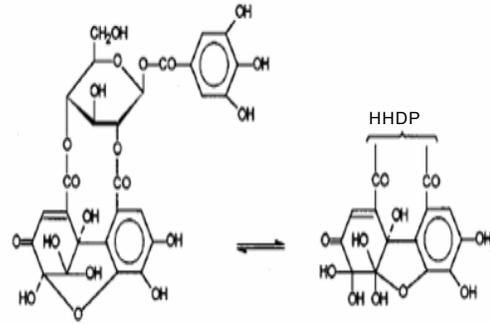


Ácido protocatéquico

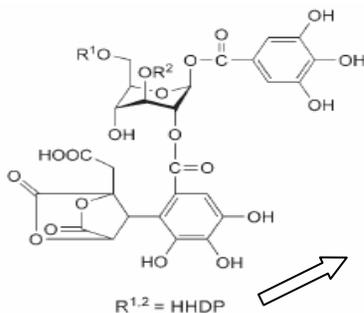
Figura 3. Ácidos fenólicos aislados de especies de *Phyllanthus*



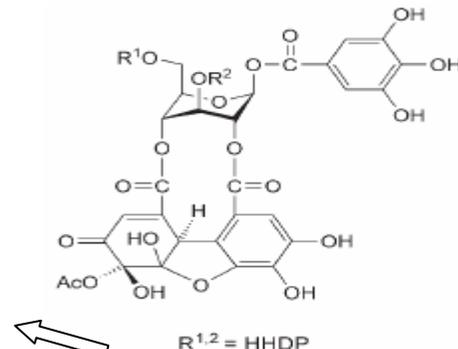
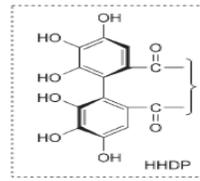
Geranina



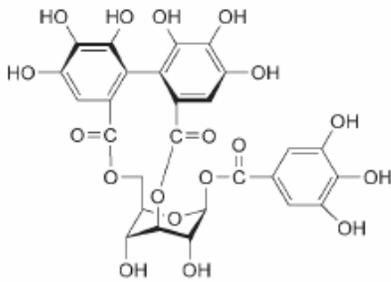
Furosina



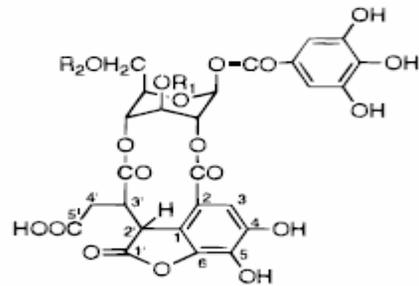
Malotinina



Acetonilgeranina

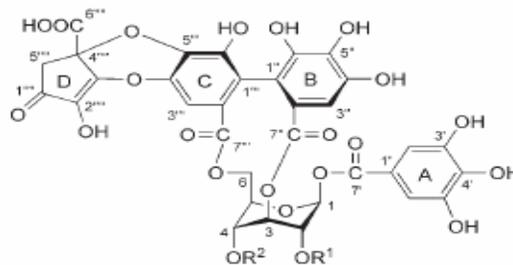


Corilagina



$R_1 = R_2 = H$

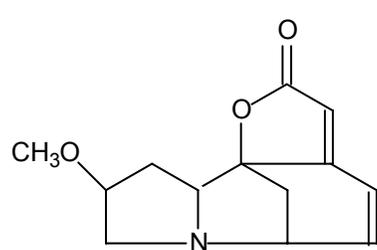
Virginina



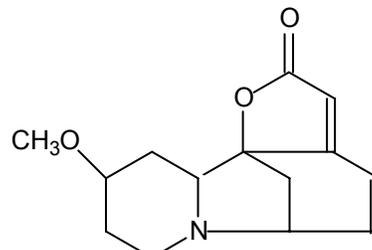
$R^1 = R^2 = H$

Repandinina B

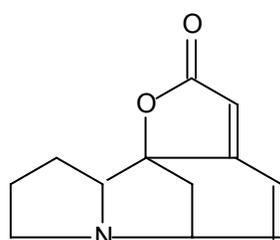
Figura 4: Taninos aislados de algunas especies de *Phyllanthus*



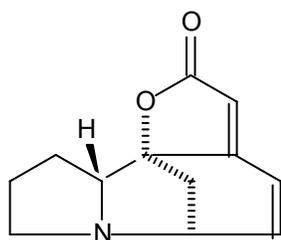
4-metoxi-nor-securinina



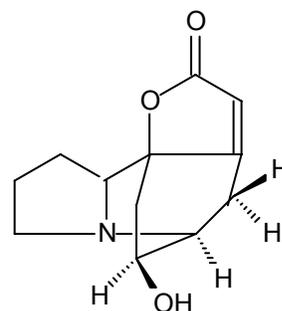
4-metoxi-securinina



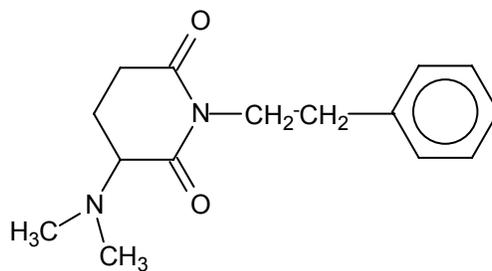
Nor-securinina



Nirurina

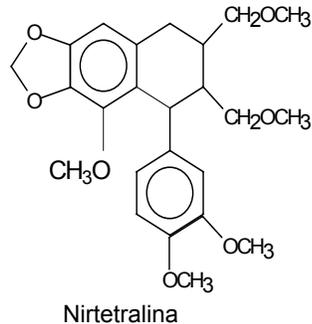
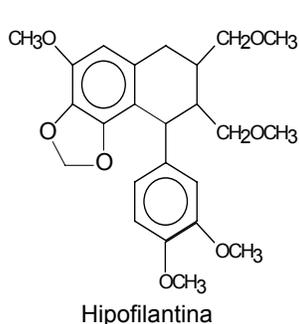
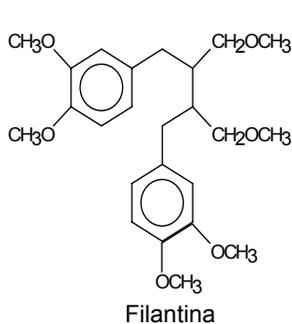
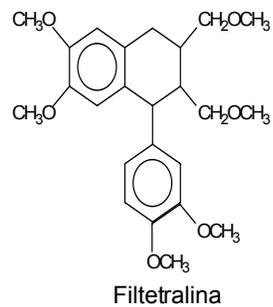
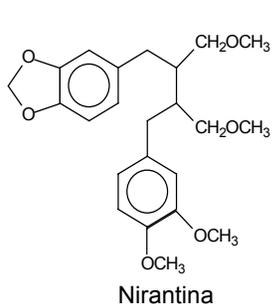
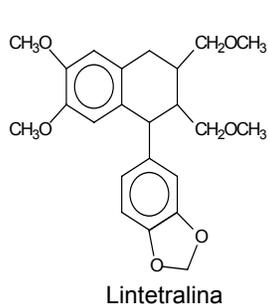


Niruroidina

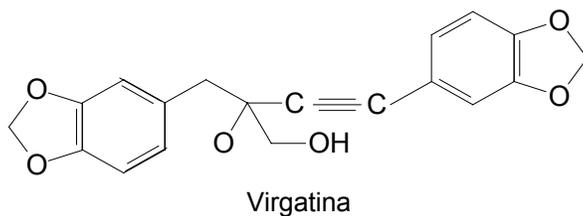


Filantimida

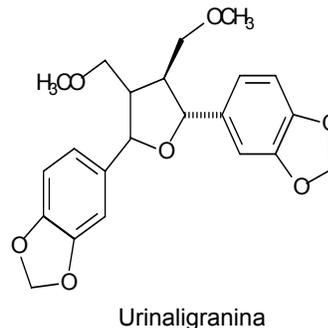
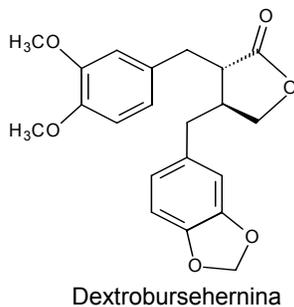
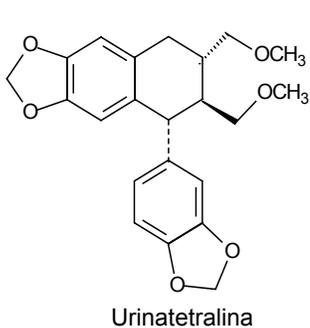
Figura 5. Alcaloides aislados de diferentes especies de *Phyllanthus*



Lignanos aislados de *P. niruri*

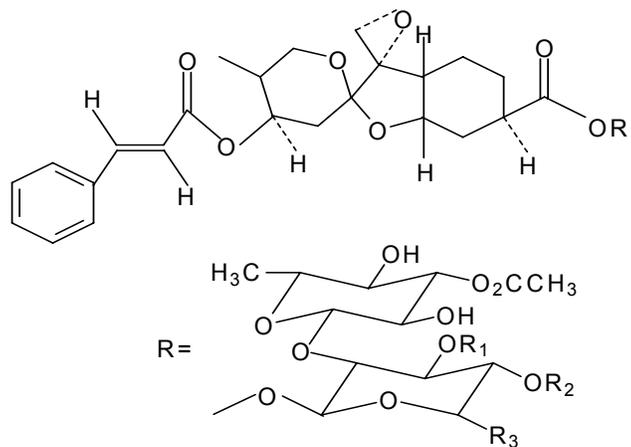


Norlignano aislado de *P. virgatus*

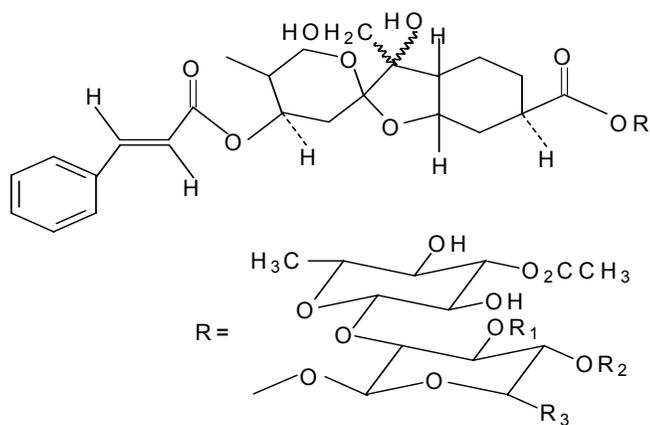


Lignanos aislados de *P. urinaria*

Figura 6. Lignanos aislados de especies de *Phyllanthus*



- $R_1 = H; R_2 = COCH_3; R_3 = CH_3$ Filantostatina 1
 $R_1 = COCH_3; R_2 = H; R_3 = CH_2OH$ Filantostatina 2
 $R_1 = COCH_3; R_2 = H; R_3 = CH_3$ Filantósido



- $R_1 = COCH_3; R_2 = H; R_3 = CH_3$ Filantostatina 3

Figura 7: Glicósidos aislados de *P. acuminatus*

También se ha determinado el contenido de fenoles en algunas especies, por ejemplo, en extractos metanólicos de los frutos de *P. emblica* se encontraron valores de 81,5-120,9 mg; 20,3-38,7 mg de flavonoides equivalentes a quercetina y 3,7-18,7 mg de catequina equivalente a proantocianidinas (Liu y cols., 2006; 2008) y en la corteza un 19,78% de fenoles totales (Yang y cols., 2009).

Sin lugar a dudas, las especies que han recibido mayor atención desde el punto de vista fitoquímico son *P. emblica*, *P. niruri*, *P. urinaria*, *P. sellowuanus* y *P. amarus*, por los usos que presentan en medicina tradicional para una gama amplia de enfermedades (Webster, 1967; Morton, 1981; Oliver, 1983; Unander y cols., 1990, 1991, 1992, 1995; Calixto y cols., 1998).

Respecto a la parte de la planta utilizada, varía en dependencia de la especie y sus antecedentes etnobotánicos, por ejemplo, en *P. acuminatus* los principales componentes han sido aislados de las raíces (Petti y cols., 1982), en *P. caroliniensis* de hojas, raíces y tallos (Cechinel y cols., 1996), de *P. parvulus* y *P. burchelli* de las hojas, las cuales presentan taninos, alcaloides, saponinas, antraquinonas y flavonoides (Mdlolo y cols., 2008), en *P. sellowianus* (Hnatyszyn y cols., 1987) y *P. polyanthus* (Vuyelwa y cols., 2008) han sido utilizadas las ramas, de *P. reticulatus* hojas y ramas (Lam y cols., 2007) al igual que en *P. niruri* (Satyanarayana y cols., 1988; Murugaiyah y Chan, 2006, 2007; Thana y cols., 2006; Shakil y cols., 2008; Colombo y cols., 2009), de *P. emblica* las raíces y corteza (Liu y cols., 2010; Yang y cols., 2009). Referente al tipo de extracto utilizado, la polaridad es muy variable, se han estudiado extractos polares como metanólicos, etanólicos, acuosos y entre los más apolares los de acetato de etilo y hexánicos. Muchos investigadores conducen el estudio fitoquímicos a extractos y fracciones que han resultado bioactivas.

I.2.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Las especies de *Phyllanthus* han sido ampliamente estudiadas desde el punto de vista biológico, siendo de particular importancia los resultados obtenidos como inhibidores del virus de la Hepatitis B (Thyagarajan y cols., 1982; 1988), analgésico y antiinflamatorio (Calixto y cols., 1997, 1998), entre otros.

Tabla I. Constituyentes químicos de algunas especies del género Phyllanthus

Tabla I. Constituyentes químicos de algunas especies del género *Phyllanthus*

Especies	Clase de compuestos	Compuestos	Referencias
<i>P. acidus</i>	Triterpeno	Lupeol, β -amirina, filantol	Calixto y cols., 1998
	Glicósido	Filantósido	
	Flavonoide	Kaempferol	Sousa y cols., 2007
	Ácido fenólico	Ácido hipogálico	
<i>P. acuminatus</i>	Glicósido	Filantósido, filantostatina A, 1, 2, 3 y 4	Petti y cols., 1982, 1984, 1988
	Lignano	Justicidina	Petti y cols., 1984, 1988
<i>P. acutissima</i>	Triterpeno	Acutisimatriterpeno A, B, C, D y E	Tuchinda y cols., 2008
	Lignano	Acutisimalignan A y B	
<i>P. amarus</i>	Triterpeno	Ácido ursólico	Calixto y cols., 1998; Dhalwal y cols., 2006
	Ácido fenólico	Ácido gálico, ácido elágico, ácido 4-O-galoilquímico, ácido geránico, ácido amárico	
	Tanino	Corilagina, geranina, amarina, 1,6-digaloilglucopiranososa, furosina, filantusina	Calixto y cols., 1998
	Flavonoide	Galocatequina, rutina, quercetin-3-O-glucósido	Calixto y cols., 1998; Londhe y cols., 2008
	Lignano	Hipofilantina, filantina, nirantina nirtetralina	Khaton y cols., 2006; Leite y cols., 2006; Tripathi y cols., 2006
	Ácido graso	Ácido oleico	Londhe y cols., 2008
Alcohol alifático	Triacantanol		
<i>P. anisobulos</i>	Lignano	Justicidina B	Calixto y cols., 1998
	Glicósido	Filantostatina A	
	Lactona	Menisdaurilido, aquilegiolido	Calixto y cols., 1998
<i>P. caroliniensis</i>	Flavonoide	Quercetina	Cechinel y cols., 1996
	Esterol	β -sitosterol, estigmasterol, campesterol	
	Tanino	Geranina	

*Tabla I. Constituyentes químicos de algunas especies del género **Phyllanthus***

<i>P. corcovadensis</i>	Éster	Ácido salicílico metil éster	Calixto y cols., 1998
	Monoterpeno	Cimeno, limoneno	
	Esterol	β -sitosterol, estigmasterol, campesterol	
<i>P. discoides</i>	Alcaloide	Filocristina, securinina, filantina, filantidina, dihidrosecurinina, filalbina, norsecurinina, 14,15-dihidro alosecurinina-15- β -ol	Calixto y cols., 1998
	Lignano	Filantina	
	Triterpeno	Ácido betulínico	
<i>P. emblica</i>	Flavonoides	Leucodelfinidina, rutina, (s)-eriodictiol-7-O-6-(6"-O-trans-p-coumaroil)- β -D-glucopiranosido, (s)-eriodictiol-7-O-(6"-O-galoil)- β -D-glucopiranosido, kaempferol-3-O- α -L-(6"-metil)-ramnopiranosido, kaempferol-3-O- α -L-(6"-etil)-ramnopiranosido, apigenin-7-O-(6'-butiril- β -glucopiranosido)	Calixto y cols., 1998; Zhang y cols., 2002; Habib y cols., 2007; El-Desouky y cols., 2008
	Glicósido fenólico	2-(2-metil butiril) floroglucinol-1-O-(6"-O- β -D-apiofuranosil)- β -D-glucopiranosido	Zhang y cols., 2002
	Alcaloide	Zeatina, zeatina nucleotido, zeatina rubosido	Calixto y cols., 1998
	Tanino	Corilagina	
	Ácido fenólico	Ácido gálico, ácido elágico	Calixto y cols., 1998; Poltanov y cols., 2009
	Diterpeno	Giberilina A-1, A-3, A-4, A-7, A-9	
	Esterol	β -sitosterol	
	Sesquiterpeno	4'-hidroxifilaemblicina B, fiulaemblicina E y F	Liu y cols., 2010
	Vitamina	Vitamina C	Majeed y cols., 2009
<i>P. engleri</i>	Triterpeno	Filantol, betulina	Calixto y cols., 1998
<i>P. flexuosus</i>	Tanino	Corilagina, geranina, filantusina A, B, C, D y E, ácido chebulágico	Calixto y cols., 1998
	Ácido fenólico	Ácido brevifolin carboxílico, ácido repandusínico	
	Coumarina	Bergenina	

*Tabla I. Constituyentes químicos de algunas especies del género **Phyllanthus***

	Esterol	β -sitosterol, estigmasterol, campesterol	
	Triterpeno	Betulina, olean-12-en-3 β -15 α -triol, olean-12-en-3 β -15 α -diol, glochidona, friedelina, β -amirina, olean-12-en-3 β -24-diol, lupeol, olean-11-13(18)-dien-3 β -24-diol, lup-20(29)ene-3 β -24-diol	Tanaka y cols., 1988a, 1988b, 2004; Wada y cols., 2001
<i>P. fraternus</i>	Esteroles	Filantosterol, filantostigmasterol, filantosecosteril éster, fraternusterol	Jyuti y Mohd, 1999
	Lignano	Filantina, hipofilantina, nirantina, nirtetralina, filtetralina, lintetralina	Gupta y Ali., 2003; Khatoon y cols., 2006
	Triterpeno	Filanteol, filantenol	
	Flavonoide	Catequina, nirurina	
	Ácido fenólico	Ácido gálico	
<i>P. maderaspatensis</i>	Ácidos grasos	Ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico	Calixto y cols., 1998
	Lignanos	Hipofilantina, filantina	Khatoon y cols., 2006
<i>P. matsumurae</i>	Flavonoides	Quercetin-3-O-xiloglucósido, quercetin-3-O-ramnoglucósido, quercetin-3-O-glucósido, quercetina	Chen y Ren, 1997
<i>P. muellerianus</i>	Esterol	β -sitosterol	Calixto y cols., 1998
	Triterpeno	Friedel-1-ene-22 β -ol, friedelin-1 β -22 β -diol	
<i>P. myrtifolius</i>	Lignano	Filamicina, retrojusticidina B, 2-metoxi-4-aril-2,3 naftalido, 4- aril naftaleno	Chang y cols., 1995; Lee S., 1996
<i>P. niruri</i>	Alcaloide	4-metoxi-nor-securinina, nirurina, norsecurinina	Calixto y cols., 1998
	Lignano	Filantina, nirantina, nirtetralina, hinokinina, isolintetralina, hipofilantina, filtetralina, cubebina dimetil éter, urinatetralina	Calixto y cols., 1998; Satyanarayana y cols., 1988; Elfahmi y cols., 2006; Murugaiyah y Chan, 2006, 2007

*Tabla I. Constituyentes químicos de algunas especies del género **Phyllanthus***

	Flavonoide	Quercetina, quercitrina, Isoquercetina, rutina, quercetin-3-O- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 4)- α -ramnopiranosido, 8-(3-metil-but-2-enil)-2-croman-4-ona, 2-(4-hidroxifenil)-8-(3-metil-but-enil)-croman-4-ona	Calixto y cols., 1998; Thana y cols., 2006; Shakil y cols., 2008; Colombo y cols., 2009
	Ácido fenólico	Ácido gálico	Calixto y cols., 1998
	Tanino	Geranina, corilagina	Calixto y cols., 1998; Thana y cols., 2006; Colombo y cols., 2009
	Ácido graso	Ácido recinoleico	Calixto y cols., 1998
	Esterol	Estradiol, β -sitosterol, isopropil-24-colesterol	
	Triterpeno	Acetato de lupeol, lupeol, 3,7,11,15,19,23-hexametil-2Z,6Z,10Z,14E,18E,22E-tetracosenen-1-ol, filantenol, filantenona, filanteol	
	Polisacárido	Arabinogalactán	Mellinger y cols., 2008
<i>P. polyanthus</i>	Triterpeno	Filantol (13,27-cicloursan-3 β -ol), filantona (13,27-cicloursan-3-ona), (20S)-3 β -acetoxi-24-metilenodammaran-20-ol, (20S)-3 α -acetoxi-24-metilenodammaran-20-ol, acetato de δ -amirina, lupenona	Vuyelwa y cols., 2008
<i>P. polyphyllus</i>	Ácido fenólico	Ácido-4-O-metil gálico	Rao y cols., 2005
	Lignano	Filamiricina, justicidina, difilina (serie del aril naftalido)	Rao y cols., 2005
<i>P. reticulatus</i>	Ácido fenólico	Ácido pirogálico, ácido elágico	Calixto y cols., 1998; Lam y cols., 2007
	Esterol	β -sitosterol, estigmasterol	Calixto y cols., 1998; Joshi y cols., 1981
	Triterpeno	Friedelina, friedelanol, friedelan-3 β -ol; 21 α -hidroxifriedelina, 21 α -hidroxifriedel-4(23)-en-3-ona, ácido betulínico, glochinodol	Calixto y cols., 1998; ; Joshi y cols., 1981; Lam y cols., 2007

*Tabla I. Constituyentes químicos de algunas especies del género **Phyllanthus***

	Flavonoide	quercetin-3-rutinósido, quercetin-3-O-β-D-glucopiranósido	Lam y cols., 2007
P. sellowianus	Flavonoide	4',4''di-O-metil cupressuflavona, quercetina, 7-hidroxiflavanona, rutina	Hnatsyzyn y cols., 1987; Calixto y cols., 1998
	Ácido fenólico	Ácido cafeico, ácido clorogénico	Tempesta y cols., 1988; Miguel y cols., 1996
	Alcaloide	Filantimida	Calixto y cols., 1998
	Acetofenona	Xantocilina	
	Coumarina	Escopoletina, isofraxidina	
	Triterpeno	Glochidona, glochidiol, glochidonol, lup-20(29)-ene-1β,3β-diol, filantol	
	Esterol	β-sitosterol, estigmasterol, campesterol	
Sacárido	Levulosa, glucosa, galactosa, sacarosa		
P. Simplex	Alcaloide	Filantina, simplexina	Calixto y cols., 1998
P. Taxodiifolius	Lignano	Glicósido de aril naftalido	Tuchinda y cols., 2006
	Triterpeno	Glochidona	
P.urinaria	Ácido graso	Ácido hexacosanoico	Calixto y cols., 1998
	Alcohol alifático	Triacantanol	Calixto y cols., 1998; Xu y cols., 2007; Haw y cols., 2009
	Ácido fenólico	Ácido gálico, ácido elágico, ácido protocatéquico, ácido brevifolin carboxílico	
	Éster	Ácido montanoico etil éster	Xu y cols., 2007
	Flavonoide	Quercetina, quercitrina, rutina, isoquercitrina, kaempferol, kaempferol-7-metil éster	Calixto y cols., 1998; Xu y cols., 2007
	Tanino	Geranina, furosina, 1,3,4,6-tetra-O-galoil-β-D-glucosa, malotinina, corilagina	Calixto y cols., 1998; Xu y cols., 2007; Haw y cols., 2009
	Lignano	filantina, hipofilantina, nirantina, nirtetralina, 5-dimetoxinirantina, urinaligranina, urinatetralina, dextroburseernina	Chia y cols., 2003; Srivastava y cols., 2006

*Tabla I. Constituyentes químicos de algunas especies del género **Phyllanthus***

	Esterol	β -sitosterol	Calixto y cols., 1998
	Triterpeno	Acetato de lupeol, β -amirina	
<i>P. ussuriensis</i>	Flavonoide	Quercetin-3-O-rutinósido	Ham y cols., 2001
	Tanino	Coliragina, geranina	
<i>P. verminatus</i>	Glicósido	Filantósido, filantostatina 1, 2 y 3	Calixto y cols., 1998
<i>P. virgatus</i>	Lignano	Filantina, hipofilantina, nirantina, isolintetralina, virgatina	Calixto y cols., 1998; Huang y cols., 1998; Srivastava y cols., 2006
	Flavonoide	Galangin 8-sulfonato, galangin 3-O- β -D-glucósido-8-sulfonato, kaempferol-8-sulfonato	Huang y cols., 1998
<i>P. Watsonii</i>	Esterol	β -sitosterol, sitosterol- β -(d)-glucósido	Calixto y cols., 1998
	Triterpeno	Lupenil palmitato, friedelin, lupeol, epi-friedelanol, glochidona, glochinodol, lup-0(29)-en-1 β -diol, 26-nor-D:A-friedoolean-14-en-3-ona, 26-nor-D:A-friedoolean14-en-3 β -ol	Calixto y cols., 1998

Cabe destacar los estudios efectuados por Del Barrio y cols. (1995) a extractos alcohólicos de hojas, tallos y raíces de *P. chamaecristoides*, raíces y tallos de *P. formosus*, así como raíces y hojas de *P. microdictyus* donde se demuestra, que son capaces de inactivar “*in vitro*” al antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B en un rango entre 93 y 97%.

Extractos acuosos de *P. amarus* también mostraron efecto inhibitorio sobre el antígeno de superficie de la Hepatitis B (Jayaram y Thyagarajan, 1996; Lee C., 1996) y a las dosis de 200 y 1000mg/Kg de peso mostraron en ratones, una inhibición de lesiones gástricas y de la inflamación, inducidas por la administración intragástrica de etanol absoluto (a la dosis de 8mL/kg) (Raphael y Kuttan, 2003). Se ha encontrado actividad antimicrobiana, específicamente contra *Streptococcus faecalis* (Okigbo e Igwe, 2007; Eldeen y cols., 2011); propiedades antioxidante (Kumaran y Karunakaran, 2006; Lee y cols., 2006; Londhe y cols., 2008), hepatoprotectora (Lee y cols., 2006; Naaz y cols., 2007; Pornpen y cols., 2007; Rai y Mehrotra, 2008; Toyin y cols., 2008; Yadav y cols., 2008); actividad contra el VIH (Notka y cols., 2003); efecto hipoglicemiante (Raphael y cols., 2002; Ali y cols., 2006), así como propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas (Sripanidkulchai y cols., 2002; Harikumar y cols., 2009).

Otras especies con actividad antiviral frente al virus de la Hepatitis B son: *P. hirtellus*, *P. gunni*, *P. gastroemii*, *P. tenellus* (Thyagarajan, 1982; Shead y cols., 1992; Gulati y cols., 1995).

Extractos acuosos, cetónicos y metanólicos obtenidos de hojas y ramas de *P. muellerianus* manifestaron actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Doughari y Sunday, 2008).

P. emblica ha demostrado actividad frente al VIH (Ogata y cols., 1992), efecto antioxidante (Chen y cols., 2008; Liu y cols., 2008; Saito y cols., 2008; Kusirisin y cols., 2009), hepatoprotector, antibacteriano (Krishnaveni y Mirunalini, 2010), así como propiedades antidiarreica y espasmolítica (Mehmood y cols., 2011).

Con actividad antioxidante se han encontrado también a *P. debilis*, *P. simplex*, *P. virgatus* y *P. maderaspatensis* (Kumaran y Karunakaran, 2006; Shabeer y cols., 2009), refiriéndose para esta última especie actividad antihepatotóxica (Asha y cols., 2004).

Por su parte la especie *P. acuminatus* exhibió actividad contra la leucemia linfocítica P-388 y el melanoma murino B16 (Petti y cols., 1983; 1984; 1988) y *P. engleri* contra células de cáncer renal (Ratnayake y cols., 2009).

Mensah (1990) demostró la actividad antibacteriana “*in vitro*” del extracto acuoso de *P. discoides*. *P. myrtifolius* evidenció efecto inhibitorio sobre la actividad del enzima reverso transcriptasa del VIH (Chang y cols., 1995; Eldeen y cols., 2011) y *P. sellowianus* demostró tener efecto hipoglicemiante, diurético, analgésico y antiespasmódico (Calixto y cols, 1997; 1998; Hnatyszyn y cols., 2002).

P. urinaria también ha mostrado propiedades antioxidantes (Xu, 2007; Shen, 2008); actividad contra el virus de la Hepatitis B (Shin y cols., 2005), los virus del Herpes Simple tipo 1 y 2 (Yang y cols, 2005, 2007) y la reverso transcriptasa del VIH (Eldeen y cols., 2011). Se citan además, efecto antitumoral (Huang y cols., 2006), inhibiendo el crecimiento en líneas celulares de cáncer humano nasofaríngeo (NPC-BM1) (Huang y cols., 2009) y en células de carcinoma hepatocelular HepG2 (Chudapongse y cols., 2010). Los extractos clorofórmicos y metanólicos de la planta son capaces de inhibir la inflamación inducida por helicobacter pylori en células humanas gástricas epiteliales AGS, mostrando además una potente actividad antimicrobiana (Chih-Ho y cols., 2008). También se ha reportado efecto hepatoprotector en la necrosis inducida por acetaminofen por administración oral en ratones (Haw y cols., 2009).

Gupta y Ali (2003) demostraron que *P. fraternus* posee propiedad hepatoprotectora, antibacteriana, antifúngica y antiviral, específicamente contra el virus de la hepatitis B (Unander y cols., 1990) y Hukeri y cols. (1988) por su parte determinaron la actividad hipoglicemiante, mientras que Sailaja y Setty (2006) demostraron su efecto protector frente al estrés oxidativo.

Desde el punto de vista biológico *P. niruri* ha sido la especie más estudiada, se destacan efectos hipoglicemiantes significativos (Ramakrishnan, 1982), actividad antiviral contra la Hepatitis B y el VIH, hepatoprotectora e inmunosupresora (Kodakandla y cols., 1985; Reddy, 1993; Naik y Juvekar, 2003; Li y cols., 2005, 2007; Bagalkotkar y cols., 2006; Bhattacharjee y Sil, 2007), antiplasmodial (Cimanga y cols., 2004), analgésica y antiinflamatoria (Santos y cols., 1994), así como actividad antioxidante (Sarkar y cols., 2009).

Respecto a las referencias encontradas sobre estudios farmacológicos efectuados a especies del género *Phyllanthus* se puede señalar que las mismas hacen alusión a los antecedentes etnobotánicos de aquellas especies con reconocido uso en la medicina folklórica para el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades, principalmente las de etiología viral, como es el caso de la hepatitis B, así se tienen a los extractos de *P. amarus*, *P. urinaria*, *P. fraternus* y *P. niruri* que son capaces de inhibir tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” el antígeno de superficie de dicho virus (AgsHB).

Otros estudios están referidos a la actividad contra el virus del herpes simple tipo 1 y 2 donde *P. urinaria* ha jugado un papel fundamental. Es importante destacar la actividad contra el VIH de diferentes extractos de especies como *P. amarus*, *P. urinaria*, *P. emblica* y *P. niruri*.

Los informes encontrados en la literatura científica hasta el momento demuestran categóricamente el valor de las plantas del género *Phyllanthus* en el control de tres patógenos que representan actualmente graves problemas de salud a nivel mundial; el virus de la hepatitis B, los virus del herpes simple y el virus de inmunodeficiencia humana. Los extractos de estas especies han demostrado ser verdaderos “cocteles naturales” pues contienen múltiples principios activos que inhiben de forma diferente, momentos del ciclo replicativo, lo que hace prácticamente imposible el desarrollo de resistencia (Álvarez y Del Barrio, 2008).

I.2.5. RELACIÓN GRUPO QUÍMICO - ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

Son varios los reportes sobre la relación grupo químico - actividad farmacológica en especies del género *Phyllanthus*, dirigidos fundamentalmente a extractos totales y

fracciones enriquecidas con un tipo de metabolito, no obstante se han evidenciado algunas referencias en la que se determina la actividad biológica de compuestos aislados, entre ellos alcaloides con efecto antiespasmódico, flavonoides, terpenoides y lignanos con actividad antiinflamatoria y analgésica (Calixto y cols., 1997, 1998; Kassuya y cols., 2005); taninos contra los virus del Herpes Simple tipo 1 y 2 (Yang y cols., 2007), entre otros. En la tabla II se muestran algunos compuestos de especies de *Phyllanthus* con su actividad farmacológica.

I.3. *Phyllanthus orbicularis* HBK

I.3.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Phyllanthus orbicularis HBK es una especie endémica cubana que se conoce vulgarmente como Alegría (Hermano L. y Hermano A., 1974; Roig, 1988) y pertenece a la familia *Phyllanthaceae*.

Es un arbusto que mide de 1 a 2 metros de altura (figura 8), muy ramoso, ramitas rojizas, la epidermis se separa con la edad (Hermano L. y Hermano A., 1953; Roig, 1988).

Las hojas (figura 9) son de color verde rojizas, orbiculares a elípticas u abobadas, mayormente de 6 a 10 milímetros de largo y de 7 a 8 milímetros de ancho, coriáceas, subsentadas, redondeadas en el ápice, la base obtusa a redondeada o subacorazonada, los nervios prominentes en el envés, el margen aplanado a menudo rojizo en las hojas jóvenes (Hermano L y Hermano A., 1953; Roig, 1988).

Las flores son blanco-crema (figura 10). Las masculinas con pedúnculos de 3 a 4 milímetros, 6 sépalos, obtusos; los estambres se encuentran de 4 a 10, filamentos connados. Las flores femeninas con ovarios subglobosos, estilo erguido, 3-lóbulos, los mismos se dividen en dos (Hermano L. y Hermano A., 1953; Roig, 1988).

Los reportes bibliográficos encontrados hasta el momento correspondientes a los aspectos botánicos de la especie, están referidos solamente a la macromorfología de la planta, en ningún caso se hace alusión a las características micromorfológicas, las

Tabla II. Actividad farmacológica de compuestos aislados de algunas especies de *Phyllanthus*

Especies	Compuestos	Actividad Farmacológica	Referencias
<i>P. acuminatus</i>	Filantina, filantósido	Antineoplásicos	George y cols., 1982
<i>P. acumminatus</i> <i>P. anisobolus</i> <i>P. verminatus</i>	Filantostatina 1, 2 y 3	Antineoplásicos	Calixto y cols., 1997, 1998
<i>P. amarus</i>	Corilagina, geranina	Inhibidores de la reverso transcriptasa del VIH	Notka y cols., 2003
	Filantusina D, ácido repandusínico, rutina, quercetin-3-O-glucósido	Antioxidantes	Londhe y cols., 2008
	Nirtetralina, filantina	Inhibidores de la leucemia K-562 en línea celular	Leite y cols., 2006
	Nirantina	Antiinflamatorio	Kassuya y cols., 2006
<i>P. amarus</i> <i>P. emblica</i> <i>P. niruri</i> <i>P. sellowianus</i> <i>P. urinaria</i>	Rutina	Antiinflamatorio, analgésico	Calixto y cols., 1997, 1998
<i>P. acidus</i> <i>P. flexuosus</i> <i>P. urinaria</i>	β -amirina	Analgésico	Calixto y cols., 1997, 1998
<i>P. carioliniensis</i> <i>P. flexuosus</i> <i>P. niruri</i> <i>P. urinaria</i>	Geranina	Antialérgico, analgésico, contra Herpes Simple 1 y 2	Calixto y cols., 1997, 1998; Yang y cols., 2007
	Quercetina	Inhibidor de la ATP-asa mitocondrial, fosfolipasa A ₂ , fosfodiesterasa, ciclooxigenasa, fosforilasa, tirosina quinasa, actividad analgésica	Cechinel y cols., 1996; Calixto y cols., 1997, 1998
<i>P. carioliniensis</i> <i>P. corcovadensis</i> <i>P. flexuosus</i> <i>P. sellowianus</i>	Estigmasterol	Analgésico	Santos y cols., 1995; Calixto y cols., 1997, 1998

Tabla II. Actividad farmacológica de compuestos aislados de algunas especies del género Phyllanthus

<i>P. caroliniensis</i> <i>P. corcovadensis</i> <i>P. emblica</i> <i>P. flexuosus</i> <i>P. muellerianus</i> <i>P. reticulatus</i> <i>P. sellowianus</i> <i>P. urinaria</i> <i>P. watsonii</i>	β -sitosterol	Analgésico, antiinflamatorio	Santos y cols., 1995 Calixto y cols., 1997, 1998
<i>P. discoideus</i> <i>P. flexuosus</i> <i>P. niruri</i>	filantina, hipofilantina	Inhibidores de la reverso transcriptasa del VIH, antihepatotóxico	Ogata y cols., 1992; Calixto y cols., 1997, 1998
<i>P. emblica</i>	Apigenin-7-O-(6''-butiril- β -lucopiranósido)	Antioxidante	El-Desouky y cols., 2008
<i>P. emblica</i> <i>P. niruri</i> <i>P. reticulatus</i> <i>P. urinaria</i>	Ácido elágico	Inhibidor de la aldosa reductasa	Calixto y cols., 1997, 1998
<i>P. flexuosus</i>	Lupeol, betulina, lup-20(29)ene-3 β -24diol	Antitumoral y actividad contra el virus Epstein- Barr	Tanaka y cols., 2004
<i>P. niruri</i>	8-(3-metil-but-2-enil)-2- fenil-croman-4-ona y 2- (4-hidroxifenil)-8-(3-metil- but-2-enil)-croman-4-ona	Actividad contra nemátodos reniformes	Shakil y cols., 2008
	Nirusida, ácido repandusínico	Inhibidores de la reverso transcriptasa del VIH	Ogata y cols., 1992; Qian- Cutrone y cols., 1996; Calixto y cols., 1997, 1998
	Filantina, hipofilantina, filitetralina	Actividad antihiperuricémica	Murugaiyah y cols., 2006
<i>P. polyphyllus</i>	Ácido 4-O-metilgálico, filamicina C, justicidina B, difilina	Antiinflamatorios	Rao y cols., 2005
<i>P. sellowianus</i>	Ácido cafeico	Antialérgico Analgésico	Calixto y cols., 1997, 1998
	Filantimida	Antiespasmódico, antibacterial	Tempesta y cols., 1988

*Tabla II. Actividad farmacológica de compuestos aislados de algunas especies del género **Phyllanthus***

<i>P. urinaria</i>	1,3,4,5,6-tetra-O-galoil- β -D-glucosa	Contra Herpes Simple 1 y 2	Yang y cols., 2007
	Repandinina B, furosina, ácido repandusínico, malotinina, corilagina, acetnilgeranina D, ácido gálico, ácido brevifolincarboxílico	Antioxidantes	Xu y cols., 2007
	Geranina	Antioxidante, antihipertensivo	Shyr y cols., 2008
<i>P. virgatus</i> <i>P. tenellus</i> <i>P. amarus</i>	Nirantina, nirtetralina, geranina	Inhibidores del antígeno de superficie de la hepatitis B	Huang y cols., 2003



Figura 8: Arbustos de *Phyllanthus orbicularis* HBK



Figura 9: Hojas de *Phyllanthus orbicularis*



Figura 10: Flores de *Phyllanthus orbicularis* HBK

cuales son imprescindibles para el establecimiento de los parámetros de calidad de la especie.

I.3.2. HABITAT Y DISTRIBUCIÓN

Se localiza fundamentalmente en suelos serpentinosos, pedregosos, ligeramente ácidos, en vegetación de material acromorfo espinoso (cuabal), muy abundante en las poblaciones naturales, prefiere los lugares expuestos al sol y a orillas de caminos, al parecer tiene buenos mecanismos de propagación y resistencia (Roig, 1988).

Se ha sembrado en el Jardín Botánico Nacional sobre suelo cuabal, de forma artificial, procedente de Canasí y desde 1982 procedente de Cajálbana.

Según los datos ofrecidos por la Estación Forestal de Mil Cumbres, Cajálbana, La Palma, provincia Pinar del Río, la especie ***P. orbicularis* HBK** tiene una distribución muy amplia, crece sobre un suelo cuabal, ferralítico rojo, lixiviado con perdigones de hierro, la altura promedio del suelo es de 2,35m sobre el nivel del mar; la reproducción es por semilla y goza de muy buena salud, florece a partir de los meses de Marzo y Abril, y alcanza su máximo esplendor en Mayo, se mantiene florecida casi todo el año excepto los meses de Enero y Febrero.

I.3.3. USOS ATRIBUIDOS TRADICIONALMENTE

A la especie no se le conocen usos tradicionales como planta medicinal, solamente está referido su empleo como ornamental debido al follaje fino y frondoso que presenta (Roig, 1988).

I.3.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Hasta el momento los reportes acerca de la composición química de la planta son escasos, a no ser los derivados de este trabajo y los referidos por Reeves y cols. (1996) y Berazaín y cols. (2007a; 2007b) donde determina la concentración de níquel a nivel de tejidos de hojas y ramas de la especie (4140-10950 mg/Kg de planta y 3660 mg/Kg de planta respectivamente) y los resultados obtenidos por Álvarez y cols. (2009) quienes revelaron la presencia de quercetina, rutina, kaempferol-3-o-rutinósido,

procianidina, catequina, epicatequina, ácido protocatéuico y derivados de ácido gálico en el extracto acuoso.

Por dicha razón, cualquier estudio que se realice en este sentido resultará un aspecto novedoso que contribuirá a ampliar el conocimiento químico de la especie, una de las tantas endémicas cubanas con grandes perspectivas desde el punto de vista biológico.

I.3.5. ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y TOXICIDAD

A diferencia del estudio químico, los reportes sobre la actividad biológica de la planta son varios, pudiendo destacar los trabajos realizados por Del Barrio y cols. (1994), donde demuestran la gran efectividad de los extractos alcohólicos provenientes de tallos y hojas de la especie contra el antígeno de superficie de la Hepatitis B. Estudios desarrollados por la misma autora pero con el extracto acuoso de la especie mostraron igual efecto (Del Barrio y cols., 1995).

Otros trabajos (Del Barrio, 1999; Del Barrio y Parra, 2000) evidenciaron que el extracto acuoso posee acción antiviral “*in vitro*” frente al virus del Herpes Bovino tipo 1 y el Herpes Simple tipo 2, en términos de la capacidad de inhibición de la replicación o del proceso infeccioso de ambos herpes virus.

Martínez y cols. (1999) determinaron la actividad antiviral “*in vitro*” del extracto acuoso de la especie contra el virus del Herpes Simple tipo 1. También están los resultados de Fernández y cols. (2003) contra el mismo virus pero de fracciones butanólica y acético/acuosa obtenidas de la planta, las cuales presentaron muy buena actividad con posible acción sobre los pasos tempranos del ciclo replicativo de dicho virus.

Por su parte, Valdés y cols. (2003) demostraron en ensayos “*in vivo*” que el extracto acuoso de ***P. orbicularis*** (12mg/Kg) por vía tópica reduce de forma significativa el desarrollo de lesiones en ratones infectados por vía subcutánea con el virus del Herpes Simple tipo 1.

De importancia son los trabajos desarrollados por Sánchez y cols. (1999; 2002) donde demuestran las cualidades antígenotóxicas, antioxidantes y antimutagénicas del extracto acuoso.

Igualmente se refieren los estudios desempeñados por Ferrer y cols. (2001; 2002; 2004) que confirman las propiedades antimutagénicas, lo cual fundamenta las potencialidades de la especie como agente quimiopreventivo terapéutico de enfermedades tumorales.

Estudios de toxicidad aguda y subcrónica realizados por Rivero y Vidal (1998), demostraron que el extracto acuoso no presenta efecto tóxico por vía oral a la dosis recomendada para su uso como antiviral en humanos (60mg/Kg).

Fue demostrado que el extracto acuoso era totalmente no irritante al efectuar ensayos de irritabilidad dérmica, oftálmica, sobre mucosa y sensibilización sobre la piel (Gutiérrez y cols., 2002).

Los resultados farmacológicos obtenidos por investigadores cubanos para *P. orbicularis* HBK hacen un aporte interesante al conocimiento de sus propiedades biológicas, principalmente en el campo de los antivirales, permitiendo considerar a la especie objeto de estudio como un buen candidato antiviral.

I.4. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL CONTROL DE CALIDAD DE MATERIAS PRIMAS DE ORIGEN VEGETAL

A nivel mundial, las drogas y preparados fitoterapéuticos obtenidos a partir de ellas, ocupan un lugar importante dentro del comercio de medicamentos. Enfatizando en la necesidad de garantizar su control de calidad con la aplicación de técnicas modernas y el uso de patrones apropiados (De Diego, 1992; Bauer y Tittel, 1996; Bauer, 1998; Busse, 2000; Osorio, 2009).

Para garantizar un correcto control de la calidad es necesario desarrollar un adecuado procesamiento del material vegetal desde la recolección, para ello los investigadores deben tener conocimiento de la especie en cuanto a la organografía y fisiología de la

misma, del lugar donde se realiza la colecta y saber las variaciones que puede sufrir la composición de las plantas en las diferentes épocas y fases de su vida. Después de la cosecha se debe examinar y separar las partes deterioradas, manchadas y con señales de ataques de insectos y/o hongos (Sharapin y cols., 2000; HMPWG, 2001; WHO, 2003).

La etapa más importante es el secado, mediante el cual se priva a la planta del agua, impidiendo su alteración con el tiempo debido a procesos degradativos causados por enzimas, evitando el desarrollo de microorganismos y las reacciones de hidrólisis. Los métodos empleados para el secado del material vegetal dependerán de las características del mismo y la forma en que puede efectuarse el proceso debe determinarse experimentalmente para cada especie (Sharapin y cols., 2000; Miranda y Cuéllar, 2001).

El almacenamiento es otro aspecto de gran importancia para mantener la calidad, pues las plantas pueden perder principios activos durante este proceso, es por eso que la conservación de la materia prima vegetal por largos períodos de tiempo depende de las condiciones de almacenamiento donde debe protegerse del contacto con el sol, humedad, el polvo, los roedores, insectos y otros factores de degradación. (Sharapin y cols., 2000; Miranda y Cuéllar, 2001).

En diversas farmacopeas se describen métodos generales de ensayos para evaluar las drogas oficiales, pero la Organización Mundial de la Salud ha recomendado la realización de monografías y la implantación de normas o especificaciones de calidad, basadas en las experiencias de cada país, para aquellas drogas no incluidas en las farmacopeas y que son ampliamente utilizadas en medicina tradicional (Franz y Vlietinck, 2001; Miranda y Cuéllar, 2001; Farmacopea Europea, 2005).

De manera general, los métodos más empleados para el control de calidad de drogas crudas deben responder a las siguientes especificaciones (NRSP 309, 1992; Menéndez, 1993; WHO, 1998; Miranda y Cuéllar, 2001; WHO, 2005): Nombre oficial, definición, descripción macromorfológica, descripción micromorfológica, determinación de microorganismos, determinación de cenizas, determinación de arsénico y metales

pesados, sustancias solubles o extraíbles, contenido de humedad residual, determinación del índice de espuma, determinación del índice de amargor, cromatografía en capa delgada y determinación cuantitativa de principios activos.

La valoración de un material vegetal sirve para identificar y determinar su calidad y pureza. Los investigadores deben estar absolutamente seguros de sus muestras y para su identificación deben compararlas con muestras auténticas o con la descripción que se hace de ellas en las farmacopeas o publicaciones autorizadas (Miranda y Cuéllar, 2001).

En resumen, la alta calidad de una materia prima vegetal es de importancia fundamental y se debe tratar de alcanzar y mantener ese nivel, siendo un aspecto importante para cumplir este objetivo, la recolección de la fuente natural correcta en el momento apropiado y de la manera adecuada; la limpieza correcta de ese material, el secado y molinado; control de la humedad, impurezas, microorganismos, etcétera. (Miranda y Cuéllar, 2001).

I.5. ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES

I.5.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

El proceso de extracción se define como la separación de porciones medicinales activas a partir de los tejidos de plantas y animales, mediante el empleo de disolventes selectivos, utilizando procedimientos establecidos (Miranda y Cuéllar, 2001).

Existen diversas técnicas de extracción consideradas “clásicas u oficiales”, siendo las más utilizadas en el campo de los productos naturales la maceración, la extracción por soxhlet, la percolación y la hidrodestilación (Miranda y Cuéllar, 2001). También están las consideradas “modernas” como es el caso del ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción por fluido supercrítico y la extracción acelerada por disolvente (conocida también como extracción por fluido automatizado o extracción por líquido presurizado) (Giergielewicz-Mozajska y cols., 2001); estas nuevas técnicas de

extracción a pesar de ser más rápidas, utilizar menos cantidad de disolvente y en algunos casos ser automatizadas, por lo general tienen como inconveniente el elevado costo de los equipos empleados.

I.5.2. MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

Los métodos más empleados hoy en día para la separación y caracterización de moléculas orgánicas son los métodos cromatográficos y espectroscópicos (Gismera, 2009).

La cromatografía gaseosa y líquida, la espectroscopía en las regiones del ultravioleta-visible (UV-VIS), infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN), son los métodos que más se emplean en el trabajo con productos naturales (Silverstein y cols, 1977; Marcano y Hasegawa, 1991; Günther, 1995; Baldwin, 1995; Braun y cols., 1996, Gismera, 2009).

La cromatografía líquida de alta resolución ha tenido una creciente difusión y representa una de las herramientas más empleadas en los laboratorios analíticos modernos. Esta técnica ha sido empleada últimamente en el análisis de compuestos de muchas especies de *Phyllanthus* con resultados satisfactorios en la separación de flavonoides y de los lignanos filantin e hipofilantin que se consideran marcadores del género. Así se tienen los estudios en *P. amarus* (Dhalwal y cols., 2006; Tripathi y cols., 2006), *P. niruri* (Murugaiyah y Chan, 2007; Colombo y cols., 2009) y *P. urinaria* (Srivastava y cols., 2006). Por lo general se utilizan columnas de fases reversas y fases móviles que abarcan disímiles polaridades y sistemas tanto isocráticos como de gradiente, diferentes longitudes de onda para la detección, tanto por arreglo de diodos como por detector UV simple y las separaciones se llevan a cabo mayormente en columnas de fases reversas RP (RP-18 o RP-8).

La cromatografía de gases es una técnica que tiene la cualidad de separar mezclas complejas, pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de la muestra problema, no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando se analizan muestras con un número elevado de componentes (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separarlos previamente debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Por lo tanto, la asociación de la CG-EM da lugar a una técnica combinada que permite la separación e identificación de mezclas complejas, o sea, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elusión sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas donde se procede a su ionización, como resultado se forman iones, cuya proporción relativa y tipo, entre otros aspectos, es característico de las moléculas analizadas. Cada uno de estos componentes se registran en forma de pico cromatográfico y se identifican mediante sus respectivos espectros de masas, brindando información estructural de los compuestos (Gutiérrez y Droguet, 2002).

La técnica CG-EM no ha sido muy utilizada en el estudio químico de especies de ***Phyllanthus***, los reportes encontrados en la literatura (Huang y cols., 1998; Xu y cols., 2007; Shakil y cols., 2008; Vuyelwa y cols., 2008, entre otros) utilizan solamente la espectrometría de masas como técnica complementaria en los análisis de compuestos aislados por otros métodos cromatográficos, e identificados además por resonancia magnética nuclear, que sin lugar a dudas es la que posibilita una mayor información sobre la estructura de los compuestos orgánicos.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS



CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO DE *Phyllanthus orbicularis*

II.1.1. RECOLECCIÓN Y SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La especie vegetal utilizada fue *Phyllanthus orbicularis* HBK, identificada y recolectada por el Ingeniero Agrónomo Rafael Carbonel Paneque en una zona de vegetación natural protegida de la Estación Forestal de Mil Cumbres, en Cajalbana, municipio La Palma, provincia Pinar del Río, correspondiendo a plantas adultas de aproximadamente 1,73m de altura. La misma fue herborizada y registrada en el Jardín Botánico Nacional con la clave HFC 85589 (HAJB).

Se trabajaron 11 lotes de plantas colectados en diferentes meses y años: Enero/03; Febrero/04; Abril/05; Junio/05; Febrero/06; Marzo/07; Mayo/07; Agosto/07; Octubre/07; Diciembre/07 y Enero/08. La especie vegetal se encontraba en estado de floración excepto en los meses de Enero y Febrero donde el estado fenológico era vegetativo.

De las colectas realizadas solo se emplearon las hojas y tallos finos, previamente lavados con agua potable, los cuales fueron cortados en trozos pequeños con ayuda de tijeras, para facilitar el proceso de secado.

II.1.2. CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE

II.1.2.1. EVALUACIÓN MACROMORFOLÓGICA DE HOJAS Y TALLOS

La descripción macromorfológica de hojas y tallos de la especie se realizó a simple vista y con ayuda de una lupa (Miranda y Cuéllar, 2000).

Se evaluaron 100 hojas por cada lote de colecta, a las cuales se les determinó la forma del limbo, borde, ápice, base, peciolo, venación, consistencia y color. También se efectuaron mediciones de largo y ancho de las hojas con ayuda de un pie de rey, se calcularon los valores promedios y la desviación estándar.

A los tallos se les analizó la consistencia, forma, superficie externa y color, así como la superficie interna y el color.

II.1.2.2. EVALUACIÓN MICROMORFOLÓGICA DE HOJAS Y TALLOS

Para el análisis histológico se realizaron cortes trasversales y longitudinales por el método manual, de hojas y tallos en estado fresco, los que fueron hidratados y aclarados con hipoclorito de sodio. Los mismos se colorearon con safranina al 1% y azul de cresil al 1% en agua destilada, se fijaron con gelatina glicerizada, según los procedimientos descritos por Arnol (1973) y Gattuso M. y Gattuso S. (1999).

También se determinaron las características microscópicas de la droga en polvo (mezcla de hojas y tallos), las muestras fueron aclaradas con hipoclorito de sodio y después de lavadas se colorearon con safranina al 1% para finalmente ser fijadas en gelatina glicerizada.

Sobre los cortes se realizaron algunas reacciones histoquímicas tales como, la determinación de lignina (se humedeció el corte con una solución de floroglucinol y luego con ácido clorhídrico al 5%). Para la identificación de súber, cutina y celulosa, se realizó una triple tinción; la identificación de taninos se efectuó mediante la reacción con una solución acuosa de cloruro férrico al 10% y una gota de solución diluida al 1% de carbonato de sodio en agua y los flavonoides se detectaron humedeciendo el corte con etanol y adición de una solución de hidróxido de potasio al 10% en etanol (Miranda y Cuéllar, 2000).

Para visualizar los diferentes caracteres anatómicos internos del vegetal se empleó un microscopio Nikon Alphaphot-2 con cámara de video a color TK-C1380 JVC modelo TK-C1380U.

II.1.3. SECADO

Se realizó mediante tres métodos: a la sombra, al sol y en estufa con recirculación de aire a 45°C, utilizando 200g de muestra por cada réplica y método. Se tuvo en cuenta el número de días que demoraba la droga en alcanzar peso constante (tiempo de secado), la pérdida en peso (con una frecuencia de 12h para el secado en estufa y 24h para el secado al sol y a la sombra), se consideró en estos últimos la temperatura

y la humedad relativa. También se realizaron determinaciones de humedad residual (NRSP 309, 1992; Miranda y Cuéllar 2000).

II.1.4. ALMACENAMIENTO

Una vez secados los diferentes lotes de droga, se trituraron en un molino de cuchilla marca PULVEX con malla 2mm y fueron almacenados en latas compuestas (cartón con interior de aluminio), frascos de vidrio de color ámbar, bolsas de papel kraft y bolsas de polietileno; se distribuyeron 100g de muestra por tipo de envase y cada uno por triplicado. Se realizaron determinaciones de las características organolépticas (olor y color), humedad residual (Miranda y col., 2000), contenido de fenoles totales (Farmacopea Británica, 2000) y control microbiológico (CIDEM, 1992; WHO, 1998; WHO, 2005).

El estudio fue desarrollado siguiendo un monitoreo de los parámetros previamente mencionados, durante un periodo de 12 meses. La frecuencia de los análisis fue de 0, 3, 6, 9 y 12 meses a partir de la Regulación No. 23 del CECMED (2000), que establece los requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos.

II.1.5. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Los diferentes ensayos se realizaron según la metodología descrita por la NRSP 309 (1992) y Miranda y Cuéllar (2000).

II.1.5.1. MATERIA ORGÁNICA EXTRAÑA E INORGÁNICA EXTRAÑA

Se procedió a la separación manual de la materia orgánica extraña (insectos, excretas de roedores, pelos de roedores, etc.) y de la materia inorgánica extraña (partículas de tierra, arena y piedrecillas presentes en la misma).

Los cálculos se realizaron por las siguientes expresiones:

$$Mo = \frac{m}{M} \times 100 \qquad Mi = \frac{m}{M} \times 100$$

Donde:

Mo: materia orgánica extraña (%)

Mi: materia inorgánica extraña (%)

m: masa de la materia orgánica o inorgánica extraña (g)

M: masa inicial de la muestra de ensayo (g)

100: factor matemático para el cálculo

II.1.5.2. HUMEDAD RESIDUAL

Se empleó el método azeotrópico, por triplicado a partir de 10g de muestra, se utilizó tolueno como disolvente, un equipo Dean Star, una plancha de calentamiento eléctrica marca MLW VEB y para las pesadas una balanza analítica marca Sartorius.

Los resultados se obtuvieron a partir de la expresión:

$$H_r = \frac{V_f - V_i}{M} \times 100$$

Donde:

Hr: humedad residual (%)

Vf: volumen final de agua (mL)

Vi: volumen inicial de agua (mL)

M: masa de la muestra (g)

100: factor matemático para el cálculo.

II.1.5.3. SUSTANCIAS SOLUBLES O EXTRAÍBLES

Este ensayo se llevó a cabo por triplicado, a partir de 5g de droga. Los menstros utilizados fueron agua, etanol al 50 y 90%. Las muestras se agitaron en una zaranda modelo BIOZARD- 2013 por un tiempo de 6 horas.

Los cálculos se realizaron según:

$$S_s = \frac{R \cdot 500 \cdot 100}{M (100 - H)}$$

Donde:

Ss: sustancias solubles (%)

R: residuo de la muestra (g)

M: masa de la muestra (g)

H: humedad residual (%)

500 y 100: factores matemáticos para el cálculo.

II.1.5.4. CENIZAS TOTALES, CENIZAS SOLUBLES EN AGUA Y CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO AL 10%

Para las determinaciones se empleó una mufla modelo MLW VEB ELEKTROBAD FRANKENHAUSEN. Las pesadas se realizaron en balanza analítica marca SARTORIUS. Cada determinación se efectuó 6 veces a partir de 2g de material.

Cenizas totales

Los cálculos se efectuaron por la siguiente expresión:

$$C_T = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Donde:

Ct: cenizas totales (%)

M: masa del crisol vacío (g)

M₁: masa del crisol con la muestra (g)

M₂: masa del crisol con la ceniza (g)

100: factor matemático para el cálculo.

Cenizas solubles en agua

Las determinaciones se llevaron a cabo a partir de las cenizas totales, luego de disolver las mismas con agua destilada. Los cálculos se realizaron por la siguiente expresión:

$$Ca = \frac{M_2 - Ma}{M_1 - M} \times 100$$

Donde:

Ca: cenizas solubles en agua en base hidratada (%)

M₂: masa del crisol con las cenizas totales (g)

Ma: masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

M₁: masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M: masa del crisol vacío (g)

100: factor matemático para el cálculo.

Cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10%

Se determinaron a partir de las cenizas totales, después de tratar las mismas con ácido clorhídrico al 10%. Los resultados se obtuvieron por la siguiente expresión:

$$B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Donde:

B: cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada (%)

M₂: masa del crisol con la ceniza (g)

M: masa del crisol vacío (g)

M₁: masa del crisol con la porción de ensayo (g)

100: factor matemático para el cálculo.

II.1.5. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico se le realizó a todas las colectas, según procedimiento descrito por Miranda y Cuéllar (2000).

Se utilizó un sistema de extracción con una batería de disolventes, de menor a mayor polaridad, sobre el mismo material vegetal, para lograr que cada metabolito fuera extraído adecuadamente según su selectividad por el disolvente empleado. La droga cruda se extrajo sucesivamente con éter de petróleo (30-40°C), etanol y agua, para obtener los extractos correspondientes, los que fueron sometidos a los diferentes ensayos (figura 11).

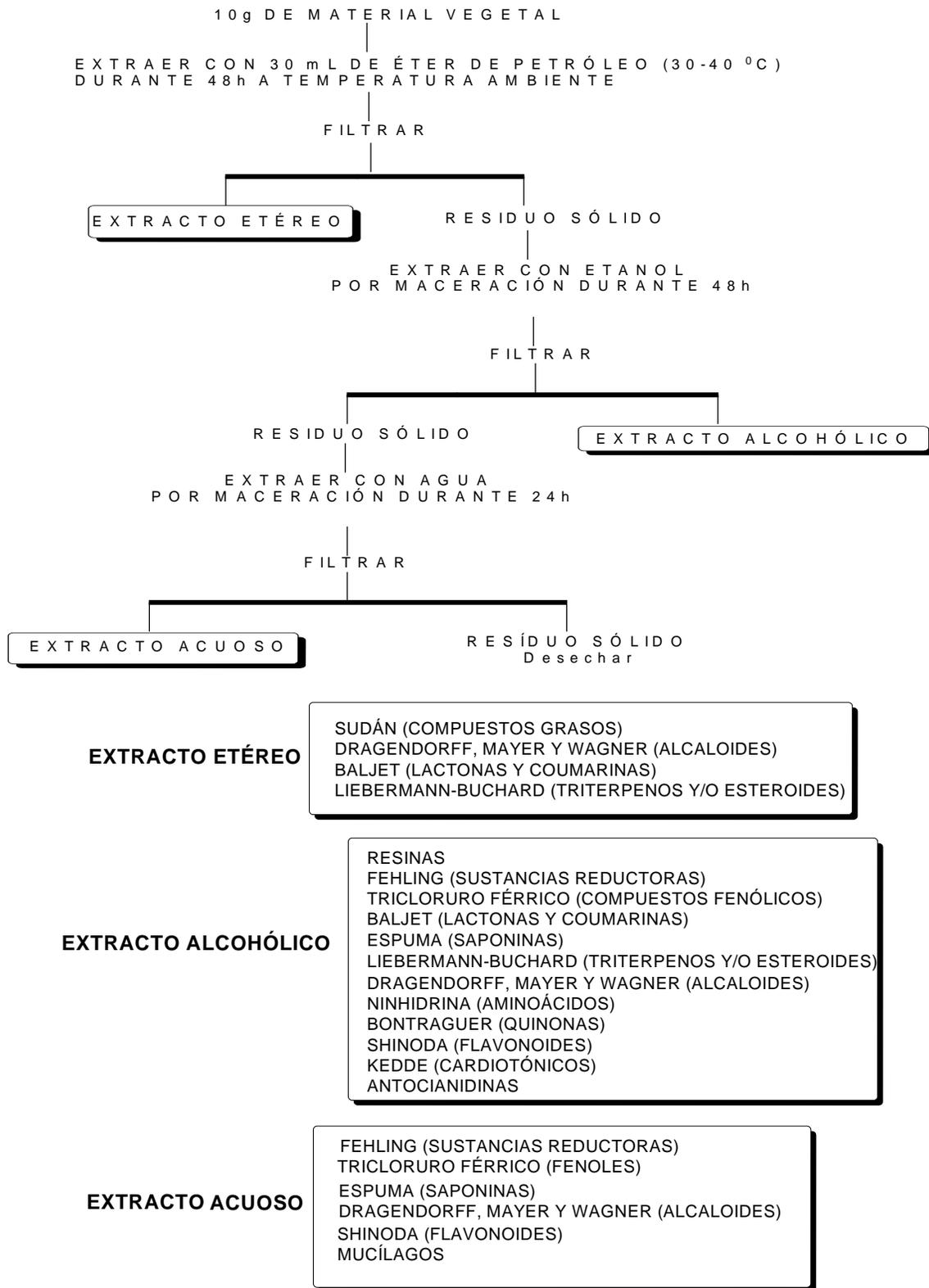


Figura 11. Extracción sucesiva del material vegetal para la aplicación de técnicas de Tamizaje Fitoquímico

II.1.6. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES Y DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DEL FLAVONOIDE RUTINA

Se determinó el contenido de fenoles totales a todas las muestras colectadas, por el método espectrofotométrico descrito en la Farmacopea Británica (2000).

La determinación cualitativa y cuantitativa del flavonoide rutina se llevó a cabo por CLAR. Se utilizó un cromatógrafo líquido KNAUER, bajo las siguientes condiciones de trabajo:

- Fase móvil: estuvo constituida por el eluyente A: agua: ácido trifluoracético (100:0,1) y eluyente B: acetonitrilo: ácido trifluoracético (100:0,1) (grado CLAR/Merck)
- Software: Chromgate
- Detector UV-K2600 por arreglo de diodo, 369nm (200-400)
- Bomba K1001: presión 14,1MPa
- Flujo: 0,6mL/min., modo gradiente lineal
- Volumen de inyección: 20µL
- Columna: Uptisphere 5 ODB 708965 (RP-18)

En la determinación cualitativa se tuvo en cuenta el tiempo de retención del estándar (rutina, 98% de pureza, procedente de Fluka Biochemika) y las muestras, considerándose como positivas para la presencia de rutina el valor que se encontraba en el rango promedio de su tiempo de retención.

La determinación cuantitativa se realizó mediante una curva de calibración elaborada con diferentes concentraciones del patrón rutina (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50mg/mL) y la estimación de la concentración de dicho compuesto en las muestras analizadas, las cuales constituyeron los extractos metanólicos preparados a partir de 1g dogo con 10mL de metanol. Estos extractos se filtraron por papel y posteriormente por membrana de teflón antes de ser inyectados y se trataron en baño ultrasónico por 15min. Se valoró el pico positivo para el patrón ensayado y la cuenta de área que correspondía al mismo.

Con los datos de cuentas de áreas obtenidos a partir del estándar de trabajo se elaboró la curva de calibración: Cuenta de área (y) vs Concentración teórica (X). Se realizó un análisis de regresión lineal y se obtuvo la ecuación lineal ($y=a+bx$) y el valor de correlación (r^2).

En la ecuación lineal obtenida se reemplazó el valor de Y por cada una de las cuentas de área de las muestras y sus réplicas. Este resultado correspondió a la concentración del compuesto expresada en mg/g de muestra.

II.2. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *Phyllanthus orbicularis* HBK

II.2.1. EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

Para el estudio se desarrolló un proceso de extracción por maceración (figura 12) a partir de 500g de muestra con una batería de disolventes de polaridad creciente: hexano, AcOEt y metanol, en cantidades de 1500mL, por un periodo de 7 días con cada disolvente con agitaciones esporádicas (el proceso se realizó por triplicado: a los tres días, a los cinco y a los siete días), para obtener los correspondientes extractos hexánicos, AcOEt y metanólicos.

Los extractos obtenidos se reunieron y filtraron por papel de filtro, luego se concentraron a sequedad en un rotoevaporador Büchi a presión reducida a una temperatura de 50°C aproximadamente, se determinó el rendimiento a cada uno y posteriormente se conservaron en desecadoras para los análisis correspondientes.

II.2.2. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA DE LOS EXTRACTOS

Los extractos hexánicos, AcOEt y metanólicos fueron analizados por CCD. Se emplearon placas de la Merck de 10 x 5cm, de gel de sílice F sobre soporte de vidrio.

El desarrollo cromatográfico fue de forma ascendente y se utilizaron indistintamente como fases móviles las siguientes mezclas de disolventes:

- Hexano: acetato de etilo (7:3)

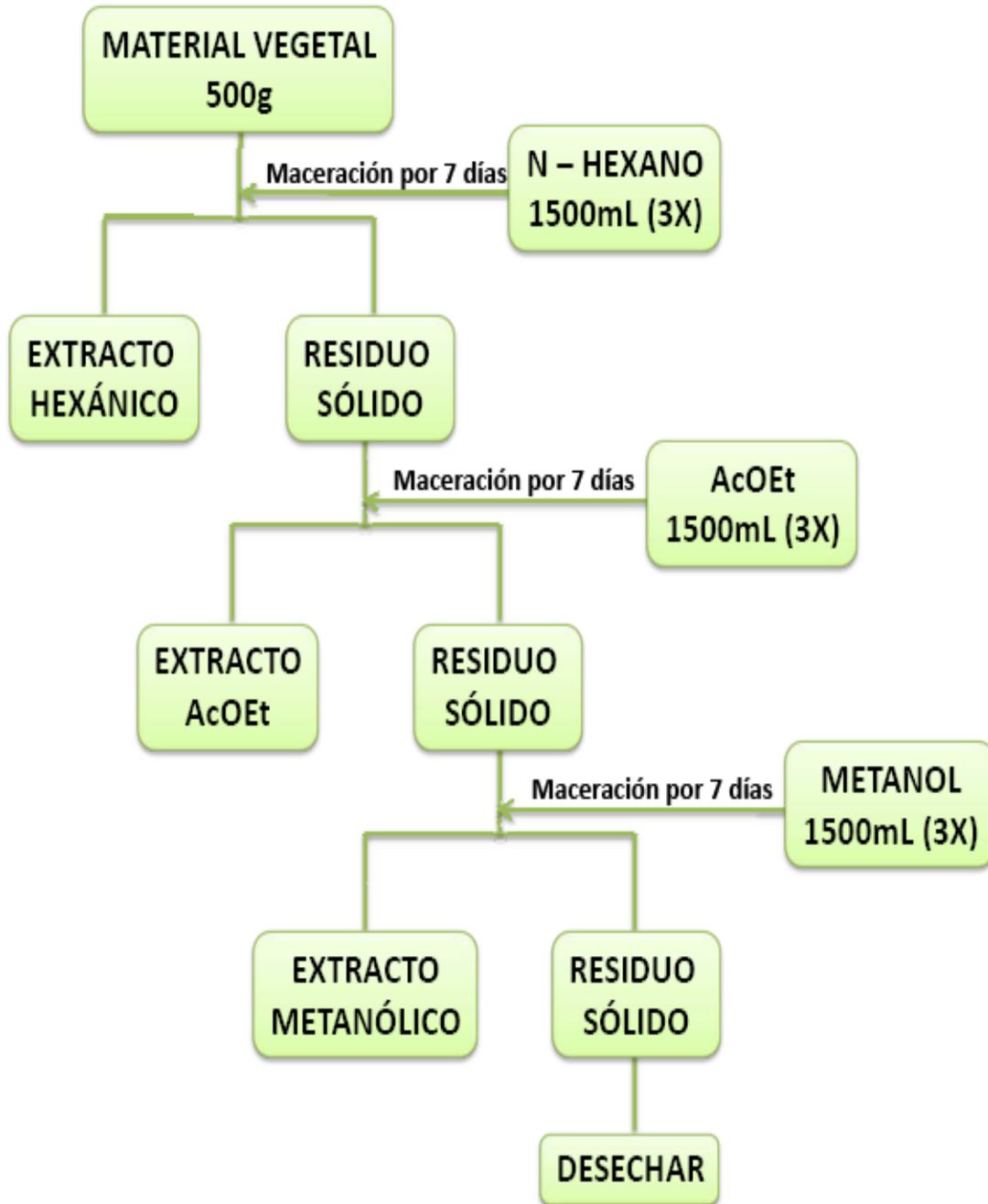


Figura 12: Esquema de extracción y fraccionamiento aplicado a *Phyllanthus orbicularis* HBK

- Cloroformo: metanol (9:1)
- n-butanol: ácido acético: agua (65:25:10)
- Acetato de etilo: metanol: agua (100:13,5:10)

Para el revelado de las placas fueron empleadas las siguientes condiciones:

- Luz ultravioleta de longitud de onda 254nm
- Exposición a los vapores de amoníaco
- Rociado con vainillina/H₂SO₄ y calor: se calentó a una temperatura de 105°C aproximadamente hasta la aparición de manchas o modificación de la apariencia de las ya existentes

II.2.3. CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)

Dicho estudio se le realizó a los extractos hexánicos y AcOEt correspondientes a las colectas de Marzo/07, Agosto/07, Octubre/07 y Enero/08.

En el análisis de los extractos hexánicos de Agosto/07 y Octubre/07 se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5945 A, JMS-SX 102 JEOL, bajo las siguientes condiciones de trabajo:

- Columna: HP-5MS de Fenilsilicona al 5% (30m x 0,25mm x 0,25µm)
- Volumen de inyección: 1µL, modo "split"
- Temperatura del Inyector: 300°C
- Gas portador y flujo: Se utilizó Helio como gas portador a un flujo de 1mL/min.
- Rampa de temperatura: La temperatura inicial fue de 40°C por 1min. y programación de 8°C por minuto hasta 305°C por un tiempo de 5min.
- El espectrómetro de masas fue operado a 70eV con un rango de masas hasta 450uma

Los extractos hexánicos de Marzo y Enero/07 se analizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 acoplado a un espectrómetro de masas 5973 con las siguientes condiciones de trabajo:

- Columna: SPB-5 (50m x 0,25mm x 0,10µm)
- Volumen de inyección: 1µL, modo "split"
- Temperatura del Inyector: 280°C
- Gas portador y flujo: Se utilizó Helio como gas portador a un flujo de 1mL/min.
- Rampa de temperatura: La temperatura inicial fue de 60°C por 2min. con programación de 4°C por minuto hasta 100°C, a partir del cual se incrementó a 10°C por minuto hasta 290°C y se dejó a esa temperatura un tiempo de 5min.
- El espectrómetro de masas fue operado a 70eV con un rango de masas de 45-700uma
- Temperatura de la fuente: 230°C

En el estudio de los extractos de AcOEt correspondientes a las diferentes colectas se utilizó el equipamiento anterior con similares condiciones de trabajo a excepción de la columna cromatográfica utilizada (HP-5MS 15m x 0,25mm x 0,25µm).

II.2.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

El análisis por CLAR estuvo encaminado a los extractos metanólicos, con el propósito de detectar posibles flavonoides, se utilizaron como patrones, rutina, quercetina, kaempferol (98% de pureza, procedentes de Fluka Biochemika). Las muestras fueron solubilizadas en metanol grado CLAR y filtradas por membrana de teflón.

Para el estudio se utilizó un cromatógrafo líquido Waters modelo 1525, bajo las siguientes condiciones de trabajo:

- Fase móvil: MeOH: Agua (10:90) y al cabo de los 40min. se siguió con MeOH
- Detector UV-Waters 2996 por arreglo de diodo, 254nm
- Flujo: 0,6 mL/min., modo gradiente lineal
- Volumen de inyección: 20µL
- Columna: Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1m x100mm 3,5µm)

Para la determinación cualitativa se estimó el tiempo de retención de cada estándar y la muestra, considerándose como positivos para la presencia de cada flavonoide

aquellos valores que se encontraban alrededor del valor promedio del tiempo de retención. Para la confirmación de los picos se realizó una coinyección de la muestra con los patrones y se determinó el espectro UV.

II.2.5. FRACCIONAMIENTO EN COLUMNA CROMATOGRÁFICA

Se realizó un fraccionamiento en columnas de vidrio (a vacío) de diferentes capacidades según la cantidad de muestra a analizar y se empaquetaron con gel de sílice (Sílica Gel 60 GF₂₅₄ Merck de 40-60mesh) en una proporción 3:1 con respecto al peso del extracto a separar, adsorbiendo previamente el extracto en gel de sílice en una proporción 1:1, la mezcla se secó con corriente de aire y se colocó en la parte superior de la columna. Las fases móviles constituyeron los disolventes hexano, AcOEt y MeOH, tanto puros como en mezclas que oportunamente se especifican en el capítulo de resultados y discusión.

Para el análisis cromatográfico de los extractos y subfracciones se utilizó la CCD, con placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (sílica gel 60/UV 254nm, Alugram) y como reveladores la luz UV y/o sulfato cérico al 1% en 2N H₂SO₄ y calor, en algunos casos se utilizó AlCl₃ al 5% en MeOH y vapores de NH₃.

II.2.6. REACCIÓN DE ACETILACIÓN

Para la reacción de acetilación se pesaron 200mg de muestra, los que fueron colocados en un matraz bola de 50mL, se le adicionó 2mL de piridina y 2mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se sometió a calentamiento (baño de agua a 70°C) durante 6 horas. Posteriormente se le agregó hielo y el precipitado obtenido se filtró; el matraz bola fue lavado con AcOEt, dicho lavado se colocó en un erlenmeyer junto con el precipitado de la reacción disuelto en AcOEt, para eliminar el agua se le agregó sulfato de sodio anhidro, se filtró mediante un embudo con algodón desengrasado y se colocó en un matraz bola para la evaporación del disolvente a presión reducida (Manjarréz y cols., 2003; Morantes y cols., 2007; Plazas y cols., 2008).

II.2.7. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS y ESPECTROSCÓPICAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS Y SUS DERIVADOS ACETILADOS

II.2.7.1. PUNTO DE FUSIÓN

Los puntos de fusión (°C) se determinaron en un equipo Fischer Jones y se reportaron los valores sin corrección. Para esta determinación se requirió aproximadamente 1mg de muestra.

II. 2. 7. 2. ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJO

Los espectros en el Infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrómetro Nicolet Magna IR Spectrophotometer 750, en pastilla de KBr, con aproximadamente 3mg de muestra. Las bandas se informaron en cm^{-1} .

II.2.7. 3. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se determinaron a 300 y 500MHz en el caso de $\text{RMN-}^1\text{H}$, a 75 y 125MHz para $\text{RMN-}^{13}\text{C}$, en espectrómetros, Varian VXR-300 y SUO Varian Unity Plus-500, utilizando como disolventes CD_3OD , D_2O , CDCl_3 y DMSO-d_6 . En todos los casos se usó TMS como referencia interna. Se emplearon secuencias de pulso para experimentos de desacoplamiento y por transferencia de polarización en ^1H y ^{13}C (DEPT). Para realizar todos los experimentos de RMN se requirieron aproximadamente 13mg de muestra. Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en partes por millón (ppm), las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz) y las señales se indicaron como: s=singlete, d=doblete, dd=doblete de doblete.

II.3. ALGUNAS EVALUACIONES BIOLÓGICAS PRELIMINARES REALIZADAS A LOS EXTRACTOS Y COMPUESTOS AISLADOS DE *Phyllanthus orbicularis* HBK

II.3.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

II.3.1.1. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE REDUCCIÓN TOTAL

El ensayo seleccionado fue el de Potencial de Reducción Total (técnica FRAP). Las determinaciones fueron de carácter espectrofotométrico, se empleó un espectrofotómetro UV- visible (Ultrospec-Plus) procedente de Pharmacia-LKB y un lector de placas de 96 pocillos marca SUMA (Sistema Ultramicroanalítico) con filtro 590nm.

Materiales:

- Micropipetas de 5-1000 μ L
- Microtubos de ensayos de 1,5mL

Reactivos:

- Acetato de sodio anhidro o acetato de sodio tri-hidratado.
- Ácido acético (99,7%)
- 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Aldrich)
- Ácido clorhídrico (37%)
- FeCl₃ x 6 H₂O (0,02M)
- FeSO₄ x 7 H₂O

Muestras:

- Extractos hexánico, AcOEt, metanólico, metanólico acetilado y los flavonoides rutina, quercetina, rutina decaacetilada y quercetina pentaacetilada obtenidos del material vegetal de *P. orbicularis*, a una concentración de 1mg/mL.
- Sustancia de referencia: Vitamina C (99% pureza, Aldrich), a una concentración de 1mg/mL.

Fundamento del método

Consiste en medir la capacidad de la muestra para reducir el hierro férrico (Fe³⁺) a ferroso (Fe²⁺). Se coloca en el medio de reacción el complejo Fe³⁺-TPTZ y el mismo en

presencia de agentes reductores se reduce a Fe^{2+} -TPTZ que desarrolla un color azul intenso con un máximo de absorción a 593nm (Benzie y Strain, 1996).

Las condiciones del ensayo favorecen la reducción del complejo y están ajustadas para que la formación de color solo ocurra por efecto de la muestra que se añade.

II.3.1.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SECUESTRADORA DE RADICALES SUPERÓXIDO

Se utilizó un espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec-Plus) procedente de Pharmacia-LKB y un lector de placas de 96 pocillos marca SUMA, se trabajó a 420nm, con cubetas de cuarzo o plástico permeable a la luz UV.

Materiales de laboratorio:

- Pipetas automáticas 50, 250 - 3000 μL
- Microtubos de ensayo 0,5 μL

Reactivos:

- Pirogalol
- EDTA
- Tris
- HCl 32%

Muestras

- Extractos hexánico, AcOEt y metanólico (100 μl)
- Agua (control negativo)
- SOD (control positivo)

Fundamento del método

El ensayo de la actividad secuestradora sobre el sistema de generación P-PO, se fundamenta en la inhibición que produce el agente secuestrante en la reacción de autoxidación del P (0.124nmol/L) en medio básico Tris-HCl 50mmol/L pH 8,20 a 25°C durante 1min., la cual transcurre normalmente hacia la formación de PO que absorbe a 420nm. La presencia del agente secuestrante de O_2 inhibe la reacción de

autoxidación, deteniendo la reacción de propagación radicalica. Se siguió el procedimiento descrito por Mahnheim (1988) y Sakagami y cols. (1990).

Para el análisis de los resultados se llevó a cabo un análisis de varianza de clasificación simple a través de ANOVA -1, para un nivel de significación $p < 0,05$.

II.3.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

La evaluación de la actividad antiinflamatoria se realizó mediante el ensayo de edema inducido en oreja de ratón por el TPA, siguiendo la metodología propuesta por Della y cols. (1994).

Ensayo de TPA: Se emplearon ratones machos (cepa CD1, de 20 a 25g), los cuales se pesaron y fueron separados en grupos de tres: un grupo control negativo, grupo control positivo (indometacina) y grupos tratados. Cada grupo fue anestesiado con pentobarbital sódico a una dosis de 31,5mg/kg por vía intraperitoneal. A los grupos control y tratados se les aplicó tópicamente 10 μ L de la solución etanólica de TPA (250 μ g/mL) en la oreja derecha, y 10 μ L de etanol en la oreja izquierda, 10 min. después de la aplicación de TPA, a los grupos tratados se les aplicó 20 μ L de las muestras objeto de estudio (extractos hexánico, AcOEt, metanólico, metanólico acetilado y los flavonoides rutina, quercetina, rutina decaacetilada y quercetina pentaacetilada obtenidos del material vegetal de *P. orbicularis*) en ambas caras de la oreja derecha a las dosis de 1 μ mol/oreja disueltos en disolventes apropiados según el compuesto y en la oreja izquierda solo se aplicó 20 μ L del vehículo, respectivamente. Se dejó 4h de post-aplicación y eventualmente cada grupo de animales fue sacrificado por dislocación cervical, se tomaron biopsias de cada oreja con un sacabocados de 7mm de diámetro. Cada una de las orejas control y tratadas se depositaron en tubos de eppendorff previamente pesados. Posteriormente se obtuvieron las diferencias de pesos entre la oreja control y la tratada de cada animal (Merlos y cols., 1991). El porcentaje de inhibición fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \left[\left(\frac{\text{Peso de la oreja tratada}}{\text{Peso de la oreja control}} \right) 100 \right]$$

Los resultados se analizaron mediante una prueba de t-student y una prueba de Dunnet, a través del programa Sigma-star (2.0). El nivel de significación en todos los análisis fue de $p < 0,05$.

II.3. . EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

La evaluación de la actividad citotóxica se llevó a cabo mediante el ensayo de la sulforrodamina B, según la metodología propuesta por Monks y cols. (1991).

Cultivos celulares: Se emplearon seis líneas celulares de cáncer humano: cáncer de colón (HCT-15), cáncer de mama (MCF-72), sistema nervioso central SNC (U251), leucemia mieloblástica crónica (K-562), cáncer de pulmón (SKUL-1) y cáncer de próstata (PC-3), provenientes del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica, las cuales fueron cultivadas en medio RPMI-1640 adicionado con 10% de Suero Fetal Bovino, 2 μ M glutamina. Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora a una atmósfera de 5% de CO₂, a una temperatura de 37°C y un ambiente saturado de humedad.

Preparación e inoculación de las células: Las células adheridas a los frascos de cultivo fueron removidas con 2 ó 3mL de solución tripsina-EDTA al 0,05%. Posteriormente la tripsina se inactivó adicionando 10mL de medio RPMI-1640 adicionado con 5% de SFB, las células se disociaron con pipeteo suave, la densidad y viabilidad de las líneas celulares se contaron en un hemacitómetro y fueron evaluadas por exclusión con azul de tripano. Se preparó una dilución para obtener una densidad adecuada y la suspensión celular fue sembrada en placas de 96 pozos. Todas las líneas celulares fueron incubadas por un periodo de 24h a 37°C y estabilizadas antes de adicionar los extractos y compuestos a evaluar (extractos hexánico, AcOEt, metanólico, metanólico acetilado y los flavonoides rutina, quercetina, rutina decaacetilada y quercetina pentaacetilada obtenidos del material vegetal de *P. orbicularis*).

Dilución de los compuestos a evaluar: Los extractos y compuestos aislados se evaluaron a una concentración de 50 μ g/mL los cuales fueron solubilizados en DMSO,

100µL de cada disolución fue agregada a los pozos. Dado que los compuestos a evaluar no fueron filtrados o esterilizados la contaminación bacteriana fue controlada por la adición de gentamicina. Como control positivo se utilizó doxorubicina. Los cultivos se incubaron por un periodo de 48h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad. El crecimiento y viabilidad celular se evaluó mediante la técnica de Sulforodamina B.

Ensayo de SRB: Transcurridas las 48h los cultivos celulares se fijaron *in situ* adicionando 50µL de ácido tricloroacético frío (50% p/v), los cultivos se incubaron por 60 min. a 4°C, se desechó el sobrenadante y los cultivos se lavaron cinco veces con agua desionizada. Posteriormente se adicionó a los pozos 100µL de solución SRB (0,4% p/v en ácido acético al 1%) durante 10 min., el exceso de SRB se removió lavando cinco veces con ácido acético al 1%. Finalmente, el botón celular teñido se solubilizó con buffer Tris y la densidad óptica fue leída en un espectrofotómetro a una λ de 515nm (lector de ELISA BIO-TEK. ELx 808). La densidad óptica es proporcional al crecimiento celular e inversamente proporcional al grado de citotoxicidad de un compuesto prueba (Houghton y cols., 2007). La citotoxicidad fue reportada como el porcentaje de inhibición del crecimiento celular y se determinó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición del crecimiento} = 100 - \left[\frac{\text{DO (muestra)}}{\text{DO (vehículo)}} \right] 100$$

II. 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados correspondientes al control de calidad de las muestras pertenecientes a las diferentes colectas de *Phyllanthus orbicularis*, así como los obtenidos en el estudio de secado, almacenamiento y cuantificación de fenoles totales, fueron procesados por el programa Statgraphics®Plus, versión 5.0, llevándose a cabo un análisis de varianza de clasificación simple a través de ANOVA-1, para un nivel de significación del 95% y para la comparación de las medias se utilizó el test de Rangos Múltiples de Duncan. Para proponer las especificaciones de calidad de la droga se determinaron los límites de tolerancia mediante el mismo paquete estadístico.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO



CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO DE *Phyllanthus orbicularis* HBK

El estudio fue desarrollado con varias épocas de colectas con el propósito de poder determinar la influencia de este factor en las características físicas y químicas de la planta.

III.1. CARACTERIZACIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE

III.1.1. EVALUACIÓN MACROMORFOLÓGICA DE LAS HOJAS Y TALLOS

Con el objetivo de determinar las características externas de la especie objeto de estudio e interpretar adecuadamente la monografía que sobre la misma se establecen en los compendios oficiales se decidió realizar un estudio macromorfológico de hojas y tallos.

La lámina foliar (figura 13A) presentó un color verde rojizo, más oscuro por el haz que por el envés con una consistencia coriácea, penninervia, cortamente peciolada, el limbo abovado-elíptico con borde ondulado, el ápice redondeado y la base acorazonada-obtusa.

Los resultados promedios para las dimensiones de largo y ancho de las hojas correspondientes a las diferentes fechas de colectas se presentan en la tabla III. Se pudo constatar que existe poca variabilidad de un dato respecto a otro en cada uno de los parámetros medidos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas al aplicar ANOVA-1 para un 95% de confianza, lo que sugiere que la época de recolección no tiene aparente influencia sobre el tamaño de las hojas cuando la planta se encuentra en estado adulto.

Al analizar los valores medios de largo y ancho se evidenció que están en correspondencia con los valores planteados por Roig (1988) (0,60-1,00cm para el largo y de 0,70-0,80cm para el ancho).

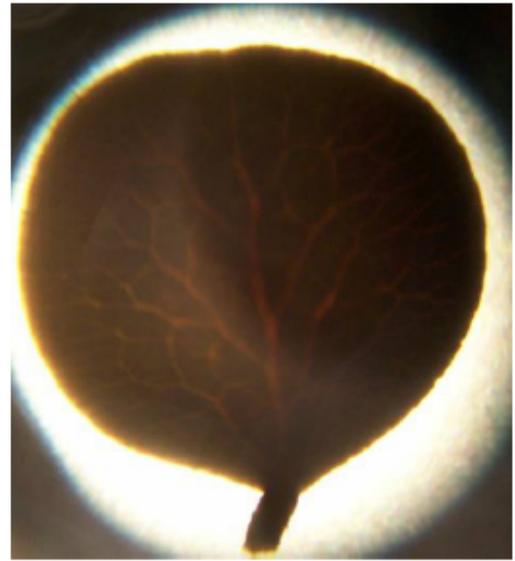
Tabla III. Mediciones de largo y ancho de las hojas

Colectas	Largo (cm) ± S	Ancho (cm) ± S
Enero/03	0,78 ± 0,09 ^a	0,74 ± 0,11 ^a
Febrero/04	0,74 ± 0,15 ^a	0,69 ± 0,13 ^a
Abril/05	0,74 ± 0,13 ^a	0,71 ± 0,20 ^a
Junio/05	0,74 ± 0,17 ^a	0,71 ± 0,13 ^a
Febrero/06	0,73 ± 0,15 ^a	0,69 ± 0,10 ^a
Marzo/07	0,77 ± 0,11 ^a	0,72 ± 0,14 ^a
Mayo/07	0,77 ± 0,12 ^a	0,71 ± 0,16 ^a
Agosto/07	0,76 ± 0,17 ^a	0,71 ± 0,14 ^a
Octubre/07	0,79 ± 0,10 ^a	0,73 ± 0,14 ^a
Diciembre/07	0,78 ± 0,13 ^a	0,73 ± 0,16 ^a
Enero/08	0,79 ± 0,15 ^a	0,74 ± 0,18 ^a
Valor Promedio	0,76 ± 0,02	0,71 ± 0,01
Límites de tolerancia	0,67 - 0,84	0,66 - 0,75

Leyenda: Letras iguales muestran que no existen diferencias significativas y letras diferentes que si existen diferencias significativas para un 95% de confianza



1



2

A: Macromorfología de la hoja. 1: Haz, 2: Envés



1



2

B: Macromorfología del tallo. 1: Superficie externa, 2: Superficie interna

Figura 13. Características macromorfológicas de la hoja y el tallo de *P. orbicularis*

En la observación de las características macromorfológicas de los tallos (figura 13B), se comprobó que son leñosos, cilíndricos, con superficie externa de color rojizo-verdoso, rugosa con estrías y una superficie interna de color crema claro, fibrosa, con pequeñas estrías. En la literatura (Hermano L. y Hermano A., 1953; Roig, 1988) solo refieren el color de las ramas, el cual coincide con los resultados obtenidos.

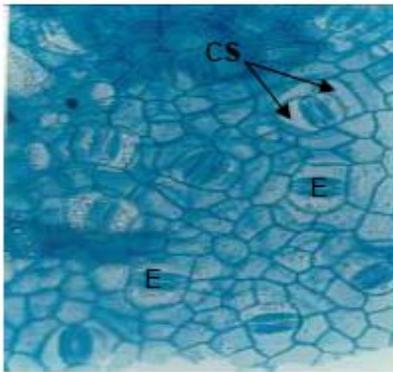
III.1.2. EVALUACIÓN MICROMORFOLÓGICA DE LAS HOJAS Y TALLOS

En los estudios farmacognósticos, resulta imprescindible determinar las características anatómica- morfológicas de las especies, con vistas a establecer su identidad. Para *P. orbicularis* HBK, no existían referencias anteriores.

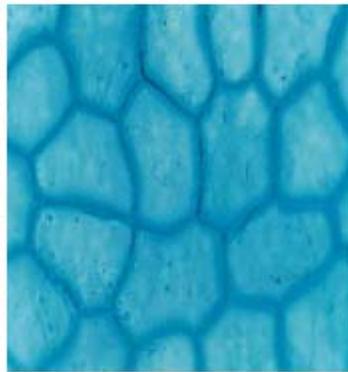
En la anatomía foliar se observó en vista superficial una epidermis abaxial (figura 14A) conformada por células pentagonales de tamaño variable, de paredes reforzadas rectas y curvas, se apreciaron abundantes estomas del tipo paracítico donde los ejes longitudinales de las células subsidiarias son paralelos a los de las células estomáticas y a la apertura del estoma, el índice estomático fue de 14. La epidermis adaxial (figura 14B) se mostró desprovista de estomas, con células pentagonales, hexagonales y heptagonales de tamaño variable, también de paredes reforzadas rectas y curvas.

La sección transversal del limbo (figura 14 1C) presentó una epidermis adaxial de cutícula gruesa con pelos tectores pluricelulares, a continuación se encontró el parénquima en empalizada, constituido por células columnares alargadas muy unidas, a continuación se apreció una zona más clara correspondiente al parénquima esponjoso con células de forma y tamaño variable con espacios intercelulares. Finalmente se observó la epidermis abaxial de cutícula gruesa formada por dos estratos de células y escasos pelos pluricelulares. Estos pelos (figura 14 2C) tienen una cierta inclinación y están conformados de cinco a seis células donde la apical es afilada en un caso y redondeada en otros, con cierta curvatura respecto a la célula basal.

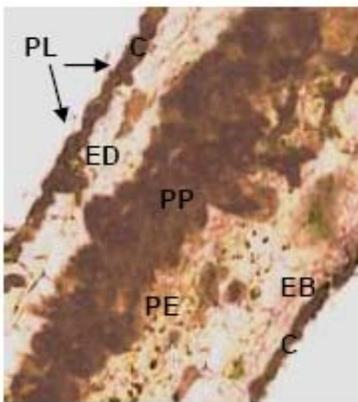
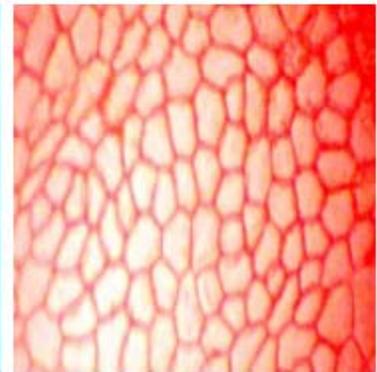
A nivel de nervio central (figura 14D) la superficie abaxial es totalmente convexa con algunos pelos pluricelulares, la epidermis de esta cara tiene una cutícula gruesa



A: Vista frontal de la epidermis abaxial



B: Vista frontal de la Epidermis adaxial

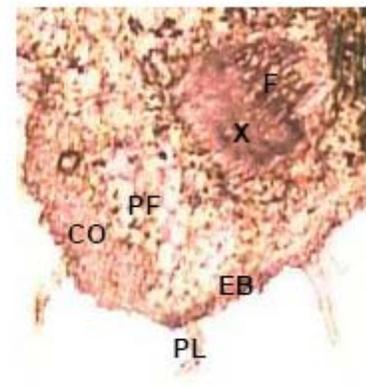


1

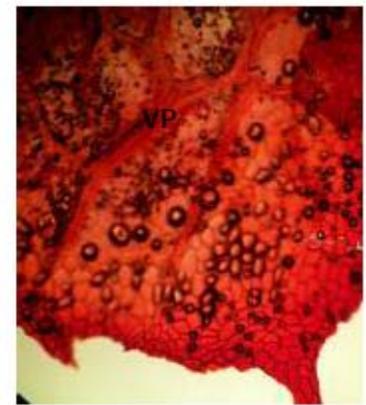
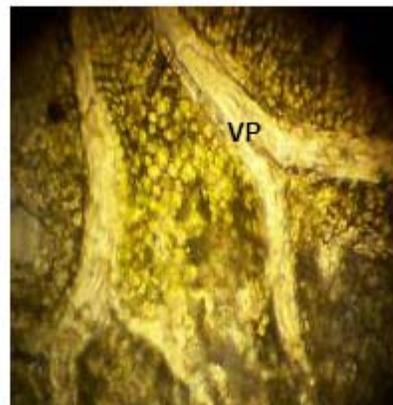
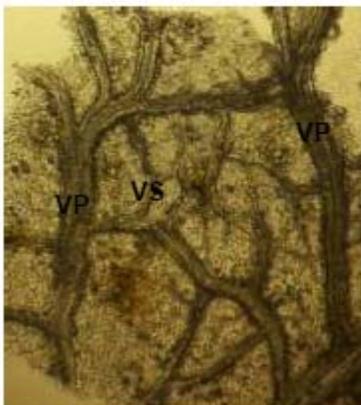
C: Corte trasversal a nivel del limbo



2



D: Corte trasversal a nivel del nervio central



E: Vista frontal de la nervadura

Figura 14. Características micromorfológicas de la hoja de *P. orbicularis*

14A: E. Estomas, CS. Células subsidiarias; 14B: Células de la epidermis; 14C: PL. Pelos pluricelulares, C. Cutícula, ED. Epidermis adaxial, PP. Parénquima en empalizada, PE. Parénquima esponjoso, EB. Epidermis abaxial; 14D: CO. Colénquima, PF. Parénquima fundamental, X. Xilema, F. Floema. 14E: VP. Venas primarias, VS. Venas secundarias

seguida de varios estratos de células colenquimatosas de pequeño tamaño, le siguen células más grandes ligeramente esferoidales, correspondientes al parénquima fundamental y más al centro una zona de células más reforzadas, relacionadas con el floema y xilema. La nervadura de la hoja en su vista frontal (figura 14E) es prominente, las venas primarias siguen un recorrido curvo con ramificaciones en varios sentidos y las venas secundarias ramificadas presentan diferentes ángulos de divergencias.

En las secciones transversales del tallo (figura 15 1A) se constata la epidermis con una cutícula bastante gruesa de escasos pelos pluricelulares, conformada por 6 estratos de células pentagonales y hexagonales alargadas, a continuación se presenta una zona de células muy unidas y pequeñas que constituyen el colénquima, le sigue la zona de cambium bien definida, se observan campos más claros correspondientes a células esféricas que son los vasos del leño. Se visualizan el xilema y el floema (15 2A), los radios medulares (figura 15 2A y 3A) que convergen en una zona concéntrica de células esferoidales que se compactan constituyendo la médula o corazón del tallo.

En las secciones longitudinales del tallo (figura 15B) se apreciaron los radios medulares y las traqueidas conformadas por células rectangulares.

A los cortes se le realizaron algunas reacciones histoquímicas. Se observaron en campos muy visibles en la cutícula de la epidermis y en las células epidérmicas gran cantidad de lignina con una coloración roja; con una coloración amarilla se verificó la presencia del súber, localizado en zonas dispersas del tejido parenquimatoso de hojas y tallos, la celulosa y cutina de color azul se visualizaron fundamentalmente en la cutícula de la epidermis. También se detectaron taninos y flavonoides en los tejidos epidérmicos y parenquimatosos de ambos órganos vegetales.

La droga en polvo presentó una coloración verde amarillenta (figuras 16B y C), se observaron al microscopio fragmentos de hojas donde se destaca una fuerte vascularización y células epidérmicas luego de una tinción con safranina al 1% (figura

16A). En una muestra sin teñir se visualizaron restos de traqueidas del sistema vascular (16B) y algunos pelos pluricelulares (figura 16C).

Es importante destacar que no se encontraron diferencias cuando se analizaron microscópicamente las muestras correspondientes a las diferentes colectas.

Los estudios encontrados sobre los caracteres micromorfológicos de especies pertenecientes al género *Phyllanthus* son escasos, solo los realizados por Khatoon y cols. (2006) en la India a *P. amarus*, *P. fraternus* y *P. maderaspatensis*.

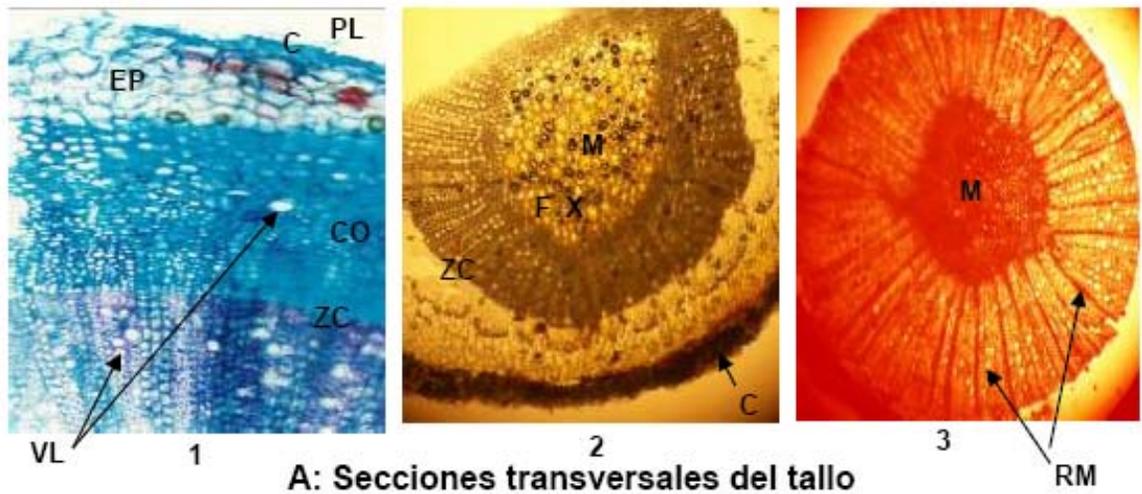
P. amarus presenta estomas anisocítico en ambas caras de la epidermis, con contorno de células epidérmicas ondulado. El índice estomático de la epidermis abaxial es de 28-30 y de la cara adaxial de 16-19. En los cortes del tallo la cutícula es fina y el contorno exterior es cilíndrico (figuras 17A y B).

En *P. fraternus* los estomas son también del tipo anisocítico en ambas caras de la epidermis y las células de éstas tienen un contorno muy ondulado. El índice estomático de la epidermis abaxial es de 25-28 y el de la cara adaxial de 20-24. En los cortes del tallo la cutícula es fina y el contorno exterior es sinuoso (figuras 18 A y B).

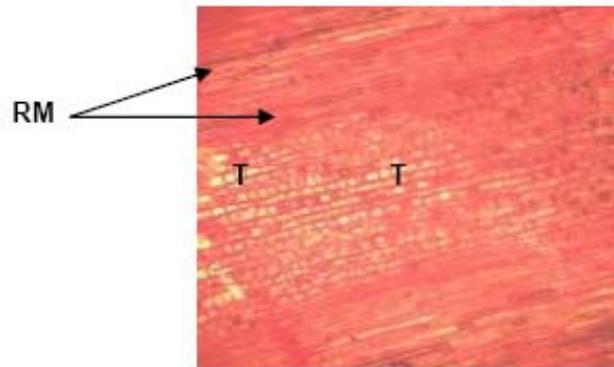
Por su parte, *P. maderaspatensis* presenta estomas anisocítico en ambas caras de la epidermis pero el contorno de las células epidérmicas es recto y en algunos casos ligeramente curvo. El índice estomático de la epidermis abaxial es de 23-26 y de la cara adaxial de 18-20. En los cortes del tallo la cutícula es fina y el contorno exterior es cilíndrico (figuras 19A y B).

En ninguna de las tres especies se observó la presencia de pelos pluricelulares.

Como se observa, entre estas especies existen diferencias notables y respecto a la que se informa en este trabajo, fundamentalmente en el tipo de estomas (estomas paracíticos para *P. orbicularis*), la presencia de pelos pluricelulares en la endémica cubana y ausentes en esas especies, así como en la forma y contorno de las células epidérmicas. Lo anterior ratifica lo señalado por Esau (1972) y Cronquist (1986), quienes plantean que los caracteres micromorfológicos distinguen a una especie en



A: Secciones transversales del tallo



B: Sección longitudinal del tallo

Figura 15. Características micromorfológicas del tallo de *P. orbicularis*

15 1A: PL. Pelo pluricelular, C. Cutícula, EP. Epidermis, CO. Colénquima, ZC. Zona de cambium, VL. Vasos del leño; 15 2A: M. Médula, X. Xilema, F. Floema; 15 3A: RM. Radios medulares; 15B: T. Traqueidas

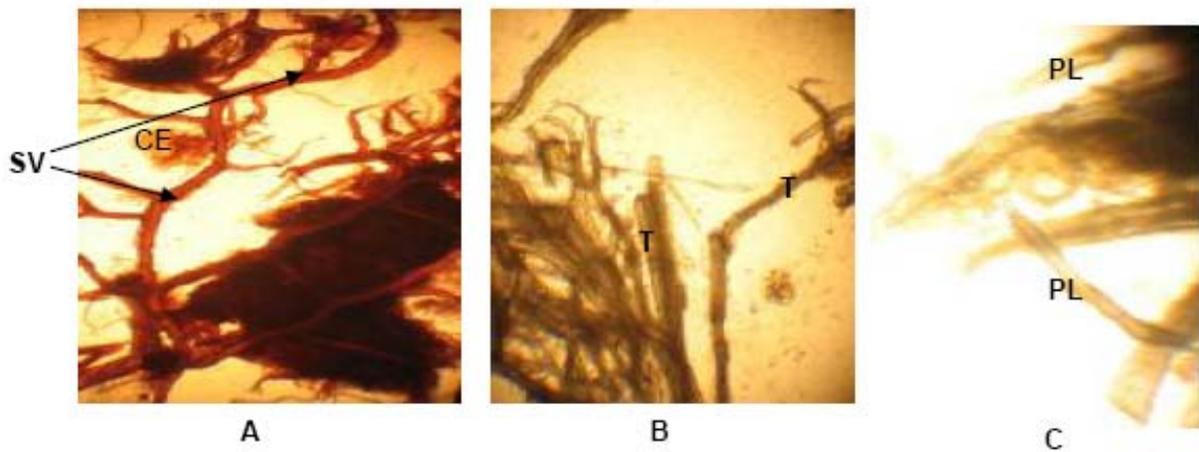
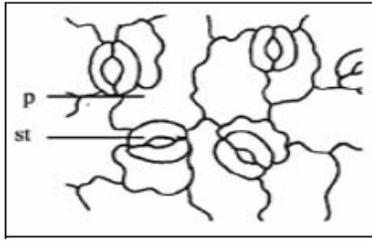
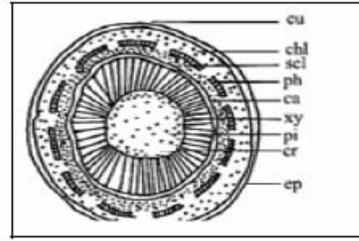


Figura 16. Micromorfología de la droga en polvo de *P. orbicularis*

16 A: SV. Sistema vascular, CE. Células epidérmicas; 16B: T. Traqueidas; 16C: PL. Pelos pluricelulares



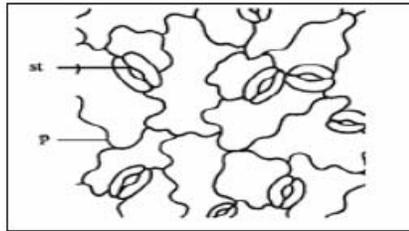
A: Vista frontal de las epidermis abaxial y ataxia de las hojas



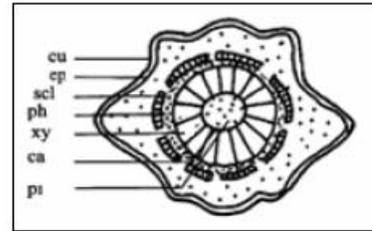
B: Corte transversal del tallo

Figura 17. Características microscópicas de las hojas y tallos de *P. amarus* (Khatoon y cols. (2006))

p: Células epidérmicas, **st:** Estoma, **cu:** Cutícula, **chl:** Parénquima esponjoso, **scl:** Colénquima, **ph:** Floema, **ca:** Anillo de cámbium, **xi:** Xilema, **pi:** Médula, **cr:** Radios medulares



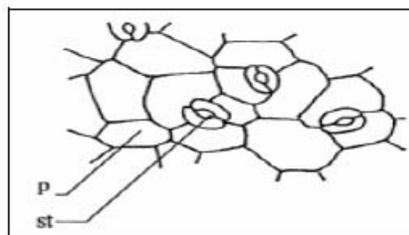
A: Vista frontal de las epidermis abaxial y adaxial de las hojas



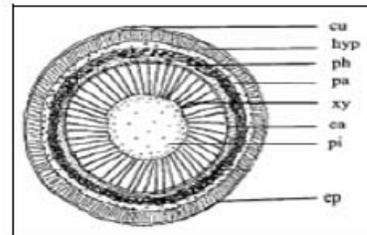
B: Corte transversal del tallo

Figura 18. Características microscópicas de las hojas y tallos de *P. fraternus* (Khatoon y cols. (2006))

p: Células epidérmicas, **st:** Estoma, **cu:** Cutícula, **ep:** Epidermis, **scl:** Colénquima, **ph:** Floema, **ca:** Anillo de cámbium, **xi:** Xilema, **pi:** Médula, **cr:** Radios medulares



A: Vista frontal de las epidermis abaxial y adaxial de las hojas



B: Corte transversal del tallo

Figura 19. Características microscópicas de las hojas y tallos de *P. maderaspatensis* (Khatoon y cols. (2006))

p: Células epidérmicas, **st:** Estoma, **cu:** Cutícula, **ep:** Epidermis, **hyp:** Hipodermis, **pa:** Parénquima, **ph:** Floema, **ca:** Anillo de cámbium, **xi:** Xilema, **pi:** Médula

particular, y por dicha razón los resultados obtenidos hacen un aporte interesante para la especie y el género.

III.2. ESTUDIO DE SECADO

El secado es un aspecto fundamental dentro de los estudios farmacognósticos encaminados a establecer la calidad de una droga, por lo que aplicar un método de secado apropiado evita que se activen procesos enzimáticos (fermentativos) que modifiquen la estructura de los posibles principios activos.

Aunque se conoce que el secado artificial es el más recomendado en todos los casos, resulta conveniente estudiar otros métodos de secado natural que permitan, de ser posible, proponer una alternativa que se tenga en cuenta en aquellos lugares donde no existan condiciones para aplicar un secado artificial.

La especie objeto de estudio (muestras correspondientes a las colectas de Enero/03, Febrero/04 y Abril/05) fue sometida a secado por diferentes métodos (sol, sombra y estufa), con vistas a determinar él o los recomendables para su secado sin afectar sus características físico-químicas. En la tabla IV se ofrecen los resultados del estudio.

El secado a la sombra fue el que menos cantidad de agua permitió perder a la droga en todos los casos, con valores de 36,86% a 38,05% de pérdida en peso, para lograr pesos aproximadamente constantes entre los 11 y 13 días, con porcentajes de humedad residual que no excedieron el 13,33%. En el caso del secado al sol, las muestras perdieron agua entre un 46,63 y 49,52%, se demoró en secar la planta de 6 a 8 días y se alcanzaron valores de humedad residual no mayores del 12,50%. En comparación con el secado a la sombra, éste método fue más eficiente, sin embargo al presentar el inconveniente de no poder controlar la intensidad de las radiaciones, no resulta del todo aconsejable. En el secado en estufa el material vegetal secó completamente entre los 3 y 4 días (72 y 96 horas respectivamente), o sea, un tiempo relativamente corto en comparación con los otros métodos ensayados, lográndose valores de pérdidas en peso entre 53,84 y 55,32% y contenidos de humedad residual que no superaron el 10,10%.

Tabla IV. Resultados del estudio de secado correspondiente a tres épocas de colecta

Método de secado	Pérdida por desecación (%) ± S			Tiempo de secado (%) ± S			Humedad residual (%) ± S		
	Enero /03	Febrero /04	Abril /05	Enero /03	Febrero /04	Abril /05	Enero /03	Febrero /04	Abril /05
Sombra	36,86±3,42 ^a	38,05±1,36 ^d	37,27±0,23 ^g	12±1,00 ^a	11±0,0 ^d	13±0,57 ^g	11,15±1,23 ^a	13,33±0,57 ^d	12,85±0,25 ^e
Sol	46,63±2,87 ^b	47,83±1,12 ^e	49,52±2,34 ^h	6±1,00 ^b	7±0,57 ^e	8±0,57 ^h	9,33±0,58 ^b	12,50±0,50 ^e	10,25±0,86 ^f
Estufa	53,84±2,87 ^c	54,29±2,04 ^f	55,32±0,57 ⁱ	3±1,00 ^c	4±1,52 ^f	3±0,0 ^c	8,17±0,79 ^c	10,10±0,25 ^f	9,50±1,25 ^b

Leyenda: Letras iguales muestran que no existen diferencias significativas y letras diferentes que si existen diferencias significativas para un 95% de confianza

Al comparar los resultados para cada parámetro entre muestras de diferentes meses de colecta, se demostró que existían diferencias significativas, lo cual pudo deberse a las condiciones climáticas (humedad relativa) durante los días en que se realizó el estudio, así como a la cantidad de agua acumulada en la planta antes del proceso de colecta, la cual puede variar en dependencia de la época de recolección.

Las diferencias encontradas entre métodos se atribuyen a que las técnicas de secado natural (sol y sombra) son susceptibles a la influencia de diversos factores entre los que se pueden citar los niveles de radiación solar, temperatura y humedad ambiental. El secado en estufa, al ser un método artificial, existe control de la temperatura y la ventilación, no influyendo por tanto factores ambientales en el proceso. Según los análisis efectuados, los mejores resultados se obtienen con el secado en estufa, al no apreciar durante la inspección visual alteraciones en cuanto al color de las partes secadas.

Para las muestras que fueron secadas por los dos métodos restantes, a pesar de que el tiempo de secado fue mayor, mostraron un contenido de humedad por debajo del límite máximo admitido (14%), pero durante la inspección visual, las que fueron secadas a la sombra, mostraron ligeras alteraciones en el color, no siendo así para las secadas al sol, aunque en este último no es posible controlar el nivel de radiaciones solares.

Los resultados evidenciaron que para un correcto control de la calidad la droga debe ser secada en estufa a 45°C durante 84 horas.

III.3. ESTUDIO DE ALMACENAMIENTO

Se estudió la droga durante el almacenamiento, para lo cual se trabajó con el material vegetal colectado en el mes de Febrero de 2006. Esto reviste gran importancia debido a que las drogas presentan variaciones en su composición y en ocasiones se hace necesario recolectarlas en una época determinada y almacenarlas en condiciones adecuadas. Como resultado se obtuvo que la muestra almacenada en bolsas de papel kraft, al cabo de los 9 meses presentó cambios ligeros en la coloración (de verde amarillento a verde carmelitoso) en comparación con la guardada en otros envases,

en los cuales las características organolépticas (olor y color) permanecieron inalterables, o sea, olor característico y color verde amarillento.

El contenido de humedad residual (tabla V) presentó un aumento gradual a partir de los 6 meses y por encima del límite máximo admitido (14%) al cabo de los 9 meses de estudio, con diferencias significativas hasta el año de estudio. En el resto de los envases aunque existieron algunas diferencias significativas en los últimos meses, los valores encontrados estuvieron muy por debajo del límite máximo permisible.

Respecto al control microbiológico se puede señalar que para el material contenido en bolsas de papel (tabla VI) se encontró proliferación de microorganismos aerobios totales y hongos a los 9 meses de estudio y este último alcanzó valores por encima del límite establecido a los 12 meses, aunque no se encontraron microorganismos patógenos (***Salmonella***, ***E. coli***, ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa***). Las muestras almacenadas en el resto de los envases no presentaron contaminación microbiológica.

Con relación al contenido de fenoles totales (tabla VII) se confirmó, que en las muestras almacenadas en frascos de cristal, latas compuestas y bolsas de polietileno, se mantuvo bastante estable durante los 12 meses. Sin embargo, el material almacenado en bolsas de papel kraft presentó variación en este valor con una tendencia a la disminución, exhibiendo diferencias estadísticamente significativas en las dos últimas determinaciones para un nivel de significación del 95% al aplicar ANOVA-1. Este comportamiento puede atribuirse a la proliferación de microorganismos aerobios totales y hongos por encima de los límites establecidos al cabo de los 9 meses de estudio, lo cual pudo causar algún proceso fermentativo o reacción de oxidación de dichos metabolitos que ocasionaran su descomposición y por ende su disminución en el tiempo.

Los resultados permiten inferir que hasta 1 año (tiempo de análisis), el material vegetal de ***P. orbicularis*** puede ser conservado fragmentado en frascos de vidrio de color ámbar, latas compuestas y bolsas de polietileno, sin que se produzcan alteraciones en su apariencia y contenido de fenoles totales. No se recomienda el

Tabla V. Contenido de humedad residual de las muestras almacenadas en los diferentes envases

Tiempo (meses)	Contenido de Humedad Residual (%)± S			
	Bolsas de papel kraft	Frascos de cristal	Latas compuestas	Bolsas de polietileno
0	9,47 ± 0,03 ^a	9,47 ± 0,03 ^a	9,47 ± 0,03 ^a	9,47 ± 0,03 ^a
3	9,62 ± 0,97 ^b	9,57 ± 0,09 ^a	9,63 ± 0,14 ^a	9,57 ± 0,29 ^a
6	13,70 ± 0,43 ^c	9,68 ± 0,69 ^a	9,77 ± 0,22 ^a	9,83 ± 0,07 ^a
9	16,23 ± 0,46 ^d	9,89 ± 0,13 ^a	10,46 ± 0,07 ^b	10,70 ± 0,78 ^b
12	19,80 ± 0,18 ^d	10,52 ± 0,06 ^b	10,75 ± 0,02 ^b	11,18 ± 0,01 ^c

Leyenda: Letras iguales muestran que no existen diferencias significativas y letras diferentes que si existen diferencias significativas para un 95% de confianza

Tabla VI. Resultados del análisis microbiológico de las muestras en los distintos envases

Tiempo (meses)	Resultados (UFC/g) de la muestra almacenada en bolsas de papel kraft						
	Conteo de aerobios totales	Conteo de enterobacterias	Conteo de hongos	<i>Salmonellas</i>	<i>Eschericia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
6	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
9	10 ³	Ausente	10 ³	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
12	10 ⁶	Ausente	32x10 ⁵	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Resultados para las muestras almacenadas en frascos de vidrio, latas compuestas y bolsas de polietileno							
0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
9							
6							
12							
Límites permisibles (UFC/g)	10 ⁷	10 ⁴	10 ³	Ausencia	Máx. 10 ²	Ausencia	Ausencia

Tabla VII. Contenido de fenoles totales de las muestras almacenadas en los diferentes envases

Tiempo (meses)	Contenido de fenoles totales (%)± S			
	Bolsas de papel kraft	Frascos de cristal	Latas compuestas	Bolsas de polietileno
0	2,40 ± 0.10 ^a	2,40 ± 0.10 ^a	2,40 ± 0.10 ^a	2,40 ± 0.10 ^a
3	2,29 ± 0.08 ^a	2,38 ± 0.04 ^a	2,31 ± 0,14 ^a	2,40 ± 0,01 ^a
6	2,18 ± 0.02 ^a	2,40 ± 0.06 ^a	2,25 ± 0,22 ^a	2,31 ± 0,04 ^a
9	1,42 ± 0.07 ^b	2,31 ± 0.06 ^a	2,25 ± 1,07 ^a	2,20 ± 0,17 ^a
12	1,02 ± 0.08 ^c	2,25 ± 0.06 ^a	2,16 ± 0,02 ^a	2,12 ± 0,11 ^a

Leyenda: Letras iguales muestran que no existen diferencias significativas y letras diferentes que si existen diferencias significativas para un 95% de confianza

envase de papel Kraft porque propicia el deterioro de la droga, facilitando la absorción de humedad, proliferación de hongos y por ende cambios en su composición.

III.4. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DETERMINADOS AL MATERIAL VEGETAL

El establecimiento de los parámetros físico-químicos de una droga vegetal es indispensable para proponer índices de calidad que puedan garantizar su eficacia y seguridad. Para establecer los mismos se seleccionó el material vegetal secado artificialmente, para el cual se demostraron las mejores características.

III.4.1. CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA E INORGÁNICA EXTRAÑA

Al analizar el contenido de materia orgánica e inorgánica extraña (tabla VIII) se pudo apreciar que el grado de pureza de los lotes evaluados fue adecuado debido a que la recolección y procesamiento del material vegetal se realizó por personal especializado. Solamente en tres colectas (Enero/03, Marzo/07 y Octubre/07) se presentaron materias extrañas con valores muy pequeños, correspondiendo fundamentalmente a polvo.

III.4.2. HUMEDAD RESIDUAL

La determinación de humedad residual en el material vegetal es uno de los índices numéricos que ayudan a complementar la calidad del método de secado evaluado. Un exceso de agua en la droga puede provocar la proliferación de microorganismos e insectos, seguido de la hidrólisis de principios activos, específicamente de los metabolitos glicosilados, y por consiguiente el deterioro de la droga.

Las Normas y Farmacopeas establecen, en dependencia del material vegetal, un contenido de humedad residual entre 8 y 14% (Lou-Zhi-cen, 1980; WHO, 1998; Miranda, 2001). En el estudio efectuado a la planta el promedio de las determinaciones para cada uno de los lotes evaluados estuvo dentro del intervalo exigido (tabla IX), lo que demostró la eficiencia del proceso de secado (estufa a 45°C con recirculación de aire durante 84 horas).

Tabla VIII. Resultados del contenido de materias extrañas

Colectas	Materia orgánica extraña (%) ± S	Materia inorgánica extraña (%) ± S
Enero/03	No presenta	0,10 ± 0,02
Febrero/04	No presenta	No presenta
Abril/05	No presenta	No presenta
Junio/05	No presenta	No presenta
Febrero/06	No presenta	No presenta
Marzo/07	No presenta	0,08 ± 0,02
Mayo/07	No presenta	No presenta
Agosto/07	No presenta	No presenta
Octubre/07	No presenta	0,09 ± 0,01
Diciembre/07	No presenta	No presenta
Enero/08	No presenta	No presenta
Valor promedio	-	0,09 ± 0,01

Tabla IX. Resultados del contenido de humedad residual en las diferentes colectas

Colectas	Humedad Residual (%) \pm S	Parámetros climáticos en la estación meteorológica La Palma, Pinar del Río*	
		Precipitaciones (mm)	Temperatura media (° C)
Enero/03	8,39 \pm 0,03 ^a	40,3	19,5
Febrero/04	8,24 \pm 0,08 ^a	30,3	22,6
Abril/05	8,41 \pm 0,25 ^b	47,6	23,8
Junio/05	12,83 \pm 0,03 ^b	366,8	26,6
Febrero/06	9,47 \pm 0,03 ^c	76,5	21,4
Marzo/07	8,17 \pm 0,79 ^a	23,1	23,3
Mayo/07	10,70 \pm 0,02 ^b	123,3	25,4
Agosto/07	12,50 \pm 0,00 ^d	394,6	26,9
Octubre/07	11,42 \pm 0,07 ^b	252,4	26,4
Diciembre/07	8,50 \pm 0,11 ^b	51,6	23,4
Enero/08	9,50 \pm 1,25 ^c	64,7	22,0
Valor promedio	9,83 \pm 1,75 ^c		
Límites de tolerancia	5,55 - 14,10		

Leyenda: Letras iguales muestran que no existen diferencias significativas y letras diferentes que si existen diferencias significativas para un 95% de confianza

* **Datos del Centro del Clima del Instituto de Meteorología (INSMET). Cuba**
 Lic. Nancy Maso (Jeje Dpto Climatología) y Lic. Liset Abreu Pérez de Corcho (Especialista Comercial INSMET)

Se presentaron algunas diferencias entre muestras, lo cual pudo deberse, fundamentalmente, a la cantidad de agua absorbida por la planta antes de la recolección, destacándose con mayores porcentajes las colectas de los meses de Junio/05 y Agosto/07 con valores de 12,83 y 12,50% respectivamente. Este comportamiento pudo estar relacionado con las altas precipitaciones que se produjeron en esos meses en comparación con los restantes (según datos del Instituto de Meteorología que se muestran en la tabla IX), lo que hace que la planta tenga mayor contenido de agua en su interior y por tanto mayor cantidad de agua que perder.

III.4.3. SUSTANCIAS SOLUBLES O EXTRAÍBLES

La determinación de sustancias extraíbles o solubles es uno de los índices numéricos más importantes para seleccionar los mejores disolventes en el proceso de extracción.

Los resultados revelan (tabla X) que se obtiene mayor rendimiento de sustancias extraíbles de manera general con los disolventes menos polares, o sea, etanol-agua al 50 y 90%, sin existir diferencias significativas entre ellos, pero sí respecto a los extractivos en agua, donde los valores fueron menores en todos los lotes estudiados.

Al analizar el comportamiento entre colectas también se encontraron algunas diferencias significativas. Se obtuvo la mayor cantidad de constituyentes en el mes de Agosto, seguido por los meses de Mayo, Marzo, Abril y Octubre, lo cual pudiera estar relacionado con una mayor disponibilidad de metabolitos por parte de la planta para favorecer algún proceso fisiológico que estuviese ocurriendo en ese momento o con las condiciones climatológicas o ambas.

En los meses de Marzo y Abril la especie vegetal está comenzando el proceso de floración y en Mayo alcanza su máximo esplendor (información de la Estación Forestal de Mil Cumbres), según Osorio (2009) esta etapa demanda gran cantidad de metabolitos. En los meses de Agosto y Octubre factores relacionados con las condiciones climáticas como la influencia de radiaciones solares y lluvias, pudieron favorecer la producción de metabolitos (ver tabla IX). Este comportamiento

Tabla X. Resultados de la determinación de sustancias solubles o extraíbles

Colectas	Sustancias solubles en agua (%) ± S	Sustancias solubles en etanol 50% (%) ± S	Sustancias solubles en etanol 90% (%) ± S
Enero/03	5,33 ± 0,04 ^a	9,23 ± 0,05 ^c	9,50 ± 0,07 ^c
Febrero/04	4,90 ± 0,05 ^b	12,55 ± 0,11 ^f	12,23 ± 0,04 ^f
Abril/05	9,30 ± 0,20 ^c	20,57 ± 0,13 ^g	21,02 ± 0,18 ^l
Junio/05	6,75 ± 0,07 ^d	12,94 ± 0,05 ^f	12,65 ± 0,04 ^f
Febrero/06	5,71 ± 0,03 ^a	10,75 ± 0,08 ^h	10,49 ± 0,04 ^h
Marzo/07	8,64 ± 0,13 ^e	20,73 ± 0,17 ^g	20,34 ± 0,22 ^g
Mayo/07	9,56 ± 0,10 ^c	21,66 ± 0,04 ⁱ	21,75 ± 0,07 ⁱ
Agosto/07	9,69 ± 0,05 ^c	24,48 ± 0,10 ^j	24,31 ± 0,03 ^j
Octubre/07	8,45 ± 0,03 ^e	18,55 ± 0,12 ^k	19,24 ± 0,09 ^m
Diciembre/07	6,27 ± 0,04 ^d	12,86 ± 0,14 ^f	12,78 ± 0,09 ^f
Enero/08	4,70 ± 0,08 ^b	9,31 ± 0,13 ^c	9,37 ± 0,09 ^c
Valor promedio	7,20 ± 1,95	15,78 ± 5,49	15,79 ± 5,55
Límites de tolerancia	2,92 - 11,47	7,69 - 39,25	7,94 - 39,52

Legenda: Letras iguales muestran que no existen diferencias significativas y letras diferentes que si existen diferencias significativas para un 95% de confianza

evidentemente denota la influencia de la época de recolección en el contenido de extractivos.

III.4.4. CENIZAS TOTALES, CENIZAS SOLUBLES EN AGUA Y CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO AL 10%

Las cenizas son indicativas de la calidad del material con que se trabaja y constituye una base para juzgar su pureza e identidad, brindando información relativa a la posible adulteración con materias inorgánicas o cuerpos extraños que posea (Miranda y Cuéllar, 2001).

Las Farmacopeas plantean un índice de cenizas totales hasta el 5% (Lou-Zhi-cen, 1980; WHO 1998). En la experiencia realizada los valores se encontraban por debajo del límite exigido (de 2,32 a 2,85%).

La cantidad de cenizas solubles en agua y las insolubles en ácido clorhídrico al 10%, son también parámetros que ayudan a evaluar la pureza de la droga. Al analizar los resultados para cada lote, se pudo evidenciar que las cenizas solubles en agua se hallaban entre un 1,13 y 1,36%, y las cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10% entre 0,36% y 0,63%. En ambas determinaciones los valores son pequeños y están dentro de los límites establecidos (alrededor del 2% para plantas medicinales) (Lou-Zhi-cen, 1980; WHO 1998). La tabla XI ofrece los resultados del estudio.

A pesar de que las muestras fueron colectadas en el mismo lugar (suelo cuabal, ferralítico rojo con roca serpentina), se constataron algunas diferencias estadísticamente significativas, que pudieran ser atribuibles a la época de recolección, donde la disponibilidad de nutrientes absorbidos del suelo, por parte de la planta, puede variar para favorecer uno u otro proceso metabólico, o a sesgos en la manipulación de las muestras.

Tabla XI. Resultados de la determinación del contenido de cenizas

Colectas	Cenizas totales (%)± S	Cenizas solubles en agua (%) ± S	Cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10% (%) ± S
Enero/03	2,32 ± 0,08 ^a	1,24 ± 0,01 ^d	0,45 ± 0,06 ^g
Febrero/04	2,85 ± 0,03 ^b	1,17 ± 0,05 ^e	0,36 ± 0,07 ^h
Abril/05	2,82 ± 0,07 ^b	1,22 ± 0,06 ^d	0,52 ± 0,03 ⁱ
Junio/05	2,78 ± 0,02 ^b	1,36 ± 0,06 ^f	0,56 ± 0,06 ⁱ
Febrero/06	2,82 ± 0,03 ^b	1,13 ± 0,03 ^e	0,63 ± 0,03 ^j
Marzo/07	2,62 ± 0,06 ^c	1,24 ± 0,03 ^d	0,39 ± 0,05 ^h
Mayo/07	2,58 ± 0,05 ^c	1,17 ± 0,07 ^e	0,52 ± 0,09 ⁱ
Agosto/07	2,74 ± 0,11 ^b	1,26 ± 0,06 ^d	0,63 ± 0,01 ^j
Octubre/07	2,40 ± 0,15 ^a	1,30 ± 0,03 ^f	0,45 ± 0,00 ^g
Diciembre/07	2,74 ± 0,07 ^b	1,33 ± 0,11 ^f	0,61 ± 0,03 ^j
Enero/08	2,62 ± 0,01 ^c	1,22 ± 0,08 ^d	0,63 ± 0,12 ^j
Valore promedio	2,66 ± 0,17	1,24 ± 0,07	0,52 ± 0,09
Límites de tolerancia	1,93 - 3,38	0,94 - 1,53	0,13 - 0,90

Legenda: Letras iguales muestran que no existen diferencias significativas y letras diferentes que si existen diferencias significativas para un 95% de confianza

III.5. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Uno de los aspectos considerados de interés en el estudio de una droga es conocer de forma preliminar su composición química general por métodos de tamizaje fitoquímico.

Al efectuar los análisis correspondientes a los extractos etéreos (tabla XII) se evidenciaron resultados positivos para núcleos triterpénicos y esteroidales, lactónicos y compuestos grasos. Los extractos alcohólicos (tabla XIII) respondieron positivo a sustancias reductoras, flavonoides, antocianidinas, quinonas, taninos, saponinas, triterpenos y esteroides, y compuestos lactónicos. En los extractos acuosos (tabla XIV) resultaron positivos los ensayos para saponinas, taninos, flavonoides y sustancias reductoras.

Es importante destacar que no se apreciaron diferencias en la composición química determinada por tamizaje fitoquímico en los lotes evaluados, pero si en las intensidades de color para algunos ensayos (Antocianidina, Shinoda y Lieberman-burchard, Tricloruro férrico y Fehling).

En estudios fitoquímicos efectuados a especies del género *Phyllanthus* se revela la presencia de taninos, flavonoides, coumarinas, saponinas, triterpenos, glicósidos, entre otros (Jiménez y Bernal, 1989; Calixto y cols., 1997, 1998; Mdlolo y cols., 2008). Los resultados confirman de manera tentativa la presencia de estos compuestos.

III.6. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES Y DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DEL FLAVONOIDE RUTINA

La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo considerando los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico, donde los compuestos de naturaleza fenólica como flavonoides, antocianidinas y taninos fueron predominantes y los reportes de Álvarez y cols. (2009) quienes informaron la presencia de flavonoides en el extracto acuoso de esta especie.

Tabla XII . Resultados del tamizaje fitoquímico para el extracto etéreo de las muestras

Ensayos	Colectas										
	Ene/03	Feb/04	Abr/05	Jun/05	Feb/06	Mar/07	May/07	Ago/07	Oct/07	Dic/07	Ene/08
Compuestos grasos	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+	+
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triterpenos/ Esteroides	+	+	+	++	+	++	+	+	+	++	+
Compuestos lactónicos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: + ensayo positivo; ++ muy positivo; - negativo

Tabla XIII. Resultados del tamizaje fitoquímico para el extracto alcohólico

Ensayos	Colectas										
	Ene/03	Feb/04	Abr/05	Jun/05	Feb/06	Mar/07	May/07	Ago/07	Oct/07	Dic/07	Ene/08
Saponinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	+	+	++	++	+	++	++	++	++	++	++
Antocianidinas	+	+	++	++	+	++	++	++	++	++	++
Sustancias Reductoras	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Fenoles/ taninos	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Resina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinonas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicósidos cardiotónicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triterpenos/ Esteroides	+	+	+	+	+	++	+	+	+	++	++
Compuestos lactónicos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
aminoácidos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Leyenda: + ensayo positivo; ++ muy positivo; - negativo

Tabla XIV. Resultados del tamizaje fitoquímico para el extracto acuoso

Ensayos	Colectas										
	Ene/03	Feb/04	Abr/05	Jun/05	Feb/06	Mar/07	May/07	Ago/07	Oct/07	Dic/07	Ene/08
Saponinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	+	+	++	++	+	++	++	++	++	++	++
Sustancias Reductoras	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Fenoles/taninos	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Mucílagos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Principios amargos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Leyenda: + ensayo positivo; ++ muy positivo; - negativo

Respecto al contenido de fenoles totales (tabla XV) es de señalar que los mayores porcentajes se obtuvieron para los meses de Marzo, Agosto, Mayo y Octubre y los menores valores para las colectas efectuadas en Enero, Febrero y Diciembre, con algunas diferencias estadísticamente significativas.

El alto valor encontrado para la colecta de Marzo pudiera atribuirse a que en ese periodo la especie vegetal comienza su proceso de floración, lo que demandaría una alta disponibilidad de estos metabolitos para apoyar dicho proceso (Osorio, 2009).

El mes de Mayo es típico de primavera y la planta está en su floración máxima, en esta etapa los procesos metabólicos son intensos lo que pudiera favorecer la producción de polifenoles (Osorio, 2009).

El mes de Agosto, por lo general, es muy cálido debido a los altos niveles de radiaciones solares y así lo demuestran los datos ofrecidos por el Instituto de Meteorología (ver tabla IX), según diversos autores (Vogt y cols., 1991; Cen y Bornean, 1993; Panagopoulos y cols., 1994 y Chaves y cols., 1997) este factor actúa como un potente inductor en la producción de compuestos fenólicos, dado el papel ecofisiológico que juegan estos metabolitos de servir como filtros protectores contra el efecto dañino de las radiaciones, sobre los pigmentos fotosintéticos, DNA o sobre cualquier otra parte del vegetal.

Por su parte, el mes de Octubre fue un mes lluvioso y según Miranda y Cuéllar (2001), un factor inductor en la producción de principios activos es la humedad la cual depende fundamentalmente del régimen de precipitaciones. El agua es la encargada de transportar los principios solubles que se encuentran en el suelo e interviene en la síntesis de metabolitos primarios que son el punto de partida en la biosíntesis de metabolitos secundarios, entre ellos, los compuestos fenólicos.

Sin embargo, los meses de Diciembre, Enero y Febrero son considerados poco lluviosos según Lechea (1994) y el Instituto de Meteorología, y Enero el más típico de invierno según las condiciones geográficas de Cuba, esto pudo influir en el bajo contenido de fenoles totales, pues se plantea (Miranda y Cuéllar, 2001) que las

Tabla XV. Contenido de fenoles totales en las muestras evaluadas

Colectas	Fenoles totales (%)
Enero/03	1,80 ± 0,08 ^a
Febrero/04	2,73 ± 0,09 ^b
Abril/05	3,44 ± 0,12 ^c
Junio/05	3,36 ± 0,08 ^c
Febrero/06	2,40 ± 0,10 ^b
Marzo/07	5,60 ± 0,50 ^d
Mayo/07	4,85 ± 0,04 ^e
Agosto/07	5,38 ± 0,22 ^d
Octubre/07	3,95 ± 0,15 ^c
Diciembre/07	2,59 ± 0,09 ^b
Enero/08	2,25 ± 0,06 ^b
Valor promedio	3,48 ± 1,30
Límites de tolerancia	2,07 - 9,03

Leyenda: Letras iguales muestran que no existen diferencias significativas y letras diferentes que si existen diferencias significativas para un 95% de confianza

épocas de sequía y bajas temperaturas pueden disminuir considerablemente la proporción y composición de principios activos, entre ellos los compuestos fenólicos (ver tabla IX).

Para la determinación cualitativa y cuantitativa del flavonoide rutina se llevó a cabo un análisis por cromatografía líquida de alta resolución a las muestras colectadas en los meses de Marzo/07 a Enero/08. En el anexo 2 se muestran los cromatogramas obtenidos.

En la prueba de detección cualitativa se inyectó primeramente el estándar rutina y se estableció un tiempo de retención promedio de 21,71 minutos. Para corroborar la presencia de este compuesto se efectuó una inyección de la muestra con el patrón y se obtuvo como resultados un incremento en los valores de áreas.

En la determinación cuantitativa de este flavonoide se analizaron aquellos picos positivos para rutina, se anotaron las cuentas de áreas que correspondía al mismo y se llevaron a una curva de calibración, obteniéndose como resultados las concentraciones que se muestran en la tabla XVI. Se pudieron constatar diferencias significativas en algunos casos, para las concentraciones de rutina en cada lote evaluado, correspondiendo el mayor valor para las colectas efectuadas en los meses de Agosto y Marzo y la menor concentración de este metabolito en el mes de Enero.

EL análisis por CLAR de las muestras de diferentes meses de colectas permitió separar adecuadamente bajo las condiciones ensayadas el flavonoide rutina del resto de los componentes presentes, al mismo tiempo que pudo cuantificarlo, evidenciándose diferencias en su concentración y en la apariencia de los cromatogramas obtenidos, lo cual denota una vez más la influencia de la época de recolección.

III.7. CONSIDERACIONES GENERALES DEL ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO

Los resultados obtenidos hasta el momento sobre el estudio farmacognóstico del material vegetal de *P. orbicularis* HBK permitieron arribar a las siguientes consideraciones generales:

Tabla XVI. Contenido de rutina en las muestras evaluadas

Colectas	Contenido de rutina mg/g de muestra
Marzo/07	41,38 ± 1,45 ^a
Mayo/07	37,05 ± 3,15 ^b
Agosto/07	45,60 ± 3,02 ^c
Octubre/07	36,91 ± 0,62 ^d
Diciembre/07	36,74 ± 2,20 ^d
Enero/08	28,88 ± 0,46 ^e
Valor promedio	37,76 ± 5,58
Límites de tolerancia	31,98 - 43,53

Leyenda: Letras iguales muestran que no existen diferencias significativas y letras diferentes que si existen diferencias significativas para un 95% de confianza

- 1- Se describieron por primera vez las características micromorfológicas de las hojas y tallos de la especie, a la vez que se amplió el estudio de los caracteres macromorfológicos de la misma, haciendo un aporte novedoso a la caracterización botánica de la planta, aspecto importante a tener en cuenta a la hora de su identificación.
- 2- El estudio de secado efectuado permitió establecer el secado artificial como el método más factible para ser aplicado a la especie.
- 3- El estudio de almacenamiento demostró, que bajo las condiciones ensayadas (estante a temperatura ambiente), la droga previamente fragmentada puede ser conservada por un año (periodo de estudio) en tres tipos de envases (latas compuestas, bolsas de polietileno y frascos de vidrio de color ámbar) sin que se afecte su apariencia, la humedad residual, el contenido de fenoles totales y el control microbiológico.
- 4- Se establecieron los parámetros físico-químicos de control de la calidad de la droga, los cuales estuvieron dentro de los límites establecidos en las normas internacionales (Lou-Zhi-cen, 1980; WHO 1998).
- 5- La determinación del contenido de fenoles totales en función de la fecha de recolección sugiere la mayor cantidad de estos metabolitos durante los meses de Marzo, Mayo, Agosto y menor en los meses de Enero, Diciembre y Febrero, lo cual está en concordancia con la concentración de uno de los constituyentes de la planta (flavonoide rutina), aspecto a tener en consideración para una exitosa recolección del material vegetal con vistas a definir las potencialidades biológicas de la especie.

El análisis de los resultados del estudio farmacognóstico, todos ellos informados por primera vez, permitió realizar una propuesta de Norma de Control de la Calidad, la cual se muestra en el anexo 1. La propuesta resulta novedosa porque aunque la especie presenta perspectivas desde el punto de vista terapéutico por las propiedades farmacológicas debidamente demostradas, no contaba con datos que permitieran su control como droga cruda.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
ESTUDIO FITOQUÍMICO



CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *Phyllanthus orbicularis* HBK

IV.1. EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

En el estudio se empleó como método de extracción la maceración, por ser uno de los más utilizados en el campo de los productos naturales, y menos agresivo para el material vegetal. Dicho proceso contempló el uso de tres disolventes de polaridad creciente (hexano, AcOEt y metanol) sobre la misma droga con el propósito de lograr un mayor agotamiento de los metabolitos presentes. Se trabajó con material vegetal perteneciente a las colectas de Marzo/07, Agosto/07, Octubre/07 y Enero/08.

Como resultado del proceso se obtuvieron tres extractos: hexánico, acetato de etilo y metanólico, los que concentrados a sequedad brindaron los valores de rendimientos que se recogen en la tabla XVII.

Los extractos hexánicos presentaron una alta pigmentación verde amarillenta y manifestaron los valores más bajos de rendimiento promedio (1,27%) respecto al peso de la planta de partida que fue 500g, seguido de los extractos de acetato de etilo con un 2,57%, los que presentaron una pigmentación verde carmelitosa. Finalmente los extractos metanólicos con una coloración carmelita rojiza fueron los que aportaron mayor cantidad de extractivos (7,08%), lo que sugiere que la composición química que prevalece en la planta es de alta polaridad.

IV.2. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA DE LOS EXTRACTOS

Considerando las características del disolvente empleado para la obtención de los extractos hexánicos, es de señalar que éste es capaz de remover los metabolitos de menor polaridad presentes en la droga, incluyéndose clorofilas que en ocasiones pueden enmascarar a otros constituyentes de mayor interés.

Tabla XVII. Valores de rendimiento obtenidos para cada extracto en las diferentes colectas

Colectas	Fracciones					
	Extracto hexánico		Extracto de Acetato de etilo		Extracto metanólico	
	Masa (g)	Porcentaje (%)	Masa (g)	Porcentaje (%)	Masa (g)	Porcentaje (%)
Marzo/07	6,91	1,38	10,60	2,12	30,85	6,17
Agosto/07	6,63	1,32	10,21	2,04	47,05	9,41
Octubre/07	6,04	1,20	12,32	2,46	39,43	7,88
Enero/08	5,90	1,18	18,40	3,68	24,30	4,86
Rendimiento promedio	6,37 ± 0,47	1,27 ± 0,09	12,88 ± 3,79	2,57 ± 0,75	35,40 ± 9,93	7,08 ± 1,98

No obstante, el análisis por CCD, utilizando como fase móvil hexano:AcOEt (7:3) mostró al visible un comportamiento cromatográfico con cierta complejidad (figura 20 A-I), lográndose una adecuada separación. Se destacaron dos manchas de color amarillo bien definidas, una de Rf 0,35 (1) y otra cercana al frente del disolvente (2).

Al exponer el cromatograma a la luz ultravioleta (254nm) todas las manchas cambiaron de color, resaltando las manchas 1, 2 y la del punto de aplicación quienes tomaron coloración naranja (figura 20 A-II).

Al asperjar con vainillina en presencia de ácido sulfúrico y calor (figura 20 A-III), gran número de ellas tomaron color rojizo, incluyendo las señaladas anteriormente, lo cual pudiera ser indicativo de estructuras de tipo triterpenoide (Lock, 1988).

Las otras fases móviles señaladas en el acápite II.2.2 no lograron un corrimiento adecuado de los componentes de los extractos. De igual manera, la exposición a los vapores de amoníaco no mostró resultados importantes.

En el análisis de los extractos de acetato de etilo los mejores resultados se obtuvieron al emplear como fase móvil hexano:AcOEt (7:3), al visible se observó un cromatograma sencillo con varias manchas a lo largo de la placa cromatográfica (figura 20 B-I).

A la luz UV (254nm) no se evidenciaron grandes cambios, pocas manchas aumentaron su intensidad y solo la del punto de aplicación modificó su color. Al rociar la placa con vainillina/H₂SO₄/calor algunas manchas se tornaron rojizas (figura 20 B-II).

El desarrollo cromatográfico en las restantes fases móviles no fue el más adecuado pues no se logró una buena separación de las manchas.

En el análisis de los extractos metanólicos, luego de varias experiencias con sistemas de disolventes, los mejores resultados se lograron con la fase móvil constituida por n-butanol:ácido acético:agua (65:25:10).

Al visible se observó poca complejidad cromatográfica, siendo evidente una mancha bien definida de color amarillo de Rf 0,30 (2) en las cuatro colectas analizadas y otra retenida en el punto de aplicación (1), algo indicativo de compuestos polares (figura 20 C-I).

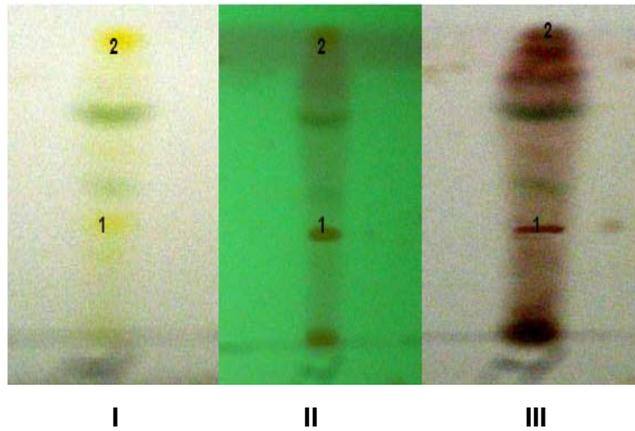
La exposición a la luz ultravioleta permitió observar modificaciones en el color de las manchas, especialmente en las señaladas anteriormente (1 y 2) (figura 20 C-II), este comportamiento es evidencia de grupos cromóforos. Frente a los vapores de amoníaco (figura 20 III) la mancha 1 se tornó parda amarillenta y la 2 amarilla naranja, característico de metabolitos secundarios que presentan grupos fenólicos libres, entre ellos glicósidos fenólicos, y al asperjar con vainillina/H₂SO₄/calor, las manchas 1, 2 y 3 intensificaron su color (figura 20 C-IV).

Respecto al comportamiento cromatográfico de los extractos obtenidos a partir del material vegetal de *P. orbicularis* HBK, es de señalar que los disolventes empleados lograron separar de alguna manera los componentes según su polaridad, al observar diferencias en los cromatogramas en cuanto al número de manchas, intensidad y respuesta a los reveladores empleados. Estos resultados no deben ser considerados concluyentes ya que los extractos vegetales suelen ser muy complejos en cuanto a su composición química. Como consecuencia, los metabolitos presentes pueden solaparse entre si no logrando buenas resoluciones en muchas ocasiones, pues es común que una mancha esté compuesta por varios de ellos.

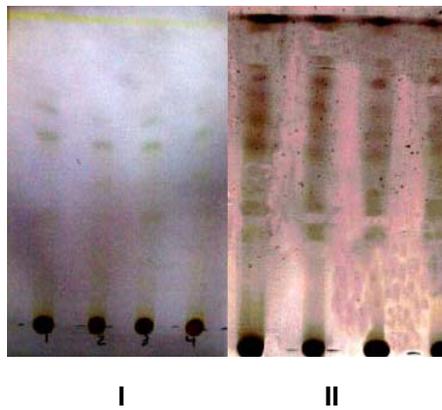
IV.3. ANÁLISIS POR CROMATOGRFÍA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)

La cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas fue la técnica analítica empleada para la caracterización de los extractos hexánicos y de acetato de etilo obtenidos de la especie *P. orbicularis* HBK.

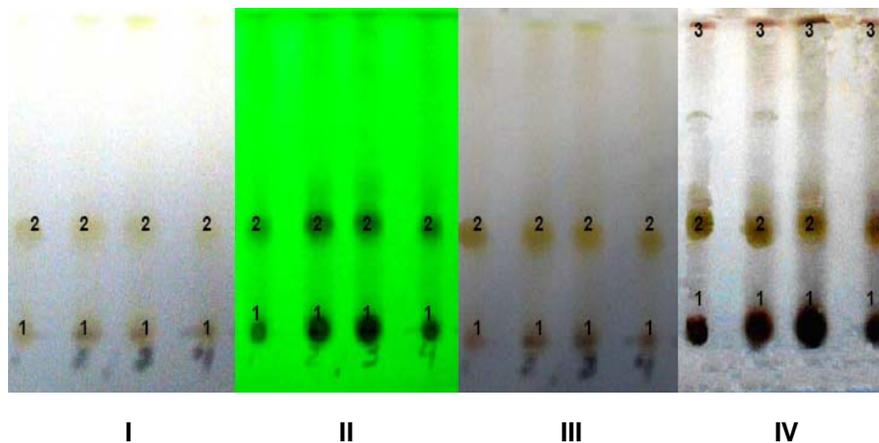
La asignación de las estructuras se efectuó por comparación de los espectros de masas de los compuestos con los de la base de datos del equipo, seleccionando



A: Cromatograma del extracto hexánico en la fase móvil hexano:AcOEt (7:3)
 I: Al visible; II: Luz UV (254nm); III: Vainillina/ H₂SO₄ /calor



B: Cromatograma de los extractos de AcOEt en la fase móvil hexano:AcOEt (7:3). I: Al visible; II: Vainillina/ H₂SO₄ /calor



C: Cromatograma de los extractos metanólicos en la fase móvil n-butanol:ácido acético:agua (65:25:10)
 I: Al visible; II: Luz UV (254nm); III. Vapores de NH₃; IV: Vainillina/ H₂SO₄ /calor

Figura 20. Cromatogramas de los extractos obtenidos de *P. orbicularis*

aquellos que sobrepasaban el 90% de confiabilidad, y con los datos ofrecidos por la literatura (Gunther, 1995; Gutiérrez y Droguet, 2002).

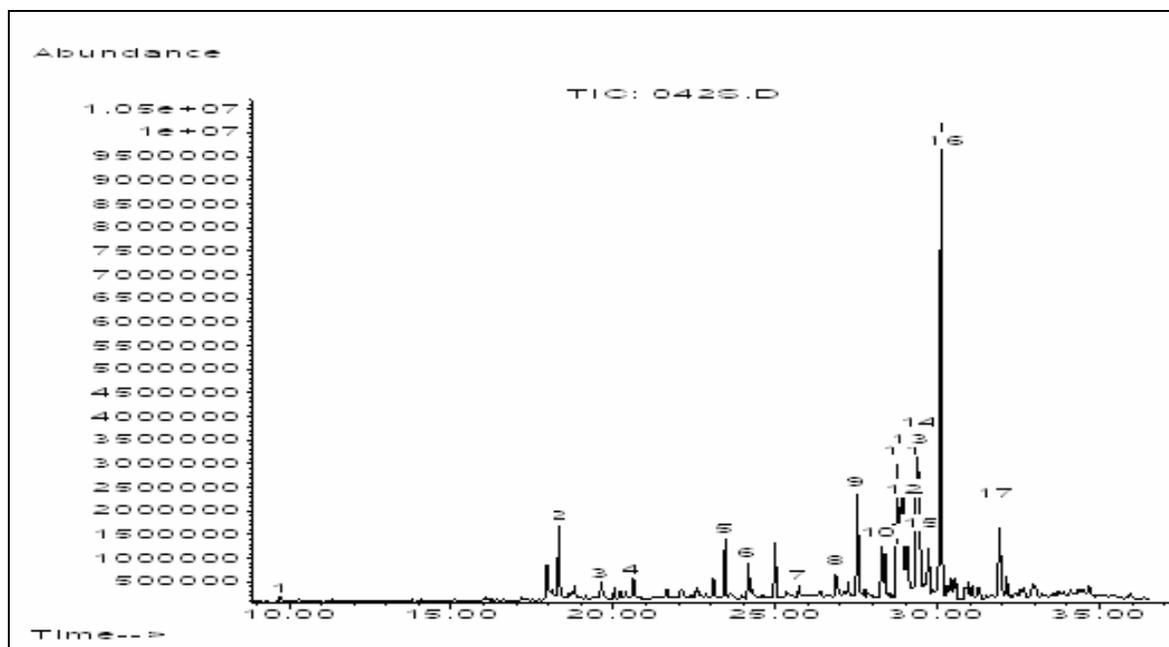
IV.3.1. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICOS

El extracto hexánico obtenido a partir de la colecta de Marzo/07 mostró un cromatograma (figura 21) con varios picos cromatográficos de diferentes intensidades, siendo más complejo a partir de los 27 minutos., aproximadamente. En la tabla XVIII y en Anexo 3 se relacionan los 17 compuestos identificados por la base de datos y sus espectros de masas, respectivamente, representando el mayor porcentaje a estructuras esteroidales con un 42,96%, seguida de estructuras triterpénicas con un 30,71%. También se encontraron cetonas, alcoholes de alto peso molecular, hidrocarburos alifáticos, un ácido graso y tocoferoles.

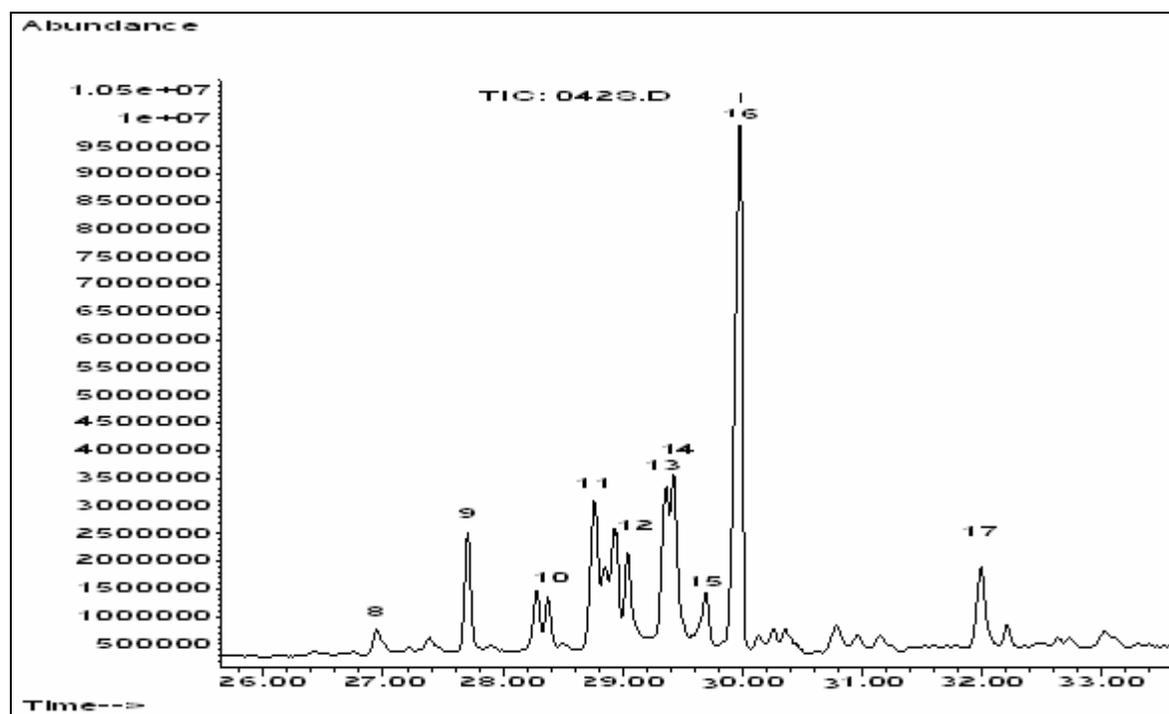
El constituyente mayoritario fue el esteroide estigmast-4-en-3-ona que eluyó a un tiempo de retención de 29,92 minutos con una abundancia relativa de 33,73%. En el espectro de masas del compuesto (Anexo 3.16) puede observarse el ión molecular prominente con m/z 412. Debido a la pérdida de metilo a partir del ion M^+ se origina m/z 397, es apreciable otro fragmento con m/z 271 originado por la pérdida de la cadena lateral ($C_{10}H_{21}$) (Marques, 2005; Isaza y cols., 2007). En la figura 22 se muestran algunas fragmentaciones sugeridas para este compuesto.

Otro compuesto presente en el extracto fue el triterpeno pentacíclico 20(29) lupen-3-ona con un 8,99% de abundancia relativa y que presenta como fórmula general $C_{30}H_{48}O$, el mismo es de la serie del lupano y como tal tiene un patrón de fragmentación similar al lupeol, muy abundante en la naturaleza y en especies como *P. acidus*, *P. flexuosus*, *P. niruri*, *P. urinaria* y *P. watsonii* (Calixto y cols., 1998; Tanaka y cols., 1988a, 1988b, 2004; Wada y cols., 2001).

El espectro de masas (Anexo 3.14) muestra el ion molecular con m/z 424 y un pico con m/z 409 que corresponde a $[M-CH_3]^+$. La pérdida de la cadena de isopropilo (C_3H_5) genera el ion de m/z 383, el cual es de muy baja intensidad. El fragmento de



a) Cromatograma gaseoso del extracto hexánico



b) Ampliación del cromatograma de 26 a 33min.

Figura 21. Cromatograma gaseoso del extracto hexánico de la colecta de Marzo/07

Tabla XVIII. Compuestos sugeridos por CG-EM en el extracto hexánico de la colecta de Marzo/07

Picos	Tiempos de retención (min)	Compuestos sugeridos	Áreas relativas (%)	Fórmulas químicas
1	9,71	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	0,33	C ₁₃ H ₂₂ O
2	18,28	6,10,14- trimetil-5,9,13-pentadecatrien-2-ona	3,39	C ₁₈ H ₃₀ O
3	19,72	9-octadecenol	0,86	C ₁₈ H ₃₆ O
4	21,00	Fitol	1,15	C ₂₀ H ₄₀ O
5	23,45	Ácido linoleico	2,98	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
6	24,12	3-eicoseno	2,38	C ₂₀ H ₄₀
7	25,87	Dotriacontano	0,59	C ₃₂ H ₆₆
8	26,98	γ - tocoferol	1,79	C ₂₈ H ₄₈ O ₂
9	27,75	α- tocoferol	6,35	C ₂₉ H ₅₀ O ₂
10	28,39	Derivado del taraxastanediol	2,65	C ₃₀ H ₅₂ O ₂
11	28,77	Derivado del epi-ψ-taraxastanonol	10,80	C ₃₀ H ₅₀ O ₂
12	29,00	1- eicosanol	6,43	C ₂₀ H ₄₂ O
13	29,37	4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-octametil-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadecahidro-2H-picen-3-ona	8,27	C ₃₀ H ₄₈ O
14	29,58	20(29) lupen-3-ona	8,99	C ₃₀ H ₄₈ O
15	29,70	Espinasterona	3,22	C ₂₉ H ₄₈ O
16	29,92	Estigmast-4-en-3-ona	33,73	C ₂₉ H ₄₈ O
17	32,00	5 α-estigmastane-3,6-diona	6,01	C ₂₉ H ₄₈ O ₂

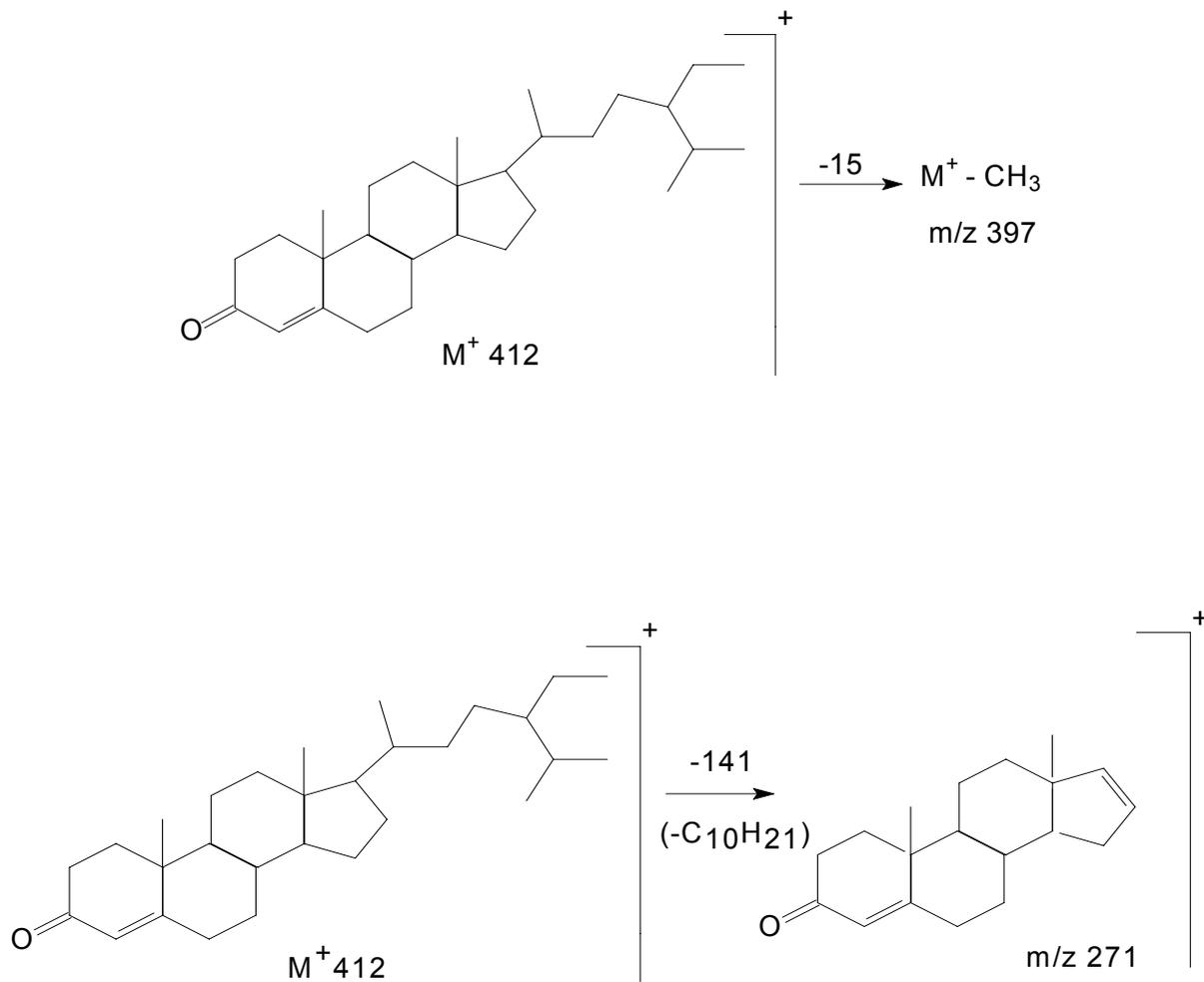


Figura 22. Ruta de fragmentación sugerida para la estigmast-4-en-3-ona
 (Marques, 2005; Isaza y cols., 2007).

m/z 218 contiene a los anillos D y E y la cadena de isopropenilo y el mismo se forma por la ruptura del anillo C. Se aprecia otro pico de gran abundancia de m/z 205 característico de triterpenos pentacíclicos, formado a partir del ion molecular y es el que contiene los anillos A y B. Los principales fragmentos asociados a la ruptura del compuesto se presentan en la figura 23 (Budzikiewicz y cols., 1963).

También se destaca la posible presencia de derivados del taraxastano, triterpenos pentacíclicos que no han sido identificados en otras especies de *Phyllanthus* y a los que más adelante se les dedicará la atención.

El extracto correspondiente a la colecta de Agosto/07 mostró un cromatograma (figura 24) con gran cantidad de picos cromatográficos de diferentes intensidades, mostrándose más complejo a partir de los 21 minutos, aproximadamente, aunque solo pudieron ser identificados por la base de datos del equipo 10 constituyentes. Se encontraron ácidos grasos (picos 1, 5, 6, 7), un diterpeno (pico 2), un alcohol (pico 3), un derivado del naftaleno (pico 8), α -tocoferol (pico 9) y un estero (pico 10), siendo predominantes los de naturaleza lipídica que representan el 42,35%. En la tabla XIX se reflejan los metabolitos identificados y en los Anexos 3 y 4 se presentan sus espectros de masas.

El compuesto mayoritario fue el ácido palmítico o ácido hexadecanoico con un 19,39% de abundancia relativa, el mismo ha sido identificado en *P. maderaspatensis* (Calixto y cols., 1998). Su espectro de masas (Anexo 4.4) mostró un pico fácilmente discernible de m/z 256 en correspondencia con su ión molecular y fórmula general $C_{16}H_{32}O_2$; se evidencia un pico de m/z 60 característico de ácidos carboxílicos alifáticos (Silverstein y cols., 1977), que aunque no es el pico base del espectro como suele ocurrir algunas veces, es prominente y se forma debido a un reordenamiento de McLafferty. Está presente un pico pequeño con m/z 227 relacionado con la pérdida de 29 unidades de masas ($C_2H_5^+$) desde el ion molecular, un fragmento a m/z 213 en concordancia con la pérdida $C_3H_7^+$ desde el ion molecular, otro a m/z 73 que pertenece al agrupamiento $(CH_2)_2CO_2H^+$, además de m/z 43 ($C_3H_7^+$) y m/z 29 ($C_2H_5^+$) (Marques, 2005).

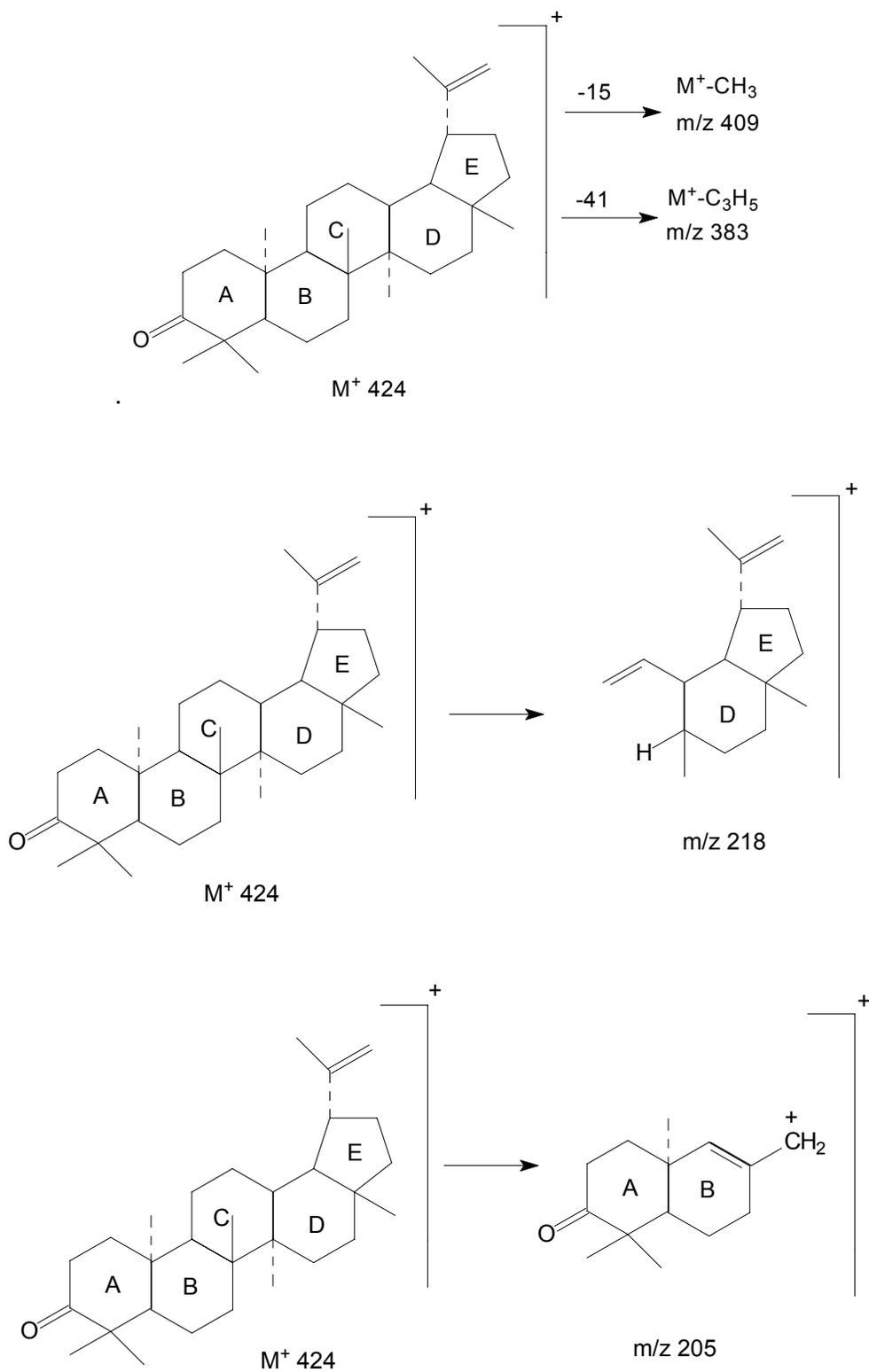


Figura 23. Ruta de fragmentación propuesta para la 20(29)lupen-3-ona
 (Budzikiewicz y cols., 1963).

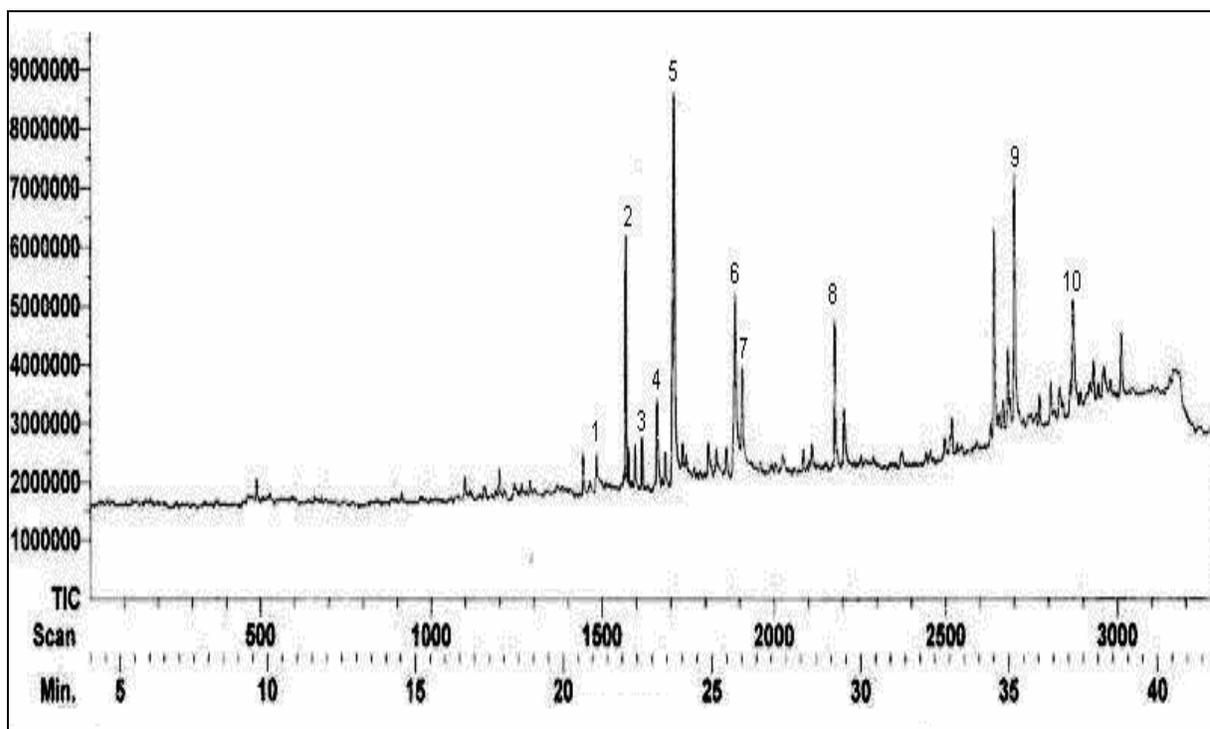


Figura 24. Cromatograma gaseoso del extracto hexánico de la colecta de Agosto/07

Tabla XIX. Compuestos sugeridos por CG-EM en el extracto hexánico de la colecta de Agosto/07

Picos	Tiempos de retención (min)	Compuestos sugeridos	Áreas relativas (%)	Fórmulas químicas
1	21,16	Ácido mirístico	3,12	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
2	22,13	Fitol	15,23	C ₂₀ H ₄₀ O
3	22,66	2-(9-octadeceniloxi)etanol	3,79	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
4	23,20	6,10,14-trimetil 5,9,13 pentadecatrien-2-ona	5,17	C ₁₈ H ₃₀ O
5	23,75	Ácido palmítico	19,39	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
6	25,80	Ácido oleico	11,20	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
7	26,03	Ácido esteárico	8,64	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
8	29,16	9,10-dihidro-9,9-dimetil-11 H-ciclohepta (α) naftalen-11-ona	10,29	C ₁₇ H ₁₆ O
9	35,19	α- tocoferol	13,12	C ₂₉ H ₅₀ O ₂
10	37,17	γ-sitosterol	10,04	C ₂₉ H ₅₀ O

También se presentan los ácidos mirístico, oleico y esteárico los cuales han sido reportados para *P. amarus* y *P. maderaspatensis*, sus espectros de masas (Anexos 4.1, 4.5, 4.6) presentan el ión molecular visible e iones característicos de ácidos grasos, o sea, fragmentos con m/z 29, 60, 73, 129 (Marques, 2005).

Otro compuesto mayoritario sugerido en el extracto fue el fitol, un diterpeno que responde a la fórmula general $C_{20}H_{40}O$, el mismo ha sido reportado como componente del aceite esencial de *P. urinaria* (Su y Liang, 2009). En el espectro de masas (Anexo 3.4) se observa el ion molecular muy pequeño con m/z 296, un fragmento con m/z 278 relacionado con la pérdida de H_2O a partir del ión molecular $[M-18]^+$, m/z 71 relacionada con el agrupamiento (C_5H_{11}), m/z 57 (C_4H_9), entre otros (Vincent y cols., 1975; Rojas y cols., 2008).

El extracto perteneciente a la muestra de Octubre/07 evidenció un cromatograma (figura 25) con varios picos cromatográficos y con cierta similitud al de la colecta de Agosto/07 en los picos que se encontraron entre los 14 y 40 minutos, aproximadamente. Pudieron ser identificados por la base de datos 10 compuestos, los cuales concuerdan con los referidos para el extracto anterior, aunque la abundancia de cada uno varió, predominaron, igualmente, las estructuras de naturaleza lipídica con un 38,42%. En la tabla XX se muestran los compuestos identificados y en los Anexos 3 y 4 los espectros de masas.

El compuesto mayoritario en dicho extracto fue el α -tocoferol con una abundancia relativa del 19,93%, el mismo no ha sido identificado en otras especies de *Phyllanthus*. El espectro de masas (Anexo 3.9) está en plena correspondencia con el obtenido por Nuñez (2007), se evidencia el ion molecular a m/z 430 en correspondencia con la fórmula $C_{29}H_{50}O_2$, se observa el pico base con m/z 165 formado por la ruptura del anillo saturado contiguo al anillo de benceno 1, 3, 4-trimetil-2-hidroxi sustituido. Se presentó el ion de m/z 205 relacionado con la pérdida de la cadena lateral hidrocarbonada. En la figura 26 se muestra la ruta de fragmentación sugerida para el compuesto.

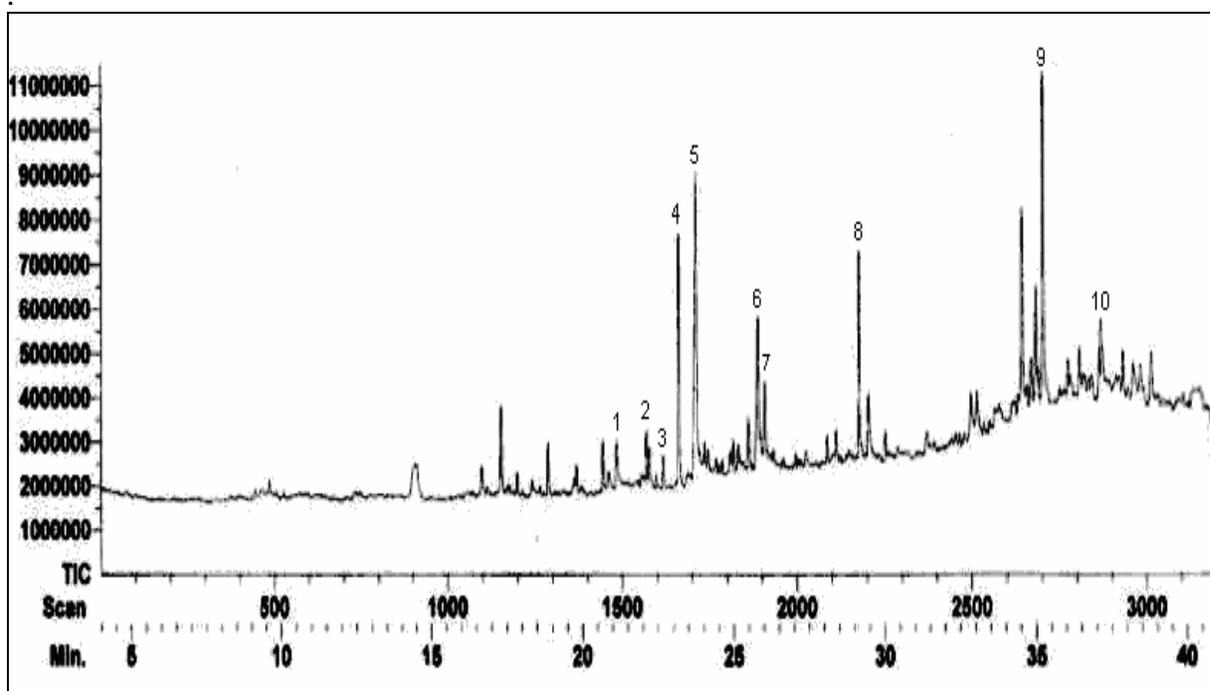


Figura 25. Cromatograma gaseoso del extracto hexánico de la colecta de Octubre/07

Tabla XX. Compuestos sugeridos por CG-EM en el extracto hexánico de Octubre/07

Picos	Tiempos de retención (min)	Compuestos sugeridos	Áreas relativas (%)	Fórmulas químicas
1	21,17	Ácido mirístico	3,84	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
2	22,11	Fitol	4,78	C ₂₀ H ₄₀ O
3	22,67	2-(9-octadeceniloxi)etanol	3,02	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
4	23,18	6,10,14- trimetil- 5,9,13 pentadecatrien-2-ona	13,82	C ₁₈ H ₃₀ O
5	23,75	Ácido palmítico	15,55	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
6	25,79	Ácido oleico	10,32	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
7	26,02	Ácido esteárico	8,71	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
8	29,16	9,10 dihidro-9,9- dimetil-11 H-ciclohepta (α) naftalen-11-ona	11,79	C ₁₇ H ₁₆ O
9	35,21	α- tocoferol	19,93	C ₂₉ H ₅₀ O ₂
10	37,19	γ-sitosterol	8,23	C ₂₉ H ₅₀ O

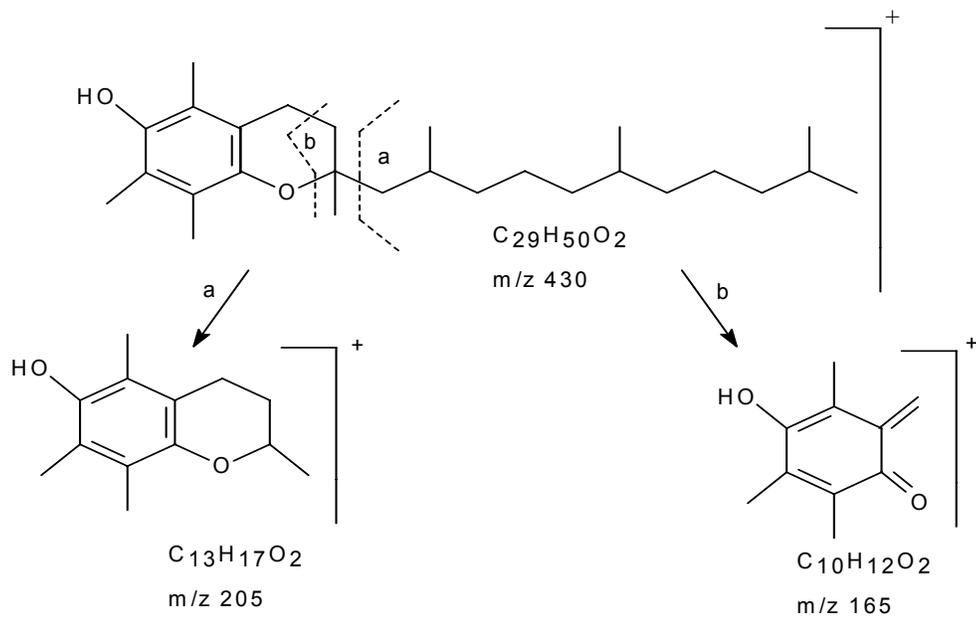


Figura 26. Ruta de fragmentación sugerida para el α -tocoferol

Se presentaron también con cierta abundancia el ácido palmítico (15,55%) y la 6,10,14-trimetil-5,9,13-pentadecatrien-2-ona (farnesil cetona) (13,82%), esta última no ha sido referida para el género *Phyllanthus*, su espectro de masas (Anexo 3.2) mostró un pico de pequeña intensidad con m/z 262 en correspondencia con su ión molecular y su fórmula química $C_{18}H_{30}O$. En las cetonas alifáticas el ión molecular no es pronunciado y las mayores fragmentaciones ocurren por las rupturas de los enlaces C-C adyacentes al átomo de oxígeno, como en alcoholes y éteres, dando esta ruptura picos intensos con m/z 43, 57 ó 71, que generalmente constituyen el pico base. En el compuesto que se analiza se observó un pico prominente con m/z 43 relacionado con el agrupamiento $C_2H_3O^+$ (Siverstein y cols., 1977; Dass, 2007).

Por su parte, el extracto hexánico de la muestra de Enero/08 exhibió un cromatograma (figura 27) con gran cantidad de picos cromatográficos de diferentes intensidades. Se identificaron con ayuda de la base de datos del equipo 17 componentes, encontrándose una cetona (pico 1), hidrocarburos, entre ellos, cuatro alifáticos (picos 3, 5, 7, 9) y uno cíclico (pico 15), alcoholes superiores (picos 2, 8, 13, 16), un diterpeno (pico 4), un compuesto lactónico (pico 6), esteroides (picos 12, 14, 17) y tocoferoles (pico 10 y 11), siendo predominantes los compuestos hidrocarbonados. En la tabla XXI se muestran los metabolitos y en los Anexos 3, 4 y 5 se recogen los espectros de masas de los mismos.

El componente mayoritario en este extracto hexánico fue el hidrocarburo ciclooctacosano con un valor de área relativa de 23,77%. Este compuesto no ha sido identificado en especies de *Phyllanthus*, aunque se ha encontrado como componente del aceite esencial de *Minuartia meyeri* Bornm (*Caryophyllaceae*) (Nurettin y cols., 2006).

El espectro de masas del compuesto evidenció un comportamiento propio de cicloalcanos y similar al de los hidrocarburos saturados alifáticos. El ion molecular a m/z 392 que corresponde a la fórmula general $C_{28}H_{56}$ se presentó con un pico de muy baja intensidad, seguido de un fragmento de m/z 364 en correspondencia con la pérdida del grupo C_2H_4 desde el ion molecular y fragmentos con m/z 83 y 167 correspondientes a pérdidas sucesivas desde el ión molecular de varios grupos C_2H_4

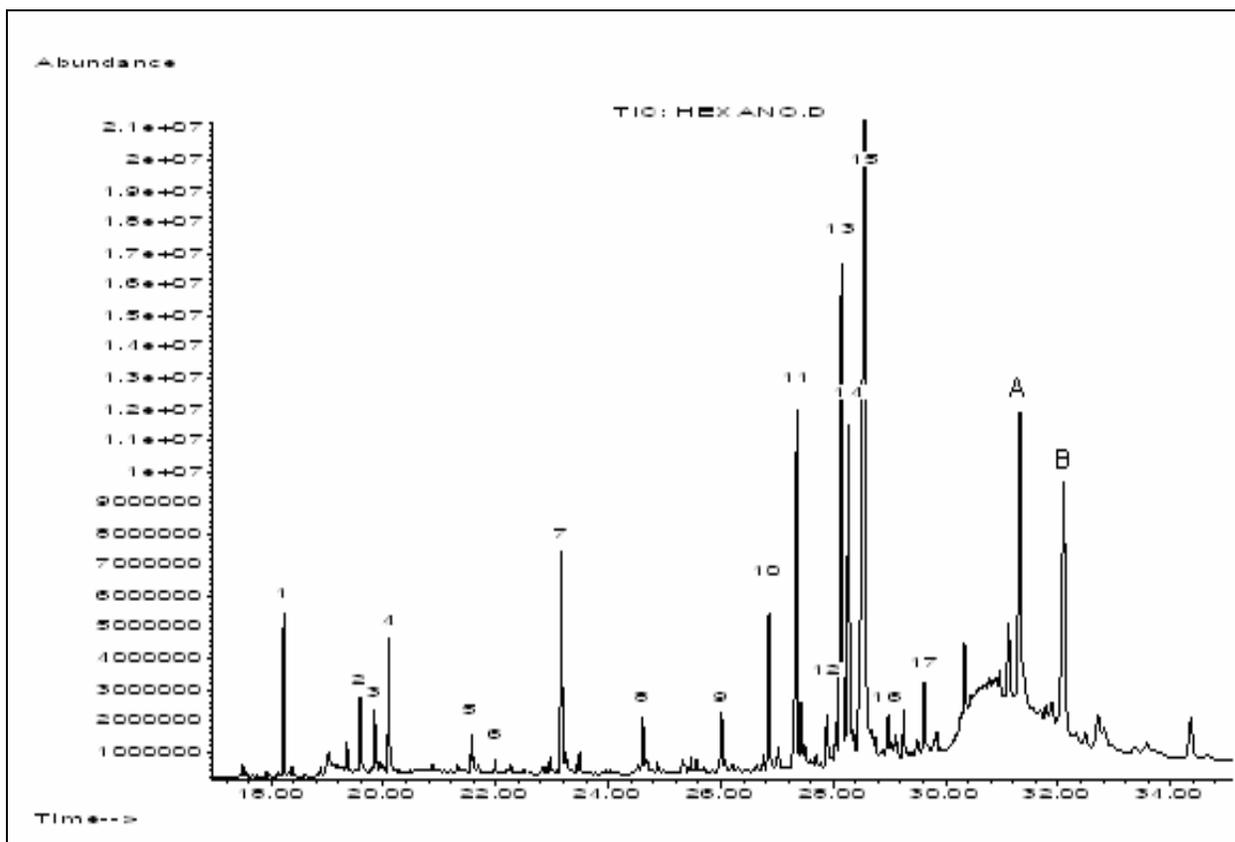


Figura 27. Cromatograma gaseoso del extracto hexánico de Enero/08

Tabla XXI. Compuestos sugeridos por CG-EM en el extracto hexánico de Enero/08

Picos	Tiempos de retención (min)	Compuestos sugeridos	Áreas relativas (%)	Fórmulas químicas
1	18,22	6,10,14-trimetil-5,9,13-pentadecatrien-2-ona	2,80	C ₁₈ H ₃₀ O
2	19,58	9-octadecenol	1,38	C ₁₈ H ₃₆ O
3	19,84	5-octadeceno	1,03	C ₁₈ H ₃₆
4	20,09	Fitol	2,44	C ₂₀ H ₄₀ O
5	21,56	5-eicoseno	0,82	C ₂₀ H ₄₀
6	21,98	4,8,12,16-tetrametil heptadecan-4-olido	0,28	C ₂₁ H ₄₀ O ₂
7	23,16	1-docoseno	4,70	C ₂₂ H ₄₄
8	24,61	1-tetracosanol	1,20	C ₂₄ H ₅₀ O
9	26,00	Nonacosano	1,19	C ₂₉ H ₆₀
10	26,85	γ-tocoferol	3,45	C ₂₈ H ₄₈ O ₂
11	27,35	α-tocoferol	8,63	C ₂₉ H ₅₀ O ₂
12	27,85	Estigmasterol	1,50	C ₂₉ H ₄₈ O
13	28,14	1,30-triacontanediol	13,99	C ₃₀ H ₆₂ O ₂
14	28,28	γ-sitosterol	8,69	C ₂₉ H ₅₀ O
15	28,55	Ciclooctacosano	23,77	C ₂₈ H ₅₆
16	28,97	1-eicosanol	2,01	C ₂₀ H ₄₂ O
17	29,61	Estigmast-4-en-3-ona	1,21	C ₂₉ H ₄₈ O
A	31,32	Desconocido	10,08	-
B	32,10	Desconocido	10,72	-

(28), acompañado de la pérdida de hidrógeno y un fragmento con m/z 57 característico de compuestos hidrocarbonados cíclicos (Silverstein y cols., 1977; Dass, 2007). En el Anexo 5.9 se muestra el espectro de masas del compuesto sugerido para el extracto y el ofrecido por la base de datos del equipo, apreciándose gran correspondencia entre ambos.

El 1,30-triacontanediol fue otro pico muy intenso en el cromatograma con un 13,99% de área relativa, y ha sido encontrado en la especie *P. urinaria* (Calixto y cols., 1998). En el caso de los alcoholes alifáticos el ion molecular es muy pequeño al punto de ser imperceptible, algo similar ocurre con el compuesto, donde su espectro de masas muestra un ion molecular muy pequeño de m/z 454 el cual se corresponde con su fórmula general $C_{30}H_{62}O_2$. Se presentaron, además, una serie de picos característicos de alcoholes alifáticos, por ejemplo, el fragmento de m/z 418 relacionado con la pérdida de dos moléculas de agua desde el ión molecular, m/z 437 relacionado con la pérdida del grupo OH $[M-17]^+$, m/z 43 ($C_3H_7^+$), m/z 57 ($C_4H_9^+$), etc. (Silverstein y cols., 1977; Méndez, 2003; Dass, 2007). En el Anexo 5.8 se evidencia el espectro de masas sugerido para el extracto y el ofrecido por la base de datos del equipo, pudiendo constatar correspondencia en la secuencia de las fragmentaciones.

Se presentaron dos picos (A y B) después de los 30 minutos que exhibieron una abundancia apreciable, los mismos no fueron identificados por la biblioteca del equipo, aunque sus espectros de masas (Anexos 5.10) sugieren que pueden ser derivados del escualeno, ya que se observaron algunos fragmentos coincidentes con este compuesto (m/z 69, 107, 137 y 341). Es probable que estos brinden un resultado novedoso en cuanto a la composición química, pero se necesitaría de su aislamiento para confirmarlo por otras técnicas espectroscópicas.

Al hacer un análisis de los extractos hexánicos obtenidos de las diferentes colectas se puede apreciar que éstos están constituidos, fundamentalmente, por compuestos de naturaleza grasa, según la clasificación de Marcano y Hasegawa, 1991 (Tabla XXII).

En total fueron identificados 33 componentes, de ellos siete hidrocarburos, dos cetonas aunque de naturaleza terpénica, cinco alcoholes, cinco ácidos grasos, 11 entre

Tabla XXII. Compuestos sugeridos por CG-EM en los extractos hexánicos obtenidos de diferentes colectas

No	Clase de compuesto/Nombre	Abundancia relativa %/ Época de colecta			
		Mar/ 07	Ago/ 07	Oct/ 07	Ene/ 08
HIDROCARBUROS					
1	3-eicoseno	2,38			
2	5-eicoseno				0,82
3	1- dococeno				4,70
4	5-octadeceno				1,03
5	Nonacosano				1,19
6	Ciclooctacosano				23,77
7	Dotriacontano	0,59			
CETONAS					
8	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona (geranil/neril-cetona)	0,33			
9	6,10,14-trimetil-5,9,13-pentadecatrien-2-ona (Farnesil-cetona)	3,39	5,17	13,82	2,80
ALCOHOLES Y DIOLES					
10	9-octadecenol	0,86			1,38
11	1-eicosanol	6,43			2,01
12	2-(9-octadecenoxi)-etanol		3,79	3,02	
13	1-tetracosanol				1,20
14	1,3-triacontanediol				13,99
ÁCIDOS Y ÉSTERES					
15	Ácido linoléico	2,98			
16	Ácido mirístico		3,12	3,84	
17	Ácido palmítico		19,39	15,55	
18	Ácido oléico		11,20	10,32	
19	Ácido esteárico		8,64	8,71	
TERPENOS Y FITOSTEROLES					
20	Epi- Ψ -taraxastanonol (derivado)	10,80			
21	Taraxastanediol (derivado)	2,65			
22	Fitol	1,15	15,23	4,78	2,44
23	4,4,6a,8a,11,11,14b-octametil-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-octadecahidro-2H-picen-3-ona (triterpeno pentacíclico)	8,27			
24	9,10-dihidro-9,9-dimetil-11-H-ciclohepta(α)-naftalen-11-ona		10,29	11,79	
25	20(29) lupen-3-ona	8,99			
26	Epinasterona	3,22			
27	Estigmast-4-en-3-ona	33,73			1,21
28	5 α -estigmastane-3,6-diona	6,01			
29	γ -sitosterol		10,04	8,23	8,69
30	Estigmasterol				1,50
OTROS COMPONENTES					
31	4,8,12,16-tetrametil-4-heptadecanolido (lactona)				0,28
32	γ -tocoferol	1,79			3,45
33	α - tocoferol	6,35	13,12	19,93	8,63

terpenos y fitoesteroles, una lactona y dos tocoferoles, estos tres últimos no clasificados como compuestos grasos.

Es importante señalar que se encontraron diferencias tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo de estos compuestos, lo cual pudiera responder a las condiciones climáticas, que ocasionaron que no se detectaran por el método de análisis empleado bajo las condiciones ensayadas en todas las colectas, teniendo en cuenta, además, que no se utilizó en todos los casos el mismo equipamiento. El hecho de no haber podido identificar todos los componentes presentes, no permite tener la certeza de la ausencia de alguno de ellos en un determinado mes y asumir entre otras cuestiones que dada su poca abundancia en la planta no fueron detectados por el equipo.

Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos puede inferirse que la mayoría de los hidrocarburos, alcoholes y algunos terpenoides, fueron más abundantes en la colecta de Enero, un mes frío y poco lluvioso en Cuba. Los terpenos y fitoesteroles prevalecieron en la colecta de Marzo, mientras que los ácidos grasos presentaron elevada abundancia en Octubre y Agosto.

Es de destacar la presencia de la 6,10,14-trimetil-5,9,13-pentadecatrien-2-ona (farnesil cetona), que no ha sido informada para el género y presentó una abundancia relativa en todas las colectas efectuadas, exhibiendo el mayor valor en el mes de Octubre. El agrupamiento farnesilo es un intermediario de la biosíntesis de terpenos y esteroides.

Común para todos los extractos hexánicos también se encontró al fitol, con mayor abundancia relativa en el mes de Agosto/07. Por su parte, el γ -sitosterol estuvo presente en tres de las muestras analizadas. La presencia de fitoesteroles, triterpenos y compuestos de naturaleza lipídica corroboran los ensayos positivos para estos compuestos (Sudam y Lieberman-Burchard) encontrados en el tamizaje fitoquímico y la relación quimiotaxonómica de la especie con otras de la familia ***Euphorbiaceae*** y ***Phyllanthaceae*** donde es característico la presencia de estructuras terpénicas, especialmente triterpenoides.

Algo notorio en el análisis fue la detección de α -tocoferol que aunque la abundancia fue variable, se presentó en las 4 muestras evaluadas con mayor concentración en el mes de Octubre, lo cual demuestra, sin lugar a dudas, su existencia en la planta, constituyendo un aporte novedoso para la composición química de la especie y para el género, pues hasta el momento no se han presentado reportes al respecto.

Debe señalarse que a pesar de que los compuestos sugeridos para cada colecta no son novedosos, sí constituyen nuevo reporte para la especie, ya que no se habían informado con anterioridad.

IV.3.2. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LOS EXTRACTOS DE ACETATO DE ETILO

Con los extractos de acetato de etilo se siguió el mismo esquema empleado para los extractos hexánicos.

El análisis del extracto AcOEt de la muestra de Marzo/07 evidenció un cromatograma (figura 28) conformado por gran cantidad de picos cromatográficos de diferentes intensidades, siendo más complejo a partir de los 18 minutos aproximadamente. Del total de picos mostrados, solo pudieron ser identificados con ayuda de la base de datos del equipo 16 componentes, hallándose cetonas (picos 1, 2, 3), terpenoides, entre ellos, un diterpeno (pico 5) y tres triterpenos (picos 12, 13, 15), dos fitoesteroles (14, 16), ácidos grasos (4, 6, 7), un compuesto lactónico (pico 8), un alqueno (pico 9) y tocoferoles (10 y 11). Correspondiendo el mayor porcentaje a estructuras del tipo terpénicas, aunque el constituyente mayoritario fue la cetona 6,10,14-trimetil-5,9,13-pentadecatrien-2-ona (Anexo 3.2) con una abundancia relativa del 15,61%. En la tabla XXIII se muestra la composición química que se sugiere para dicho extracto y en los Anexos 3-6 se presentan los espectros de masas, muchos de los cuales ya han sido identificados en los extractos hexánicos.

Importante en este extracto la presencia de los triterpenoides pentacíclicos α -amirina y del grupo del taraxastano, o sea, derivados del taraxastanediol (pico 12) y el taraxastanonol (pico 13).

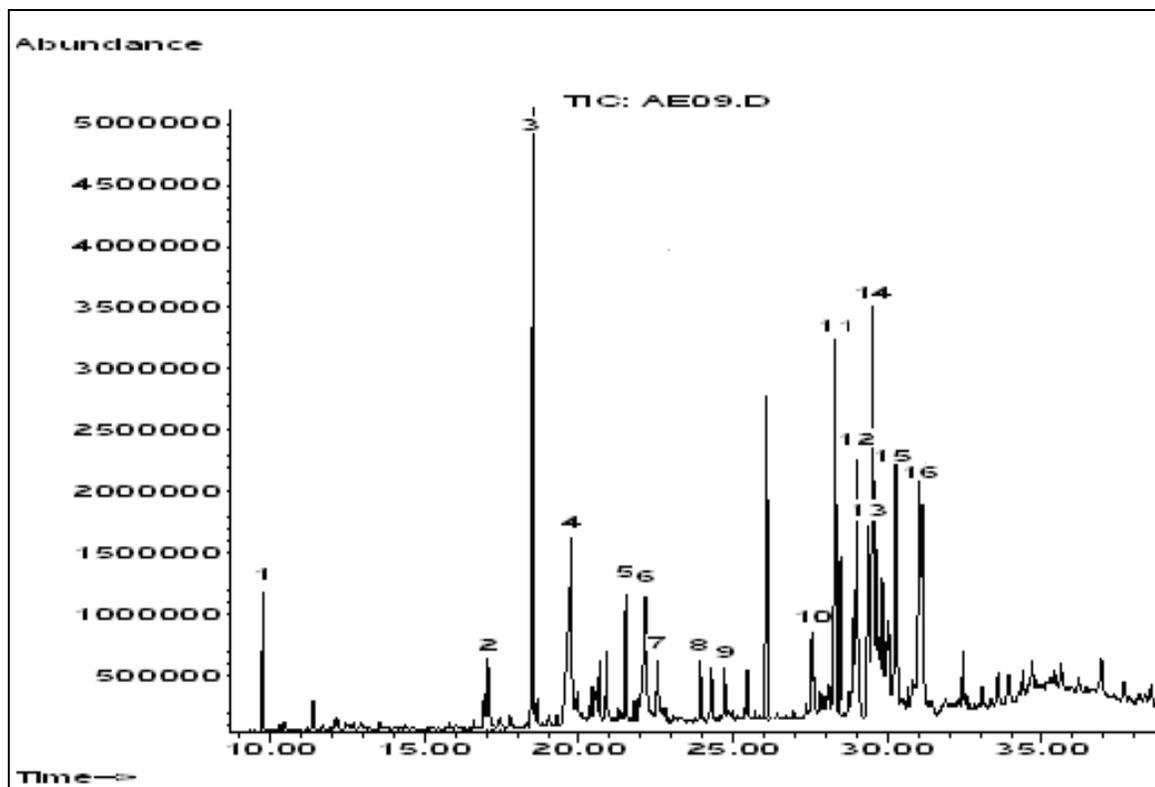


Figura 28. Cromatograma gaseoso del extracto de AcOEt de Marzo/07

Tabla XXIII. Compuestos sugeridos por CG-EM en el extracto acetato de etilo de Marzo/07

Picos	Tiempos de retención (min)	Compuestos sugeridos	Áreas relativas (%)	Fórmulas químicas
1	9,75	6,10-dimetil-5,9- undecadien-2-ona	2,76	C ₁₃ H ₂₂ O
2	17,12	6,10,14- trimetil-2-pentadecanona	2,12	C ₁₈ H ₃₆ O
3	18,60	6,10,14-trimetil-5,9,13-pentadecatrien-2-ona	15,61	C ₁₈ H ₃₀ O
4	19,89	Ácido palmítico	11,31	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
5	21,60	Fitol	3,03	C ₂₀ H ₄₀ O
6	22,12	Ácido oleico	5,56	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
7	22,82	Ácido esteárico	1,98	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
8	23,98	4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido	1,74	C ₂₁ H ₄₀ O ₂
9	24,87	1-docoseno	1,47	C ₂₂ H ₄₄
10	27,60	β -tocoferol	2,51	C ₂₈ H ₄₈ O ₂
11	28,43	α- tocoferol	9,76	C ₂₉ H ₅₀ O ₂
12	29,01	Derivado del taraxastanediol	7,11	C ₃₀ H ₅₂ O ₂
13	29,50	Derivado del epi-ψ-taraxastanonol	6,31	C ₃₀ H ₅₀ O ₂
14	29,68	γ -sitosterol	11,68	C ₂₉ H ₅₀ O
15	30,18	α- amirina	9,42	C ₃₀ H ₅₀ O
16	31,00	Estigmast-4-en-3-ona	7,62	C ₂₉ H ₄₈ O

La α -amirina es uno de los triterpenos más abundantes en la naturaleza y tiene referida actividad antiinflamatoria (Toshihiro y cols., 1996), aunque en especies de *Phyllanthus* como *P. acidus*, *P. urinaria* (Calixto y cols., 1998) y *P. flexuosus* (Tanaka y cols., 1988a, 1988b, 2004; Wada y cols., 2001) está reportada la presencia de su isómero β .

Al analizar su fragmentación en el espectro de masas (Anexo 6.3) se visualiza su ion molecular con m/z 426 acorde con su fórmula general $C_{30}H_{50}O$, se observa un pico de pequeña intensidad con m/z 411 correspondiente con la pérdida de un grupo CH_3 a partir del ión molecular, siendo el pico base del espectro m/z 218 el cual se forma tras una reacción de Retro Diles-Alder a nivel del anillo C y a partir del cual se originan los iones con m/z 203 por la pérdida de un grupo CH_3 y m/z 189 debido a la pérdida del grupo C_2H_5 por la ruptura del enlace que une a los anillos D y E. También se presenta un ión a m/z 207 que contiene a los anillos A y B. Los resultados obtenidos están en correspondencia con lo reportado por Wan y cols. (1972). En la figura 29 se representa la ruta de fragmentación sugerida para el compuesto.

En el caso de los compuestos del grupo del taraxastano se puede plantear que los mismos no han sido identificados en especies de *Phyllanthus*, aunque se han estudiado mucho en la familia *Anacardiaceae*, en la especie *Mangifera indica* (Anjaneyulu y cols., 1985; 1999); también se han aislado de *Euphorbia broteri* (Pascual y cols., 1987), de *Canarium strictum Roxb* (Hinge y cols., 1966), entre otras, manifestando muchas de estas estructuras actividad antiinflamatoria y antitumoral (Toshihiro y cols., 1996).

El compuesto representado por el pico 12 que eluyó a los 29,01 minutos presentó algunas similitudes en fragmentaciones típicas del taraxastanediol, este presenta fragmentos a m/z 444 relacionado con el ión molecular y acorde con su fórmula general $C_{30}H_{52}O_2$, iones con m/z 426 y 408 correspondientes con la pérdida de agua. La presencia de un fragmento con m/z 207 que agrupa a los anillos A y B o D y E con el grupo hidroxilo y otro con m/z 189 formado por la pérdida de agua a partir de dichos fragmentos. En la figura 30 se presentan los principales fragmentos asociados a la ruptura del compuesto según Hinge y cols. (1966).

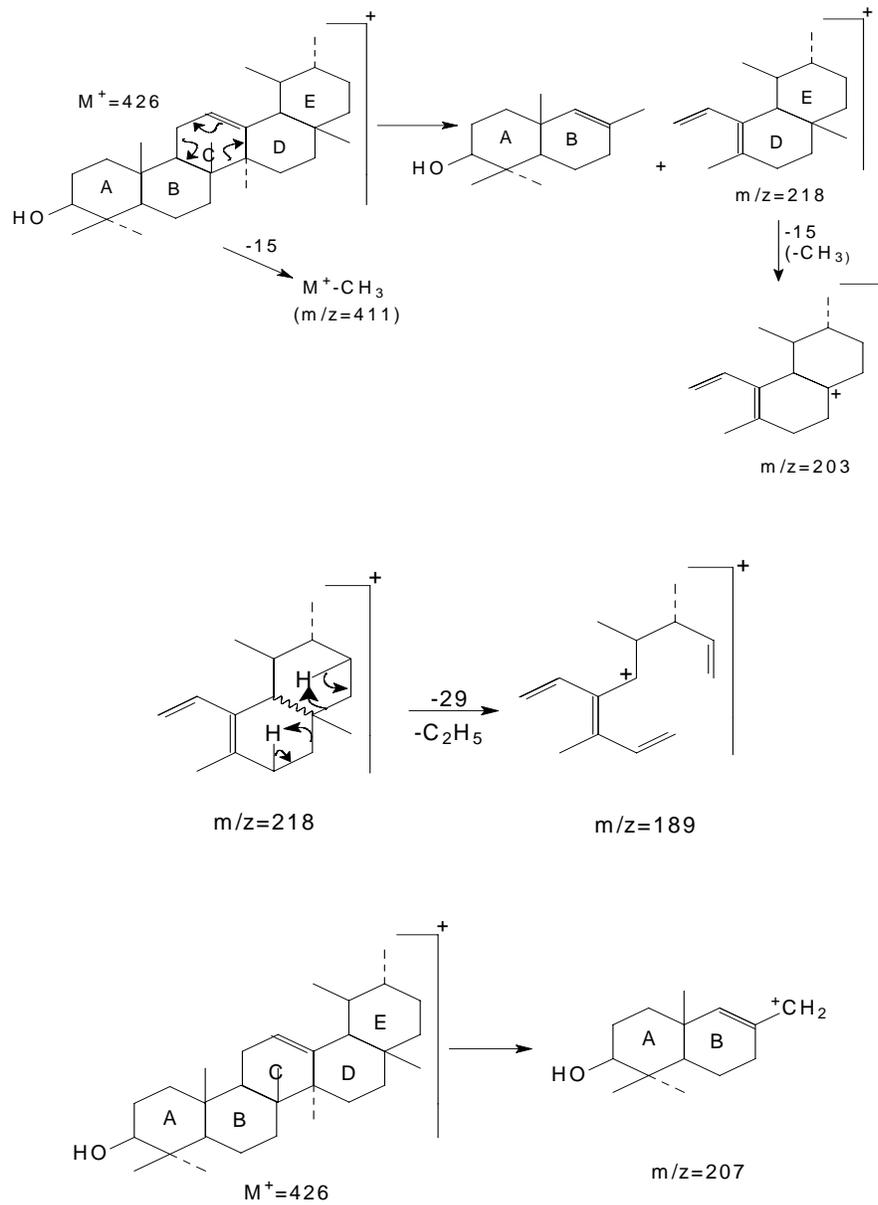


Figura 29. Ruta de fragmentación sugerida para la α - amirina

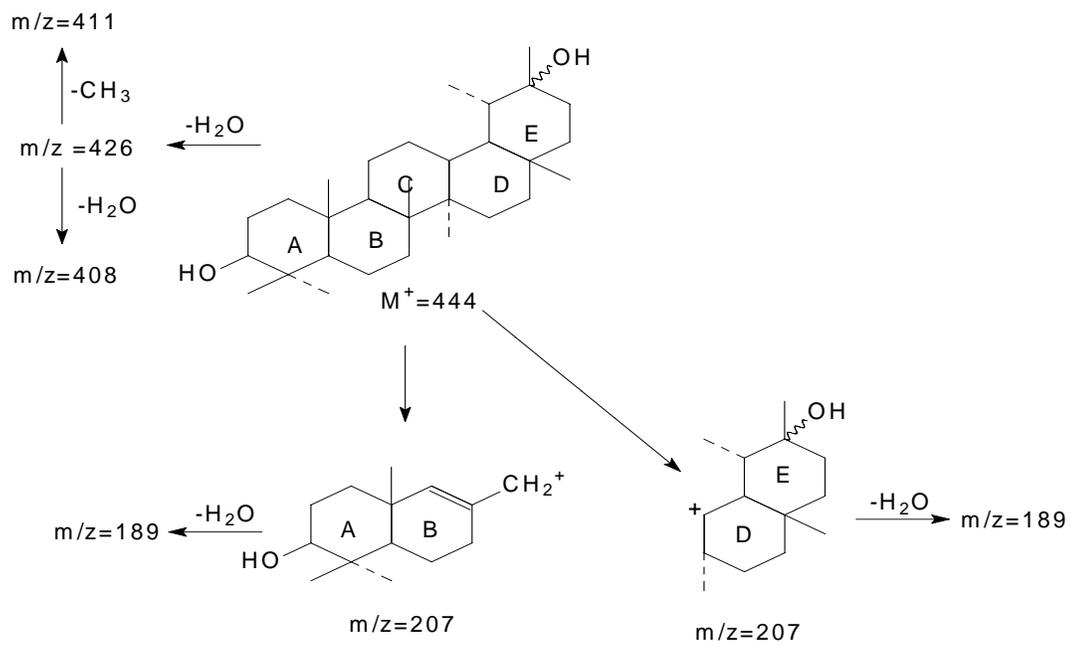


Figura 30. Principales fragmentos asociados a las rupturas del taraxastenediol
 (Hinge y cols., 1966)

Al comparar el espectro de masas del compuesto 12 (Anexo 3.10) con los fragmentos del taraxastanediol se pudo constatar que existían similitudes en la masa molecular y en secuencia de fragmentaciones, o sea, el ion molecular de m/z 444 y otros picos con m/z 426, 411, 207 y 189, lo cual permite sugerir dicha propuesta estructural.

El metabolito representado por el pico 13 que eluyó a los 29,50 minutos, según los resultados brindados por la base de datos del equipo y las referencias bibliográficas consultadas (Budzikiewicz y cols., 1963; Hinge y cols., 1966; Anjaneyulu y cols., 1985, 1999), permite sugerir que es un triterpeno pentacíclico del grupo del taraxastano, específicamente un derivado del epi- ψ -taraxastanonol cuya fórmula química es $C_{30}H_{50}O_2$, de masa molecular 442.

El espectro de masas obtenido para el compuesto 13 y el propuesto por la biblioteca del equipo para el epi- ψ -taraxastanonol se muestra en Anexo 3.11. Como se puede apreciar, existe una alta coincidencia entre ambos espectros. El espectro de masas no muestra ión molecular pero se presenta un fragmento iónico a m/z 424 producido por la pérdida de agua desde el ión molecular $[M-18]^+$. Se observa un fragmento prominente a m/z 205 característico de triterpenos pentacíclicos saturados (Budzikiewicz, 1963), el cual contiene los anillos A y B con el grupo carbonilo, y se forma por la ruptura del anillo C. Otra fragmentación representada por los picos de m/z 342 y m/z 82 es producida a través de una reacción Retro-Diels Alder durante la ruptura del anillo E, también se genera otro fragmento a m/z 314, debido posiblemente a la pérdida de una molécula de monóxido de carbono (CO) desde el fragmento 342 y otro con m/z 272 que involucra la función carbonílica con dos grupos metilos. En la figura 31 se representa una de las rutas propuestas para las principales fragmentaciones del taraxastanonol (Hinge y cols., 1966; Anjaneyulu y cols., 1999).

El extracto de AcOEt de la colecta de Agosto/07 también mostró un cromatograma (figura 32) con gran cantidad de picos, de los cuales solo pudieron ser identificados 14 componentes, entre ellos, cetonas, alcoholes superiores, ácidos grasos, tocoferoles, un triterpeno y un fitoesterol. En la tabla XXIV se recogen los principales metabolitos detectados y en el Anexo 7 se muestran los espectros de algunos de ellos, el resto aparece en colectas anteriores (Anexos 3-6).

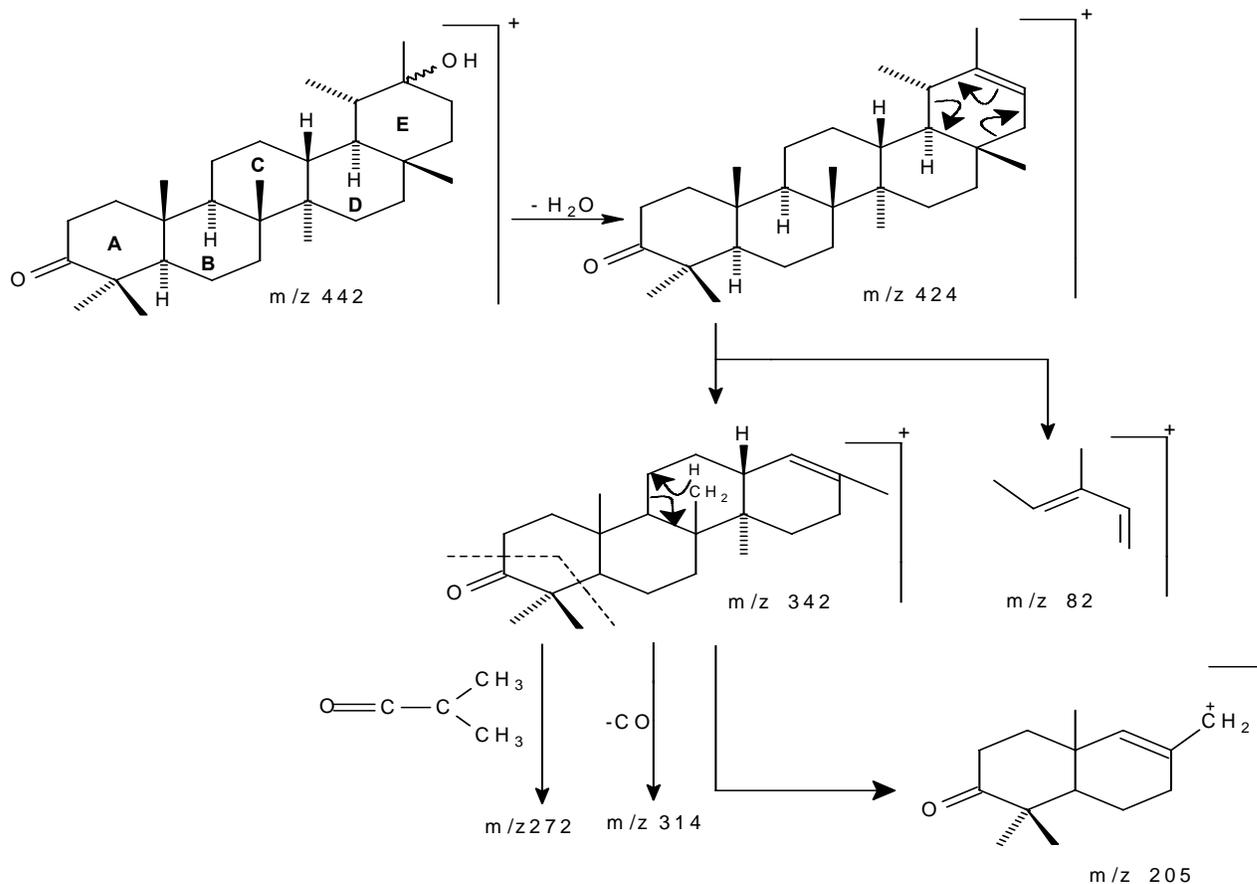


Figura 31. Principales fragmentos asociados a las rupturas del epi- ψ -taraxastanol
 (Hinge y cols., 1966; Anjaneyulu y cols., 1999)

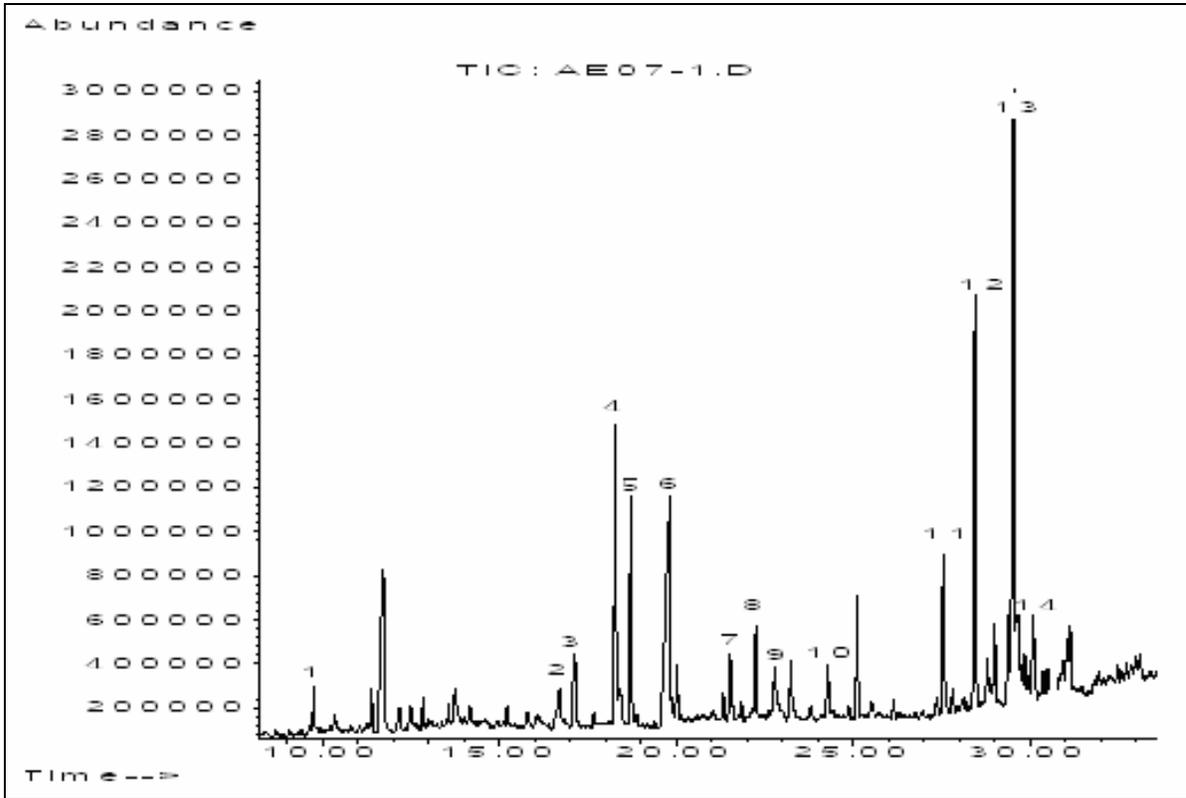


Figura 32. Cromatograma gaseoso del extracto de AcOEt de Agosto/07

Tabla XXIV. Compuestos sugeridos por CG-EM en el extracto acetato de etilo de Agosto/07

Picos	Tiempos de retención (min)	Compuestos sugeridos	Áreas relativas (%)	Fórmulas químicas
1	9,75	6,10-dimetil-5,9- undecadien-2-ona	0,93	C ₁₃ H ₂₂ O
2	16,71	Ácido mirístico	1,19	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
3	17,09	1-octadeceno	1,88	C ₁₈ H ₃₆
4	18,20	Neofitadieno	9,88	C ₂₀ H ₃₈
5	18,88	6,10,14-trimetil-5,9,13-pentadecatrien-2-ona	7,48	C ₁₈ H ₃₀ O
6	19,82	Ácido palmítico	17,90	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
7	21,52	Fitol	2,63	C ₂₀ H ₄₀ O
8	22,20	Ácido oleico	4,08	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
9	22,90	Ácido esteárico	2,29	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
10	24,22	1-docoseno	2,25	C ₂₂ H ₄₄
11	27,52	β -tocoferol	6,29	C ₂₈ H ₄₈ O ₂
12	28,49	α- tocoferol	15,63	C ₂₉ H ₅₀ O ₂
13	29,50	γ-sitosterol	23,69	C ₂₉ H ₅₀ O
14	30,09	α- amirina	3,88	C ₃₀ H ₅₀ O

Como se puede apreciar en la tabla, el γ -sitosterol es el que evidencia el mayor valor de área relativa (23,69%). Dentro del grupo de los esteroides, éste es uno de los esteroides tetracíclicos menos frecuentes, es común encontrar su isómero β -sitosterol, ampliamente distribuido en la naturaleza y en muchas especies de *Phyllanthus*, entre ellas, *P. caroliniensis*; *P. corcovadensis*; *P. engleri*; *P. flexuosus*; *P. muellerianu*; *P. niruri*; *P. urinaria* y *P. Watsonii*, y ha demostrado tener en estudios farmacológicos actividad antiinflamatoria y analgésica (Calixto y cols., 1998).

En el espectro de masas de dicho compuesto (Anexo 7.3A) se puede observar el ion molecular con m/z 414 que corresponde con la fórmula general $C_{29}H_{50}O$, debido a la pérdida de H_2O (proveniente del grupo OH de la posición 3) a partir del ion molecular se origina el pico con m/z 396 $[M-18]^+$, este fragmento sufre una nueva fragmentación dando origen al m/z 255, el cual surge por una eliminación de la cadena lateral unida al ciclo pentano perhidrofenantreno y por la pérdida de metilo y agua $[M-15-18]^+$ se forma el ion con m/z 381. También se evidencia un fragmento con m/z 273 originado por la pérdida de la cadena lateral ($C_{10}H_{21}$), a partir del cual se origina el ión m/z 255 por pérdida de agua. Los principales fragmentos asociados a las rupturas del compuesto según Kutney y cols. (1996), Weststrate y cols. (1999) y Martínez (2002) se muestran en la figura 33.

Para sugerir la presencia de este compuesto y no de su isómero β se realizó una corrida de la muestra y un patrón de γ -sitosterol (Merck, 98% de pureza) bajo las mismas condiciones de trabajo. Como resultado se obtuvo que el compuesto sugerido por la base de datos del equipo y el patrón utilizado eluyeron al mismo tiempo de retención (29,50min). En la figura 34 se muestran los cromatogramas obtenidos y una superposición del ion 414 que es el pico base del espectro de masas del compuesto.

Al analizar los espectros obtenidos para el γ -sitosterol presente en el extracto (Anexo 7.3 A), el patrón (Anexo 7.3 B) y el ofrecido por la base de datos del equipo (Anexo 7.3 C) se pudo observar plena correspondencia entre ellos, no siendo así cuando se comparaban con el espectro del β -sitosterol (Anexo 7.3D) donde el ion molecular 414 es mucho más intenso y la diferencia de intensidad de este pico respecto al m/z 396

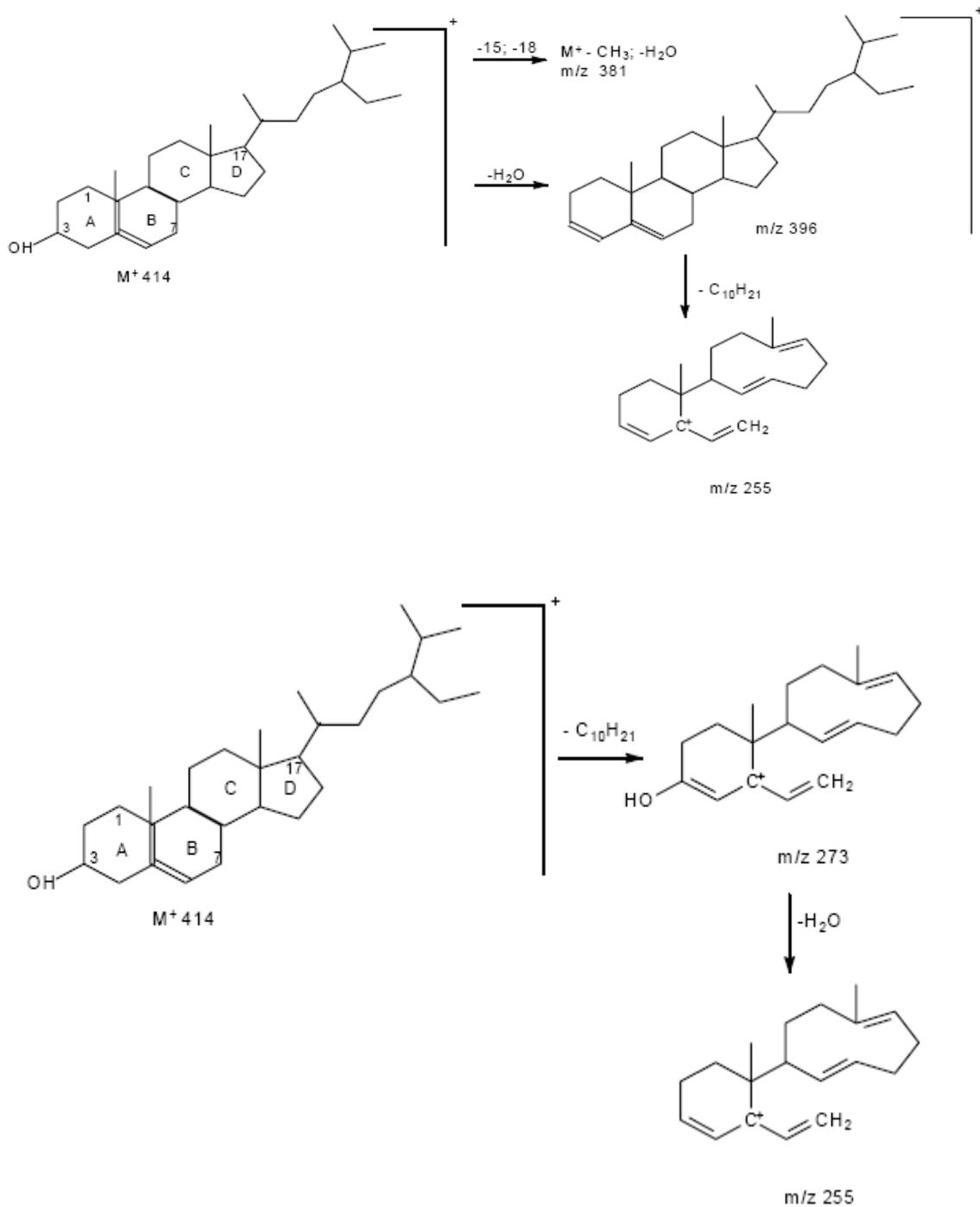
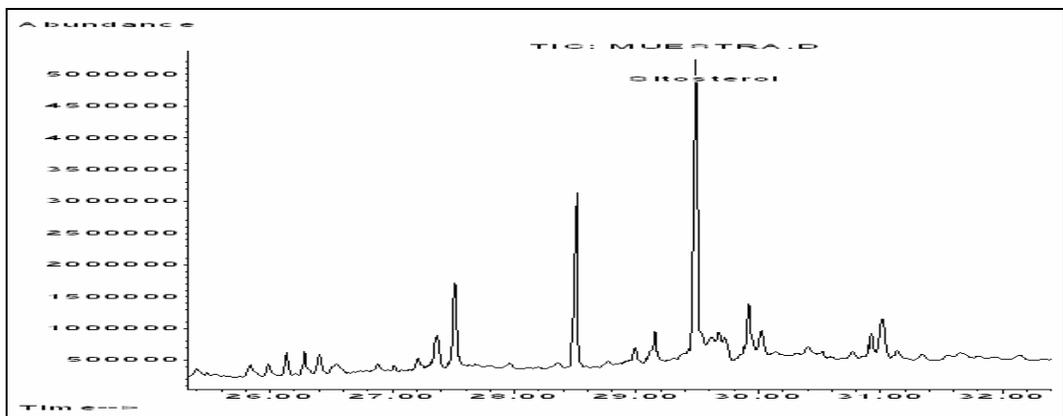
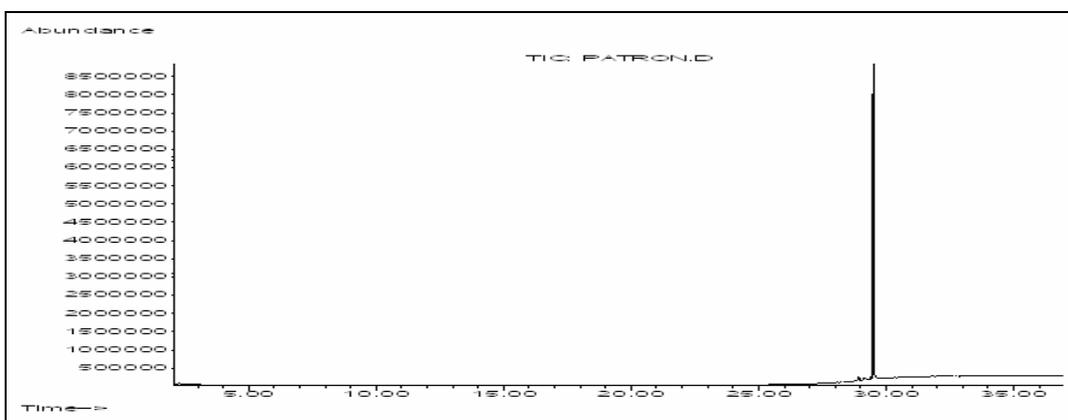


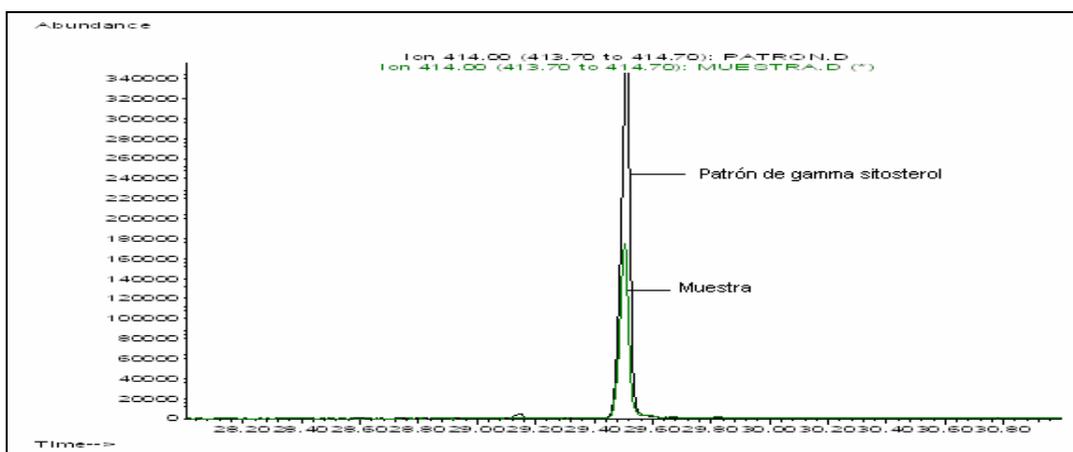
Figura 33. Principales fragmentos asociados a las rupturas del γ -sitosterol
(Kutney y cols., 1996; Weststrate y cols., 1999; Martínez, 2002.)



A



B



C

Figura 34. Cromatogramas gaseosos obtenidos en el análisis del γ -sitosterol

A: Cromatograma del extracto hexánico de Agosto/07; **B:** Cromatograma del patrón γ -sitosterol; **C:** Superposición del pico de γ -sitosterol obtenido para el extracto y el patrón

es mayor con respecto al γ . Estos resultados están en correspondencia con lo reportado por Garibello (2010).

Otros metabolitos mayoritarios sugeridos fueron el ácido palmítico y el α -tocoferol, con abundancias relativas de 17,90 y 15,63% respectivamente, ya referidos anteriormente en el estudio.

El extracto perteneciente a la muestra de Octubre/07 también mostró un cromatograma (figura 35) con varios picos de diferentes intensidades, se identificaron con ayuda de la base de datos 12 constituyentes, los cuales se muestran en la tabla XXV y en los Anexos 3-8 los espectros de ellos.

El compuesto mayoritario también resultó ser el γ -sitosterol con una abundancia relativa del 26,05%, aunque existe un predominio de estructuras de naturaleza lipídica (picos 2, 3, 5 y 6), entre ellos el oleato de metilo (20,71%) y el linoleato de metilo (con una abundancia relativa del 11,92%), siendo este último el éster metílico del ácido linoleico que constituye un ácido graso esencial, necesario para el crecimiento, la reparación de las células y precursor de muchas otras sustancias del organismo, responsables de regular la presión arterial, la respuesta inflamatoria o la coagulación sanguínea (Manera y Zudaire, 2009). Estos compuestos lipídicos han sido identificados en *P. maderaspatensis* (Calixto y cols., 1998).

Los ésteres alifáticos poseen un patrón de fragmentación semejante al de los hidrocarburos lineales, diferenciándose de éstos por la presencia del ion m/z 74 que en ocasiones corresponde con el pico base del espectro. Este pico es el más característico de los ésteres alifáticos y se forma por un reordenamiento de McLafferty con una ruptura del enlace β en relación al grupo $C=O$. Los ésteres presentan aglomerados de hidrocarburos en intervalos de 14 unidades de masa y el pico con m/z 87 que corresponde al ion $[CH_2CH_2COOCH_3]$ está siempre presente. (Silverstein y cols., 1977; Dass, 2007).

El análisis del extracto correspondiente a la muestra de Enero/08 presentó un cromatograma (figura 36) conformado por gran cantidad de picos cromatográficos de

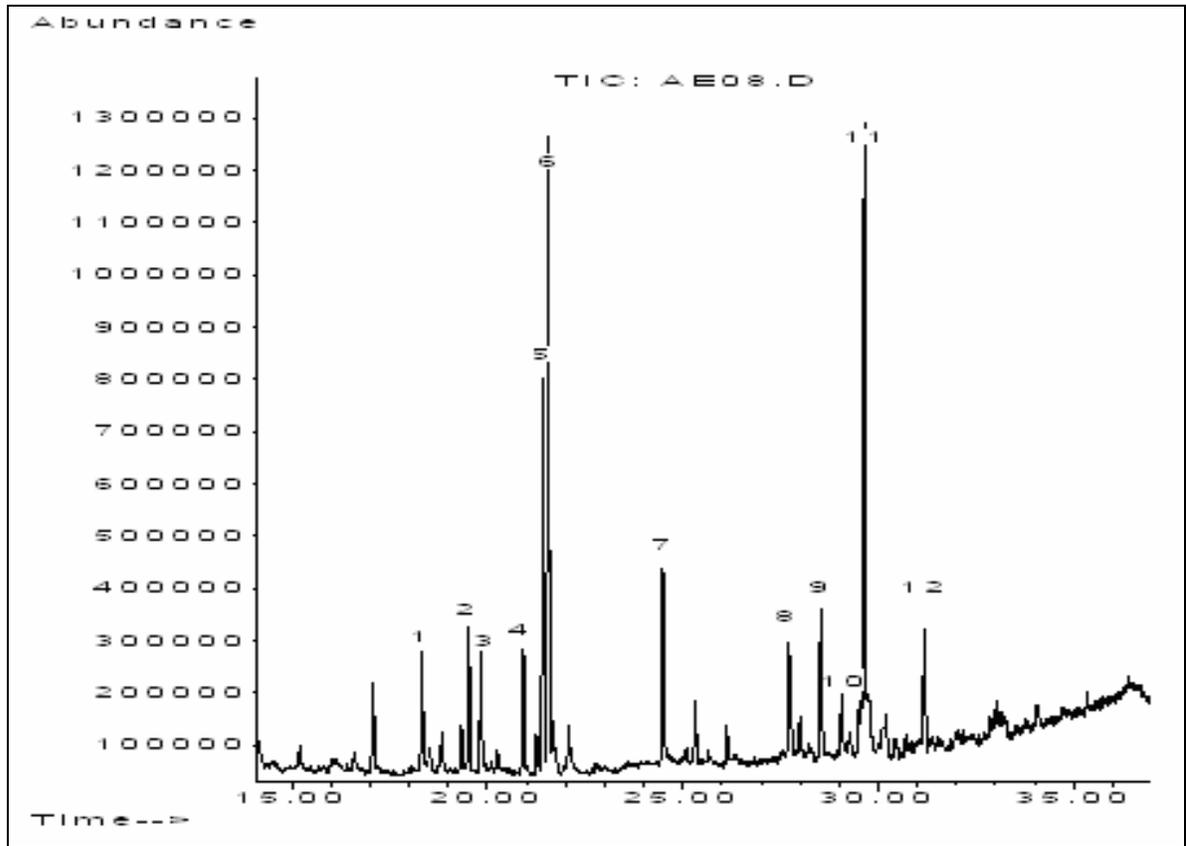


Figura 35. Cromatograma gaseoso del extracto de AcOEt de Octubre/07

Tabla XXV. Compuestos sugeridos por CG-EM en el extracto acetato de etilo de Octubre/07

Picos	Tiempos de retención (min)	Compuestos sugeridos	Áreas relativas (%)	Fórmulas químicas
1	18,36	Neofitadieno	3,78	C ₂₀ H ₃₈
2	19,70	Palmitato de metilo	4,17	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
3	19,90	Ácido palmítico	4,59	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
4	20,95	Ácido 4-oxazolecarboxílico, 4,5-dihidro-2-fenil-1-metil etil éster	4,16	C ₁₃ H ₁₅ O ₃ N
5	21,20	Linoleato de metilo	11,92	C ₁₉ H ₃₄ O ₂
6	21,48	Oleato de metilo	20,71	C ₁₉ H ₃₆ O ₂
7	24,50	1-docoseno	7,21	C ₂₂ H ₄₄
8	27,75	β -tocoferol	5,40	C ₂₈ H ₄₈ O ₂
9	28,67	α- tocoferol	5,37	C ₂₉ H ₅₀ O ₂
10	29,41	Estigmasta-5,22-dien-3-ol	1,92	C ₂₉ H ₄₈ O
11	29,80	γ-sitosterol	26,05	C ₂₉ H ₅₀ O
12	31,10	Estigmast-4-en-3-ona	4,66	C ₂₉ H ₄₈ O

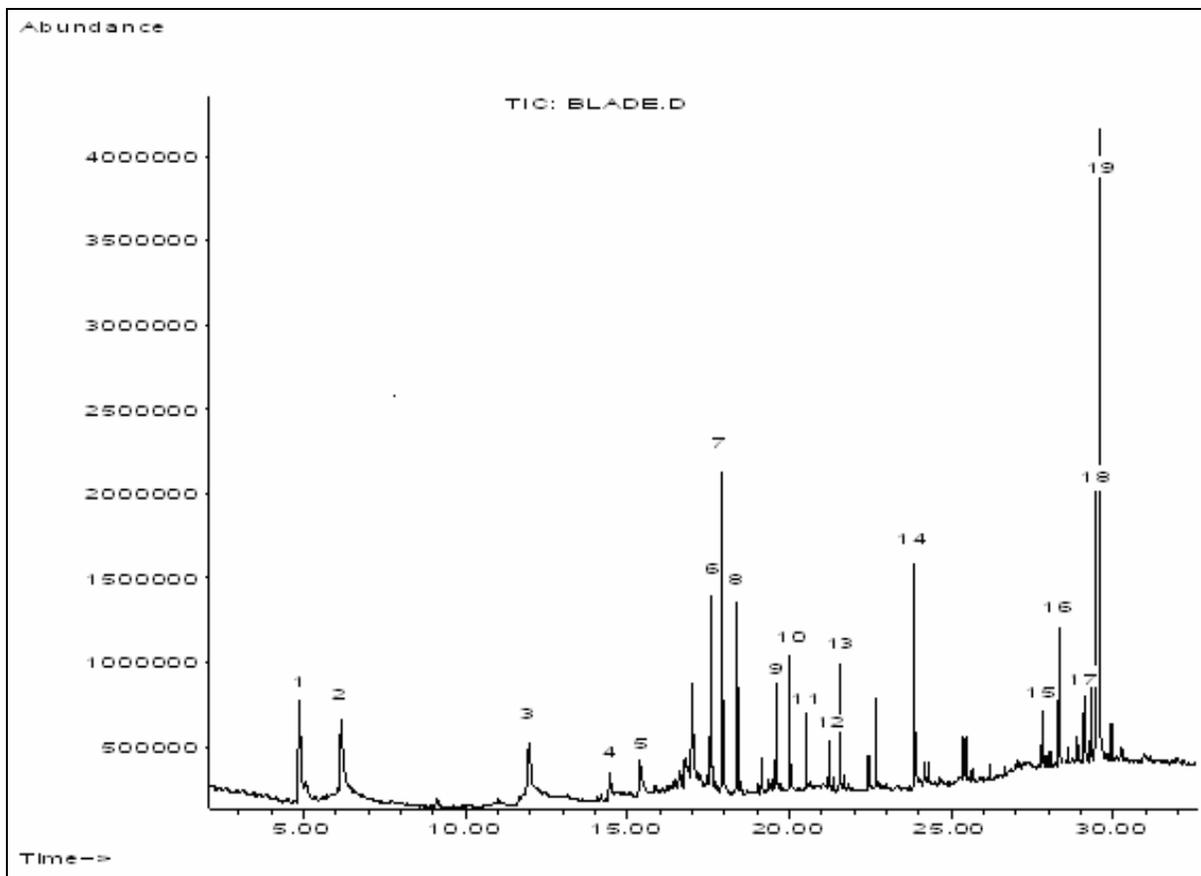


Figura 36. Cromatograma gaseoso del extracto de AcOEt de Enero/08

diferentes intensidades, encontrando mayor complejidad a partir de los 15 minutos, aproximadamente.

Del total de picos mostrados, solo pudieron ser identificados 19 componentes, fenol (pico 1) y tres derivados del mismo (picos 2, 4, 5), una coumarina (pico 3), cinco terpenos, entre ellos, un apocarotenoide (pico 6), un alcohol terpénico (pico 7), dos diterpenos (picos 8,13) y un triterpeno (pico 18), dos fitoesteroles (picos 17, 19), dos ésteres de ácidos grasos (picos 9, 12), alcoholes superiores (picos 10, 11), un alqueno (pico 14) y dos tocoferoles (pico 15 y 16). El mayor porcentaje de compuestos identificados correspondió a estructuras del tipo terpénicas, aunque el γ -sitosterol fue el que mostró el mayor valor de área relativa (20,96 %). En la tabla XXVI se señalan los compuestos y en Anexo 9 los espectros de masas de la mayoría de ellos, encontrándose los restantes en los Anexos 3-8.

Otro metabolito mayoritario según los valores de áreas relativas es el terpeno vomifoliol con un 10,14%, el mismo no ha sido referido en otras especies de *Phyllanthus* aunque se ha identificado en especies de *Rauwolfia vomitoria*, *Policourea alpina* (Stuart e Ivonne, 1975), *Picus chlamydocarpa* y *Picus cordata* (*Moraceae*) (Kuetze y cols., 2008) y juega un importante papel en la apertura y cierre de los estomas en las plantas. En el espectro de masas del compuesto (Anexo 9.7) se observó un pico casi imperceptible a m/z 223 relacionado con la pérdida de un átomo de hidrógeno desde el ión molecular (m/z 224). También un fragmento de m/z 206 producido por la pérdida de agua desde el ion molecular. El pico base del espectro aparece a m/z 124, relacionado con el agrupamiento químico $C_8H_{12}O$. Otros picos fueron localizados a m/z 151 ($C_9H_{11}O_2$), m/z 95 (C_7H_{11}), m/z 79 (C_6H_7), entre otros, en correspondencia con lo planteado en la literatura (Stuart e Ivonne, 1975, Kuetze y cols., 2008). En la figura 37 se muestran algunas fragmentaciones sugeridas para el compuesto.

Se presenta también en dicho extracto el triterpeno pentacíclico derivado del taraxastanol, del cual se hizo referencia en extractos anteriores.

Tabla XXVI. Compuestos sugeridos por CG-EM en el extracto acetato de etilo de Enero/08

Picos	Tiempos de retención (min)	Compuestos sugeridos	Áreas relativas (%)	Fórmulas químicas
1	4,90	Fenol	7,05	C ₆ H ₆ O
2	6,20	2-metoxi fenol	6,05	C ₇ H ₈ O ₂
3	12,00	2-coumaranona	5,03	C ₈ H ₆ O ₂
4	14,49	2-metoxi-4-vinilfenol	1,76	C ₉ H ₁₀ O ₂
5	15,36	2,5-dimetoxi fenol	2,10	C ₈ H ₁₀ O ₃
6	17,51	Blumenol C	5,86	C ₁₃ H ₂₂ O ₂
7	17,98	Vomifoliol	10,14	C ₁₃ H ₂₀ O ₃
8	18,30	Neofitadieno	5,47	C ₂₈ H ₃₈
9	19,57	Palmitato de metilo	2,32	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
10	20,00	9-octadecenol	3,58	C ₁₈ H ₃₆ O
11	20,50	1-octadecanol	1,93	C ₁₈ H ₃₈ O
12	21,25	Linoleato de metilo	1,32	C ₁₉ H ₃₄ O ₂
13	21,50	Fitol	3,10	C ₂₀ H ₄₀ O
14	23,90	5-eicoseno	6,73	C ₂₀ H ₄₀
15	27,82	β -tocoferol	1,39	C ₂₈ H ₄₈ O ₂
16	28,38	α- tocoferol	4,26	C ₂₉ H ₅₀ O ₂
17	29,16	Estigmasterol	1,72	C ₂₉ H ₄₈ O
18	29,50	Derivado de epi- ψ-taxastanonol	9,21	C ₃₀ H ₅₀ O ₂
19	29,62	γ -sitosterol	20,96	C ₂₉ H ₅₀ O

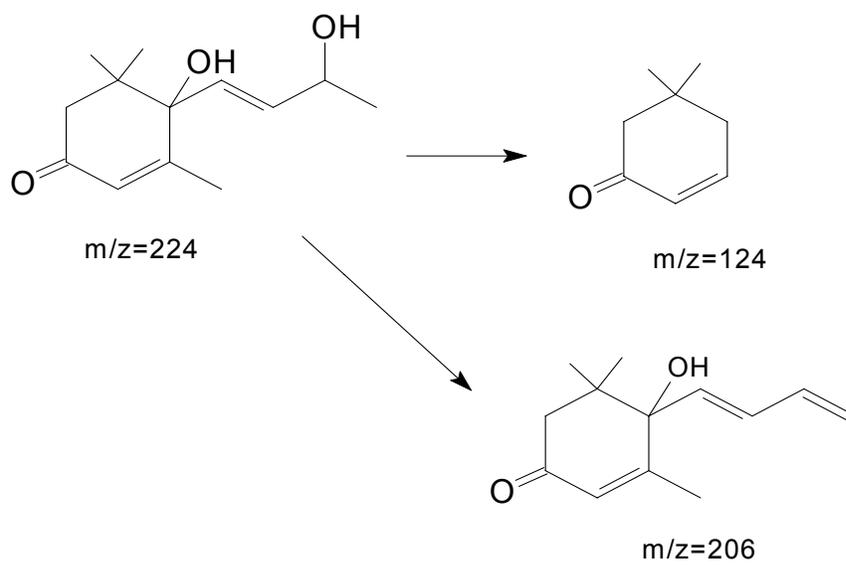


Figura 37. Algunos fragmentos sugeridos a la ruptura del vomifoliol

Otro compuesto con un valor apreciable de área relativa es el fenol (7,05%). Al tener un anillo aromático en su estructura, se presenta un ion molecular muy intenso que muchas veces coincide con el pico base del espectro, como sucede en este caso, el mismo mostró en su espectro de masas (Anexo 9.1) un pico prominente a m/z 94 que corresponde con el ion molecular y aparece un fragmento a m/z 66 de menor intensidad relacionado con la pérdida de monóxido de carbono desde el ion molecular $[M-28]^+$, lo cual es característico de este tipo de compuesto (Silverstein y cols., 1977).

Fue identificado también el 2-metoxi fenol, cuyo espectro de masas (Anexo 9.2) mostró el ión molecular con m/z 124 del cual resulta un fragmento de muy baja intensidad con m/z 95 correspondiente a la pérdida de CHO (M^+-29) (Silverstein y cols., 1977). El resto de los derivados fenólicos como 2-metoxi vinilfenol (Anexo 9.4) y 2,5- dimetoxi fenol (Anexo 9.5) tienen un comportamiento similar a este compuesto.

El blumenol C, identificado con el pico 6, eluyó a un tiempo de 17,51 min. aproximadamente, éste es un pigmento de color amarillo y se forma por la ruptura de moléculas de carotenos, el mismo no ha sido identificado en especies del género *Phyllanthus* según las bibliografías consultadas, pero si en las raíces de *Nicotiana tabacum* (tabaco) (Maier y cols., 1999), *Triticum aestivum* (trigo), *Secale cereale* (centeno) y *Avena sativa* (avena) (Maier y cols., 1995) y de las partes aéreas de *Epimedium grandiflorum* (Miyase y cols., 1988). Su espectro de masas y el ofrecido por la base de datos del equipo (Anexo 9.6) muestran un ion molecular de mediana intensidad a m/z 210 y otros fragmentos de interés de m/z 150, 135, 108, 93, entre otros, característicos del compuesto (Miyase y cols., 1988; Maier y cols., 1995).

Uno de los compuestos menos abundantes en el extracto fue el estigmasterol, un esteroide muy frecuente en la naturaleza y en especies de *Phyllanthus* como, *P. flexuosus*, *P. caroliniensis*, *P. corcovadensis*, *P. sellowianus* (Calixto y cols., 1998). En el espectro de masas (Anexo 5.7) pudo visualizarse el ion molecular (M^+) con m/z 412 característico del compuesto, en correspondencia con su fórmula general $C_{29}H_{48}O$, se observaron otros picos con m/z 397 originado por pérdida de un grupo metilo a partir de M^+ , m/z 394 por la pérdida de agua a partir de M^+ y por la pérdida de metilo y H_2O $[M-15-18]^+$ el ion con m/z 379, producto de la ruptura arílica

de la cadena lateral se origina el ion con m/z 369 $[M-43]^+$ y el ion con m/z 351 $[M-43-18]^+$ formado por la ruptura de la cadena lateral ($-C_3H_7$) y la pérdida de H_2O , así como fragmentos con m/z 273, 255, 213, entre otros. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura (Weststrate y cols., 1999; Ticona, 2006; Chegwing, 2007; Isaza, 2007; Nieto y Ávila, 2008; Garibello, 2010).

El análisis de los extractos de acetato de etilo de las diferentes colectas, permitió la identificación de 35 componentes de diferente naturaleza química, de ellos, 17 ya se habían identificado en los extractos hexánicos, lo que confirma su abundancia en la especie y a la vez indica que la extracción por maceración con este disolvente no extrajo la totalidad de los componentes presentes (tabla XXVII).

Como metabolitos exclusivos de estos extractos fueron identificados 18, de los cuales predominaron los alcoholes y fenoles (cinco compuestos), terpenoides y esteroides (cinco componentes), ácidos grasos esterificados (cuatro compuestos), un hidrocarburo, una cetona, una cumarina y β -tocoferol.

En sentido general, en los extractos de baja polaridad (hexano y acetato de etilo), fueron extraídos, fundamentalmente, compuestos de naturaleza grasa.

La presencia de hidrocarburos en la especie, puede ser explicada atendiendo a diversas funciones que como metabolitos secundarios tienen en las plantas, donde los alcanos constituyen una fuente de carbono o energía. También se encuentran alcanos sólidos de cadena larga, que forman una capa firme, la cutícula, sobre las áreas expuestas al aire, que protege a la planta de la pérdida de agua, de bacterias, hongos e insectos dañinos, a la vez que evita el arrastre de minerales por la lluvia. Las cadenas carbonadas de las ceras tienen generalmente entre veinte y treinta átomos de carbono y las especies vegetales las preparan a partir de los ácidos grasos. La composición exacta de la película de cera no sólo depende de la especie (pueden estar constituidas por mezclas complejas de compuestos alifáticos, alcanos, alcoholes, aldehídos y ácidos grasos aunque estos en menor proporción), sino que cambia con la estación y factores ambientales como las condiciones de iluminación, temperatura o humedad (Taiz y Zeiger, 2006), lo que puede explicar que en el caso

Tabla XXVII. Compuestos sugeridos por CG-EM en los extractos de acetato de etilo obtenidos de diferentes colectas

No	Clase de compuesto/Nombre	Abundancia relativa %/ Época de colecta			
		Mar/ 07	Ago/ 07	Oct/ 07	Ene/ 08
HIDROCARBUROS					
1	5-eicoseno				6,73
2	1- dococeno	1,47	2,25	7,21	
3	1-octadeceno		1,88		
CETONAS					
4	6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona (geranil/neril-cetona)	2,76	0,93		
5	6,10,14-trimetil-5,9,13-pentadecatrien-2-ona (Farnesil-cetona)	15,61	7,48		
6	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	2,12			
ALCOHOLES Y FENOLES					
7	9-octadecenol				3,58
8	1-octadecanol				1,93
9	Fenol				7,05
10	2-metoxi-fenol				6,05
11	2,5-dimetoxi-fenol				2,10
12	2-metoxi-4-vinil-fenol				1,76
ÁCIDOS Y ÉSTERES					
13	Ácido mirístico		1,19		
14	Ácido palmítico	11,31	17,90	4,59	
15	Ácido oléico	5,56	4,08		
16	Ácido esteárico	1,98	2,29		
17	Ácido-4-oxazolecarboxílico-4,5-dihidro-2-fenil-1-metil-etil-éster			4,16	
18	Linoleato de metilo			11,92	1,32
19	Palmitato de metilo			4,17	2,32
20	Oleato de metilo			20,71	
TERPENOS Y FITOSTEROLES					
21	Epi- Ψ -taraxastanonol (derivado)	6,31			9,21
22	Taraxastanediol (derivado)	7,11			
23	Fitol	3,03	2,63		3,10
24	Neofitadieno		9,88	3,78	5,47
25	Estigmast-4-en-3-ona	7,62		4,66	
26	Estigmast-5,22-dien-3-ol			1,92	
27	γ -sitosterol	11,68	23,69	26,05	20,96
28	α -amirina	9,42	3,88		
29	Estigmasterol				1,72
30	Blumenol C				5,86
31	Vomifoliol				10,14
OTROS COMPONENTES					
32	4,8,12,16-tetrametil-4-heptadecanólido (lactona)	1,74			
33	β -tocoferol	2,51	6,29	5,40	1,39
34	α - tocoferol	9,76	15,63	5,37	4,26
35	2-coumaranona				5,03

Leyenda: Las líneas oscuras corresponden a compuestos identificados en los extractos hexánicos

particular de la especie objeto de estudio, tanto los hidrocarburos, como los alcoholes hayan tenido una concentración más elevada en Enero, como un mecanismo de defensa al estrés hídrico, pues según Lechea (1994) este mes es considerado uno de los más típicos de sequía en Cuba. La existencia de una cutícula gruesa en las hojas de la especie fue demostrada en el estudio micromorfológico.

La presencia de fenoles en la especie puede ser justificada como compuestos intermediarios en la biosíntesis de otros compuestos fenólicos y como monómeros de la lignina, un componente de incrustación de la membrana celular, que le da resistencia y sostén a la misma.

Los otros componentes presentes, son productos también del metabolismo secundario, el cual es mucho más heterogéneo entre las diferentes especies, las épocas de colecta, de crecimiento y los diversos tejidos, y algunas de sus rutas pueden ser imprescindibles en ciertas situaciones ecofisiológicas. Sus funciones pueden ser varias y están fundamentalmente relacionadas con la comunicación entre las partes del vegetal y de este con otros seres vivos, tales como, atraer insectos polinizadores, inhibir el crecimiento de plantas vecinas, dar resistencia física o ejercer de transmisor de señales entre diferentes tejidos, lo cual puede explicar las variaciones encontradas (Judd y cols., 2002; Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Teniendo en cuenta que la especie objeto de estudio es endémica de Cuba y los estudios químicos son escasos, los resultados obtenidos en este trabajo representan aportes en el conocimiento de la composición química de *P. orbicularis*.

IV.4. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS

Dadas las características de polaridad del extracto metanólico, éste solo podría analizarse por CG-EM si se sometieran a derivatización las muestras, los resultados obtenidos en un análisis previo por esta vía permitió la detección de gran cantidad de azúcares y estructuras tipo flavonoides, considerando estos antecedentes se seleccionó otro método para su separación y análisis.

IV.4.1. ANÁLISIS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

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. Esta técnica separativa ha sido empleada últimamente en el análisis de flavonoides brindando resultados satisfactorios, en la misma 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.

Este análisis se realizó a los extractos metanólicos de las muestras correspondientes a las colectas de Marzo/07, Agosto/07, Octubre/07 y Enero/08, con el propósito de identificar los flavonoides presentes, a partir de los antecedentes que se tenían de otras especies de *Phyllanthus* (Calixto y cols., 1997, 1998; Ham y cols., 2001; Shakil y cols., 2008).

En este estudio se inyectaron primeramente los estándares (rutina, quercetina y kaempferol) para establecer los tiempos de retención de cada uno, en iguales condiciones a la de los extractos a analizar, como resultados se obtuvieron valores de 20,24; 24,55 y 26,94 minutos respectivamente. El anexo 10 muestra los cromatogramas y espectros UV obtenidos para cada patrón.

El extracto metanólico de Marzo/07 mostró un cromatograma sencillo (figura 38A) con la presencia de 11 picos cromatográficos, donde los representados con los tiempos de 20,22, 24,60 y 26,96min. correspondieron con la rutina, quercetina y kaempferol respectivamente, pudiendo sugerir que la rutina es mayoritaria entre los flavonoides ensayados con un valor de área relativa del 34,29%.

La muestra de Agosto/07 presentó alrededor de 13 picos (figura 38B), siendo el metabolito mayoritario, con un valor de área relativa del 58,33%, el de tiempo de retención de 20,32min. que al compararlo con los patrones (tr y espectro UV) se pudo constatar que era la rutina, además de detectar en ella a la quercetina, quien eluyó a un tiempo de 24,68min.

Por su parte, el extracto de la colecta de Octubre/07 también evidenció un cromatograma con 13 picos cromatográficos (figura 38C), pudiendo identificar los 3 flavonoides ensayados, destacándose entre ellos igualmente la rutina como el mayoritario con un valor de área relativa del 27,53%.

El extracto correspondiente a Enero/08 fue el más complejo (figura 38D) con alrededor de 17 picos cromatográficos, identificando a la rutina como el metabolito mayoritario (12,23%), la cual eluyó a un tiempo de 20,33min., detectándose además, los flavonoides quercetina y kaempferol con tr de 24,69 y 26,85min. y áreas relativas de 10,40 y 10,15% respectivamente.

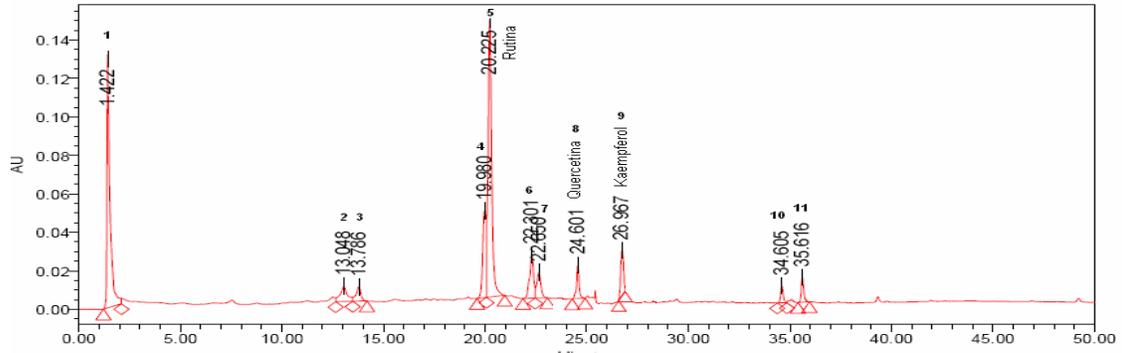
En la tabla XXVIII se recogen los resultados del estudio.

Es de notar, en los cuatro extractos metanólicos que el metabolito mayoritario entre los flavonoides ensayados fue la rutina, acompañado siempre de la quercetina que tuvo menor porcentaje de área relativa en la colecta de Marzo, no ocurriendo así para el kaempferol, el cual no fue detectado en la muestra de Agosto/07.

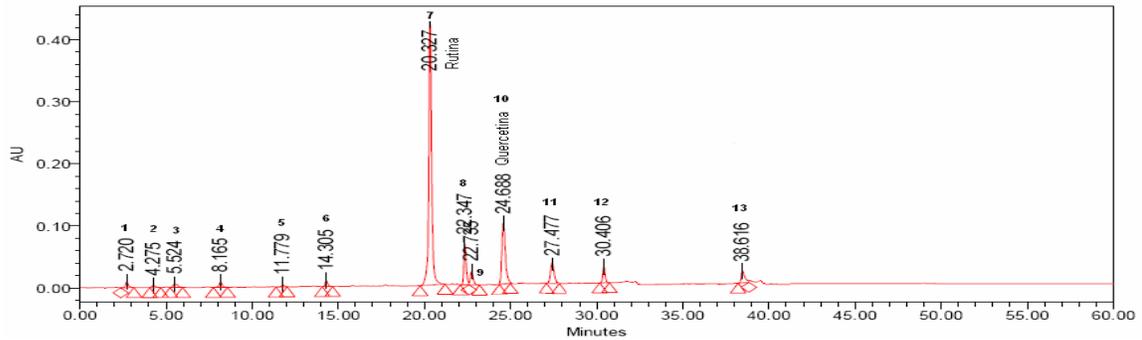
En la mayoría de los flavonoides y en especial en flavonas y flavonoles, el espectro de absorción UV, exhibe dos bandas en la región del ultravioleta/visible, la banda I representativa del anillo A de estos compuestos que aparece en un rango de los 320 a 385nm y la banda II perteneciente al anillo B, ubicada entre los 250 y 285nm (Lock, 1988; Markham, 1989).

Teniendo en cuenta este análisis, es importante destacar que en los cromatogramas de los extractos estudiados (figura 38), varios picos cromatográficos mostraron al UV espectros característicos de flavonoides, pudiendo señalar:

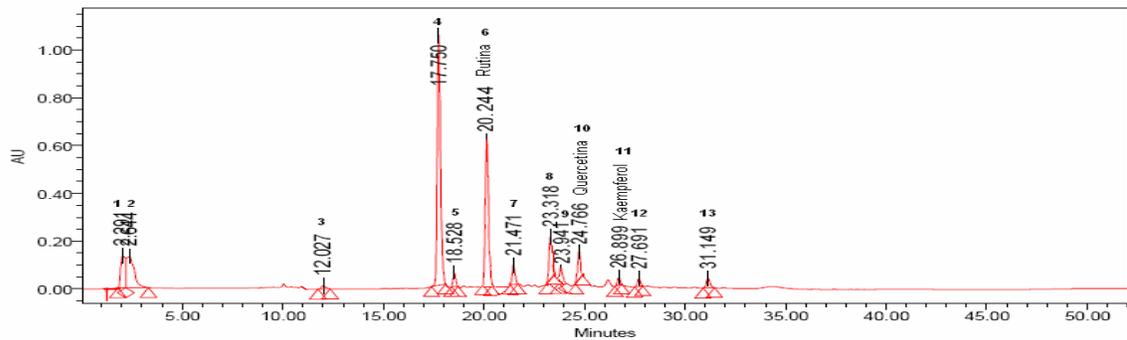
- Picos 4-6, 8-9 del cromatograma de la colecta de Marzo/07
- Picos 7-8, 10-12 del cromatograma de la colecta de Agosto/07
- Picos 5-12 del cromatograma de la colecta de Octubre/07
- Picos 9-11, 13-16 de cromatograma de la colecta de Enero/08



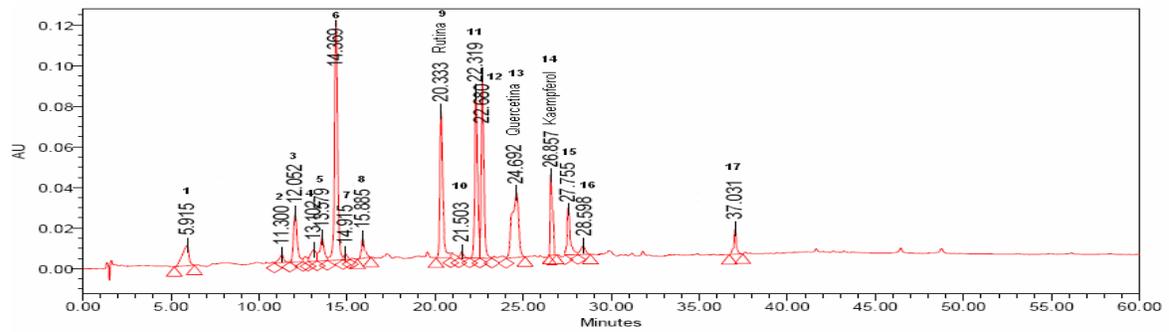
A. Cromatograma CLAR del extracto metanólico de Marzo/07



B. Cromatograma CLAR del extracto metanólico de Agosto/07



C. Cromatograma CLAR del extracto metanólico de Octubre/07



D. Cromatograma CLAR del extracto metanólico de Enero/08

Figura 38. Cromatogramas CLAR de los extractos metanólicos de las diferentes colectas

Tabla XXVIII. Resultados del análisis por CLAR de los extractos metanólicos obtenidos de las diferentes colectas

Marzo/07			Agosto/07			Octubre/07			Enero/08		
Picos	Tr (min)	Ar (%)	Picos	Tr (min)	Ar (%)	Picos	Tr (min)	Ar (%)	Picos	Tr (min)	Ar (%)
1	1.42	26,63	1	2.72	1,30	1	2.29	5,95	1	5.91	3,57
2	13.04	3,64	2	4.27	0,57	2	2.64	7,92	2	11.30	1,05
3	13.78	2,33	3	5.52	1,19	3	12.02	0,37	3	12.05	5,01
4	19.98	9,91	4	8.16	1,32	4	17.75	38,35	4	13.10	1,73
5	20.22	34,29	5	11.77	0,40	5	18.52	1,33	5	13.57	2,69
6	22.30	5,67	6	14.30	1,16	6	20.24	27,53	6	14.36	16,68
7	22.65	3,53	7	20.32	58,33	7	21.47	1,78	7	14.91	0,53
8	24.60	4,88	8	22.34	7,61	8	23.31	6,14	8	15.88	2,40
9	26.96	5,48	9	22.73	2,97	9	23.94	1,62	9	20.33	12,23
10	34.60	1,49	10	24.68	11,43	10	24.76	5,46	10	21.50	0,56
11	35.61	2,05	11	27.47	7,41	11	26.89	1,09	11	22.31	12,30
			12	30.40	3,19	12	27.69	1,28	12	22.66	12,78
			13	38.61	3,06	13	31.14	1,18	13	24.69	10,40
									14	26.85	10,15
									15	27.55	4,73
									16	28.39	1,11
									17	37.03	2,08

Leyenda: Tr: tiempo de retención; Ar: área relativa

- Rutina
- Quercetina
- Kaempferol

Estos resultados sugirieron la presencia en los extractos de un elevado número de compuestos de esta naturaleza, aunque hubiera sido conveniente utilizar otros patrones de flavonoides y de ácidos fenólicos para identificar picos de buena abundancia relativa. Un análisis por HPLC acoplado a masas o el empleo de HPLC preparativo o semipreparativo con posterior análisis espectroscópico de los compuestos aislados, permitirían sugerir un determinado grupo de compuesto o propuesta estructural, lo cual no fue posible por su disponibilidad.

También se pudo constatar que los mayores porcentajes de áreas relativas de los flavonoides en conjunto (los ensayados) y de la rutina en particular correspondieron a las colectas de Agosto/07 y Marzo/07 y los menores a Enero/08, estos resultados están en concordancia con los obtenidos en la determinación cuantitativa de fenoles totales y análisis cuantitativo de rutina bajo otras circunstancias cromatográficas, ya comentadas en un acápite anterior, pudiendo proponer a dicho metabolito como el marcador químico de estos extractos bajo las condiciones ensayadas.

IV.4.2. FRACCIONAMIENTO EN COLUMNA CROMATOGRÁFICA

Este estudio se llevó a cabo solamente en los extractos metanólicos teniendo en cuenta antecedentes biológicos con extractos polares de la planta, considerando además, la presencia en los mismos, de compuestos fenólicos como los flavonoides, quienes tienen referidos varias propiedades farmacológicas, y de alguna manera poder aislar los mismos para su posterior evaluación biológica, algo que no ha sido referido anteriormente para la planta. Como se señaló anteriormente se trabajó con las muestras de Agosto/07 y Enero/08.

El extracto metanólico (15g) correspondiente a la muestra de Agosto/07 fue sometido a un fraccionamiento en columna, se colectaron 100 eluatos de 150mL, utilizando las combinaciones de fases móviles que se muestran en la tabla XXIX. Las fracciones eluidas con Hexano: AcOEt (10:90) y AcOEt fueron reunidas por su similitud cromatográfica y una vez concentradas (F_{13-30}) fueron sometidas a CC, rindiendo un total de 85 subfracciones de 50mL cada una según se muestra en la tabla XXX, como resultado del proceso, de las subfracciones eluidas con hexano:AcOEt (30:70)

Tabla XXIX. Fraccionamiento del extracto metanólico de la colecta de Agosto/07

Fracciones	Proporción (%)	Fracciones obtenidas
Hexano	100	1-2
Hexano: AcOEt	50:50	3-4
Hexano: AcOEt	40:60	5-7
Hexano: AcOEt	30:70	8-12
Hexano: AcOEt	10:90	13-18
AcOEt	100	19-30
AcOEt: MeOH	90:10	31-45
AcOEt: MeOH	70:30	46-55
AcOEt: MeOH	60:40	56-63
AcOEt: MeOH	50:50	64-72
AcOEt: MeOH	40:60	73-80
AcOEt: MeOH	30:70	81-90
AcOEt: MeOH	10:90	91-95
MeOH	100	96-100

Tabla XXX. Fraccionamiento de F₁₃₋₃₀

Fases móviles	Proporción (%)	Fracciones obtenidas
Hexano	100	1-2
Hexano: AcOEt	80:20	3-4
Hexano: AcOEt	60:40	5-8
Hexano: AcOEt	50:50	9-15
Hexano: AcOEt	40:60	16-23
Hexano: AcOEt	30:70	24-33
Hexano: AcOEt	20:80	34-41
AcOEt	100	42-48
AcOEt: MeOH	80:20	49-53
AcOEt: MeOH	70:30	54-60
AcOEt: MeOH	60:40	61-67
AcOEt: MeOH	50:50	68-72
AcOEt: MeOH	40:60	73-76
AcOEt: MeOH	20:80	77-80
MeOH	100	81-85

precipitó un sólido de color amarillo claro (**1**) el cual una vez purificado, rindió 12, 8 mg aproximadamente.

Las fracciones 31-55 obtenidas del fraccionamiento inicial del extracto metanólico (tabla XXIX) fueron reunidas considerando su similitud cromatográfica y al concentrarlas precipitó un sólido amarillo intenso (**2**), el mismo se obtuvo por filtración y se purificó con hexano: AcOEt para rendir 800mg, el resto de la fracción (F₃₁₋₅₅) se pasó por CC, rindiendo un total de 64 subfracciones de 50mL cada una según se muestra en la tabla XXXI, pudiendo aislar 53,8mg de otro sólido de color amarillo (**3**) de las subfracciones eluidas con AcOEt (29-38).

El fraccionamiento en columna del extracto metanólico (15g) de la colecta de Enero/08 ofreció 104 fracciones de 150mL aproximadamente, empleando las combinaciones de fases móviles que se muestran en la tabla XXXII. Las fracciones de la 33-60 fueron reunidas por su semejanza cromatográfica y al concentrarlas precipitó un sólido coposo de color amarillo intenso (**4**), que una vez purificado rindió 300mg, al resto de la fracción (F₃₅₋₆₀) se le realizó CC, se obtuvieron 60 fracciones de 50mL cada una (tabla XXXIII); de las subfracciones de la 13-22 se logró el aislamiento de 9,6mg de un sólido de color amarillo claro (**5**) y de la subfracción 28-39 precipitó otro sólido (**6**) de color amarillo, el cual después de purificado brindó 36,4mg.

Al hacer un análisis del comportamiento cromatográfico de todas las subfracciones obtenidas en el proceso de separación en columna, se pudo constatar que muchas de ellas presentaban gran complejidad, observándose manchas alargadas con tonalidades que oscilaban desde el amarillo parduzco claro hasta el rojizo, quedando una de ellas retenidas en el punto de aplicación, algo característico de compuestos muy polares. Lo notorio en este estudio fue la presencia de manchas de color amarillo bien definidas, las cuales manifestaron un comportamiento típico de flavonoides al someter las cromatoplasmas a los vapores de amoníaco, solución metanólica de tricloruro de aluminio y luz UV, lo cual está en plena correspondencia con la mayoría de los compuestos aislados, permitiendo comprobar según el comportamiento que los compuestos **1** y **4** corresponden al mismo producto al igual que **3** y **6**.

Tabla XXXI. Fraccionamiento en CC de F₃₁₋₅₅

Fases móviles	Proporción (%)	Fracciones obtenidas
Hexano	100	1-2
Hexano: AcOEt	80:20	3-4
Hexano: AcOEt	60:40	5-8
Hexano: AcOEt	50:50	9-11
Hexano: AcOEt	40:60	12-23
Hexano: AcOEt	20:80	24-28
AcOEt	100	29-38
AcOEt: MeOH	80:20	39-43
AcOEt: MeOH	60:40	44-48
AcOEt: MeOH	50:50	49-52
AcOEt: MeOH	40:60	53-57
AcOEt: MeOH	20:80	58-60
MeOH	100	61-64

Tabla XXXII. Fraccionamiento del extracto metanólico de la colecta de Enero/08

Fracciones	Proporción (%)	Fracciones obtenidas
Hexano	100	1-2
Hexano: AcOEt	50:50	3-5
Hexano: AcOEt	40:60	6-10
Hexano: AcOEt	30:70	11-16
Hexano: AcOEt	10:90	17-25
AcOEt	100	26-32
AcOEt: MeOH	90:10	33-46
AcOEt: MeOH	70:30	47-60
AcOEt: MeOH	60:40	61-72
AcOEt: MeOH	50:50	73-81
AcOEt: MeOH	40:60	82-90
AcOEt: MeOH	30:70	91-96
AcOEt: MeOH	10:90	97-100
MeOH	100	101-104

Tabla XXXIII. Fraccionamiento del F₃₅₋₆₀

Fracciones	Proporción (%)	Fracciones obtenidas
Hexano	100	1-2
Hexano: AcOEt	80:20	3-5
Hexano: AcOEt	60:40	6-8
Hexano: AcOEt	50:50	9-12
Hexano: AcOEt	40:60	13-22
Hexano: AcOEt	20:80	23-27
AcOEt	100	28-34
AcOEt: MeOH	80:20	35-39
AcOEt: MeOH	60:40	40-43
AcOEt: MeOH	50:50	44-48
AcOEt: MeOH	40:60	49-53
AcOEt: MeOH	20:80	54-57
AcOEt: MeOH	100	58-60

IV.4.3. REACCIÓN DE ACETILACIÓN

Con el propósito de mejorar la solubilidad de los extractos metanólicos en disolventes menos polares y poder obtener algún compuesto con mejores propiedades desde el punto de vista biológico, se llevó a cabo una reacción de acetilación.

El extracto acetilado de la colecta de Agosto/07 fue sometido a fraccionamiento en columna, colectándose 160 fracciones de 25mL cada una (tabla XXXIV), las fracciones 40-61 eluidas con hexano: AcOEt (60:40) al presentar poca complejidad cromatográfica y similitud entre ellas fueron reunidas y concentradas, posteriormente se llevó a cabo un proceso de cristalización sucesiva y como resultado se obtuvieron 27,5mg de un sólido cristalino de color crema amarillento (**7**). Paralelamente a ello, de las fracciones de la 98-109 eluidas con hexano: AcOEt (10:90) se aislaron 33,2mg de un producto cristalino amarillo claro (**8**).

La separación en columna del extracto metanólico acetilado de la muestra de Enero/08 permitió colectar 150 fracciones de 25mL cada una según se muestra en la tabla XXXV. Se logró aislar de las fracciones 13-32 eluidas con hexano: AcOEt (70:30) 15,3mg de un sólido cristalino crema amarillento (**9**). De las fracciones 89-93 y 94-100 eluidas con hexano: AcOEt (10:90) y AcOEt respectivamente una vez reunidas, precipitaron cristales de color amarillo claro, los cuales fueron purificados por varias cristalizaciones para rendir finalmente una cantidad de 29,5mg (**10**).

El comportamiento cromatográfico de los cuatro compuestos aislados permitió sugerir que **7** y **9**, así como **8** y **10** corresponden al mismo compuesto.

IV.5. ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

La caracterización de los compuestos aislados se realizó sobre la base de sus constantes físicas (punto de fusión) y espectroscópicas (IR, RMN-¹H, RMN-¹³C, experimento DEPT).

Tabla XXXIV. Fraccionamiento del extracto metanólico acetilado de la colecta de Agosto/07

Fases móviles	Proporción (%)	Fracciones obtenidas
Hexano	100	1-2
Hexano: AcOEt	90:10	3-4
Hexano: AcOEt	80:20	5-10
Hexano: AcOEt	70:30	11-39
Hexano: AcOEt	60:40	40-61
Hexano: AcOEt	50:50	62-70
Hexano: AcOEt	40:60	71-80
Hexano: AcOEt	30':70	81-86
Hexano: AcOEt	20:80	87-97
Hexano: AcOEt	10:90	98-109
AcOEt	100	110-120
AcoEt: MeOH	80:20	121-131
AcoEt: MeOH	70:30	132-140
AcoEt: MeOH	60:40	141-148
AcoEt: MeOH	50:50	149-153
AcoEt: MeOH	30:70	154-157
MeOH	100	158-160

Tabla XXXV. Fraccionamiento del extracto metanólico acetilado de la colecta de Enero/08

Fases móviles	Proporción (%)	Fracciones obtenidas
Hexano	100	1-3
Hexano: AcOEt	90:10	4-6
Hexano: AcOEt	80:20	7-12
Hexano: AcOEt	70:30	13-32
Hexano: AcOEt	60:40	33-59
Hexano: AcOEt	50:50	60-71
Hexano: AcOEt	40:60	72-78
Hexano: AcOEt	30':70	79-83
Hexano: AcOEt	20:80	84-88
Hexano: AcOEt	10:90	89-93
AcOEt	100	94-100
AcOEt: MeOH	80:20	101-106
AcOEt: MeOH	70:30	107-120
AcOEt: MeOH	60:40	121-130
AcOEt: MeOH	50:50	131-139
AcOEt: MeOH	30:70	140-146
MeOH	100	147-150

IV. 5. 1. Compuesto 1

El compuesto **1** resultó ser el flavonoide apigenina según los resultados obtenidos y su comparación con los datos referidos en la literatura (Jay y Francois, 1974; Van Loo y De Bruyn, 1986; Fathiazad y cols., 2006), el mismo no es común encontrarlo en especies de *Phyllanthus*, solo se ha reportado su presencia en forma de glicósido, como apigenin-7-O-(6''-butiril- β -glucopiranósido) en *P. emblica* (Calixto y cols., 1998; Zhang y cols., 2002; Habib y cols., 2007; El-Desourky y cols., 2008).

Es un sólido amarillo, soluble en etanol, metanol, dimetilsulfóxido, poco soluble en agua e insoluble en cloroformo y presentó una fusión inmediata entre los 344-345⁰C, en correspondencia con el valor (345⁰C) reportado por Berashvili y cols. (2005).

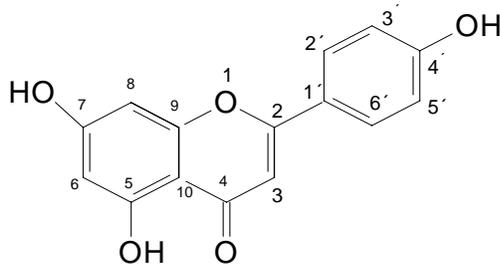
El espectro IR (Anexo 11) mostró bandas características de flavonoides (Lock, 1988), por ejemplo, absorciones a 3283,20cm⁻¹ indicativa de OH fenólicos, bandas estrechas a 1655,94, 1610,10, 1555,65cm⁻¹ propia de enlaces C=C aromáticos, entre otras (Berashvili y cols., 2005).

El espectro RMN-¹H (Anexo 12) reflejó dobletes a 6,91 y 7,90ppm, los cuales integran para dos protones cada uno y los mismos derivan del sistema de espines AA'XX' formado por los protones de las posiciones 2', 3', 5' y 6' del anillo B del compuesto, también se evidencian dobletes en 6,18 y 6,46ppm los cuales son asignados a los protones de las posiciones 6 y 8 respectivamente del anillo A, se muestra un singlete a 6,75ppm relacionado con el protón de la posición 3 y singletes a 12,93, 10,65 y 10,40ppm adjudicables a los protones hidroxílicos de las posiciones 5, 7 y 4'.

Por su parte el espectro RMN-¹³C (Anexo 13) reflejó señales para 15 carbonos donde las que están a 115,9ppm corresponden a los carbonos de las posiciones 3', 5' y la de 128,4ppm a las posiciones 2', 6', los otros desplazamientos químicos presentados son atribuibles a los 11 carbonos restantes. El experimento DEPT (Anexo 14) muestra las señales correspondientes a los grupos CH de las posiciones 3, 6, 8, 2', 3', 5' y 6'. En la tabla XXXVI se presentan las asignaciones para RMN-¹H y ¹³C del compuesto.

Tabla XXXVI. Señales obtenidas en los espectros RMN ¹H y ¹³C para el compuesto 1 y la Apigenina

Posición	Compuesto 1		Apigenina*	
	δ (ppm) ¹ H	δ (ppm) ¹³ C	δ (ppm) ¹ H	δ (ppm) ¹³ C
2		162,2		165,0
3	6,75 s 1H	102,8	6,8s 1H	103,7
4		181,6		182,0
5	12,93s 1H (OH)	157,2	12,94s 1H (OH)	158,2
6	6,18d 1H (J=3,0 Hz)	98,8	6,21d (J=2,1Hz)	99,7
7	10,65s 1H (OH)	164,2	10,80s 1H (OH)	164,6
8	6,46d 1H (J=3Hz)	93,9	6,50d 1H (J=2,1Hz)	94,8
9		163,7		162,3
10		103,3		104,6
1´		121,1		122,0
2´	7,90d 1H (J=8,5 Hz)	128,4	7,95d 1H (J=8,8 Hz)	129,4
3´	6,91d 1H (J=8,5 Hz)	115,9	6,94d 1H (J=8,8 Hz)	116,8
4´	10,40s 1H (OH)	161,4	10,39s 1H (OH)	162,0
5´	6,91d 1 H (J=8,5 Hz)	115,9	6,94d 1H (J=8,8 Hz)	116,8
6´	7,90d 1H (J=8,5 Hz)	128,4	7,95d 1H (J=8,8 Hz)	129,4



Compuesto 1. Disolvente: DMSO-D₆, RMN-¹H (300MHz), RMN-¹³C (75MHz)
 *Fathiazad y cols., 2006. Disolvente: DMSO-D₆, RMN-¹H (200MHz), RMN-¹³C (50MHz)

IV.5.2. Compuestos 2 y 4

El análisis de **2** y **4** con los informes reportados en la literatura (Mabry y cols., 1964; Markham, 1989; Fathiazad y cols., 2006) permitió determinar que correspondían al flavonoide rutina, el cual ya ha sido aislado de muchas especies de *Phyllanthus* como, *P. amarus*, *P. emblica*, *P. niruri*, *P. sellowianus*, *P. urinaria* (Calixto y cols., 1998), *P. matsumurae* (Chen y Ren, 1997), *P. reticulatus* (Lam y cols., 2007), entre otras.

El compuesto se presentó como un sólido granular de color amarillo intenso, soluble en metanol y etanol, parcialmente soluble en agua e insoluble en cloroformo. El punto de fusión estuvo comprendido entre 190 y 192⁰C en correspondencia con lo planteado por Zapesochnaya y Ban'kovskii (1966).

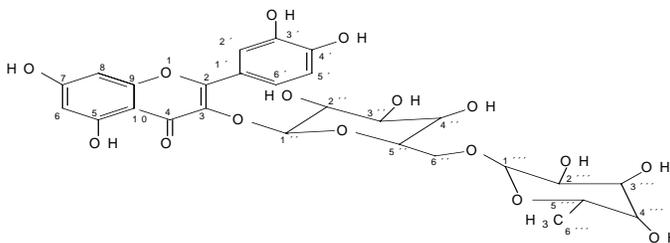
El espectro IR (Anexo 15) mostró una banda ancha a 3425,01cm⁻¹ característico de agrupamientos fenólicos, se observa una banda estrecha a 1654,7cm⁻¹ relacionada con la presencia de grupos carbonilos, otras absorciones entre 1602,53 y 1504,64cm⁻¹ son atribuibles a los agrupamientos aromáticos (Lock, 1988).

Al analizar el espectro RMN- ¹H (Anexo 16) se observaron dobletes a 6,21, 6,40, 6,86 y 7,72ppm relacionados con los protones aromáticos de las posiciones 6, 8, 5' y 2' de la estructura, un doblete de doblete a 7,68ppm correspondientes al protón aromático de la posición 6' del anillo B, varias señales entre 3,25 y 3,82ppm características de los protones de los azúcares, un doblete a 1,12ppm propio del grupo metilo de la ramnosa y dobletes a 5,11ppm y 4,52ppm asociados con los protones anoméricos de la glucosa y ramnosa respectivamente.

En el espectro RMN-¹³C (Anexo 17) se evidenciaron señales para 27 átomos de carbono y el experimento DEPT (Anexo 18) mostró la presencia de un agrupamiento CH₃ a los 17,88ppm característico de la ramnosa y un núcleo de carbono en fase negativa a 68,5ppm correspondiente al C-6 de la función CH₂OH de la glucosa. Las asignaciones de los protones y carbonos del análisis por RMN se reflejan en la tabla XXXVII.

Tabla XXXVII. Señales obtenidas en los espectros RMN ¹H y ¹³C para los compuestos 2, 4 y la Rutina

Posición	Compuestos 2 y 4		Rutina*	
	δ (ppm) ¹ H	δ (ppm) ¹³ C	δ (ppm) ¹ H	δ (ppm) ¹³ C
2		159,3		157,0
3		135,6		134,1
4		179,4		178,2
5		158,5		157,5
6	6,21d 1H (J= 2Hz)	99,9	6,21d 1H(J= 2Hz)	99,5
7		165,9		164,9
8	6,40d 1H (J= 2Hz)	94,8	6,40d 1H (J= 2Hz)	94,5
9		162,9		162,1
10		105,6		104,8
1'		123,5		122,5
2'	7,72d 1H (J= 2Hz)	116,0	7,55d 1H(J= 2,1Hz)	116,1
3'		145,8		145,6
4'		149,7		149,3
5'	6,86d 1H (J=8,5Hz)	117,7	6,86d 1H (J=9,0Hz)	117,1
6'	7,68dd 1H (J=8,5; 2Hz)	123,1	7,56dd 1H (J=9,0; 2,1Hz)	122,0
Glu-1''	5,11d 1H (J=8Hz)	102,4	5,35d 1H (J=7,4Hz)	101,6
Glu-2''		75,7		74,9
Glu-3''		78,2		77,3
Glu-4''		73,9		72,7
Glu-5''		77,2		76,7
Glu-6''	3,81d 2H (J=1,5Hz)	68,5	3,70d (J=2,0Hz)	67,9
Ram-1'''	4,52d 1H (J=1,5Hz)	104,7	4,38d(J=2,0Hz)	102,2
Ram-2'''		71,4		70,8
Ram-3'''		72,1		71,2
Ram-4'''		72,2		71,4
Ram-5'''		69,7		69,1
Ram-6'''	1,12d 3H (CH ₃) J=6,0Hz)	17,8	1,00d 3H(CH ₃) (J=6,1Hz)	18,6



Compuestos 2 y 4. Disolvente: CD₃OD, RMN-¹H (500MHz), RMN-¹³C (125,7MHz)

*Fathiazad y cols., 2006. Disolvente DMSO-D₆, RMN-¹H (200MHz), RMN-¹³C (50MHz)

IV.5.3. Compuestos 3 y 6

Los compuestos **3** y **6** fueron identificados como quercetina, también muy abundante en la naturaleza y en muchas especies de *Phyllanthus* tales como *P. anisobulos*, *P. niruri*, *P. urinaria*, *P. sellowianus* (Calixto y cols., 1998), *P. caroliniensis* (Cechinel y cols, 1996), *P. matsumurae* (Chen y Ren, 1997). La asignación de la estructura se efectuó por la comparación de los datos físicos y espectroscópicos con los reportados en la literatura para este compuesto (Buitriago y Morales, 2001; Fathiazad y cols., 2006; Xiao y cols., 2006; Dutta y cols., 2007). El mismo es un sólido de color amarillo, soluble en metanol, etanol, parcialmente soluble en agua e insoluble en cloroformo. El punto de fusión estuvo entre 308 y 309⁰C, en correspondencia con (309-311⁰C) lo planteado por Dutta y cols. (2007).

El espectro IR (Anexo 19) mostró bandas a 3375,46 y 2922,25cm⁻¹ características de anillos aromáticos, absorciones a 1612,66 y 1429,58cm⁻¹ indicativa de estructura quinoidea y enlaces -C=C-, así como una banda a 1360,02cm⁻¹ relacionadas con la existencia de grupos hidroxilos (Lock, 1988; Dutta y cols, 2007).

El espectro RMN-¹H (Anexo 20) permitió observar dobletes a 6,17; 6,39; 6,87; 7,66ppm relacionados con los protones de las posiciones 6, 8, 5', 2' de los anillos A y B, un doblete de doblete a 7,52ppm que integra para el protón de la posición 6'. También se evidenciaron 5 singletes entre 9,24 y 12,46ppm en correspondencia con los protones hidroxílicos de las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' de la estructura.

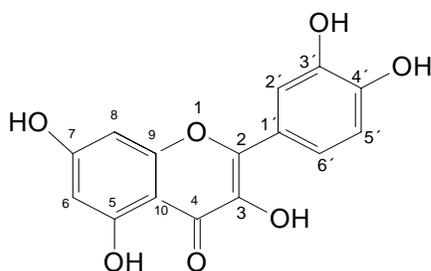
El espectro RMN-¹³C (Anexo 21) mostró señales para 15 carbonos entre 93,2 y 175,7ppm y el experimento DEPT (Anexo 22) reflejó la presencia de los agrupamientos CH típicos del compuesto. En la tabla XXXVIII se recogen los resultados del análisis por RMN.

IV.5.4. Compuesto 5

El compuesto **5** fue identificado como kaempferol según el análisis de sus datos físicos y espectroscópicos y su comparación con los reportados en la literatura (Markham, 1977; Pastene y cols., 2001; Xiao y cols., 2006), es un flavonoide también

Tabla XXXVIII. Señales obtenidas en los espectros RMN ^1H y ^{13}C para los compuestos 3,6 y la Quercetina

Posición	Compuestos 3 y 6		Quercetina*	
	δ (ppm) ^1H	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H	δ (ppm) ^{13}C
2		146,7		147,6
3	9,53s 1H (OH)	135,6	9,63s 1H (OH)	136,6
4		175,7		176,7
5	12,46s 1H (OH)	156,0	12,52s 1H (OH)	157,0
6	6,17d 1H (J=3,5Hz)	98,1	6,20d 1H (J=2,0Hz)	99,0
7	10,72s 1H (OH)	163,8	10,82s	164,7
8	6,39d 1H (J=3,0Hz)	93,2	6,42d 1H (J=2,0Hz)	94,2
9		160,6		161,6
10		102,9		103,9
1'		121,8		122,8
2'	7,66d 1H (J=3,5Hz)	115,5	7,69d 1H (J=2,2Hz)	116,5
3'	9,24s 1H (OH)	144,9	9,35s 1H (OH)	145,9
4'	9,29s 1H (OH)	147,6	9,41s 1H (OH)	148,6
5'	6,87d 1H (J=8,0Hz))	115,0	6,90d 1H (J=8,5Hz)	115,9
6'	7,52dd 1H (J=8,0; 3,5Hz)	119,9	7,56dd 1H (J=8,5; 2,0Hz)	120,8



Compuestos 3 y 6. Disolvente: DMSO- D_6 , RMN- ^1H (300MHz), RMN- ^{13}C (75MHz)
 *Fathiazad y cols., 2006. Disolvente DMSO- D_6 , RMN- ^1H (200MHz), RMN- ^{13}C (50MHz)

abundante en la naturaleza y en algunas especies de *Phyllanthus* como *P. acidus* (Sousa y cols., 2007), *P. urinaria* (Calixto y cols., 1998; Xu y cols., 2007). Resultó ser un sólido algo cristalino de color amarillo, soluble en metanol, etanol, dimetilsulfóxido, parcialmente soluble en agua e insoluble en cloroformo y mostró un punto de fusión de 279 a 280°C en concordancia con lo planteado por Xiao y cols. (2006).

El espectro RMN-¹H (Anexo 23) evidenció dos dobletes que integran para dos protones cada uno, o sea, una señal a 8,03ppm (posiciones 2', 6') y otra a 6,91ppm (3', 5') relacionado con el sistema de espines AA'XX' del anillo B, así como dos dobletes a 6,16 y 6,40ppm asignables a los protones de las posiciones 6 y 8 del anillo A de la estructura. Se apreciaron singletes a 9,98 y 12,44ppm correspondientes a los protones hidroxílicos de las posiciones 3 y 5 (tabla XXXIX).

Por su parte el espectro RMN-¹³C (Anexo 24) reflejó señales adjudicables a 15 carbonos, donde las que aparecen a 115,3 y 129,4ppm corresponden a dos carbonos cada una, la primera a los ubicados en las posiciones 3', 5' y la segunda a 2', 6', las otras señales pertenecen a los 11 carbonos restantes. El experimento DEPT (Anexo 25) permitió observar los CH de las posiciones 6, 8 del anillo A y los situados en 2', 3', 5', 6' del anillo B.

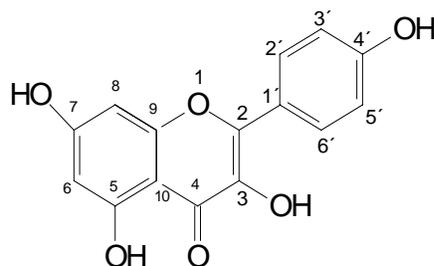
IV.5.5. Compuestos 7 y 9

La interpretación de los resultados obtenidos para los compuestos **7** y **9** y su comparación con los datos físicos y espectroscópicos brindados por la literatura (Rao y cols., 2002; Peña y cols., 2009) permitió sugerirlos como quercetina pentaacetilada. Este compuesto es un sólido cristalino de color crema amarillento soluble en metanol, etanol, cloroformo, acetato de etilo e insoluble en agua; el punto de fusión estuvo comprendido entre 178 y 179°C.

El espectro IR (Anexo 26) mostró bandas típicas de un flavonoide acetilado (Rao y cols., 2002), o sea, una absorción a 1776,3cm⁻¹ que sugiere la naturaleza acetilada del compuesto, una banda a 1646,5cm⁻¹ relacionada con la presencia de grupo carbonilo y otras entre 1624,2 y 1502,8cm⁻¹ en correspondencia con agrupamientos aromáticos (Lock, 1988).

Tabla XXXIX. Señales obtenidas en los espectros RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto 5 y el Kaempferol

Posición	Compuesto 5		Kaempferol*	
	δ (ppm) ^1H	δ (ppm) ^{13}C	δ (ppm) ^1H	δ (ppm) ^{13}C
2		146,6		146,9
3	9,98s 1H (OH)	135,5		136,5
4		175,8		176,5
5	12,44s 1H (OH)	156,1	12,65s 1H (OH)	157,7
6	6,16d 1H (J=3,5Hz)	98,2	6,27d 1H (J=2,0Hz)	98,9
7		164,1		165,0
8	6,40d 1H (J=3,0Hz)	93,4	6,54d 1H (J=2,0Hz)	94,3
9		159,1		160,1
10		102,8		103,9
1'		121,6		123,1
2'	8,03d 1H (J=7,5Hz)	129,4	8,16d 1H (J=8,8Hz)	130,3
3'	6,91d 1H (J=7,5Hz)	115,3	7,03d 1H (J=8,8Hz)	116,1
4'		160,9		161,9
5'	6,91d 1H (J=7,5Hz)	115,3	7,03d 1H (J=8,8Hz)	116,1
6'	8,03d 1H (J=7,5Hz)	129,4	8,16d 1H (J=8,8Hz)	130,3



Compuesto 5. Disolvente: DMSO- D_6 , RMN- ^1H (300MHz), RMN- ^{13}C (75MHz)
 *Xiao y cols., 2006. Disolvente: CD_3COCD_3 , RMN- ^1H (400MHz), RMN- ^{13}C (400MHz)

El espectro RMN-¹H (Anexo 27) mostró varios singletes entre 2,32 y 2,42ppm asociados a los grupos acetatos (CH₃COO) de la estructura, dobletes a 6,87; 7,33; 7,73ppm relacionados con los protones aromáticos de las posiciones 6, 8 y 2' respectivamente, así como un doblete de doblete a 7,69ppm adjudicado al protón de la posición 6' del anillo B y un doblete a 7,36ppm atribuible a la posición 5'.

El espectro RMN-¹³C (Anexo 28) también evidenció señales propias de un flavonoide acetilado (Lock, 1988; Markham, 1989); se observaron señales entre 20,47 y 21,69ppm relacionadas con los grupos CH₃ de los grupos de acetato, otras entre 167,71 y 169,22ppm asociadas a los carbonilos de los acetatos. El experimento DEPT (Anexo 29) manifestó señales asociadas a los grupos metilos del acetato y a los CH de la estructura. En la tabla XL se recogen las asignaciones de protones y carbonos obtenidas para el compuesto.

IV.5.6. Compuestos 8 y 10

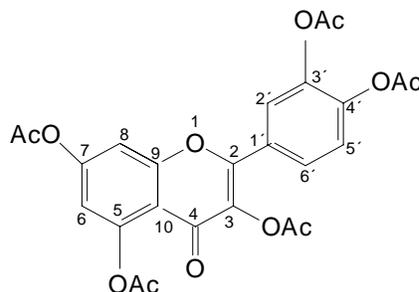
El análisis de los datos espectroscópicos de **8** y **10** comparados con los expuestos en la literatura (Lock, 1988; Markham, 1989) permitió sugerir su identificación como rutina decaacetilada, la misma se presentó como un sólido cristalino amarillo claro, soluble en metanol, etanol, cloroformo y acetato de etilo e insoluble en agua. Su punto de fusión estuvo comprendido entre 120 y 123⁰C.

El espectro IR (Anexo 30) mostró una banda de absorción a 1754,39cm⁻¹ relacionada con la presencia de grupos acetatos, una banda a 1632,15cm⁻¹ asociada a la presencia de grupo carbonilo y otra a 1503,99cm⁻¹ atribuible a agrupamientos aromáticos (Lock, 1988).

El espectro RMN-¹H (Anexo 31) reflejó varios singletes en la zona comprendida entre 1,93 y 2,43ppm asociados con los protones del agrupamiento CH₃COO del compuesto, un doblete a 1,06ppm en correspondencia con el grupo metilo de la ramnosa, un doblete a 3,78ppm relacionado con los dos protones del grupo CH₂ de la glucosa, dobletes a 4,51 y 5,43ppm adjudicables a los protones anoméricos de la ramnosa y glucosa respectivamente (Mabry y cols., 1964; Drake y Brown, 1977). También se observaron dobletes a 6,83; 7,30; 7,34; 7,95ppm relacionados con los

Tabla XL. Señales obtenidas en los espectros RMN ¹H y ¹³C para los compuestos 7,9 y la Quercetina pentaacetilada

Posición	Compuesto 7 y 9		Quercetina pentaacetilada *, **	
	δ (ppm) ¹ H	δ (ppm) ¹³ C	δ (ppm) ¹ H *	δ (ppm) ¹³ C*,**
2		153,82		153,8
3		134,1		134,1
4		169,23		169,3
5		170,05		170,0
6	6,87d 1H (J=3,5Hz)	113,8	6,86d 1H (J=2,0Hz)	114,2
7		154,3		154,3
8	7,33d 1H (J=3,5Hz)	108,9	7,24d 1H (J=2,5Hz)	109,0
9		156,89		156,9
10		114,78		114,8
1'		127,7		127,8
2'	7,73d 1H (J=3,5Hz)	126,35	8,12d 1H (J=2,0Hz)	126,5
3'		142,23		142,3
4'		144,40		144,4
5'	7,36d 1H (J=3,0Hz)	123,8	7,38d 1H (J=2,0Hz)	123,9
6'	7,69dd 1H (J=9,0; 2,5Hz)	126,41	7,71dd 1H (J=8,5; 2,0Hz)	126,7
	2,42s ; 2,41s; 2,34s; 2,33s; 2,32s (3H de CH ₃ COO)	167,71; 167,75; 167,77; 167,82; 169,22 (5C=O)	2,41; 2,33; 2,32; 2,31; 2,30 (3H de CH ₃ COO)	169,76; 168,35; 168,31; 168,29; 168,23 (5C=O)
		21,69; 21,14; 21,01; 20,63; 20,47 (CH ₃)		21,20; 21,10; 20,70; 20,50; 20,20 (CH ₃)



Compuestos 7 y 9. Disolvente: CDCl₃, RMN-¹H (300MHz), RMN-¹³C (75MHz)

*Rao y cols., 2002. **Peña y cols., 2009. Disolvente: CDCl₃, RMN-¹H (300MHz), RMN-¹³C (100MHz)

protones de las posiciones 6, 8, 5', 2' respectivamente y un doblete de doblete en 7,91ppm asociado al protón de la posición 6 del anillo B de la estructura.

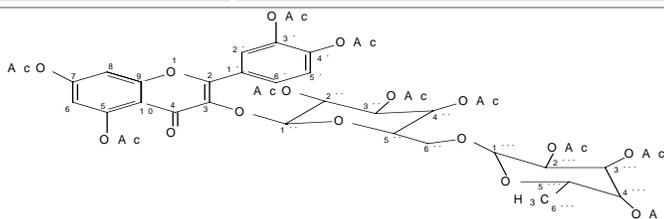
El espectro RMN-¹³C (Anexo 32) mostró una señal a 17,17ppm adjudicable al carbono del grupo metilo de la ramnosa y otra a 66,99ppm propia del CH₂ de la glucosa, se observaron 10 señales entre 20,21 y 21,98ppm relacionadas con los grupos metilos del acetato y otras entre 167,67 y 170,11ppm atribuibles al grupo C=O de los acetatos (Markham, 1989). El experimento DEPT (Anexo 33) reflejó un agrupamiento CH₃ a 17,17ppm característico de la ramnosa y un núcleo de carbono en fase negativa a 66,99ppm correspondiente al C-6 de la función CH₂OH de la glucosa. Se observaron señales entre 20,21 y 21,98ppm en correspondencia con los 10 grupos metilos de los acetatos, y otras señales entre 66,35 y 127,21ppm asociadas a los CH de la estructura. Las asignaciones de los protones y carbonos del análisis por RMN se reflejan en la tabla XLI.

El análisis de los extractos metanólicos por CC permitió el aislamiento de los flavonoides apigenina, rutina, quercetina y kaempferol, tres de los cuales fueron previamente identificados por CLAR, así como de la quercetina pentaacetilada y la rutina decaacetilada, estas últimas obtenidas por un proceso de acetilación del extracto tras su fraccionamiento en columna. En la figura 39 se muestran las estructuras químicas de los compuestos aislados.

Es importante señalar que los estudios fitoquímicos relacionados en la literatura sobre especies del género ***Phyllanthus*** son amplios, los mismos hacen referencia al aislamiento y caracterización de compuestos de polaridad variada, siendo más frecuentes triterpenos (lupeol, lupenona, friedelanos), flavonoides, alcaloides, lignanos, esteroides. Por ejemplo, se pueden citar: norlignanos, taninos hidrolizables de ***P. virgatus***, flavonoides prenilados y terpenos de ***P. niruri***, compuestos fenólicos de ***P. urinaria***, alcaloides de ***P. discordes***, etc. (Yoshida y cols., 1992; Fool, 1993 y 1995; Calixto y cols., 1997; 1998; Yu-Lin y cols., 1998; Amir y cols., 2003; Wang y Lee, 2005; Zhou y cols., 2007; Shakil y cols., 2008).

Tabla XLI. Señales obtenidas en los espectros RMN ¹H y ¹³C de los compuestos 8 y 10

Posición	Compuestos 8 y 10	
	δ (ppm) ¹ H	δ (ppm) ¹³ C
2		153,96
3		136,91
4		171, 92
5		150,18
6	6,83d 1H (J=2,5Hz)	99,56
7		156,61
8	7,30d 1H (J=2,5Hz)	97,77
9		154,63
10		115,08
1´		128,57
2´	7,95d 1H (J=2,5Hz)	123,42
3´		141,79
4´		144,09
5´	7,34d 1H (J=8,5Hz)	124,66
6´	7,91dd 1H (J= 8; 3,5Hz)	127,21
Glu-1´´	5,43d 1H (J=8,0Hz)	102,4
Glu-2´´		71,42
Glu-3´´		72,80
Glu-4´´		70,91
Glu-5´´		72,58
Glu-6´´	3,78d 2H (J=2,0Hz)	66,99
Ram-1´´´	4,51d 1H (J=2,0Hz)	113,40
Ram-2´´´		69,01
Ram-3´´´		69,39
Ram-4´´´		69,54
Ram-5´´´		66,35
Ram-6´´´	1,06d 3H (CH ₃) (J=6,5Hz)	17,17
	1,93; 1,95; 2,02; 2,03; 2,08; 2,13; 2,29; 2,33; 2,34; 2,43 (s,3H, CH ₃)	20,21; 20,28; 20,34; 20,49; 20,63; 20,81; 20,95; 21,04; 21,11; 21,98 (CH ₃) 167,67; 167,81; 168, 00; 168,16; 169,19; 169,54; 169,68; 169,84; 170,04; 170,11 (C=O del grupo CH ₃ COO)



Compuestos 8 y 10. Disolvente: CDCl₃, RMN-¹H (300MHz), RMN-¹³C (75MHz)

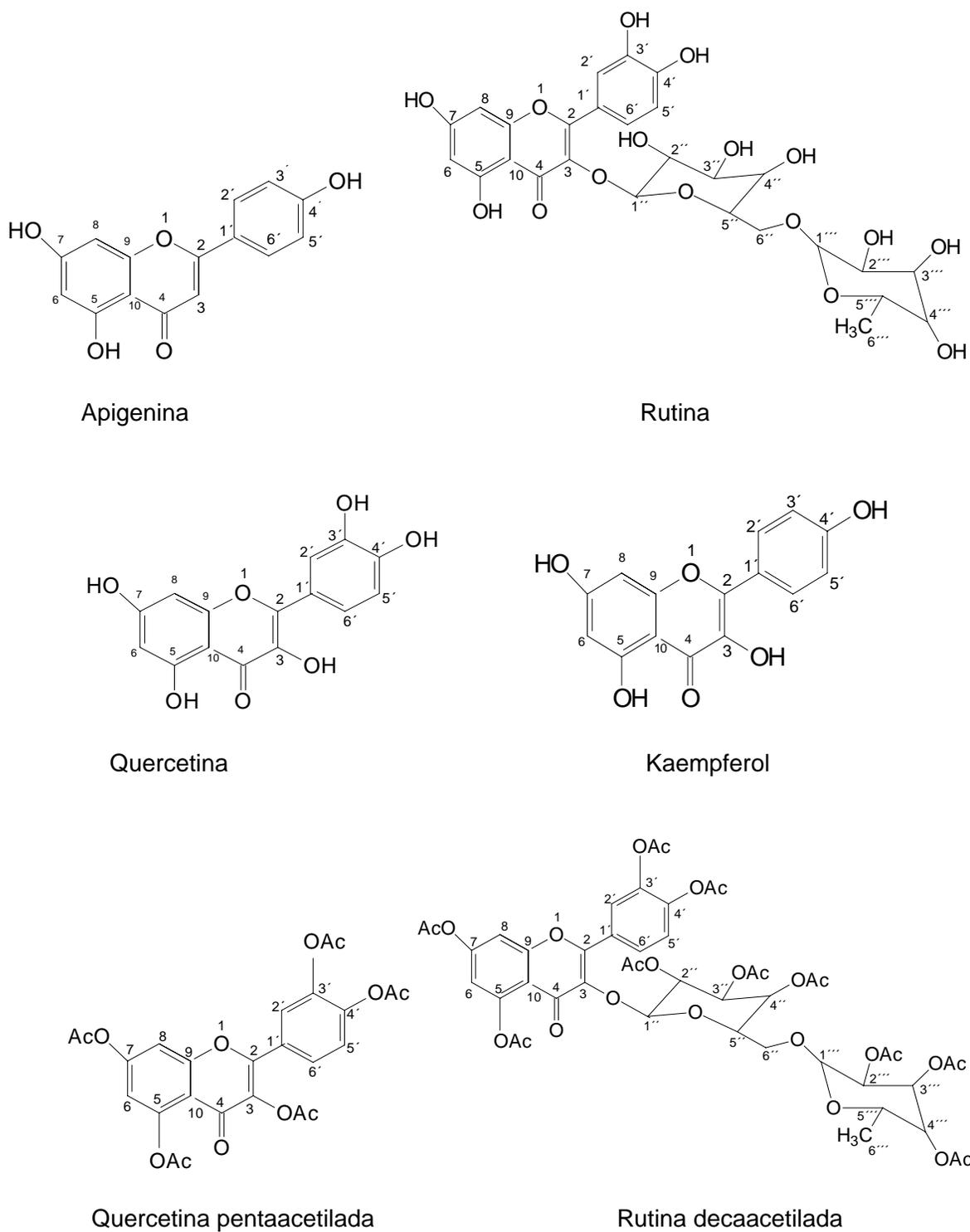


Figura 39. Estructuras químicas de los compuestos aislados de los extractos metanólicos no acetilados y acetilados

En el caso de *P. orbicularis* HBK los reportes encontrados sobre estudios fitoquímicos son muy escasos, por lo tanto, cualquier trabajo encaminado en este sentido brindará aspectos novedosos y contribuirá a ampliar el conocimiento acerca de esta planta endémica cubana. Los resultados alcanzados así lo demuestran, pues todos los compuestos identificados por CG-EM desde los extractos apolares constituyen nuevas referencias para la especie y algunos para el género, y de los metabolitos aislados en los extractos metanólicos, a pesar de ser compuestos conocidos, la apigenina no había sido descrita para la planta.

Atendiendo a los informes de la literatura, debió esperarse la presencia de lignanos, específicamente hipofilantina y filantina los cuales constituyen marcadores del género por estar presentes en varias especies tales como *P. amarus*, *P. fraternus*, *P. niruri*, *P. urinaria*, *P. maderaspatensis*, *P. virgatus*, entre otras. Estos metabolitos han sido detectados en extractos hexánicos obtenidos de hojas y tallos de estas especies, y han manifestado actividad antiepatotóxica, antihiperuricémica, inhibidores de la leucemia K-562 en línea celular y de la reverso transcriptasa del VIH (George y cols., 1982; Ogata y cols., 1992; Calixto y cols., 1998; Leite y cols., 2006; Murugaiyah y cols., 2006).

Los resultados obtenidos hasta el momento bajo las condiciones ensayadas no revelan la presencia de los mismos, lo que no quiere decir que estén ausentes en la especie, pues hubo muchos compuestos que no fueron identificados por la base de datos del equipo, otros pudieron quedarse retenidos en la columna, sugiriéndose además, que dada su baja abundancia no pudieron ser detectados. Ante esta situación se precisa de un estudio más profundo como una dinámica de acumulación de tales compuestos y un análisis de los extractos apolares con pasos previos de derivatización, con vistas a mejorar las características cromatográficas de muchas sustancias (en cuanto a volatilidad, inercia química y propiedades espectrométricas) que no pudieron ser detectadas, así como la hidrólisis de éstas, lo cual posiblemente permitirá detectar glicéridos (a través de ácidos grasos) y ésteres de alto peso molecular (en forma de ácidos y alcoholes grasos).

No obstante, los resultados obtenidos en el estudio fitoquímico de la especie bajo las condiciones ensayadas, y las actividades farmacológicas atribuidas y demostradas, se sugiere que la misma presenta una composición química rica en compuestos de significación biológica en los meses de Marzo y Agosto, donde las concentraciones de fenoles totales, del flavonoide rutina fueron superiores y la abundancia de α -tocoferol, terpenos y fitosteroles, fueron también apreciables, por lo que pudiera recomendarse estos meses como los más propicios para su recolección.

IV.6. CONSIDERACIONES GENERALES DEL ESTUDIO FITOQUÍMICO

Los resultados obtenidos sobre el estudio Fitoquímico de *P. orbicularis* HBK posibilitó arribar a las siguientes consideraciones generales:

1. Se informa por primera vez la composición química de los extractos de baja polaridad de la especie, logrando identificar 51 componentes, siendo nueve de ellos (ciclooctacosano, tocoferoles, γ -sitosterol, α -amirina, blumenol C, vomifoliol, derivado de taraxastanediol, derivado del epi- ψ -taraxastanonol y 6,10,14-trimetil-5,9,13-pentadecatrien-2-ona), nuevos reportes para el género *Phyllanthus*.
2. Se aislaron e identificaron cuatro flavonoides en el extracto polar (apigenina, rutina, quercetina y kaempferol), se informó por primera vez para el género y la especie la apigenina en forma de aglicón.
3. Se realiza por primera vez la acetilación del extracto metanólico de la planta, logrando aislar y caracterizar la quercetina pentaacetilada y la rutina decaacetilada para su posterior estudio biológico.

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EVALUACIONES BIOLÓGICAS



CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. ALGUNAS EVALUACIONES BIOLÓGICAS REALIZADAS A LOS EXTRACTOS Y COMPUESTOS AISLADOS DE *Phyllanthus orbicularis* HBK

V.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Teniendo en cuenta el antecedente que existe sobre las cualidades antioxidantes del extracto acuoso de la especie objeto de estudio (Sánchez y cols., 1999; 2002) se evaluó dicha actividad mediante la determinación del potencial de reducción total (FRAP) y la actividad secuestradora de radicales superóxidos, a otros extractos y flavonoides obtenidos de la planta.

V.1.1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE CON CARÁCTER REDUCTOR

Este ensayo se le realizó a los extractos hexánico, de acetato de etilo, metanólico y metanólico acetilado correspondientes a la colecta de Agosto/07, así como a los flavonoides rutina, quercetina y sus derivados acetilados, donde se determinó por la técnica de FRAP el poder reductor de las mismas a través de la reducción de hierro férrico a ferroso. En la tabla XLII se presentan los resultados del potencial de reducción para cada muestra evaluada.

Como se puede constatar en la tabla, los potenciales de reducción de las muestras evaluadas difieren significativamente de la sustancia de referencia (Vitamina C, reconocido antioxidante) al aplicar ANOVA-1 para un 95% de confianza. El valor encontrado para el extracto metanólico sin acetilar y los obtenidos para los flavonoides rutina y quercetina son superiores a dicho patrón, sin embargo el resto de los extractos, conjuntamente con los derivados acetilados de los flavonoides ensayados arrojaron resultados significativamente inferiores, siendo el extracto hexánico el que manifestó el menor valor de potencial de reducción.

Tabla XLII. Potencial de reducción de extractos y flavonoides aislados de *P. orbicularis* HBK

Muestras (1mg/mL)	Potencial de reducción (μM) \pm S
Vitamina C (sustancia de referencia)	404 \pm 22,10 ^a
EH	43,44 \pm 2,04 ^b
EA	387,10 \pm 10,93 ^c
EM	1067,18 \pm 25,57 ^d
EMAc	103,10 \pm 4,75 ^e
Rutina	467,39 \pm 23,30 ^f
Rutina decaacetilada	82,30 \pm 3,24 ^g
Quercetina	1559,68 \pm 60,05 ^h
Quercetina pentaacetilada	90,35 \pm 4,39 ⁱ

Leyenda: EH: extracto hexánico; EA: extracto de acetato de etilo; EM: extracto metanólico; EMAc: extracto metanólico acetilado
 Letras iguales muestran que no existen diferencias significativas y letras diferentes que si existen diferencias significativas para un 95% de confianza.

Al hacer un análisis de las muestras acetiladas respecto a las no acetiladas se pudo constatar que la reacción de acetilación en este caso no favoreció la actividad antioxidante con carácter reductor, lo cual demuestra una vez más que la existencia de grupos hidroxilos (fundamentalmente en las posiciones 3', 4') en la estructura de los flavonoides evaluados, es indispensable para la actividad (Rafat y cols., 1987; Gusdinar y cols., 2011).

V.1.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SECUESTRADORA DE RADICALES SUPERÓXIDOS

El ensayo se realizó solamente a los extractos hexánico, AcOEt y metanólico de la colecta de Agosto/07. Según se muestra en la tabla XLIII, los extractos de hexano y AcOEt mostraron porcentajes de inhibición de la autoxidación del pirogalol, inferiores a la sustancia de referencia (SOD), sin embargo los mismos estuvieron por encima del 30% lo que indica una moderada actividad antioxidante.

En el caso del extracto metanólico el resultado fue superior, incluso significativamente diferente al obtenido para la SOD, reconocido antioxidante enzimático secuestrador de radicales anión superóxido, por lo que se puede plantear que en el modelo ensayado presenta una elevada actividad.

Entre los componentes químicos presentes en los extractos hexánico y AcOEt se encontraron tocoferoles los cuales según la literatura (Akaike y cols., 2004; Schneider, 2005) presentan propiedades antioxidantes, al parecer, la concentración de los mismos o el microambiente en que se encuentran en estos extractos no fue suficiente para demostrar tal efecto antioxidante por ambas técnicas. Es necesario tener en consideración que la capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de los componentes, los mismos interactúan entre si produciendo efectos sinérgicos o inhibitorios (Prior y Cao, 1999; Robards y cols., 1999; Kuskoski y cols., 2005).

Tabla XLIII. Actividad secuestradora de radicales superóxido de extractos obtenidos de *P. orbicularis* HBK

Muestras	Inhibición de la autoxidación del pirogalol (%)
Blanco	0
Superóxido dismutasa (SOD)	42,3 ± 4,5 ^a
EH	32,73 ± 3,7 ^c
EA	34,85 ± 1,23 ^d
EM	47,74 ± 6,7 ^b

Leyenda: EH: extracto hexánico; EA: extracto de acetato de etilo; EM: extracto metanólico
Letras iguales muestran que no existen diferencias significativas y letras diferentes que si existen diferencias significativas para un 95% de confianza.

En los extractos metanólicos sin acetilar, los resultados alcanzados están en concordancia con la composición planteada, o sea, en ellos están presentes flavonoides como rutina, quercetina, kaempferol y apigenina los cuales se destacan por sus propiedades antioxidantes, pero acetilados pierden la actividad (Rafat y cols., 1987; Gusdinar y cols., 2011).

Es importante destacar que los antecedentes de actividad antioxidante de *P. orbicularis* están referidos solamente al extracto acuoso, donde se demuestra que el mismo es capaz de actuar como agente protector al daño oxidativo producido por aminas aromáticas y el peróxido de hidrógeno en células de *Salmonella thyphimurium* (Ferrer y cols., 2002), por tanto los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen a ampliar el conocimiento acerca de las propiedades antioxidantes de esta especie endémica.

V.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Considerando que algunas especies de *Phyllanthus* como *P. amarus* (Kassuya y cols., 2006), *P. emblica*, *P. flexuosus* (Calixto y cols., 1997; 1998), *P. polyphyllus* (Rao y cols., 2005), *P. niruri* (Santos y cols., 1994), tienen referido efecto antiinflamatorio y teniendo en cuenta que la especie objeto de estudio no contaba con reportes en este sentido, se llevó a cabo un estudio preliminar de dicha actividad. La evaluación se realizó mediante el método de inducción de edema por TPA por vía tópica, para lo cual se ensayaron los extractos hexánico, AcOEt, metanólico, metanólico acetilado, de las muestras colectadas en Agosto/07 y los flavonoides rutina, quercetina, rutina decaacetilada y quercetina pentaacetilada. Los resultados se muestran en la tabla XLIV

De los extractos evaluados, los que presentaron mayor porcentaje de inhibición del edema fueron los hexánico, metanólico y metanólico acetilado con valores de 42,74, 50,00 y 59,80% respectivamente, los cuales difieren significativamente entre si y con los valores alcanzados para la indometacina, utilizada como control positivo. De los flavonoides ensayados, los que manifestaron mayor actividad fueron la quercetina

Tabla XLIV. Actividad antiinflamatoria de extractos y flavonoides aislados de *P. orbicularis* HBK

Muestras	Dosis (mg/oreja)	Inhibición (%)
Indometacina (control positivo)	0,36	78,76 ^a
EH	1	42,74 ^b
EA	1	28,40 ^c
EM	1	50,00 ^d
EMAc	1	59,80 ^e
Rutina	1	24,51 ^f
Rutina decaacetilada	1	64,12 ^g
Quercetina	1	33,73 ^h
Quercetina pentaacetilada	1	66,80 ⁱ

Leyenda: EH: extracto hexánico; EA: extracto de acetato de etilo; EM: extracto metanólico; EMAc: extracto metanólico acetilado
 Letras iguales muestran que no existen diferencias significativas y letras diferentes que si existen diferencias significativas para un 95% de confianza

pentaacetilada y el derivado acetilado de la rutina con porcentajes de 66,80 y 64,12% respectivamente.

Es de notar, como la reacción de acetilación de alguna manera favorece la actividad antiinflamatoria en el caso del extracto metanólico donde el valor se incrementa de 50 a 59,80%, en concordancia con el comportamiento de la rutina y su derivado donde el porcentaje de inhibición aumentó sustancialmente de 24,51 a 64,12%; algo similar ocurrió con la quercetina y la quercetina pentaacetilada (de 33,73 a 66,80%). Estos resultados están en correspondencia con lo planteado por Chen y cols., (2001) y Gusdinar y cols. (2011).

La actividad antiinflamatoria de los extractos metanólicos puede deberse probablemente a la presencia de flavonoides, pues se ha referido que muchos de ellos pueden modular la síntesis de prostaglandinas, funcionando como inhibidores enzimáticos. Unos pueden inhibir la enzima cicloxigenasa (COX), mientras que otros pueden inhibir la enzima lipoxigenasa, como es el caso de la quercetina (Bauman y cols., 1992; González y cols., 2007) presente en dicho extracto. Los flavonoides también pueden manifestar propiedades antiinflamatorias a través de su acción antioxidante (capacidad de captar radicales libres) que les permite actuar contra el daño tisular debido a la formación de radicales libres generados como subproductos de las rutas cicloxigenasa y lipoxigenasa, pudiendo citar entre ellos a la rutina (Hollman y col., 1998; Selloum y cols., 2003; Coskun y cols, 2004).

V.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Dentro de las propiedades farmacológicas demostradas a especies del género *Phyllanthus* también se encuentra la citotoxicidad sobre diferentes líneas celulares de cáncer humano, informadas para *P. amarus* (Sripanidkulchai y cols., 2002; Haricumar y cols., 2009), *P. engleri* (Ratnayake y cols., 2009), *P. urinaria* (Huang y cols., 2009); por otra parte, se ha demostrado que los flavonoides rutina, quercetina, kaempferol y apigenina son considerados como una nueva generación de moléculas anticancerígenas, debido a la dualidad de tener efecto antioxidante y actividad apoptótica de células cancerígenas (Tan y col., 2002; Galati y col., 2004; Kothan y

cols., 2004; Dechsupa y cols., 2007; Jeong, 2009). Teniendo en cuenta estos antecedentes y considerando que la especie no tiene referido estudios en este sentido, se llevó a cabo dicha evaluación a extractos hexánico, AcOEt, metanólico y metanólico acetilado de la colecta de Agosto/07 y a los flavonoides rutina, quercetina y sus derivados acetilados aislados de la planta, mediante el ensayo de sulforrodamina B, utilizando como control positivo la doxorubicina. En la tabla XLV se recogen los resultados del estudio.

Como se puede observar en la tabla, los extractos que mostraron inhibición del crecimiento celular en las líneas de cáncer fueron el hexánico y el metanólico acetilado, el primero fue selectivo hacia la línea de cáncer de mama con un valor mayor del 50% (56,57%), mientras que el segundo fue activo sobre glía del sistema nervioso central, mama y pulmón con porcentajes de 100, 72,48 y 79,00% respectivamente. De los compuestos aislados, el derivado acetilado de la rutina, la quercetina y la quercetina pentaacetilada manifestaron los mayores porcentajes de inhibición, siendo activos sobre todas las líneas de cáncer ensayadas, con valores superiores al 50% y en algunos casos iguales a los del control positivo con un 100% de inhibición celular.

La acetilación del extracto metanólico y de los flavonoides mayoritarios de dicho extracto (rutina y quercetina), favoreció en gran medida la actividad citotóxica, lo cual pudiera atribuirse a la lipofilia de las estructuras que propicia su acumulación en las células, inhibiendo el crecimiento de las mismas.

En estudios efectuados por Choiprasert y cols. (2010) se demostró que la rutina y la quercetina eran activas sobre la línea celular de leucemia (K-562) y que la esterificación de la rutina, incrementaba notablemente la actividad citotóxica. Según los resultados obtenidos se puede señalar que en el caso de la rutina la actividad presentada sobre esta línea celular fue muy pequeña en comparación con los otros compuestos ensayados aunque se logró una cierta inhibición, en concordancia la quercetina si presentó alta actividad (100%). La acetilación de dichos compuestos

Tabla XLV. Resultados de la actividad citotóxica de extractos y flavonoides aislados de *P. orbicularis* HBK

Muestras	% de inhibición del crecimiento por línea celular					
	Líneas celulares					
	U-251	PC-3	K-562	HCT-15	MCF-7	SKUL
Doxorrubicina (control positivo)	100	100	100	100	100	100
EH	20,89	23,27	15,05	24,84	56,57	38,43
EA	23,58	19,00	-	44,33	24,00	31,07
EM	11,18	23,54	S.A	S.A	8,00	3,00
EMAc	100	-	44,54	8,11	72,48	79,00
Rutina	43,80	-	11,20	1,00	33,9	24,97
Rutina decaacetilada	100	89,30	87,00	100	100	100
Quercetina	95,00	62,80	100	71,80	70,90	92,90
Quercetina pentaacetilada	100	60,90	100	100	100	100

Leyenda: EH: extracto hexánico; EA: extracto de acetato de etilo; EM: extracto metanólico; EMAc: extracto metanólico acetilado
S.A: sin actividad; -: no realizado; colon (HCT-15); mama (MCF-7); leucemia (K-562); sistema nervioso central (U-251 Glía); próstata (PC-3) y pulmón (SKUL)

incrementó la citotoxicidad, siendo más notable la diferencia entre la rutina y su derivado acetilado.

No obstante, a los resultados obtenidos, es necesario señalar que con este estudio preliminar solamente se establece una relación cualitativa entre los diferentes compuestos evaluados, pues aunque se logró un efecto inhibitorio, las concentraciones utilizadas fueron elevadas (50mM) en comparación con las concentraciones que se utilizan en la clínica (0,4 a 9 mM), requiriendo de un estudio más profundo para determinar la concentración mínima o la concentración efectiva media a la cual esos productos hacen su efecto.

A pesar de que estos ensayos no determinan la utilización de estas sustancias como agentes anticancerosos en la clínica, son de gran ayuda para descartar que las mismas puedan ser empleadas en terapias contra el cáncer, o bien, para continuar con los estudios necesarios para su posible aplicación en la clínica.

V.4. CONSIDERACIONES GENERALES DEL ESTUDIO BIOLÓGICO

Los resultados obtenidos sobre algunas evaluaciones biológicas preliminares de ***P. orbicularis* HBK** posibilitó arribar a las siguientes consideraciones generales:

1. Se notificó para los extractos metanólicos y los flavonoides aislados, el efecto antioxidante. Se demostró que el extracto metanólico acetilado y los flavonoides acetilados presentan menor efecto antioxidante de carácter reductor, aspecto éste no informado con anterioridad para la especie.
2. Se determinó por primera vez, que los extractos de ***P. orbicularis* HBK**, presentan actividad antiinflamatoria por vía tópica al menos en el modelo de inducción de edema por TPA. De los extractos evaluados los que presentaron mayor porcentaje de inhibición del edema fueron los hexánico, metanólico y metanólico acetilado. De los flavonoides ensayados, los que manifestaron mayor actividad fueron la quercetina pentaacetilada y el derivado acetilado de la rutina.

3. Se estudiaron por primera vez para la especie, de forma preliminar, las propiedades citotóxicas en diferentes líneas de cáncer humano, informadas algunas de ellas para otras especies del género. Los extractos que mostraron inhibición del crecimiento celular fueron el hexánico y el metanólico acetilado, el primero fue selectivo hacia la línea de cáncer de mama, mientras que el segundo fue activo sobre glía del sistema nervioso central, mama y pulmón. De los compuestos aislados, el derivado acetilado de la rutina, la quercetina y la quercetina pentaacetilada manifestaron los mayores porcentajes de inhibición, siendo activos sobre todas las líneas de cáncer ensayadas, con valores superiores al 50% y en algunos casos iguales a los del control positivo con un 100% de inhibición celular.

DISCUSIÓN GENERAL



DISCUSIÓN GENERAL

Los estudios farmacognósticos conllevan a una serie de etapas que son tan amplias en su complejidad, que deben ser abordadas por un colectivo multidisciplinario de investigadores.

Para llevar a cabo estos estudios y en general el de una planta medicinal, diversos autores han planteado rutas críticas de trabajo, para poder seguir un orden lógico en las investigaciones a realizar.

El primer paso es la clasificación taxonómica de la especie, la cual en el caso que nos ocupa, ya se encontraba clasificada y con algunas descripciones macromorfológicas, como lo exigen los estudios botánicos. Sin embargo, carecía de los estudios micromorfológicos indispensables para la norma de control de calidad y la propuesta de monografía farmacopeica.

Al comparar los resultados obtenidos de *P. orbicularis* con los de otras del género *Phyllanthus* de la India, se observaron diferencias notables, fundamentalmente en el tipo de estomas, en la forma y contorno de las células epidérmicas, en la presencia de pelos pluricelulares en la especie cubana y ausentes en las otras, lo que ratifica que los caracteres micromorfológicos distinguen a una especie en particular. No sólo se realizó el estudio de los caracteres microscópicos de las hojas y los tallos, también se dieron las características de la droga en polvo para su correcta caracterización.

La composición química de una planta medicinal, puede estar influenciada por una serie de factores extrínsecos, intrínsecos y tecnológicos que determinan en ocasiones la presencia o ausencia de un metabolito en particular, que puede o no ser parte de los constituyentes de la planta. Es por ello que hay que realizar investigaciones que permitan conocer la influencia de estos factores, los cuales forman parte de los estudios farmacognósticos. En este trabajo, se evaluaron diferentes métodos de secado, el almacenamiento en distintos envases, así como la influencia de los principales parámetros físico-químicos, contenido de fenoles totales y del flavonoide rutina en función de la época de recolección.

Se demostró que no era conveniente secar la planta ni al sol ni a la sombra y que sólo se recomendaba el método de secado artificial para una mejor conservación de la droga. Por otra parte, el material vegetal secado en estufa demostró bajo las condiciones ensayadas (estante a temperatura ambiente), ser estable por un periodo de un año cuando se almacenaba troceado, en latas compuestas, frascos de vidrio y bolsas de polietileno, no recomendándose el almacenamiento en cartuchos de papel kraft, que es una forma muy habitual de almacenar las drogas.

Se demostró que la concentración de fenoles totales estaba en función de la fecha de recolección y que la mayor cantidad de estos metabolitos aparecía durante los meses de Marzo, Mayo y Agosto y era menor en el mes de Enero, lo cual estuvo en concordancia con la concentración de uno de los constituyentes de la planta, el flavonoide rutina, resultado a tener en consideración para una exitosa recolección del material vegetal con fines terapéuticos.

Unido a estos estudios, se establecieron los parámetros físico-químicos de calidad de la droga cruda, los cuales estuvieron dentro de los límites establecidos en normas internacionales para plantas medicinales (Lou-Zhi-cen, 1980; WHO 1998).

Se redactó una propuesta de norma de control de la calidad para entregarse al Ministerio de Salud Pública, donde se recogen las principales especificaciones para la droga cruda de la especie. Para establecer estos parámetros se consideraron los estudios farmacognósticos de varios lotes de material vegetal correspondientes a diferentes épocas de recolección, que incluyen las ya referidas en este trabajo y en otros anteriores, y los límites de tolerancia determinados para cada parámetro analizado.

Importante en esta propuesta de norma el contenido de fenoles totales especificado (mínimo 1%) para lo cual se consideraron los antecedentes de estudios biológicos, específicamente la actividad antiviral contra los virus del herpes simple tipo 1 y 2, donde la droga cruda utilizada para dichos ensayos presentaba un contenido de fenoles promedio del 1%. No obstante sería conveniente en próximos estudios hacer un monitoreo de la concentración de estos metabolitos en las distintas colectas en

función al menos de la actividad antiviral, lo cual no fue objetivo de nuestro trabajo. Es importante señalar que solo se trata de una propuesta de Norma que pudiera estar sujeta a cambios, pero lo referido en ella sienta las bases para la Monografía Farmacopeica de la planta, validando de alguna manera su posible uso como medicinal.

Un aspecto también importante fue el estudio fitoquímico realizado a la especie, aplicándose para esto un método de extracción por maceración empleando una batería de disolventes de polaridad creciente (n-hexano, AcOEt y metanol), para obtener los extractos correspondientes, los cuales fueron caracterizados químicamente en función de la época de recolección.

El análisis de los extractos hexánicos y de acetato de etilo permitió identificar por CG-EM 51 componentes, siendo nueve de ellos nuevos reportes para el género (ciclooctacosano, tocoferoles (especialmente α), γ -sitosterol, α -amirina, blumenol C, vomifoliol, derivados del taraxastanediol y epi- ψ -taraxastanonol y 6,10,14-trimetil-5,9,13-pentadecatrien-2-ona (farnesil-cetona)).

Se llevó a cabo un estudio por CLAR de los extractos metanólicos, permitiendo la identificación de los flavonoides rutina, quercetina y kaempferol, donde el más abundante entre los flavonoides ensayados fue la rutina, acompañado siempre de la quercetina. En el fraccionamiento en columna de dichos extractos se aislaron esos flavonoides incluyendo a la apigenina, informada por primera vez como aglicón para la especie y el género. Todos fueron caracterizados por métodos físicos y espectroscópicos (IR, RMN- ^1H , RMN- ^{13}C y experimento DEPT).

El aporte esencial de este trabajo estuvo en identificar por primera vez en los extractos apolares y metanólico, la presencia de numerosos componentes para la especie (52) y el género (10), pudiendo realizar el estudio en diferentes épocas de cosecha, sugiriéndose para el mes de Enero una mayor concentración de hidrocarburos, alcoholes, fenoles y de algunos triterpenoides, mientras que en los restantes meses las concentraciones de flavonoides y tocoferoles en sentido general fueron superiores, permitiendo recomendar como los meses más apropiados para la

recolección de la especie, Marzo y Agosto, los cuales concuerdan con los meses donde se obtuvieron los mayores valores de actividad antiviral contra el virus de la Hepatitis B en estudios efectuados por Del Barrio y cols.(2001).

A pesar de que a la especie se le atribuyen usos tradicionales solo como ornamental, estudios preclínicos y clínicos llevados a cabo con extractos y compuestos purificados de plantas del género ***Phyllanthus*** sustentan la mayor parte de los reportes correspondientes al uso popular de éstas en el tratamiento de una gran variedad de condiciones patológicas. En adición, investigaciones fitoquímicas reflejan que muchos compuestos aislados como alcaloides, flavonoides, lignanos, fenoles y terpenos, pueden ser los responsables del efecto farmacológico reportado, esto por tanto fue el motivo de que las investigaciones sobre ella comenzaran por un conjunto de evaluaciones biológicas, principalmente como antiviral, seguido de su estudio antioxidante, antígeno tóxico y estudios toxicológicos, todos referentes al extracto acuoso.

Uno de los aspectos importantes que se tuvo en cuenta en el trabajo fue determinar si los extractos no acuosos presentaban actividad antioxidante, lo cual se notificó para los extractos metanólicos y los flavonoides mayoritarios aislados (rutina y quercetina). Se demostró que el extracto metanólico acetilado y los flavonoides acetilados presentaban un menor efecto antioxidante de carácter reductor, aspecto éste no informado con anterioridad para la especie.

Se determinó, por primera vez, que los extractos de ***P. orbicularis* HBK**, al igual que los de otras especies de ***Phyllanthus***, presentaban actividad antiinflamatoria por vía tópica en el modelo de inducción de edema por TPA. Los extractos hexánico, metanólico y metanólico acetilado fueron los que presentaron mayor porcentaje de inhibición del edema. De los flavonoides ensayados, los que manifestaron mayor actividad fueron la quercetina pentaacetilada y el derivado acetilado de la rutina, con valores superiores al 50%.

Se evaluaron también, por primera vez para la especie de forma preliminar, las propiedades citotóxicas en diferentes líneas celulares de cáncer humano, informadas

algunas de ellas para otras especies del género. Los resultados obtenidos demostraron que el extracto hexánico fue selectivo hacia la línea de cáncer de mama, mientras que el metanólico acetilado fue activo sobre glía del sistema nervioso central, mama y pulmón. De los compuestos aislados, el derivado de la rutina, la quercetina y la quercetina pentaacetilada manifestaron los mayores porcentajes de inhibición, siendo activos sobre todas las líneas de cáncer ensayadas, con valores superiores al 50%, y en algunos casos iguales a los del control positivo con un 100% de inhibición celular.

No obstante los resultados obtenidos, que resultaron novedosos para la especie, teniendo en cuenta que el estudio se realizó a los extractos, los flavonoides aislados y los extractos y flavonoides acetilados, éstos deben de profundizarse por los especialistas dedicados a esta temática, ya que en este caso sólo sirvieron de apoyo para el conocimiento de la especie y para la verificación de su posible uso como especie medicinal.

En términos generales se puede plantear que la aplicabilidad del trabajo está precisamente en que se estudió una especie vegetal endémica de Cuba, lo cual es una ventaja para su adquisición, la misma presenta buena propagación y resistencia, encontrándose fundamentalmente en suelos serpentinosos, pedregosos, especialmente a orillas de caminos y expuestos al sol, además de ser un arbusto perenne, aspecto este que hace más factible el proceso de recolección. Al ser un recurso natural, fácil de recolectar y procesar no contribuye a grandes gastos económicos.

Otro aspecto importante a señalar es que el trabajo caracterizó desde el punto de vista farmacognóstico y fitoquímico a la especie, aspecto fundamental en el establecimiento de futuras Normas de Control de la Calidad y para su registro e introducción como medicamento herbario, sentando las bases para el desarrollo de formas farmacéuticas que posibiliten aprovechar a ***P. orbicularis* HBK** como una posible alternativa en el campo de la medicina, aunque se precisan de otros estudios que permitan avalar la efectividad terapéutica de la especie y la relación beneficio-riesgo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Akaike, A., Osakada, F., Hashino, A., Kume, T., Katsuki, H y Kaneko, S. 2004. α -tocotrienol provides the most potent neuroprotection among vitamin E analogs on cultured striatal neurons. *Neuropharmacology*. 47: 904-915.
- ❖ Acosta, L. L. y Rodríguez C. A. 2006. Plantas Medicinales. Bases para su producción sostenible. *Agrinfor*. Impresiones MINAG. 9-41.
- ❖ Alberson, P. H. 1990. Medicine from plants. *Science*. 247.
- ❖ Ali, H., Houghton, P. J., Soumyanath, A. 2006. Alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes, with particular reference to ***Phyllanthus amarus***. *J. Ethnopharmacol.* 107(3):449-55.
- ❖ Álvarez, A., Del Barrio, G. 2008. Propiedades antivirales de 4 plantas del género ***Phyllanthus***. *Revista Cubana de Farmacia*. 42(1).
- ❖ Álvarez, A., Del Barrio, G., Kouri, V., Martínez, P., Suárez, B. Parra, F. 2009. In Vitro anti-herpetic activity of an aqueous extract from the plant ***Phyllanthus orbicularis***. *Phytomedicine*. 6(10):960-6.
- ❖ Amir, M., Kumar, S., Singh, S. 2003. Chemical and biological review of ***Phyllanthus niruri***. *Indian Journal of Natural Products*. 9(4):3-13.
- ❖ Anjaneyulu, V., Harischandra, K., Ravi, K. and Connolly, J. 1985. Triterpenoids from ***Mangifera indica***. *Phytochemistry*. 24(10):2359-2367.
- ❖ Anjaneyulu, V., Satyanarayana, P., Viswanadham, K., Jyothi, V. 1999. Triterpenoids from ***Mangifera indica***. *Phytochemistry*. 50:1229-1236.
- ❖ APG III. 2009. An update of the ***Angiosperm*** Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants:APG III. ***Angiosperm*** Phylogeny Group. *Bot. J. Linn Soc.* 161(2):105-121.
- ❖ Arnol, E. 1973. Peacock's Elementary Microtechnique. 4th edition. 33-7
- ❖ Asha, V., Akhila, W., Subramoniam, E. 2004. Further studies on the antihepatotoxic activity of ***Phyllanthus maderaspatensis*** Lin. *Journal of Ethnopharmacology*. 92:67-70.
- ❖ Ávalos, G. A., Pérez-Urria, C. E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145. ISSN 1989-3620.

- ❖ Bagalkotkar, G., Sagineedu, S. R., Saad, M. S., Stanlas, J. 2006. Phytochemicals from ***Phyllanthus niruri* Linn.** and their pharmacological properties: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 58(12):1559-1570.
- ❖ Baldwin, M. A. 1995. Modern mass spectrometry in bioorganic análisis. *Nat. Prod. Rep.* 33-44.
- ❖ Bauer, R., Tittel, G. 1996. Quality assessment of herbal preparations as precondition of pharmacological and clinical studies. *Phytomedicine*. 2:193-8.
- ❖ Bauer, R. 1998. Quality criteria and standarization of phytopharmaceuticals: can acceptable drug Standard be achieved?. *Drug Information Journal*. 32:101-10.
- ❖ Bauman, J., Bruchhausen, F. V. and Wurm, G. 1992. Flavonoids and arachidonis acid metabolism. Flavonoids and bioflavonoids. Studies in Organic Chemistry 11. *Elseiver. Oxford*. 411-419.
- ❖ Benzie, I. F, Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidante Power”. The FRAP assay. *Anal. Biochem*. 239:70-76.
- ❖ Berashvili, D. T., Alaniya, M. D., Bakuridze, A. D., Gvazava, L. N., Balansard, G. and Elias, R. 2005. Apigenin glucuronide from ***Perilla nankinensis*** leaves. *Chemestry of Natural Compounds*. 41(1):97-98.
- ❖ Berazaín, R., De la Fuente, V., Rufo, L., Rodríguez, N., Amils, R., Díez, B., Sánchez, D., Asensi, A. 2007a. Nickel localization in tissues of different hyperaccumulator species of ***Euphorbiaceae*** from ultramafic areas of Cuba. *Plant Soil*. 293:99-106.
- ❖ Berazaín, R., Fuente, V., Sánchez, D., Rufo, L., Rodríguez, N., Amils, R. 2007b. Nickel localization on tissues of hyperaccumulator species of ***Phyllanthus* L. (*Euphorbiaceae*)** from ultramafic areas of Cuba. *Biol Trace Elem. Res*. 115:67-86.
- ❖ Bhattacharjee, R., Sil, P. 2007. Protein isolate from the herb, ***Phyllanthus niruri* L. (*Euphorbiaceae*)**, plays hepatoprotective role against carbon tetrachloride induced liver damage via its antioxidant properties. *Food Chem Toxicol*. 45(5):817-26.
- ❖ Braun, S., Kalinowiski, H. O., Berger., S. 1996. 100 and more Basic NRM experiments. A practical course. Weimnhein:ED.VCH.

- ❖ Bruhn, J. G. 1989 The use of natural products in modern medicine. *Acta Pharmac. Nord.* 1:117-130.
- ❖ Budzikiewicz, H, Wilson, J. M., Djerassi, C. 1963. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. 85:3688-3699.
- ❖ Buitriago, D., Morales, A. 2001. Flavonoides del ***Pseudognaphalium moritzianum***. *Revista de la Facultad de Farmacia.* 42:40-42.
- ❖ Busse, W. 2000. The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal products. *Drug Information Journal.* 34:15-23.
- ❖ Calixto, J. B., Adair, R. S., Niraldo, P., Valdir, C. F., Rosendo, A.Y. 1997. The plants of genus ***Phyllanthus*** as a potential source of new drugs. *Natural products research in Brazil.* 49:5-6.
- ❖ Calixto, J. B., Adair, R. S., Valdir, C. F., Rosendo, A.Y. 1998. A review of the plants of the genus ***Phyllanthus***: Their chemistry, pharmacology and therapeutic potential. John Wiley & Sons, Inc., *Med. Res. Rev.* 18(4): 225-258.
- ❖ Cechinel, V., Santos, A., De Campos, R., Obdulio, G., Yunes, R., Ferrari, F., Messana, I., Calixto, J. 1996. Chemical and pharmacological studies of ***Phyllanthus caroliniensis*** in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 48(12):1231-1236.
- ❖ Cen Y. P. and Bornean J. F. 1993. The effect of exposure to enhanced UV-B radiation in leaves of *Brassica napus*. *Physiol. Plants.* 249-255.
- ❖ Chang, C. W., Lin, M. T., Lee, S. S., Lui, K. C., Hsu, F. L., Lin, J. Y. 1995. Differential inhibition of reverse transcriptase and cellular DNA polymerase- α activities by lignans isolated from chinese herbs. ***Phyllanthus myrtifolius moon***, and tannins from *Ionicera japonica-thunb* and *castanopsis hystrix*. *Antiviral res.* 27(4):367-374.
- ❖ Chaves, N., Escudero J. C. and Gutiérrez M. C. 1997. Role of ecological variable in the seasonal variation of flavonoid content of ***Cistus ladanifer*** exudates. *J. Chem. Ecol.* 23(3):579-603.
- ❖ Chegwin, C. 2007. Estudio de la influencia del sustrato en la cantidad y clase de triterpenoides de ***Pleurotus ostreatus*** así como en el contenido de

- estatinas si dicho hongo las presenta. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá.
- ❖ Chen, T. S., Liou, S. Y., Chang, Y. L. 2008. Antioxidant evaluation of three adaptogen extracts. *Am. J. Chin. Med.* 36(6):1209-17.
 - ❖ Chen, Y., Ren, L. 1997. Studies on the anticancer constituents of matsumura leafflower (***Phyllanthus matsumurae***). I. Isolation and identification of flavonoid compounds. Institute Clinical Medicine, Sino Japan Friendship Hospital, Beijing, Peop. Rep. China. *Zhongcaoyao*. 28(1):5-7.
 - ❖ Chen, Y., Shen, S, Lee, W., Hou, W.,Yang, L. and Lee, T. J. F. 2001. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and Cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin and quercetin pentaacetate in RAW 264,7 macrophage. *J. Cell. Biochem.* 82:537-548.
 - ❖ Chia, C. C., Yu, C. L, Kari, C. S., Shoei, S. L. 2003. Lignans from ***Phyllanthus urinaria***. *Phytochemistry*. 63(7):825-833.
 - ❖ Chih-Ho, L., Shin-Hua, F., Yerra, K. R., Madamanchi, G., Chih-Hsin, T., Ying-Ju, L., Chien-Hui, H., Wen-Ching, W., Yew-Min, T. 2008. Inhibition in human bacter pylori-induced inflammation in human gastric epithelial AGS cell by ***Phyllanthus urinaria*** extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 118:522-526.
 - ❖ Choiprasert, W., Dechsupa, N., Kothan, S., Garrigos, M. and Mankhetkorn, S. 2010. Quercetin, Quercetrin Except Rutin Potentially Increased Pirarubicin Cytotoxicity by Non-Competitively Inhibiting the P-Glycoprotein-and MRP1 Function in Living K562/adr and GLC4/adr Cells. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 5 (1):24-33.
 - ❖ Chudapongse, N., Kamkhunthod, M. and Poompachee, K. 2010. Effects of ***Phyllanthus urinaria*** extract on HepG2 cell viability and oxidative phosphorylation by isolated rat liver mitochondria. *Journal of Ethnopharmacology. Ethnopharmacological communication*. 130(2):315-319.
 - ❖ CIDEM.1992. Técnica # 2. Control Microbiológico de drogas secas. Control técnico.
 - ❖ Cimanga, R., Tona, L., Luyindula, N., Mesia, K., Lusakibanza, M., Musuamba, C., Apers, S. O, De Bruyne, T., Van Miert, S., Hermans, N., Totte, J.,Pieters, L., Vlietinck, A. 2004. In vitro antiplasmodial activity of callus culture extracts and

- fractions from fresh apical stems of ***Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae)**: part 2. *Journal of Ethnopharmacology*. 95(2-3):399-404.
- ❖ Colombo, R., Batista, L. A. N., teles, H. L., Silva, G. H., Bomfim, G. C., Burgos, R. C., Cavalheiro, A. J., da Silva, B. V., Silva, D. H., Pelicia, C. R., Guimaraes, F. M., Heimberg, M. C. 2009. Validated HPLC method for the standardization of ***Phyllanthus niruri*** (herb and comercial extracts) using corilagin as a phytochemical marker. *Biomed Chromatogr*. 23(6):573-580.
 - ❖ Coskun, O., Kanter, M., Armutcu, F., Cetin, K., Kaybolmaz, B. and Yazgan, O. 2004. Protective effects of quercetin, a flavonoid antioxidant, in absolute etanol-induced acut gastric ulcer. *Eur. J. Med*. 1:37-42.
 - ❖ Cronquist, A. 1986. Botánica Básica. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V., México. 2^{da} Edición. 351-392.
 - ❖ Dass, C. 2007. Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry. Publisher by John Wiley & Sons, Inc., Hobeken, New Jersey. 228-243.
 - ❖ Dechsupa, S., Kothan, S., Vergote, J., Legar, G. and Martineau, A. 2007. Quercetin, siamois 1 and siamois 2 induce apoptosis in human breast cancer mda-mb-435 cells xenograft in vivo. *Cancer Biol. Ther*. 6:48-53.
 - ❖ De Diego, J. 1992. La calidad de los productos y medicamenteos fitoterapéuticos. Discurs en l'acte de recepció com a acadèmic corresponet de la Reial Academia de Farmacia de Catalunya.
 - ❖ Della, L. R., Tubaro, A., Sosa, S., Becker, H. and Saar, St. I. 1994. *Planta Médica*. 60:516.
 - ❖ Del Barrio, G., Caballero, O., Rivas, L., García, L. 1994. Efecto de extractos de ***Phyllanthus orbicularis*** sobre el AgsHB del virus de la Hepatitis B. Avances en la biotecnología Moderna. 2:236.
 - ❖ Del Barrio, G., Caballero, O., Chevalier, P. 1995. Inactivación in vitro del Ags HB por extractos de plantas del género ***Phyllanthus***. *Revista Cubana Médica Tropical*. 47(2):127-130.
 - ❖ Del Barrio, G. 1999. Actividad antiviral in vitro de ***Phyllanthus orbicularis***. *Tesis de doctorado*. Universidad de la Habana. Facultad de Biología. Ciudad Habana.

- ❖ Del Barrio, G; Parra, F. 2000. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from ***Phyllanthus orbicularis***. *Journal of Ethnopharmacology*.72:317-322.
- ❖ Del Barrio, G. A., Roque, A. Q., Arias, M. 2001. Estudio comparativo de la capacidad inactivante de distintas colectas de la planta ***Phyllanthus orbicularis***. *Rev. Cub. Plant. Med.* 3:83-6.
- ❖ Dhalwal, K., Biradar, Y. S., Rajani, M. 2006. High-performance thin-layer chromatography densitometric method for simultaneous quantitation of phyllanthin, hypophyllanthin, gallic acid, and ellagic acid in ***Phyllanthus amarus***. *J. AOAC. Int.* 89(3):619-23.
- ❖ Dhandayuthapani, K., Sundaramoorthi, K. R., Murugaiyan, G. V., Soundarapandian, S. 2011. Systematic studies in herbaceous ***Phyllanthus spp.*** (region: tiruchirappalli district in india) and a simple key to authenticate 'bhumi-yamalaki' complex members. *Journal of Phytology*. 3(2):37-48.
- ❖ Dohadwalla, A. N. 1985. Natural product. Pharmacology: strategies in search of leads for new drug designs. *Trends in Pharmacological sciences*. 6(2):49-53.
- ❖ Doughari, J., Sunday, D. 2008. Antibacterial activity of ***Phyllanthus muellerianus***. *Pharmaceutical Biology*. 46(6):400-405.
- ❖ Drake, E. N. and Brown, C. E. 1977. Application of NMR to Biochemical Kinetic. *J. Chem.* 54: 124-7. Adapted by Krull, R. E., Cocco, M., Freyer, A. and Minard, R. *Conformational Analysis of Sugars by ¹H NMR Spectroscopy and Polarimetry*.
- ❖ Dutta, N. K., Mazumdar, K., Mishar, U. S., Dastidar, S. G. and Park, J. H. 2007. Isolation and identification of a flavone (quercetin) from ***Butea frondosa*** BARK. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 41(5):37-39.
- ❖ Eldeen, I. M. S., Seow, E. M, Abdullah, R. and Sulaiman, S. F. 2011. In vitro antibacterial, antioxidant, total phenolic contents and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities of extracts of seven ***Phyllanthus sp.*** *South African Journal of Botany*. 77(1):75-79.
- ❖ El-Desourky, S. K., Ryu, S. Y., Kim, Y. K. 2008. A new cytotoxic acylated apigenin glucoside from ***Phyllanthus emblica*** L. *Nat. Prod. Res.* 22(1):91-5.

- ❖ Elfahmi, B. S., Koulman, A., Hackl, T., Bos, R., Kayser, O., Woerdengarg, H. J., Quax, W. J. 2006. Lignans from cell suspension cultures of ***Phyllanthus niruri***, an Indonesian medicinal plant. *J. Nat. Prod.* 69(1):55-8.
- ❖ Esau, K. 1972. Anatomía vegetal. Edición Revolucionaria. 355-410.
- ❖ Evans, W. C. 2002. Trease and Evans Pharmacognosy. 15ª edition. Ed. Saunder. Edinburg.
- ❖ Farmacopea Británica (British Pharmacopea). 2000. *CD room*. Vol. 1
- ❖ Farmacopea Europea. 2005. European Pharmacopoeia. 5ª Ed. y suplemento 5.1 Conseil de l'Europe (Strasbourg).
- ❖ Fathiazad, F., Delazar, A., Amiri, R. And Sarker, S. D. 2006. Extraction of flavonoids and quantification of rutin from waste Tobacco leaves. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 3:222-227.
- ❖ Fernández, J., Del Barrio, G., Romeo, B., Gutiérrez, Y., Valdés, S. and Parra, F. 2003. In vitro antiviral activity of ***Phyllanthus orbicularis*** extract againsts herpes simples type 1. *Phytotherapy research.* 17:980-982.
- ❖ Ferrer, M., Sánchez, A., Fuentes, J., Barbé, J., Llagostera, M. 2001. Studies on the antimutagenesis of ***Phyllanthus orbicularis***:mechanisms involved against aromatic amines. *Mutation Research.* 498:99-105.
- ❖ Ferrer, M., Sánchez, A., Fuentes, J., Barbé, J., Llagostera, M. 2002. Antimutagenic mechanisms of ***Phyllanthus orbicularis*** when hydrogen peroxide is tested using ***Salmonella*** assay. *Short communication. Mutation Research.* 517:251-254.
- ❖ Ferrer, M., Cristófol, C., Sánchez, A., Fuentes, J., Barbé, J., Llagostera, M. 2004. Modulation of rat and human cytochromes P450 involved in PhIP and 4-ABP activation by an aqueous extract of ***Phyllanthus orbicularis***. *Journal of ethnopharmacology.* 90:273-277.
- ❖ Fool, L. Y. 1993. Amariin, a di- dehydrohexahydroxydiphenoyl hydrolysable tannin from ***Phyllanthus amarus***. *Phytochemistry.* 33:487-491.
- ❖ Fool, L. Y. 1995. Amariin acid and related ellagitannins from ***Phyllanthus amarus***. *Phytochemistry.* 39:217-224.
- ❖ Franz, G., Vlietinck, A. 2001. Results and methods of work of the european pharmacopoeia. Proceedings of the International Symposium on Herbal

- Medicinal Products: Quality Evaluation. Contribution of the European Pharmacopoeia. *Pharmaeuropa*, número especial. 17-25.
- ❖ Galati, G. and O'Brien, P. J. 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.* 37:287-303.
 - ❖ Garibello, C. F. R. 2010. Estudio de hojas de ***Pentacalia vaccinioides (kunth) Cuatr*** como nueva fuente natural de sustancias esteroidales y cumarinas. *Trabajo de Magíster en Ciencias Biológicas*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Grupo de Investigación Fitoquímica "GIFUI". Bogotá.
 - ❖ Gattuso, M. A.; Gattuso, S. J. 1999. Manual de procedimientos para el análisis de drogas en polvo. Editorial de la Universidad nacional de Rosario Urquiza. Argentina. ISBN N^o 950-673-199-3.
 - ❖ George, R., Gordonj, M., Devens, G., Petrer, B. and Jean, M. 1982. The structures of phyllanthostatin 1 y phyllanthoside from the Central American tree ***Phyllanthus acuminatus Vahl***. *Can. J. Chem.* 60:939-941.
 - ❖ Giergielewicz-Mozajska, H., Da Browski, L., Namiesnik, J. 2001. Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples some aspects of theory and practice. *Critical Review in analytical Chemistry*. 31(3):149-165.
 - ❖ Gissera G. M. J. 2009. Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Edit. Universidad Autónoma de Madrid. ISBN 978-84-8344-145-9.
 - ❖ González, G. J. S; Tunon, M. J. 2007. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr. Hosp.* 22:287-293.
 - ❖ Gulati, R. K., Agrawal, S. and Agrawal, S. S. 1995. Hepatoprotective studies on ***Phyllanthus emblica Linn*** and quercetin. *Indian. J. Exp. Biol.* 33:261-268.
 - ❖ Günther, H. 1995. NMR spectroscopy. Basic principles, concepts and applications in chemistry. Second edition. John Wiley & Sons. 432.
 - ❖ Gupta, J., Ali, M. 2003. ***Phyllanthus fraternus Webster Syn. P. niruri Auct. non Linn. (Euphorbiaceae)***. *Recent Progress in Medicinal Plants*. 8:249-265.

- ❖ Gusdinar, T. R. H., Kartasamita, R. E. and Adnyana, I. K. 2011. Anti-inflammatory and antioxidant activity of quercetin-3,3',4'-triacetate. *J. Pharmacol. Toxicol.* 6:182-188.
- ❖ Gutiérrez, M. C.; Droguet, M. 2002. Identificación de compuestos volátiles por CG-EM. *Boletín INTEXTER (U:P:C)*. 122:35-41.
- ❖ Gutiérrez, Y., García, G., Miranda, M., Valdivieso, A., Piloto, A. 2002. Evaluación toxicológica del extracto acuoso de ***Phyllanthus orbicularis***. *Revista Cubana de Farmacia*. 36, ISSN0034-7515.
- ❖ Habib, U., Yasin, K., Choudhary, M., Khaliq, N., Atta, U., Choudhary, M., Malik, S. 2007. Studies on the chemical constituents of ***Phyllanthus emblica***. *Natural Product Research, Part A: Structure and Síntesis*. 21(9):775-781.
- ❖ Ham, I., Wang, T., Cho, E., Cho, H., Whang, W. 2001. Phenolic compounds from ***Phyllanthus ussuriensis***. College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, S. Korea. *Yakhak Hoechi*. 45(3):237-244.
- ❖ Harikumar, K. B., Kuttan, G., Kuttan, R. 2009. ***Phyllanthus amarus*** inhibits cell growth and induces apoptosis in Dalton's lymphoma ascites cell through activation of Caspase-3 and downregulation of Bcl-2. *Integr cancer ther.* 8(3):254-60.
- ❖ Haw, D. K., Gambari, R., Wong, R. S., Yuen, M. C., Cheng, G. Y., Tong, C. S., Zhu, G. Y., Leung, A. K., Lai, P. B., Lau, F. Y., Chan, A. K., Wong, W. Y., Kok, S. H., Cheng, C. H., Kan, C. W., Chan, A. S., Chui, C. H., Tong, J. C., Fong, D. W. 2009. ***Phyllanthus urinaria*** extract attenuates acetaminophen induced hepatotoxicity: Involvement of cytochrome P450 CYP2E1. *Phytomedicine*. 16(9):856-63.
- ❖ Hermano, L. y Hermano, A. 1953. Flora de Cuba. Imp. P. Fernández y Cía. Tomo III. 50.
- ❖ Hermano, A. 1974. Flora de Cuba. Instituto Cubano del Libro. Editorial organismos. 95.
- ❖ Hinge, V. K., Paknikar, S. K., Das, K. G., Bose, A. K. and Bhattacharyya. 1966. Terpenoids-LXXXVI. Structure of Epi- ψ -Taraxastanonol and Epi- ψ -Taraxastanediol. *Tetrahedron*. 22:2861-2868.

- ❖ HMPWG. 2001. Points to consider on good agricultural and collection practice for starting materials of herbal origin. Document EMEA/HMPWG/31/99 Rev.1 (10.07.2001). Agencia Europea del medicamento (Londres).
- ❖ Hnatyszyn, O., Ferraro, G. And Coussio, J. 1987. A biflavonoid from ***Phyllanthus sellowianus***. *Journal of Natural Products*. 50(6):1156-1157.
- ❖ Hnatyszyn, O., Mino, J., Ferraro, G., Acevedo, C. 2002. The hypoglycemic effect of ***Phyllanthus sellowianus*** fractions in streptozotocin-induced diabetic mice. *Journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 9(6):556-559.
- ❖ Hoffmann, P., Kathriarachchi, H. S., Wurdack, K. J. 2006. A Phylogenetic Classification of ***Phyllanthaceae***. *Kew Bulletin*. 61(1):37-53.
- ❖ Hollman, O. C. H. and Katan, M. B. 1998. Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids. *Flavonoids in health and disease*. 7:483-522.
- ❖ Houghton, P., Fang, R., Techatanawat, I., Steventon, G., Hylands, P. and Lee, C. C. 2007. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plants extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Method*. 42:377-387.
- ❖ Huang, R., Huang, Y., Ou, J., Chen, C., Hsu, F., Chang, C. 2003. Screening of 25 compounds isolated from ***Phyllanthus*** species for anti-human hepatitis B virus in Vitro. *Phytother Res*. 17(5):449-453.
- ❖ Huang, S., Yang, R., Lee, P., Yang, S., Liao, S., Chen, T., Pang, J. 2006. Anti-tumor and anti-angiogenic effects of ***Phyllanthus urinaria*** in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Int. Immunopharmacol*. 6(6):870-879.
- ❖ Huang, S. T., Wang, C. Y., Yang, R. C., Chu, C. J., Wu, H. T., Pang, J. H. 2009. ***Phyllanthus urinaria*** increases apoptosis and reduces telomerase activity in human nasopharyngeal carcinoma cell. *Forsch Komplementmed*. 16(1):34-40.
- ❖ Huang, Y., Chen, C., Hsu, F., Chen, C. 1998. Tannins, Flavonol Sulfonates, and a Norlignan from ***Phyllanthus virgatus***. *Journal of Natural Products*. 61(10):1194-1197.
- ❖ Hukeri, V. I., Kalyani, G. A., Kakrani, H. K. 1988. Hypoglycemic activity of flavonoids of ***Phyllanthus fraternus*** in rats. *Fitoterapia*. 59(1):68-70.

- ❖ Isaza, J. H., Orozco, L. M., Zuleta, L. M., Rivera, D. A., Tapias, L. J., Veloza, L. A., Ramírez, L. S. 2007. Perfiles cromatográficos preliminares por GC-MS de especies de plantas **Melastomataceas**. *Scientia Et. Técnica*. XIII(33):359-362.
- ❖ Jay, M., Francois, J. G. 1974. Les flavonoides de deux Lentibulariacées: **Pinguicula vulgaris** et **Utricularia vulgaris**. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2:47-51.
- ❖ Jayaram, S., Thyagarajan, S. P. 1996. Inhibition of Hbs Ag secretion from Alexander Cell line by **phyllanthus amarus**. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 39(3):211-215.
- ❖ Jeong, J. H., An, J. Y., Kwon, Y.T., Rhee, J. G. and Lee, Y.J. 2009. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *J. Cell Biochem.* 106:73-82.
- ❖ Jiménez, L. C. y Bernal, H.Y. 1989. El Inchi. 4-8.
- ❖ Joshi K. C., Singh P., Mehra A. 1981. Cristalline components of the roots of **Phyllanthus reticulatus**. *J. Ind. Chem. Soc.* 58:102-103
- ❖ Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., Donoghue, M. J. 2002. Secondary Plant Compounds. En: *Plant systematics: a phylogenetic approach*, Second Edition. Sinauer Assoc, USA. Capítulo 4; "Structural and Biochemical Characters".
- ❖ Jyuti, G. and Mohd, A. 1999. Four new seco-sterols of **Phyllanthus fraternus** roots. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*. 61(2):90-96.
- ❖ Kassuya, C. A., Leite D. F., De Melo, L. V., Rehder, V. L., Calixto J. B. 2005. Anti-inflammatory properties of extracts, fractions and lignans isolated from **Phyllanthus amarus**. *Planta Med.* 71(8):721-726.
- ❖ Kassuya, C. A., Silvestre, A., Menezes-de-Lima, O. J., Marotta, D. M., Rehder, V. L., Calixto, J. B. 2006. Antiinflammatory and antiallodynic action of the lignan niranthin isolated from **Phyllanthus amarus**. Evidence for interaction with platelet activating factor receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 546(1-3):182-8.
- ❖ Kathriarachchi, H., Hoffmann, P., Samuel, R., Wurdack, K., Chase, M. 2005. Molecular phylogenetics of **Phyllanthaceae** inferred from five genes (plastid atpB, matK, 3'ndhF, rbcL, and nuclear PHYC). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 36(1):112-34.

- ❖ Kathriarachchi, H., Samuel, R., Hoffmann, P., Mlinarec, J., Wurdack, K. J., Ralimanana, H., Stuessy, T. F., Chase, M. W. 2006. Phylogenetics of tribe **Phyllanthae** (**Phyllanthaceae**; **Euphorbiaceae** sensu lato) based on nrITS and plastid matK DNA sequence data. *American Journal of Botany*. 93:637. <http://www.amjbot.org/cgi/content/full/93/4/637>.
- ❖ Khatoon, S., Rai, V., Rawat, A., Mehrotra, S. 2006. Comparative pharmacognostic studies of three **Phyllanthus** species. *Journal of Ethnopharmacology*. 104(1-2):79-86.
- ❖ Kinghorn, D. 2001. Pharmacognosy in the 21st century. *J. Pharm. Pharmacol.* 53:135-148.
- ❖ Kinghorn, D. 2002. The Role of Pharmacognosy in Modern Medicine. *Expert Opin. Pharmacother.* 3:77-79.
- ❖ Kodakandla, V., Bikram, S., Raghunath, S., Katar, H., Yoshinobu, K. and Hiroshi, H. 1985. Antihepatotoxic principles of **Phyllanthus niruri** herbs. *Journal of Ethnopharmacology*. 14:41-44.
- ❖ Kothan, S., Dechsupa, S., Leger, G., Moretti, J. L. and Vergote, J. 2004. Spontaneous mitochondrial membrane potential change during apoptotic induction by quercetin in K562 and K562/adr cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 82:1084-1090.
- ❖ Krishnaveni, M. and Mirunalini, S. 2010. Therapeutic potential of **Phyllanthus emblica** (amla): the ayurvedic wonder. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 21(1):93-105.
- ❖ Kuete, V., Ngameni, B., Fotso Simo, C., Kengap, R., Tchaleu, B., Meyer, M., Lall, N., Kuate, J. 2008. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from **Picus chlamydocarpa** and **Picus cordata** (**Moraceae**). *Journal of Ethnopharmacology*. 120 (1): 17-24.
- ❖ Kumaran, A., Karunakaran, R. 2006. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five **Phyllanthus** species from India. *LWT-Food Science and Technology*. 40(2):344-352.
- ❖ Kusirisin, W., Srichairatanakool, S., Lertrakarnnon, P., Lailerd, N., Suttajit, M., Jaikang, C., Chaiyasut, C. 2009. Antioxidative activity, polyphenolic content and

- anti-glycation effect of some thai medicinal plants traditionally used in diabetic patients. *Med. Chem.* 5(2):139-47.
- ❖ Kuskoski, E. M., Agustín, G. A., Troncosa, M. A., Manzini-Filho, J., Roseane, F. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment.* Campinas. 25(4):726-732.
 - ❖ Kutney, J. P. et al. 1996. Process of isolating a phytosterol composition from pulping soap. US Patent 5770749.
 - ❖ Lam, S., Wang, C., Chen, C. and Lee, S. 2007. Chemical Investigation of ***Phyllanthus reticulatus*** by HPLC-SPE-NMR and Conventional Methods. *Phytochemical Análisis.* 18(3):251-255.
 - ❖ Lee C. D. 1996. ***Phyllanthus amarus*** down-regulates hepatitis B virus m RNA transcription-of clinica-investigation. 1069-1076.
 - ❖ Lee, S. S. 1996. Six lignans from ***Phyllanthus myrtifolius***. *J. Nat. Products.* 59(11):1061-1065.
 - ❖ Lee, C. Y., Peng, W. H., Cheng, H. Y., Chen, F. N., Lai, M. T., Chiu, T. H. 2006. Hepatoprotective effect of ***Phyllanthus*** in Taiwán on acute liver damage induced by carbon tetrachloride. *Am J. Cin. Med.* 34(3):471-482.
 - ❖ Lechea, B. 1994. Características climáticas generales de régimen térmico en Cuba. La Habana. Editorial Academia. 19-21.
 - ❖ Leite, D. F., Kassuya, C. A., Mazzuco, T. L., Silvestre, A., de Melo, L. V., Rehder, V. L., Rumjanek, V. M., Calixto, J. B. 2006. The citotocix effect and the multidrug resistance reversing action of lignans from ***Phyllanthus amarus***. *Planta Med.* 72(15):1353-8.
 - ❖ Li, C., Wu, B., Wang, C. 2005. Preparation and clinical application of ***Phyllanthus niruri*** capsule. Institute of Liver Diseases, The Second People's Hospital of Lanzhou City, Lanzhou, Gansu Province, Peop. Rep. China. *Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi.* 25(8):771-772.
 - ❖ Li, X., Zhou, W., Wei, W. 2007. Chemical components and bioactivities of ***Phyllanthus niruri*** L. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning, Peop. Rep. China. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Haifa.* 19(5):890-896.

- ❖ Liu X., Zhao, M. 2006. Antioxidant activities and functional composition content of selected ***Phyllanthus emblica L.*** fruits juice. College of Light Industry and Food, South China University of Technology, Guangzhou, Peop. Rep. China. *Shipin Yu Fajiao Gongye*. 32(5):151-154.
- ❖ Liu, X., Zhao, M., Wang, J., Yang, B., Jiang, Y. 2008. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (***Phyllanthus emblica L.***) from six regions in China. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21(3):219-228.
- ❖ Liu, Q., Wang, Y. F., Chen, R. J., Zhang, M. Y., Wang, Y. F., Yang, C. R., Zhang, Y. J. 2010. Anti-Coxsackie Virus B3 Norsesquiterpenoids from the roots of ***Phyllanthus emblica***. *J Nat. Prod.* 73(6):1117-20.
- ❖ Lock O. 1988. Investigación fitoquímica. Métodos para el estudio de los productos naturales. Pontificia Universidad. Católica del Perú. Fondo editorial. Lima, Perú. 58-87.
- ❖ Londhe, J. S., Devasagayam, T. P., Foo, L. Y., Ghaskadbi, S. S. 2008. Antioxidant activity of some polyphenol constituents of the medicinal plant ***Phyllanthus amarus Linn.*** *Redox Rep.* 13(5):199-207.
- ❖ Lou Zhi-cen. 1980. General control methods for vegetable drugs. Comparative study of methods included in thirteen pharmacopoeias an proposals on their internacional unification. *WHO/PHARM/80.502*. 8-39.
- ❖ Mabry, T. J., Kagan, J. and Rösler, H. 1964. NMR spectra of trimethylsilyl ethers of flavonoid glycosides. *Phytochemistry*. 4:177-183.
- ❖ Mahnheim, B. M. 1988. Manual de técnicas y Datos Bioquímica. Alemania.
- ❖ Maier, W., Peipp, H., Schmidt, J., Wray, V. and Strack, D. 1995. Levels of a Terpenoid Glycoside (Blumenin) and cell Wall-bound phenolics in some cereal mycorrhizas. *Plant. Physiol.* 109:465-470.
- ❖ Maier, W., Schmidt, J., Wray, V., Herbert, M., Strack, D. 1999. The arbuscular mycorrhizal fungus, ***Glomus*** intraradices, induces the accumulation of cyclohexenone derivatives in tobacco roots. *Planta*. 207: 620-623.
- ❖ Majeed, M., Bhat, B., Jadhav, A. N., Srivastava, J. S., Nagabhushanam, K. 2009. Ascorbic acid and tannins from *Emblica officinalis* Gaertn. Fruits--a revisit. *J. Agric Food Chem.* 57(1):220-5.

- ❖ Manera, M., Zudaire, M. 2009. Ácidos grasos omega-6 y riesgo cardiovascular. <http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/tendencias/2009/03/13/184002.php>
- ❖ Manfred, L. 1947. 7000 recetas botánicas a base de 1300 plantas medicinales americanas. Ed. Kier, B A. Argentina. 778.
- ❖ Manjarréz, R., Frontana, B. A., Cárdenas, J. 2003. Estudio fitoquímico de *Salvia uruapana*. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 47(002):207-209.
- ❖ Marcano, D., Hasegawa, M. 1991. Fitoquímica orgánica. Universidad Central de Venezuela. Consejo de desarrollo Científico y Humanístico. Caracas. 17-38.
- ❖ Markham KR. 1989. Flavones, flavonols and their glycosides, Chemistry Division, D.S.I.R., Petone, New Zealand. 205-207.
- ❖ Marques, G. S. 2005. Estudio sistemático de la composición química de la fibra de la planta de curauá (*Ananas erectifolius*) y su evolución durante el proceso de cocción a la soda-AQ. Informe. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla. Universidad de Aveiro. 43-44, 58.
- ❖ Martínez, A. 2002. Esteroles. Monografía. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- ❖ Martínez, T. A. 1999. Actividad antiviral de **Phyllanthus orbicularis HBK** contra el virus del herpes simple tipo 1. *Tesis de Diploma*. Fac. Biología.
- ❖ Mdlolo, C. M., Shandu, J. S., Oyedeji, O. A. 2008. Phytochemical constituents and antimicrobial studies of two South African **Phyllanthus** species. *African Journal of Biotechnology*. 7(5):639-643.
- ❖ Mehmood, M. H., Siddiqi, H. S., Gilani, A. H. 2011. The antidiarrheal and spasmolytic activities of *Phyllanthus emblica* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and Ca(2+) channels. *J. Ethnopharmacol*. 133(2):856-65
- ❖ Mellinger, C. G., Cipriano, T. R., Noletto, G. R., Carbonero, E. R., Oliveira, M. B., Gorin, F. A. J. and Lacomini, M. 2008. Chemical and immunological modifications of an arabinogalactan present in tea preparations of **Phyllanthus niruri** after treatment with gastric fluid. *International journal of biological macromolecules*. 43(2):115-120.

- ❖ Méndez, E., Blanco, M., Laguna, A., García, E. 2003. Isolation and characterization of a mixture of higher primary aliphatic alcohols of high molecular weight from henequen (**Agave furcroydes L.**) wax. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. 34(1):35-38.
- ❖ Menéndez, R. 1993. Conceptos Farmacognósticos y Aspectos a considerar en la normalización de drogas vegetales. Conferencia. Curso-Taller Internacional. "Utilización de Productos Naturales la Industria Farmacéutica". C. Habana.
- ❖ Mensah, J. L. 1990. *Antibacterial activities of the leaves of **Phyllanthus discoideus***. *J. Ethnopharmacol.* 28 (1):129-133.
- ❖ Merlos, M., Gomez, L. A., Giral, M., Vencat, M. L., García, R. J. and From, J. 1991. Effects of PPF-antagonist in mouse ear edema induced by several inflammatory agents. *British Journal of Pharmacology*. 104:990-994.
- ❖ Miguel, O. G., Calixto, J. B., Santos, A. R. S., Messana, I., Ferrari, F., Cechinel, V. F., Pizzolatti, M. G., Yunes, R. A. 1996. Chemical and preliminary analgesic evaluation of geraniin and furosin isolated from **Phyllanthus sellowianus**. *Planta Med.* 62:97-102.
- ❖ Miranda M. M., Cuéllar A. C. 2000. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. Ciudad Habana. 25-49, 74-79.
- ❖ Miranda M. M., Cuéllar A. C. 2001. Farmacognosia y productos naturales. Editorial Félix Varela. La Habana. 135-158.
- ❖ Miyase, T., Ueno, A., Takisawa, N., Kobayashi, H., Oguchi, H. 1988. Studies on the glycosides of **Epimedium grandiflorum MORR.** var. *thunbergianum* (MIQ). NAKAI. III. *Chem. Pharm. Bull.* 36:2475-2484.
- ❖ Monks, A., Scudeiro, D., Skehan, P., Schoemaker, R., Paul, K., Vistiea, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, Gray-Gooddrich, M., Campbell, H., Mayo, J. and Boyd, M. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultered human tumor cell lines. *Journal of National Cancer Institute*. 33:757.
- ❖ Morantes, J., Prieto, C., Linares, E., Rincón, J., Aristizábal, F. 2007. Análisis fitoquímico y de actividad Biológica del musgo **Polytrichum juniperinum**. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 31(121):473-479. ISSN 0370-3908

- ❖ Morton, J. F. 1981. Atlas of medicinal plants of middle América. C C Thomas pub spring field III U.S.A. 142.
- ❖ Murugaiyah, V., Chan, K. L. 2006. Antihyperuricemic lignans from the leaves of ***Phyllanthus niruri***. *Planta Med.* 72(14):1262-7.
- ❖ Murugaiyah, V., Chan, K. L. 2007. Determination of four lignans in ***Phyllanthus niruri*** L. by a simple high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection. *J. Chromatogr A.* 1154(1-2):198-204.
- ❖ Naaz, F., Javed, S. and Abdin, M. Z. 2007. Hepatoprotective effect of ethanolic extract of ***Phyllanthus amarus*** Schum. et Thonn on aflatoxin B₁-induced liver damage in mice. *Journal of Ethnopharmacology.* 113(3):503-509.
- ❖ Naik, A. D., Juvekar, A. R. 2003. Effects of alkaloidal extract of ***Phyllanthus niruri*** on HIV replication. *Indian J. Med. Sci.* 57(9):387-393.
- ❖ Nieto, I. J., Ávila, I. M. 2008. Determinación de ácidos grasos y compuestos triterpenoides del cuerpo fructífero de ***Suillus luteus***. *Rev. Colomb. Quim.* 37(3):297-304.
- ❖ NRSP 309. Norma Ramal. 1992. Medicamentos de origen vegetal. *Droga cruda. Métodos de ensayo.* 16-29.
- ❖ NRSP 310. Norma Ramal. 1992. Medicamentos de origen vegetal. *Especificaciones generales.* MINSAP.
- ❖ Notka, F., Meier, G., Wagner, R. 2003. Inhibition of wild-type human immunodeficiency virus and reverse transcriptase inhibitor-resistant variants by ***Phyllanthus amarus***. *Antiviral Res.* 58(2):175-186.
- ❖ Núñez, R. P. P. 2007. Evaluación del contenido de tocoferoles y tocotrienoles en aceite de nuez de selecciones clonales de ***Genuina avallana*** Mol. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Agronomía. 76-77.
- ❖ Nurettin, Y., Canan, G., Osman, Ü., Ahmet, Y., Serdar, Ü., Kamil, C., Salih, T. 2006. Composition and Antimicrobial Activities of Volatile components of ***Minuartia meyeri***. *Turk J. Chem.* 30:71-76.
- ❖ Ogata, T., Higuchi, S., Mochida, S., Matsumoto, H., Kato, A., Endo, T., Kaki, A., Kaki, H. 1992. HIV-1 reverse transcriptase inhibitor from ***Phyllanthus niruri***. *AIDS Resd. Hum. Retrovir.* 8:1937-1944.

- ❖ Okigbo, R. N., Igwe, D. I. 2007. Antimicrobial effects of *Piper guineense* 'Uziza' and *Phyllanthus amarus* 'Ebe-Benizo' on *Candida albicans* and *Streptococcus faecalis*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 54(4):353-366.
- ❖ Oliver- Bever B. 1983. Medicinal plants in tropical west Africa. III. Anti- infection therapy with higher plants. *J. Ethnopharmacol.* 9:1-83.
- ❖ Osorio, D. E. 2009. Aspectos básicos de Farmacognosia. Universidad de Antioquia. Colombia. 27.
- ❖ Panagopoulos I., Bornean J. F. and Bjorn L. O. 1994. Response of sugar beet plants to ultraviolet β (280-320nm) radiation and *Cercospora* leaf spot disease. *Physiol. Plant* .84:140-145.
- ❖ Pascual, T. J.; Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Basabe, P.; Sexmero, M. J.; Fernández, R. M. 1987. Triterpenes from *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry*. 26(6):1767-1776.
- ❖ Pastene, E. R., Wilkomirsky, T., Bocaz, G., Havel, J., Pric, I., Vega, M., González, M., Alderete, J. 2001. Uso de espectroscopía de rmn y maldi-tof ms en la elucidación estructural de flavonoides antioxidantes de la planta medicinal chilena *Cheilanthes glauca* (cav.) mett. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. 46(4).
- ❖ Peña, C. M, Lange, S., Castro, D. O., Ruiz, K. N., Cruz, F. G., Schmid, R., Navarro, A. O. and Farrés. 2009. Differences in biocatalytic between two variants of Stc1 esterase from *Aspergillus nidulis* and its potencial use in biocatalysis. *Journal of Molecular Catálisis B: Enzymatic*. 61(3-4):225-234.
- ❖ Petti, G. R., Cragg, G. M., Gust, D., Brown, P. and Schmidt, J. M. 1982. The structures of phyllanthostatin 1 and phyllanthoside from the Central American tree *Phyllanthus acuminatus* Vahl. *Can. J. Chem.* 60:939.
- ❖ Petti, G. R., Gragg, G. M., Nwen, M. L., Nassimbeni, L. R. 1983. Structure of the principal antineoplastic glycosideos of *Phyllanthus acuminatus* Vahl. *Can. J. Chem.* 61:2630-2632.
- ❖ Petti, G. R., Gragg, G. M., Suffness, M. I., Boettner, F. E., Willians, M., Saehz Renaud, J. A., Brown, P., Schmidt, J. M., Ellis, P. D. 1984. Antineoplastic

- agents. 104. Isolation and structure of the ***Phyllanthus acuminatus Vahl*** glycosides. *J. Org. Chem.* 149 (22):4258-4266.
- ❖ Petti, G. R., Gragg, G. M., Schanfelberger, D. E. 1988. Isolation and structure of the cytostatic lignan glycoside phyllantostatin *A. J. Nat. Prod.* 51:1104-1112.
 - ❖ Plazas, G. E. A, Cuca, S. L. E., Delgado, A. W. A. 2008. Flavonoides aislados de las inflorescencias de ***Piper hispidum Kunth (PIPERACEAE)*** y derivados acetilados. *Rev.Colomb.Quim.* 37(2). Bogotá. ISSN 0120-2804.
 - ❖ Poltanov, E. A, Shikov, A. N., Dorman, H. J., Pozharitskaya, O. N., Makarov, V. G., Tikhonov, V. P., Hiltunen, R. 2009. Chemical and antioxidant evaluation of Indian gooseberry (***Emblica officinalis Gaertn.***, syn. ***Phyllanthus emblica L.***) supplements. *Phytother Res.* 23(9):1309-15.
 - ❖ Pornpen, P., Chanon, N., Somlak, P., Chayo, C. 2007. Hepatoprotective activity of ***Phyllanthus amarus Schum.et. Thonn.*** Extract in ethanol treated rats: In vitro and in vivo studies. *Journal of Ethnopharmacology.* 114:169-173.
 - ❖ Prior, R. L., Cao, G. 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free rad. Biol. Med.* 27(11/12):1173-1181.
 - ❖ Quian-Cutrone, J., Huang S., Trimble, J., Li, H., Lin, P., Alam, M., Klohr, S., Kadow, K. 1996. Niruside, a new HIV REV/RRE binding inhibitor from ***phyllanthus niruri.*** *J. Nat. Prod.* 59:196-199.
 - ❖ Rafat, S., Cillard, J., Cillard, P. 1987. Hidroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry.* 26(9):2449-2491.
 - ❖ Rai, V., Mehrotra, S. 2008. Chromium-induced changes in ultramorphology and secondary metabolites of ***Phyllanthus amarus Schum & Thonn.***- an hepatoprotective plant. *Environ Monit Assess.* 147(1-3):307-15.
 - ❖ Rao, M. S., Duddeck, H., Dembiinshi, R. 2002. Isolation and structural elucidation of 3,4',5,7-tetraacetyl quercetin from ***Adina cordifolia (Karam ki Gaach).*** *Phytochemical communication.* 73:353-355.
 - ❖ Rao, Y. K., Fang, S. H., Tzeng, Y. M. 2005. Anti-inflammatory activities of constituents isolated from ***Phyllanthus polyphyllus.*** *J. Ethnopharmacol.* 103(2):181-6.
 - ❖ Ramakrishnan P. N. 1982. Oral hypoglycemic effects of ***Phyllanthus niruri Linn*** leave. *Indian J.Pharm. Scienc.* 10-12,44.

- ❖ Raphael, K. R., Sabu, M. C., Kuttan, R. 2002. Hypoglycemic effect of methanol extract of ***Phyllanthus amarus* Schum & Ton** on alloxan induced diabetes mellitas in rats and its relation with antioxidant potencial. *Indian J. Exp. Biol.* 40(8):905-909.
- ❖ Raphael, K. R., Kuttan, R. 2003. Inhibition of experimental gastric lesion and inflammation by ***Phyllanthus amarus***. *J. Ethnopharmacol.* 87(2-3):193-197.
- ❖ Ratnayake, R., Novell, D., Ranson, T. T., Gustafson, K. R., Beutler, J. A. 2009. Englerin A, a selective inhibitor of renal cancer cell growth, Englerin A from ***Phyllanthus engleri***. *Org lett.* 11(1):57-60.
- ❖ Reddy, B. P. 1993. Antihepatoxi activity of ***Phyllanthus ninuri***, *Tinospora cardifolia* and *Ricinu communis*. *Indian-Drugs.* 338-341.
- ❖ Reeves, R., Baker, A., Borhidi, A., Berazaín, R. 1996. Níkel-accumulating plant from the ancient serpentine soils of Cuba. *New Phytol.* 133:217-224.
- ❖ Regulación No. 23. 2000. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos. República de Cuba. Ministerio de Salud Pública. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED).
- ❖ Rivero, F., Vidal, A. 1998. Estudio de la toxicidad aguda y subcrónica de un extracto acuoso de ***Phyllanthus orbicularis***. *Rev. Toxicol.* 15(2):64-67.
- ❖ Robards, K., Prenzler, P. D., tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative procces in fruits. *Food. Chem.* 66:401-436.
- ❖ Roig, J. T. 1974 Plantas aromáticas o venenosas de Cuba. Editorial Ciencia y técnica, La Habana. Cuba. 404-405, 569.
- ❖ Roig, J. T. 1988. *Diccionario botánico de nombres vulgares cubano*. Editorial científico técnico, La Habana, Cuba, p. 80.
- ❖ Rojas, J., Morales, A., Meccia, G., Rondón, M. 2008. Análisis por CG-EM de hidrocarburos y compuestos terpénicos en las especies ***Euphorbia caracasana* Boiss** y ***Euphorbia cotinifolia* L.** (*Euphorbiaceae*). *Rev. Latinoamer. Quím.* 36(1):22-28.

- ❖ Sailaja, R. and Setty, O. H. 2006. Protective effect of ***Phyllanthus fraternus*** againsts allyl alcohol-induced oxidative stress in liver mitochondria. *Journal of Ethnopharmacology*. 105(1-2):201-209.
- ❖ Saito, K., Cono, M., Yoshizaki, F., Niwano, Y. 2008. Extensive screening for edible herbal extracts with potent scavenging activity against superoxide anions. *Plant Foods Hum Nutr*. 63(2):65-70.
- ❖ Sakagami H., Oh-hara T. and Kawazoe Y. 1990. Biochem. Biophys. Res. Commun. 172, 1267.
- ❖ Sánchez, A., Fiore, M., Cundari, E., Ricordy, R., Cozzi, R., De Salvia, R. 1999. ***Phyllanthus orbicularis*** Aqueous Extract: Cytotoxic, Genotoxic, and Antimutagenic Effects in the CHO Cell Line. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 161:231–239.
- ❖ Sánchez, A. L., Fuentes, J. L., Fonseca, G., Cápiro, N., Ferrer, M., Alonzo, A.; Baluja L., Cozzi R., De Salvia R., Fiore M., Llagostera M. 2002. Assessment of the potential genotoxic risk of ***Phyllanthus orbicularis* HBK** aqueous extract using in vitro and in vivo assays. *Toxicology Letters*. 136:87-96.
- ❖ Santos, A., Cechinel F., Niero, R., Viana, A., Moreno, F., Campos, M., Yunes, R., Calixto, J. 1994. Analgesic effects of callus culture extracts from selected species of ***Phyllanthus*** in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 46(9):755-759.
- ❖ Santos, A., Niero, R., Cechinel F., Yunes, R., Pizzolatti, F., Monache, D., Calixto, J. 1995. Antinociceptive properties of steroids isolated from ***Phyllanthus carcovadensis*** in mice. *Planta Med*. 61:329-332.
- ❖ Sarkar, M. K., Kinter, M., Mazumder, B., Parames, C. S. 2009. Purification and characterization of novel antioxidant protein molecule from ***Phyllanthus niruri***. *Food Chemistry*. 114:1405-1412.
- ❖ Satyanarayana P., Subrahmanyam P., Viswanatham K. N. 1988. New seco-end hydroxy lignans from ***Phyllanthus niruri***. *J. Nat. Prod*. 51 (1):44-49.
- ❖ Schneider, C. 2005. Review chemistry and biology of vitamin E. *Mol. Nutr. Food Res*. 49:7-30.

- ❖ Selloum, L., Bouriche, H., Tigrine, C. and Boudoukha, C. 2003. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. URBAN & FISCHER. *Exp Toxic Pathol.* 54:313-318.
- ❖ Shabeer, J., Srivastava, R. S., Sing, S. K. 2009. Antidiabetic and antioxidant effect of various fractions of ***Phyllanthus simples*** in alloxan diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 99:21-30.
- ❖ Shakil, N, Pankaj, Kumar, J., Pandey, R., Saxena, D. 2008. Nematicidal prenylated flavanones from ***Phyllanthus niruri***. *Phytochemistry (Elsevier).* 69(3):759-764.
- ❖ Sharapin, N., Machado, L., Souza, E., de Albuquerque, E., Valverde, E. y. cols. 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Ed. Convenio Andrés Bello y Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos (RIPROFITO) del Subprograma X de CYTED. Sta. Fé de Bogotá. Colombia. 22-26.
- ❖ Shead, A., Vickery, K., Pajkos, A., Medhurst, S., Freedman, J., Dixon, R. and Cossart, J. 1992. Effects of ***Phyllanthus*** plants extracts on Duck Hepatitis B virus in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 18:127-138.
- ❖ Shen, B., Yu, J., Wang, S., Chu, E., Wong, V., Zhou, X., Lin, G., Sung, J., Chan, H. 2008. ***Phyllanthus urinaria*** ameliorates the severity of nutritional steatohepatitis both in vitro and in vivo. *Hepatology (Baltimore, Md.).* 47(2):473-483.
- ❖ Shin, M., Kang, E., Lee, Y. 2005. A flavonoid from medicinal plants blocks hepatitis B virus-e antigen secretion in HBV-infected hepatocytes. *Antiviral Research.* 67(3):163-168.
- ❖ Shyr, Y. L., Ching, C. W., Yeh, L. L., Wen, C. W., Wen, C. H. 2008. Antioxidant, anti-semicarbazide-sensitive amine oxidase, and anti-hypertensive activities of geraniin isolates ***Phyllanthus urinaria***. *Food and Chemical Toxicology.* 46:2485-2492.
- ❖ Silverstein, R. M., Bassler, C. G., Morrill, T. C. 1977. Spectrometric identification of organic compounds. Third edition. 5-38.
- ❖ Sousa M., Ousingsawat J., Seitz R., Puntheeranurak S., Regalado, A., Schmidt, A., Grego, T., Jansakul, C., Amaral, M., Schreiber, R.,Kunzelmann, K. 2007. An

- extract from the medicinal plant ***Phyllanthus acidus*** and its isolated compounds induce airway chloride secretion: a potential treatment for cystic fibrosis. *Molecular Pharmacology*. 71(1): 366-376.
- ❖ Sripanidkulchai, B., Tattawasart, U., Laupatarakasem, P., Vinitketkumneum, U. 2002. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of ***Phyllanthus amarus***. *Phytomedicine*. 9(1):26-32.
 - ❖ Srivastava, V., Singh, M., Malasoni, R., Shanker, K., Verma, R. K., Gupta, M. M., Gupta, A. K., Khanuja, S. P. 2006. Separation and quantification of lignans in ***Phyllanthus*** species by a simple charal densitometric method. Erratum in: *J. Sep Sci*. 31(12):2338.
 - ❖ Stevens, P. F. 2001. Angiosperm Phylogeny. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
 - ❖ Stuart, K. L. and Ivonne, G. W. 1975. Further effects of vomifoliol on stomatal apertura and on the germination of Lettuce and the Growth of cucumber seedlings. *Planta (Berl.)*. 127:21-25.
 - ❖ Su, X., Liang, Z. 2009. The chemical constituents of essential oil from ***Phyllanthus urinaria*** L in GuangXi. *Modern Pharmaceutical Research*. 2(6): 112-114.
 - ❖ Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Secondary Metabolites and Plant Defense. En: *Plant Physiology*, Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. Capítulo 13.
 - ❖ Tan, A. R. and Swain, S.M. 2002. Review of flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, as breast cancer therapy. *Semin. Oncol*. 29: 77-85.
 - ❖ Tanaka, R.; Matsunaga, S. 1988a. Triterpene dienols and other constituents from the bark of ***Phyllanthus flexuosus***. *Phytochemistry*. 27:2273-2277.
 - ❖ Tanaka, R., Matsunaga, S., Ishida, T. 1988b Revised structure of trichadenic acid B, a stem bark constituent of ***Phyllanthus flexuosus***. *Tetrahedron Lett*. 29:4751-4754.
 - ❖ Tanaka, R., Kinouchi, Y., Wada, S., Tokuda, H. 2004. Potential anti-tumor promoting activity of lupane type triterpenoids from the stem bark of ***Glochidion zeylanicum*** and ***Phyllanthus flexuosus***. *Planta Med*. 70(12):1234-6.

- ❖ Tempesta, M. S., Corley, D. G., Beutler, J. A., Metral, C. J., Yunes, R. A., Giacomozzi, C. A., Calixto, J. B. 1988. Phyllanthimide, a new alkaloid from ***Phyllanthus sellowianus***. *J. Nat. Prod.* 51:617- 618.
- ❖ Thana, N., Fotso, S., Poeggeler, B., Hardeland, R., Laatsch, H. 2006. Niruriflavone, a new antioxidant flavone sulfonic acid from ***Phyllanthus niruri***. *Chemical Sciences.* 61(1):57-60.
- ❖ Thyagarajan, S., Subramanian, S., Thirunalasunderi, T., Venkateswaran P., Blumberg B. 1982. In vitro inactivación of Hbs Ag by eclipta alba hassk and ***Phyllanthus ninuri*** Linn. *Indian J. Med. Res.* 76 (supply):124-130.
- ❖ Thyagarajan, S., et. al. 1988. Effect of ***Phyllanthus amarus*** on chronic carriers of hepatitis B virus. *The lancet.* 764-766.
- ❖ Ticona, J. C., Gutierrez, D. S., Ruiz, G., Paredes, C., Udaeta, E., Rodríguez, N., Garcia, G., López, I., Jiménez, A., Alvarado, P., Chuqui, R., Flores, N., Jiménez, A. 2006. Estudio fitoquímico de las hojas de ***Bowdichia virgilioides***. *Revista Boliviana de Química.* 23(1):34-39.
- ❖ Toshihiro, A., Ken, Y., Hirotooshi, O., Yoshimasa, K, Sakae, Y., Michio, T., Kunio, K., Toshitake, T. 1996. Triterpene alcohols from the flower of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry.* 43(6):1255-1260.
- ❖ Toyin, Y. F., Stephen, M. S., Michael, A. F., Udoka, E.; Obioha. 2008. Hepatoprotective potentials of ***Phyllanthus amarus*** against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology.* 46:2658-2664.
- ❖ Tripathi, A. K., Verma, R. K., Gupta, A. K., Gupta, M. M., Khanuja, S. P. 2006. Quantitative determination of phyllanthin and hypophyllanthin in ***Phyllanthus*** species by high-performance thin layer chromatography. *Phytochem Anal.* 17(6):394-7.
- ❖ Tuchinda, P., Kumkao, A., Pohmakotr, M., Santisuk, T., Reutrakul, V. 2006. Cytotoxic aryl-naphthalide lignan glycosides from the aerial parts of ***Phyllanthus taxodifolius***. *Planta Med.* 72(1):60-2.
- ❖ Tuchinda, P., Kornsakulkarn, J., Pohmakotr, M., Konsaeree, P., Prabpai, S., Yoosook, C., Kasisit, J., Napaswad, C., Sophasan, S., Reutrakul, V. 2008. Dichapetalin-type triterpenoids and lignans from the aerial parts of ***Phyllanthus caulisima***. *J. Nat. Prod.* 71(4):655-63.

- ❖ Unander, D. W., Webster, G. L. and Blumberg, B. S. 1990. *Records of usage or assay in Phyllanthus (Euphorbiaceae): I. Subgenera Isocladus, Kirganelia, Cicca, and Emblica*. *J. Ethnopharmacol.* 30:233-264.
- ❖ Unander, D. W., Webster, G. L. and Blumberg, B. S. 1991. *Uses and bioassays in Phyllanthus (Euphorbiaceae): a compilation. II. The subgenus Phyllanthus*. *J. Ethnopharmacol.* 34:97-133.
- ❖ Unander, D. W., Webster, G. L. and Blumberg, B. S. 1992. *Usage and bioassays in Phyllanthus (Euphorbiaceae): a compilation. III. The subgenera Ericoccus, Conami, Gomphidium, Botryanthus, Xylophylla and Phyllanthodendron, and a complete list of the species cited in the three-part series*. *J. Ethnopharmacol.* 36:103-112.
- ❖ Unander, D. W., Webster, G. L. and Blumberg, B. S. 1995. *Usage and bioassays in Phyllanthus (Euphorbiaceae). IV. Clustering of antiviral uses and the other effects*. *J. Ethnopharmacol.* 45:1-18.
- ❖ Valdés, S., Del Barrio, G., Gutiérrez, Y., Morier, L. 2003. *Evaluación preliminar de la actividad del extracto acuoso de Phyllanthus orbicularis frente al virus VHS-1*. *Revista Cubana de Medicina tropical.* 55(3):169-73.
- ❖ Van Loo, P and De Bruyn, A. 1986. *Reinvestigation of the structural assignment of signals in the ¹H and ¹³C NMR spectra of the flavone apigenin*. *Magnetic Resonance in Chemistry.* 24:879-882.
- ❖ Verpoorte, R. 2000. *Pharmacognosy in the New Millennium: Leadfinding and Biotechnology*. *J. Pharm. Pharmacol.* 52:253-262.
- ❖ Vincent, P. F., Ferretti, A., Schwartz, D. P., Ruth, J. M. 1975. *Characterization of two steroidal ketones and two isoprenoid alcohols in dairy products*. *Journal of Lipid Research.* 16:97-101.
- ❖ Vogt I., Gutz P. G. and Reznik H. 1991. *UV radiation dependent flavonoid accumulation of Cistus launtolius L.* *Naturforsch.* 430:37-42.
- ❖ Vuyelwa, J. N., Neil, R. C., Dulcie, A. M. 2008. *Triterpenoids from the African tree Phyllanthus polyanthus*. *Phytochemistry Letters.* 2:1-7.

- ❖ Wada, S., Lida, A., Tanaka, R. 2001. Screening of triterpenoids isolated from ***Phyllanthus flexuosus*** for DNA topoisomerase inhibitory activity. *J. Nat. Prod.* 64(12):1545-7.
- ❖ Wan, A. S., Aixel, R. T, Ramsey, R. B, Nicholas, H. J. 1972. ***Nepenthaceae***. Steroles and triterpenes of the pitcher plant. *Phytochemistry.* 11:456-461.
- ❖ Wang, C. Y., Lee, S. S. 2005. Analysis and identification of lignans in ***Phyllanthus urinaria*** by HPLC-SPE-NMR. *Phytochem Anal.* 16(2):120-6.
- ❖ Webster G. L. 1967. A remarkable new ***Phyllanthus (Euphorbiaceae)*** from Central America. *Ann Missouri Bot Gard.* 54:194- 198.
- ❖ Weniger, B y Robineau, L. 1988. Elementos para una farmacopea caribeña. Investigación científica y uso popular de plantas medicinales en el Caribe, Seminario TRAMIL. 202.
- ❖ Weststrate, J. A., Ayesh, R. B. P., Drewitt, P. N. 1999. Safety evaluation of phytosterol-esters. Part 4: Faecal concentrations of bile acids and neutral sterols in healthy normolipidaemic volunteers consuming a controlled diet either with or without a phytosterol enriched margarine. *Food Chem. Toxicol.* 37:1063-1071.
- ❖ WHO. World Health Organization. 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. *WHO/PHARM/92.559.* Ginebra.
- ❖ WHO. World Health Organization. 2000a. General Guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. *WHO/EDM/TRM/2000. 1.* Geneva, Suiza, p. V.
- ❖ WHO. World Health Organization. 2000b. Repor of the Inter-Regional Workshop on Intellectual Property Rights in the Context of Traditional Medicine. *WHO/EDM/TRM/2000. 1.* Bangkok, Thailand, p. 2.
- ❖ WHO. World Health Organization. 2003. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. *Organización Mundial de la Salud.* Ginebra.
- ❖ WHO. World Health Organization. 2005. Quality control methods for medicinal plant materials. *Ing document QAS/05.131/Rev.1.* Ginebra.

- ❖ Xiao, P. Z., Wu, H. K., Shi, H., Hang, B. and Aisa, H. A. 2006. Kaempferol and quercetin flavonoids from ***Rosa rugosa***. *Chemistry of Natural Compounds*. 42(6):736-737.
- ❖ Xu, M., Zha, Z., Qin, X., Zhang, X., Yang, C., Zhang, Y. 2007. Phenolic antioxidants from the whole plant of ***Phyllanthus urinaria***. *Chemistry & Biodiversity*. 4(9):2246-2252.
- ❖ Yadav, N. P., Pal, A., Shanker, K., Bawankule, D. U. Gupta, A. K., Darokar, M. P.; Khanuja, S. P. 2008. Synergistic effect of silymarin and standardized extracto of ***Phyllanthus amarus*** againts CCl₄-induced hepatotoxicity in *Rattus norvegicus*.
- ❖ Yang, C. M., Cheng H. Y., Lin, T. C., Chiang L. C., Lin, C. C. 2005. Acetone, ethanol and methanol extracts of ***Phyllanthus urinaria*** inhibit HSV-2 infection in vitro. *Antiviral Res.* 67(1):24-30.
- ❖ Yang, C. M., Cheng H. Y., Lin, T. C., Chiang L. C., Lin, C. C. 2007. The in vitro activity of geraniin and 1,3,4,6-tetra-O-galloyl-beta-D-glucose isolated from ***Phyllanthus urinaria*** against herpes simples virus type 1 and type 2 infection. *J. Ethnopharmacol.* 110 (3):555-558.
- ❖ Yang, L., Jiang, J. G., Li, W. F., Chen, J., Wang, D. Y., Zhu, L. 2009. Optimun extraction process of polyphenols from the bark of ***Phyllanthus emblica* L.** based on the response surface methodology. *J. Sep Sci.* 32(9):1437-44.
- ❖ Yoshida, T., Itoh, H., Matsunaga, S., Tanaka, R., Okuda, T. 1992. Tannins and related polyphenols of Euphorbiaceous plants. IX. Hydrolyzable tannins with C-glucose core from ***Phyllanthus flexuosus* Muell.** *Arg. Chem. Pharm. Bull.* 40:53- 60.
- ❖ Yu-Lin Huang, Chien-Chih Chen, Feng-Lin Hsu and Chieh-Fu Chen. 1998. Tannins, flavonol sulfonates, and a norlignan from ***Phyllanthus virgatus***. *J. Nat. Prod.* 61:1194-1197.
- ❖ Zapesochnaya, G. G., Ban'kovskii, A. I. 1966. Isolation of rutin from *cerasus pseudoprostrata*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii.* 2(3):215-216.
- ❖ Zhang, Y., Abe, T., Tanaka, T., Yang, C., Kouno, I. 2002. Two new acylated flavanone glycosides from the leaves and branches of ***Phyllanthus emblica***. *Chemical & pharmaceutical bulletin.* 50(6):841-843.

- ❖ Zhou Y., Yuan, F., Yang, L., Wang, N., Cai, L., Hu, H., Wu, Q. 2007. Research development on the chemical components of ***Phyllanthus urinaria L.*** *Medical Supplies Department*, PLA 123 Hospital, Bengbu, Anhui, Peop. Rep. China. Yaoxue Shijian.

ANEXOS



ANEXO 1.

PROPUESTA DE NORMA DE CONTROL DE LA CALIDAD PARA EL MATERIAL VEGETAL DE *Phyllanthus orbicularis* HBK

DROGA CRUDA. ESPECIFICACIONES

Se establecen los requisitos de calidad de hojas y tallos finos desecados de *Phyllanthus orbicularis* HBK.

1- Generalidades

Phyllanthus orbicularis HBK, conocida por el nombre trivial de Alegría pertenece a la familia *Phyllanthaceae*. Tiene demostrada farmacológicamente actividad antiviral contra los herpes simples tipo 1 y 2, hepatitis B, así como actividades antígenotóxica, antimutagénica y antioxidante.

2- Requisitos para el secado de la planta

Las hojas y tallos finos una vez lavados adecuadamente con agua potable y escurridos al aire, se secan a la estufa con recirculación de aire a una temperatura no mayor de 45°C durante 84 horas.

3- Requisitos de calidad

3.1. Descripción

Macromorfología de las hojas y tallos:

Las hojas son de color verde rojizo, cortamente pecioladas, penninervias, de consistencia coreácea, abovada-elípticas, borde ondulado, de ápide redondeado y base acorazonada-obtusa. Para el ancho de las hojas el valor medio es de $0,71 \pm 0,01$ cm con límites de tolerancia de 0,66-0,75 y para el largo $0,76 \pm 0,02$ cm con límites de tolerancia de 0,67-0,84.

Los tallos son de consistencia leñosa, cilíndricos, de superficie externa verde rojiza, rugosa con estrías y la superficie interna de color crema, fibrosa y con pequeñas estrías.

Micromorfología

A nivel de vista superficial la epidermis abaxial está conformada por células pentagonales de tamaño variable, se evidencian abundantes estomas del tipo

paracítico y el índice estomático de aproximadamente 14. La epidermis adaxial no presenta estomas y sus células son pentagonales, hexagonales y heptagonales de tamaño variable. La sección transversal del limbo presenta una epidermis adaxial de cutícula gruesa con pelos tectores pluricelulares, a continuación se encuentra el parénquima en empalizada constituido por células columnares alargadas muy unidas, después se aprecia el parénquima esponjoso con células de forma y tamaño variable con espacios intercelulares, finalmente se visualiza la epidermis abaxial de cutícula gruesa formada por dos estratos de células y escasos pelos pluricelulares. La nervadura de la hoja en su vista frontal es prominente, las venas primarias siguen un recorrido curvo con ramificaciones en varios sentidos y las venas secundarias ramificadas presentan diferentes ángulos de divergencias.

En las secciones transversales del tallo la epidermis tiene una cutícula gruesa con escasos pelos pluricelulares, se evidencia el colénquima de células pequeñas muy unidas, se observan los vasos leñosos y gran cantidad de radios medulares que convergen en una zona concéntrica de células esferoidales que se compactan constituyendo la médula o corazón del tallo. En las secciones longitudinales se evidenciaron los radios medulares y las traqueidas conformadas por células rectangulares.

Como componentes químicos se observa en ambos órganos gran cantidad de lignina con una coloración roja en la cutícula de la epidermis y en las células epidérmicas, el súber de color amarillo se localiza fundamentalmente en el tejido parenquimatoso de hojas y tallos, la celulosa y cutina de color azul se encuentran principalmente en la cutícula de la epidermis. Se detectaron taninos y flavonoides en los tejidos epidérmicos y parenquimatosos de ambos órganos vegetales.

La droga en polvo se presenta de color verde amarillenta, la evaluación micromorfológica muestra fragmentos de hojas donde se destaca una fuerte vascularización, se visualizan células epidérmicas, restos de traqueidas del sistema vascular, así como algunos pelos pluricelulares.

3.2. Requisitos organolépticos

- Materia orgánica extraña: no mayor del 0,1%
- Materia inorgánica extraña: no mayor del 0,1%

3.3. Requisitos físico-químicos

- Contenido de humedad: no mayor del 14%
- Contenido de sustancias solubles en agua: mayor del 2%
- Contenido de sustancias solubles en etanol al 50%: mayor del 7%
- Contenido de sustancias solubles en etanol al 90%: mayor del 7%
- Cenizas totales: no mayor del 3,5%
- Cenizas solubles en agua: no mayor del 2%
- Cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10%: no mayor del 1%
- Identificación cualitativa de marcadores: Presencia de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides
- Cuantificación de fenoles totales: mínimo 1%

3.4. Requisitos microbiológicos

- Aerobios totales: máx. 10^7
- Hongos: máx 10^3
- Enterobacterias: máx 10^4
- *E. coli*: máx 10^2
- Ausencia de patógenos

4. Condiciones de entrega

Se procede según lo establecido en la NRSP 310

5. Envase, etiquetado, embalaje y marcación

El material vegetal previamente fragmentado se puede envasar en bolsas de polietileno, latas compuestas o frascos de vidrio de color ámbar.

Para el resto de las indicaciones se procede según lo establecido en la NRSP 310

6. Inspección

Se procede según lo establecido en la NRSP 310

6.1. Orden de los métodos de ensayos

- Comprobación de los requisitos macromorfológicos
- Determinación de los requisitos micromorfológicos
- Determinación de los requisitos organolépticos
- Determinación de contaminación microbiana
- Determinación de humedad (Método azeotrópico)
- Determinación de sustancias solubles en agua (maceración con agitación en zaranda)
- Determinación de sustancias solubles en etanol al 50% (maceración con agitación en zaranda)
- Determinación de sustancias solubles en etanol al 90% (maceración con agitación en zaranda)
- Determinación del contenido de cenizas totales
- Determinación del contenido de cenizas solubles en agua
- Determinación del contenido de cenizas insolubles en HCl al 10%
- Determinación cualitativa de fenoles (FeCl_3) y flavonoides (ensayo de Shinoda)
- Determinación cuantitativa de fenoles totales (por espectrofotometría UV)

7. Métodos de ensayo

Para la determinación de los requisitos organolépticos y físico-químicos se procede según la NRSP 309.

Para el control microbiológico se procede según la metodología establecida por el CIDEM (1992) y la WHO (1998).

8. Transportación, manipulación, almacenamiento y conservación

Se procede según lo establecido en la NRSP 310

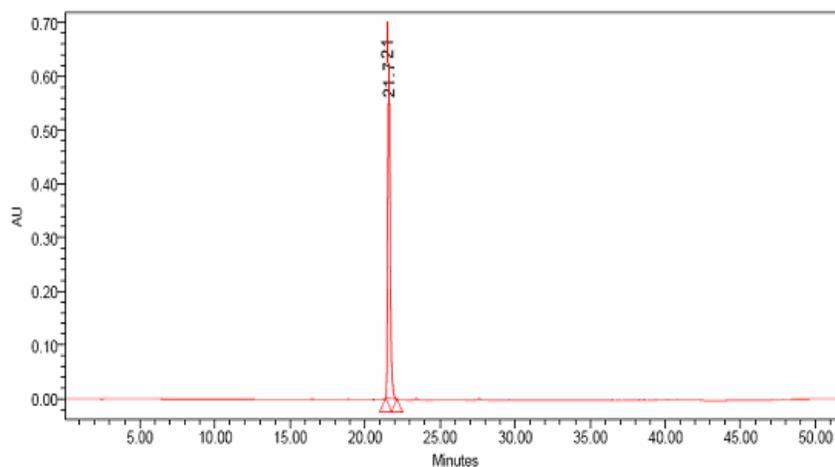
9. Garantía del productor

El producto se garantiza por un plazo de 12 meses a partir de la fecha de procesado, cumpliendo los requisitos que se establecen en la presente propuesta de norma.

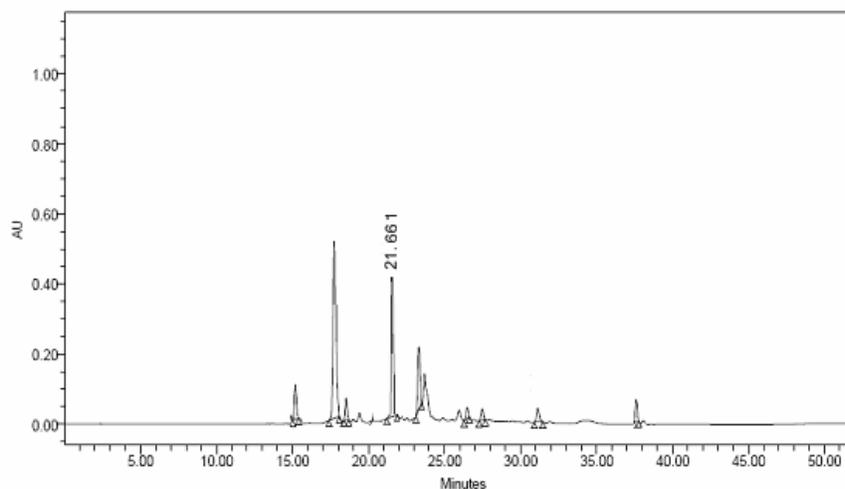
10. Referencias

- NRSP 309. 1992. Medicamentos de origen vegetal. Droga cruda. Métodos de ensayo. MINSAP. 16-20.
- NRSP 310. 1992. Medicamentos de origen vegetal. Especificaciones generales. MINSAP.
- CIDEM. 1992. Técnica # 2. Control Microbiológico de drogas secas. Control técnico.
- WHO. 1998 World Health Organization. Quality Control Methods for Medicinal Plants material. Geneva.

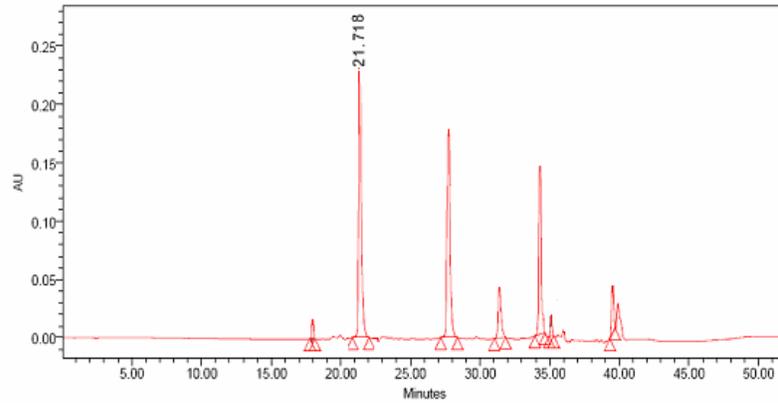
Anexo 2.
Cromatogramas obtenidos por CLAR en la determinación cualitativa del flavonoide rutina



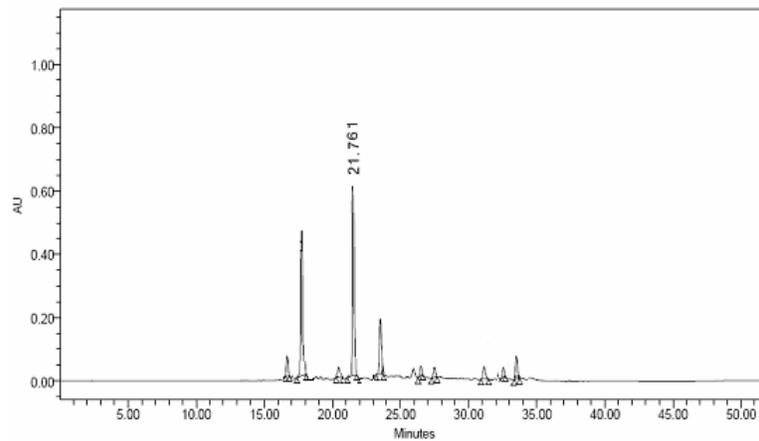
Anexo 2.1. Cromatograma del patrón rutina



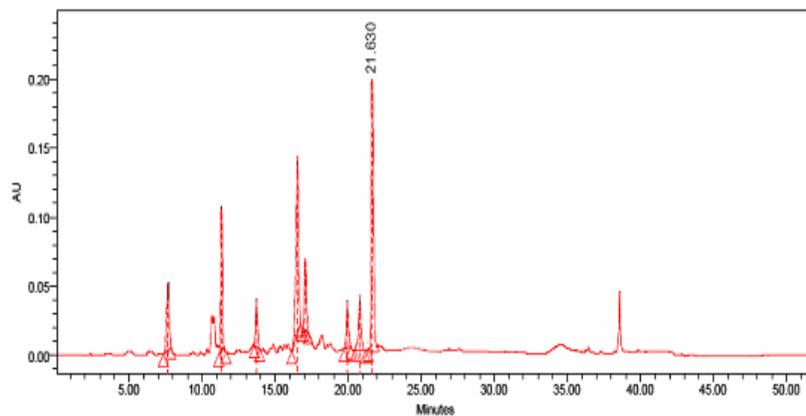
Anexo 2.2. Cromatograma de la determinación cualitativa de rutina en la muestra de Marzo/07



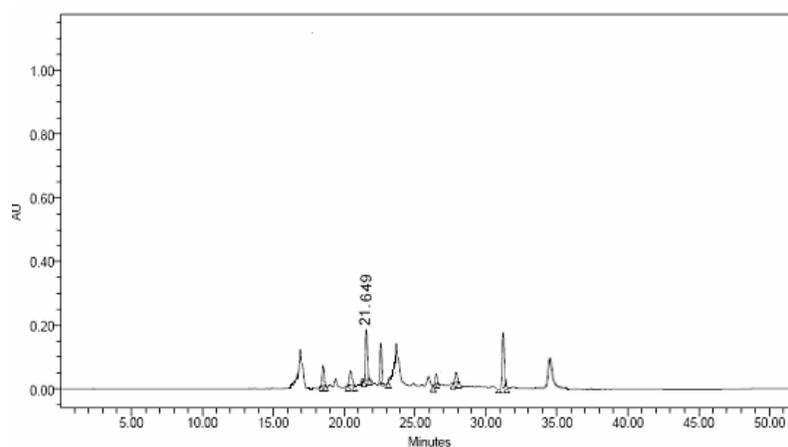
Anexo 2.3. Cromatograma de la determinación cualitativa de rutina en la muestra de Mayo/07



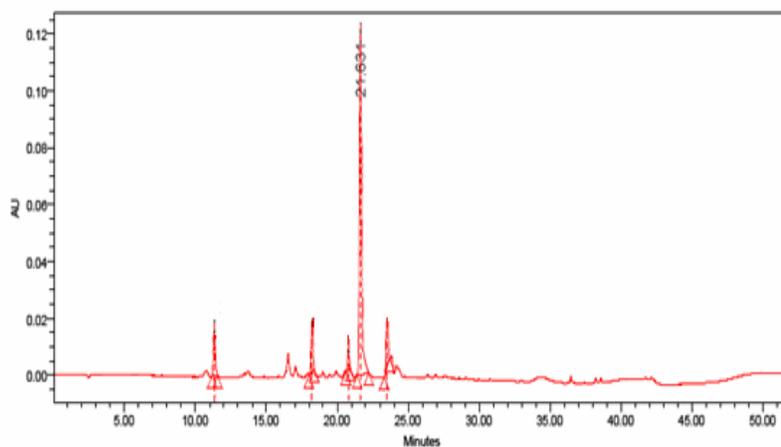
Anexo 2.4. Cromatograma de la determinación cualitativa de rutina en la muestra de Agosto/07



Anexo 2.5. Cromatograma de la determinación cualitativa de rutina en la muestra de Octubre/07

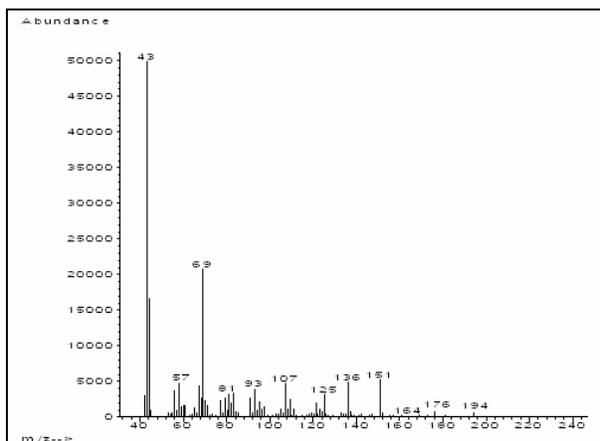


Anexo 2.6. Cromatograma de la determinación cualitativa de rutina en la muestra de Diciembre/07

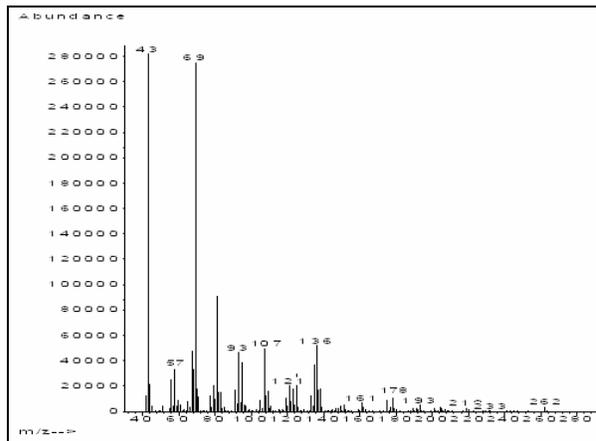


Anexo 2.7. Cromatograma de la determinación cualitativa de rutina en la muestra de Enero/08

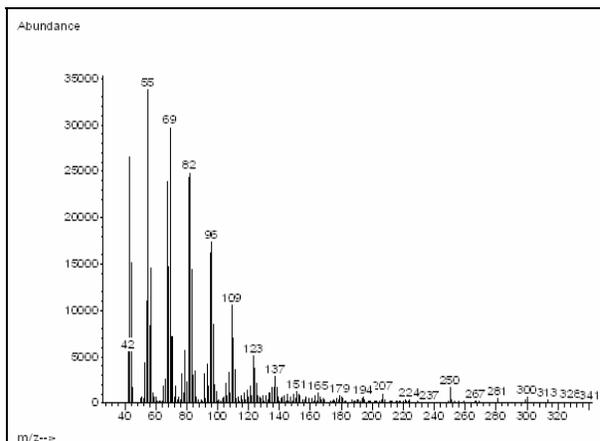
ANEXO 3. Espectros de masas de los compuestos identificados en el extracto hexánico de Marzo/07



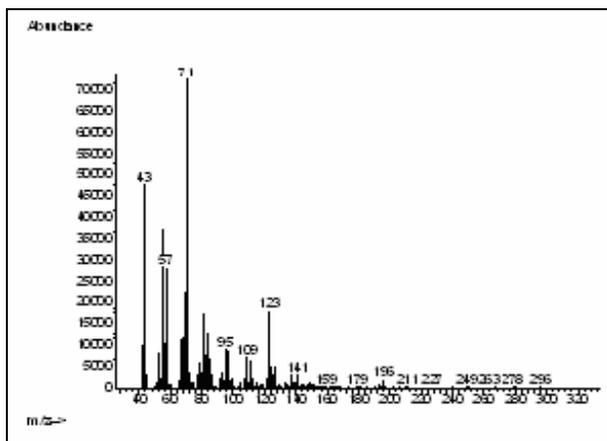
Anexo 3.1. Espectro de masas de 6,10 dimetil-5,9-undecadien-2-ona



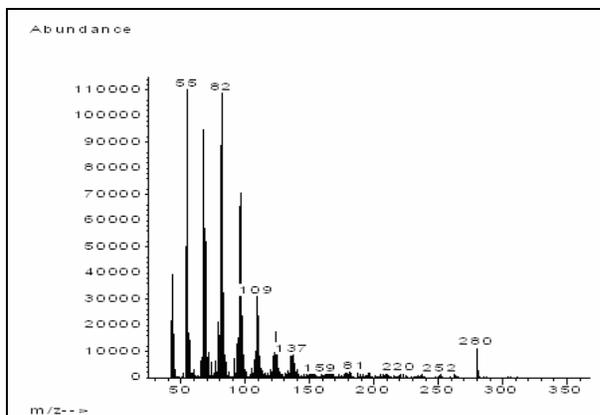
Anexo 3.2. Espectro de masas de 6,10,14- trimetil-5,9,13-pentadecatrien-2-ona



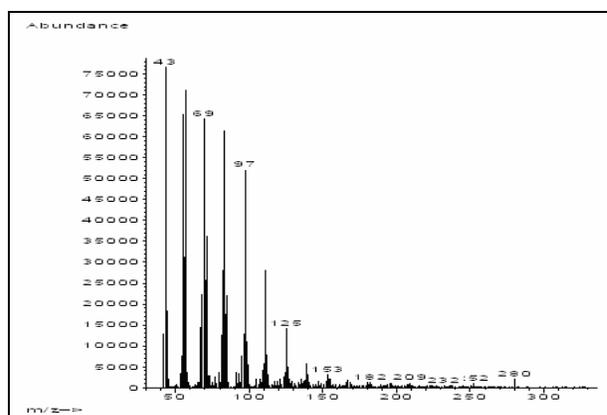
Anexo 3.3. Espectro de masas del 9-octadecenol



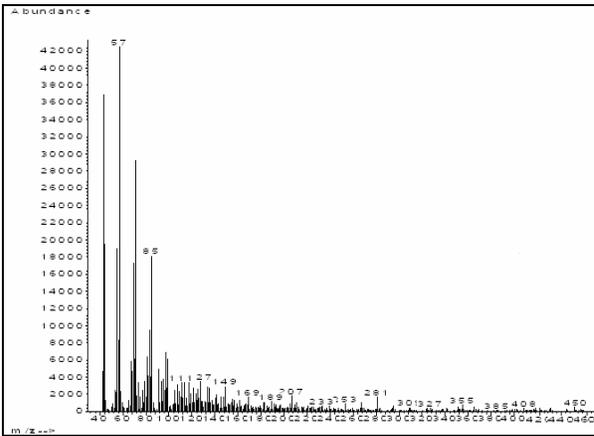
Anexo 3.4. Espectro de masas del fitol



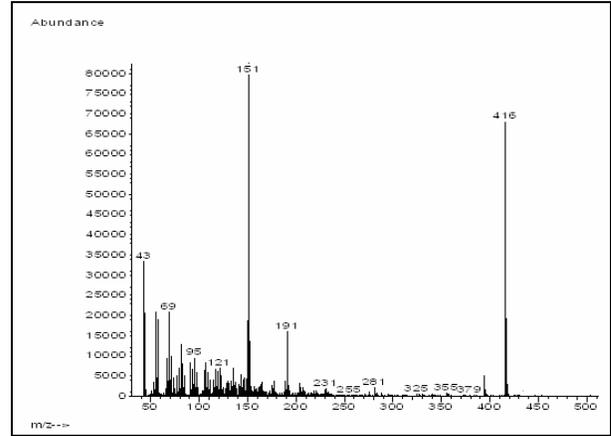
Anexo 3.5. Espectro de masas del ácido linoleico



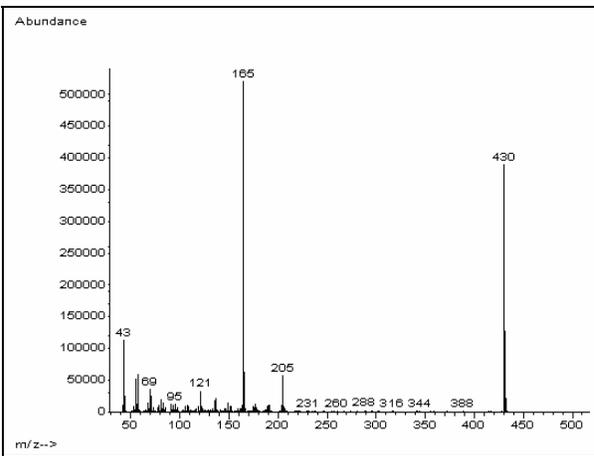
Anexo 3.6. Espectro de masas del 3-icoseno



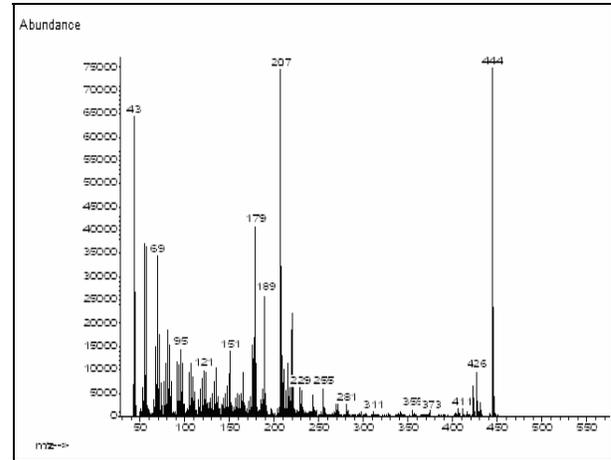
Anexo 3.7. Espectro de masas del triacontano



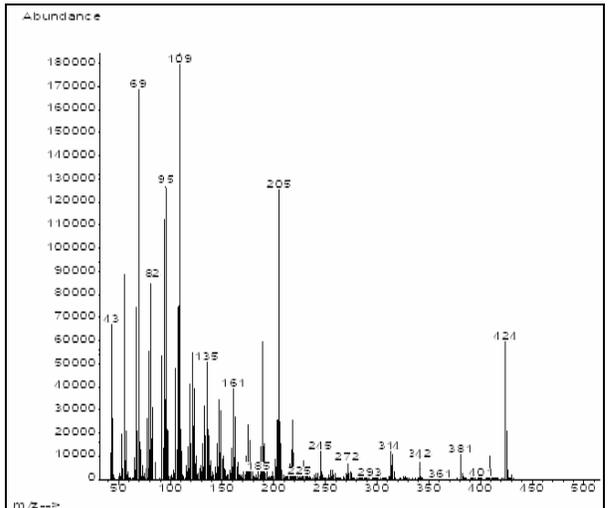
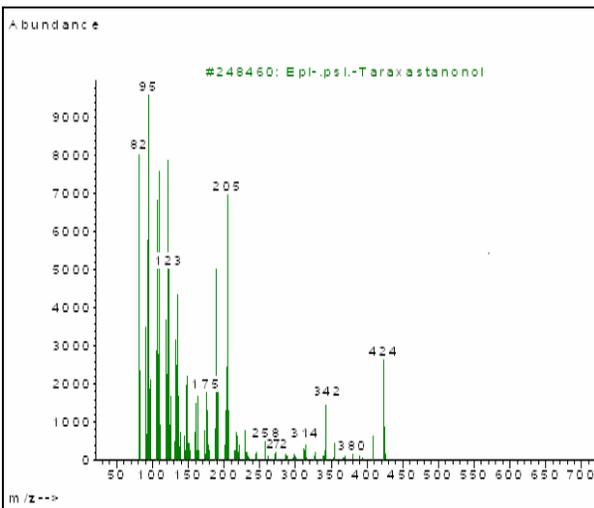
Anexo 3.8. Espectro de masas del γ -tocoferol



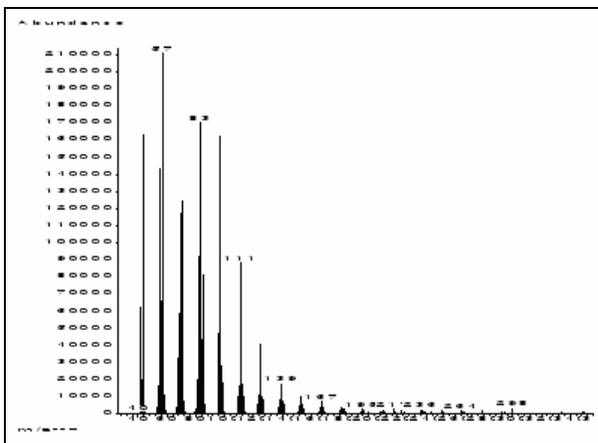
Anexo 3.9. Espectro de masas del α -tocoferol



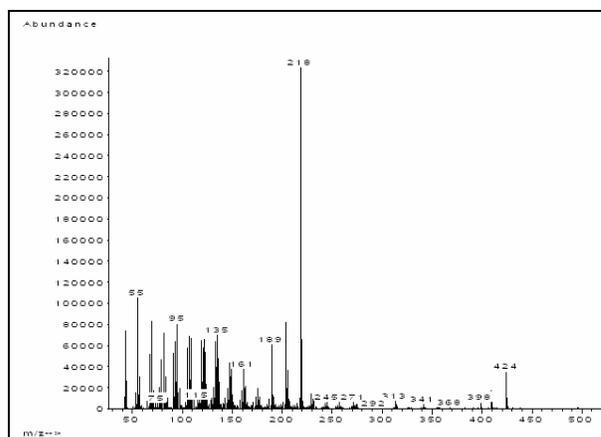
Anexo 3.10. Espectro de masas del derivado del taraxastanediol



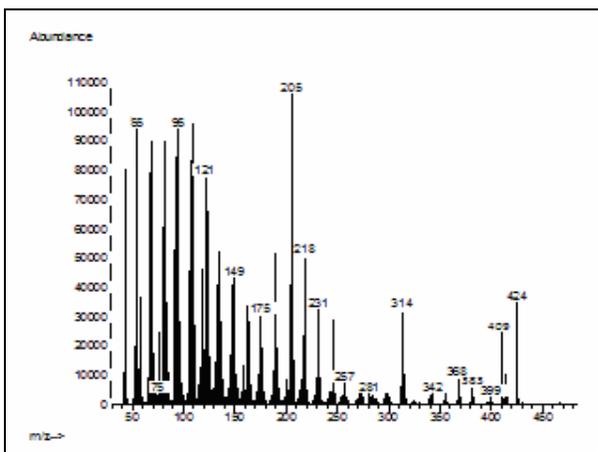
A **B**
 Anexo 3.11. Espectros de masas del epi- ψ -taraxastanonol (A) y su derivado (B)



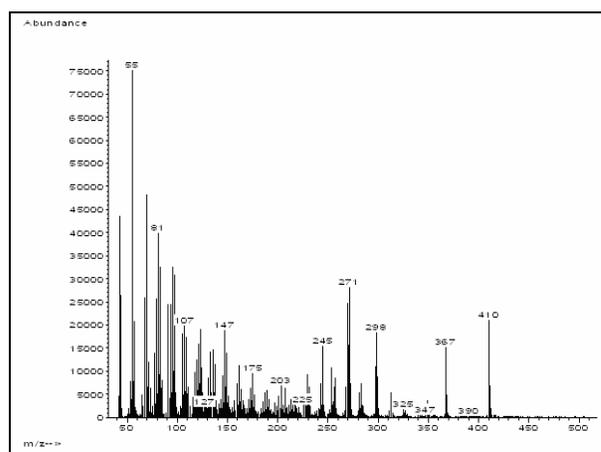
Anexo 3.12. Espectro de masas del 1- eicosanol



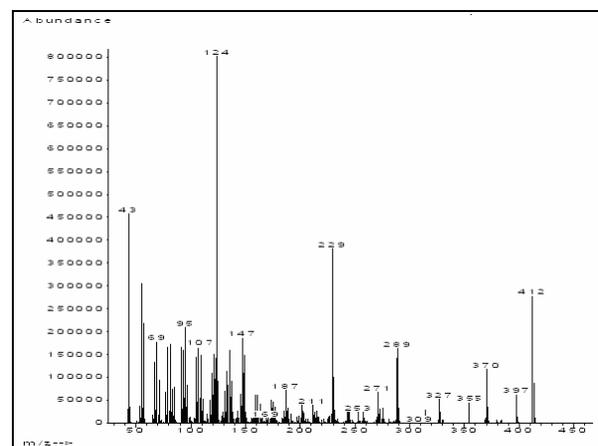
Anexo 3.13. 4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-octametil-1,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a, 14,14a, 14b-octadecahidro-2H-picen-3-ona



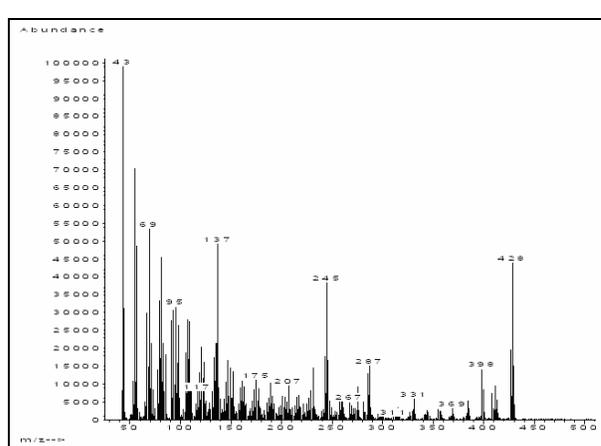
Anexo 3.14. Espectro de masas de la 20(29) lupen-3-ona



Anexo 3.15. Espectro de masas de la spinasterona

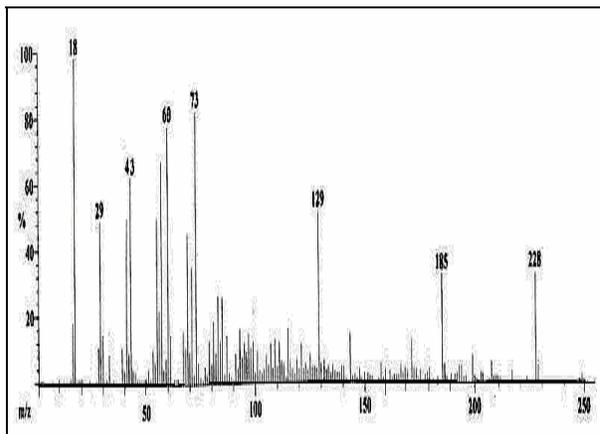


Anexo 3.16. Espectro de masas de la estigmast-4-en-3-ona

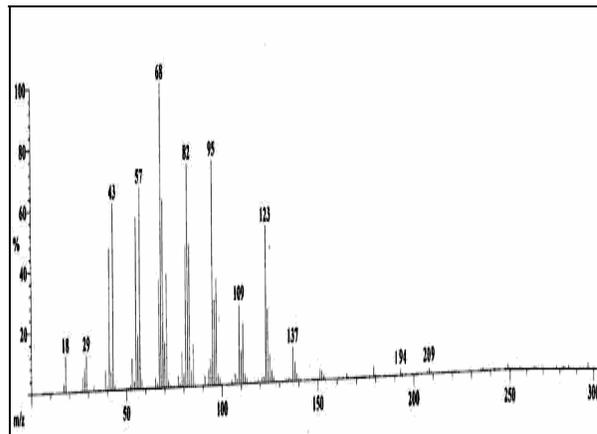


Anexo 3.17. Espectro de masas de la 5α-estigmastane-3,6-diona

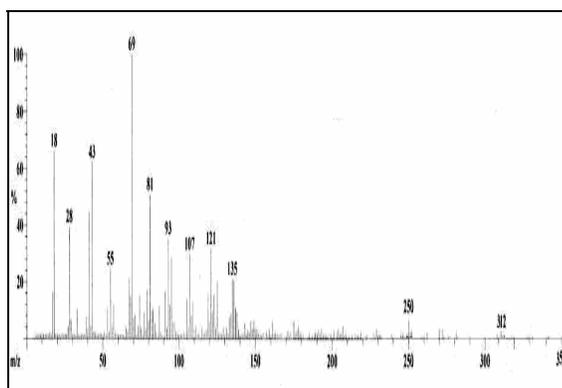
ANEXO 4. Espectros de masas de algunos compuestos identificados en los extractos hexánicos de Agosto/07 y Octubre/07



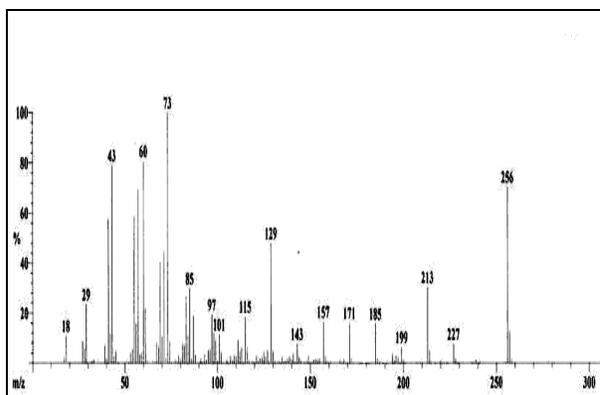
Anexo 4.1. Espectro de masas del ácido mirístico



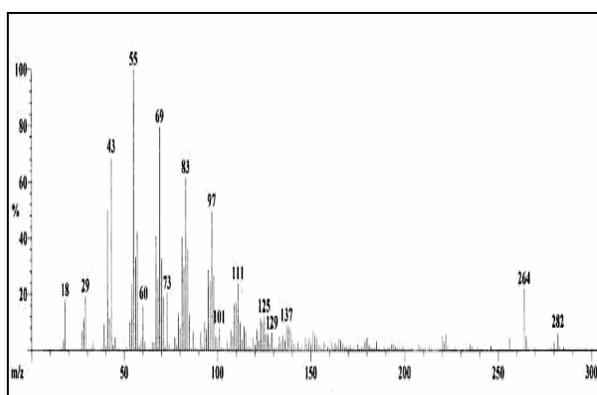
Anexo 4.2. Espectro de masas del 3, 7, 11, 15 tetrametil 2-hexadecen-1-ol



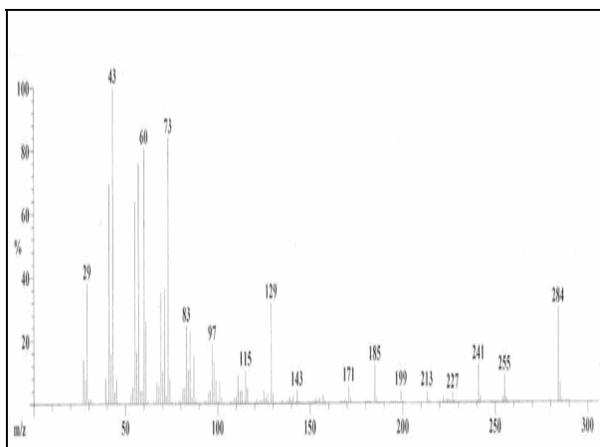
Anexo 4.3. Espectro de masas del 2-(9-octadeceniloxi) etanol



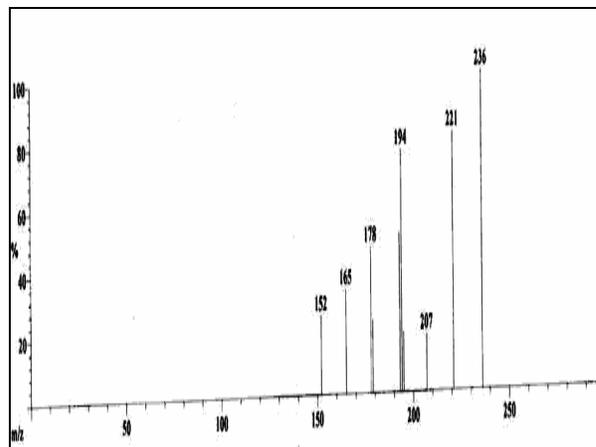
Anexo 4.4. Espectro de masas del ácido palmítico



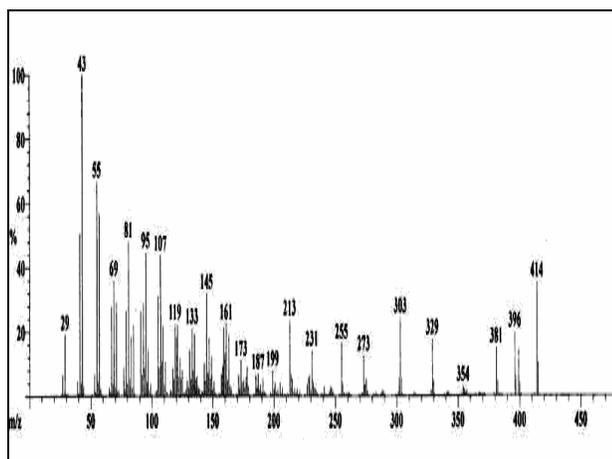
Anexo 4.5. Espectro de masas del ácido oleico



Anexo 4.6. Espectro de masas del ácido esteárico

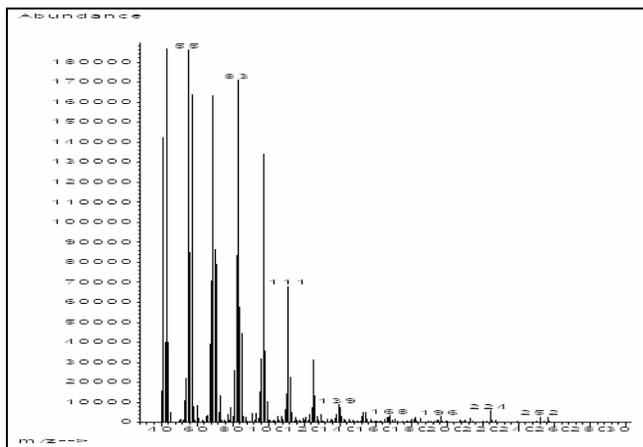


Anexo 4.7. Espectro de masas de la 9,10 dihidro-9,9 dimetil-11 H-ciclohepta (α) naftalen-11-ona

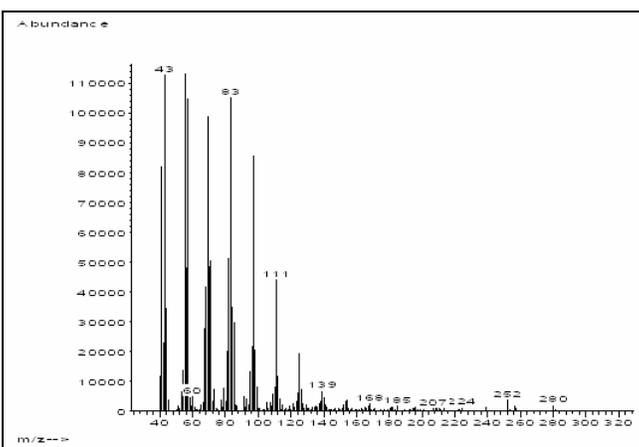


Anexo 4.8. Espectro de masas del γ-sitosterol

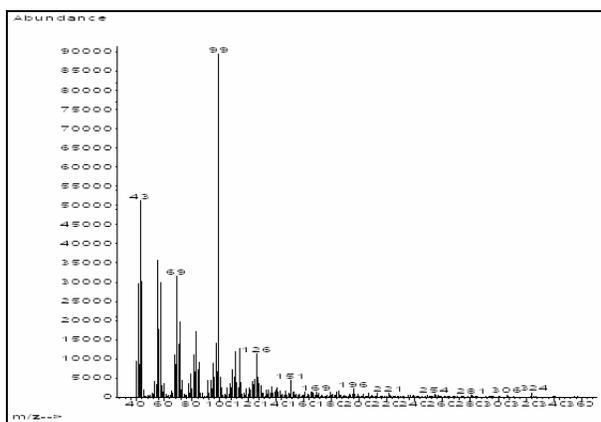
ANEXO 5. Espectros de masas de algunos compuestos identificados en el extracto hexánico de Enero/08



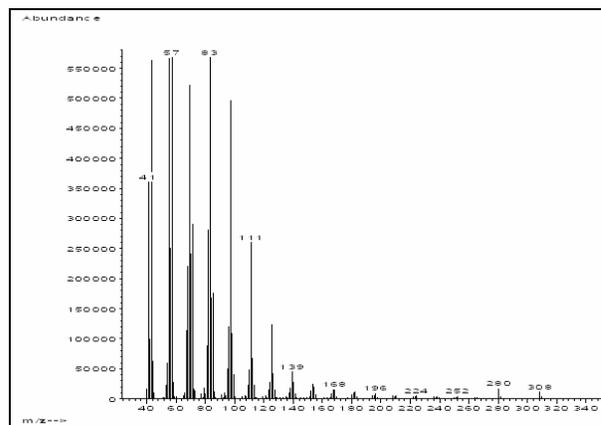
Anexo 5.1. Espectro de masas del 5-octadeceno



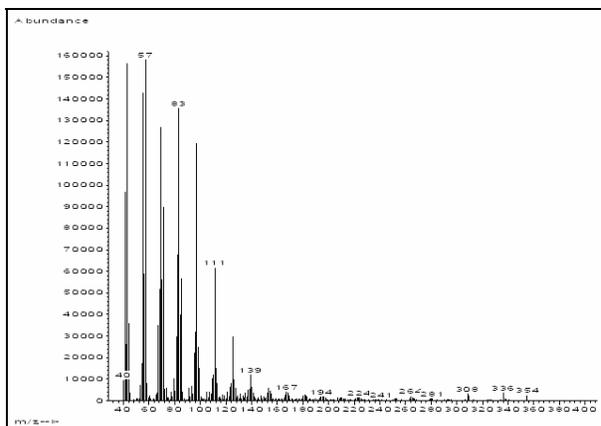
Anexo 5.2. Espectro de masas del 5-eicoseno



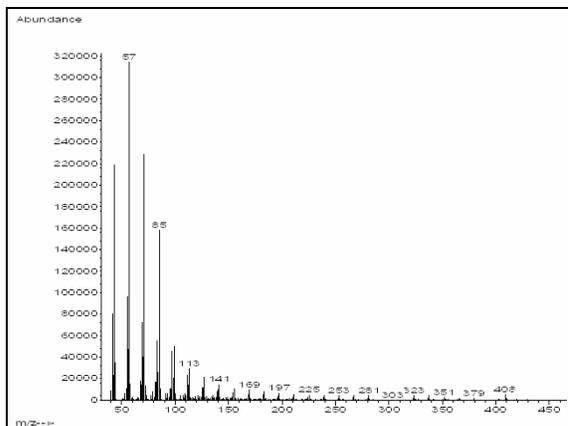
Anexo 5.3. Espectro de masas del 4, 8, 12, 16-tetrametilheptadecan-4-olido



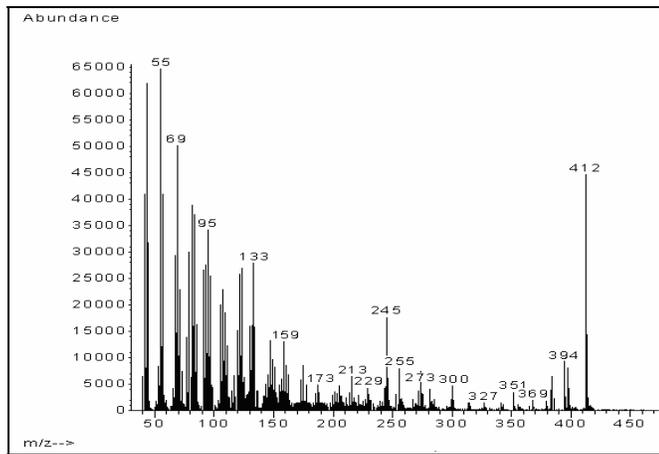
Anexo 5.4. Espectro de masas del 1-docoseno



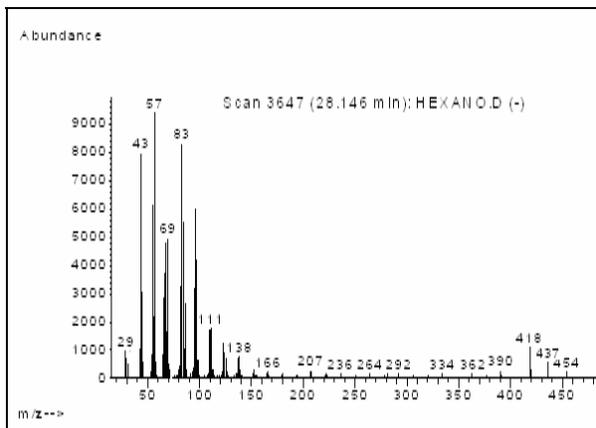
Anexo 5.5. Espectro de masas del 1-tetracosanol



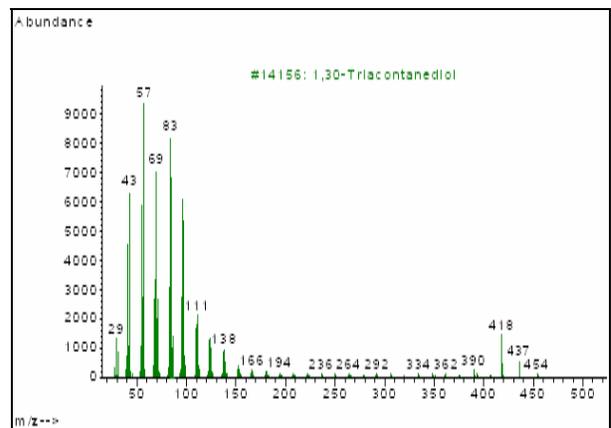
Anexo 5.6. Espectro de masas del nonacosano



Anexo 5.7. Espectro de masas del estigmasterol

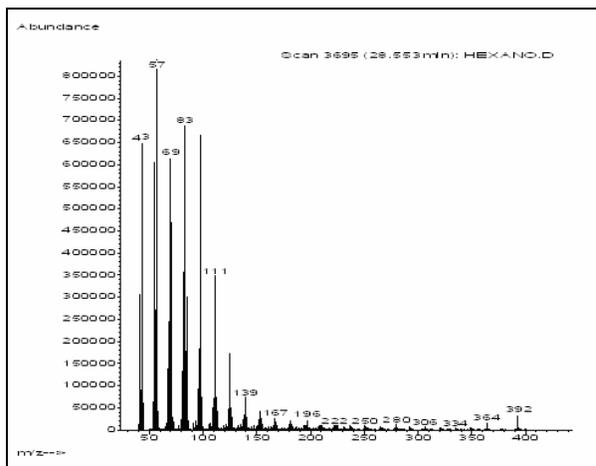


A

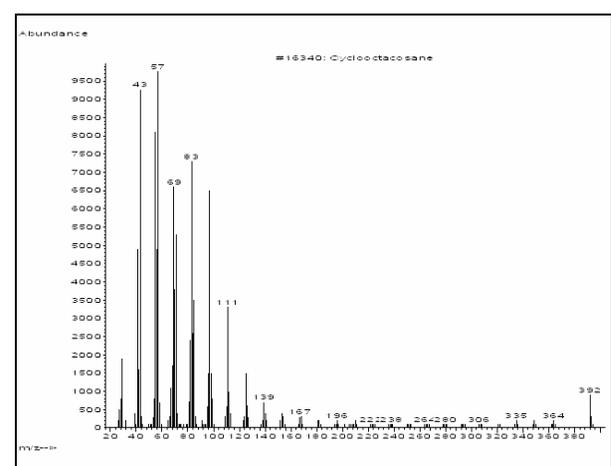


B

Anexo 5.8. Espectros de masas del 1,30-triacontanediol
A: Sugerido para el extracto, B: Ofrecido por la base de datos del equipo

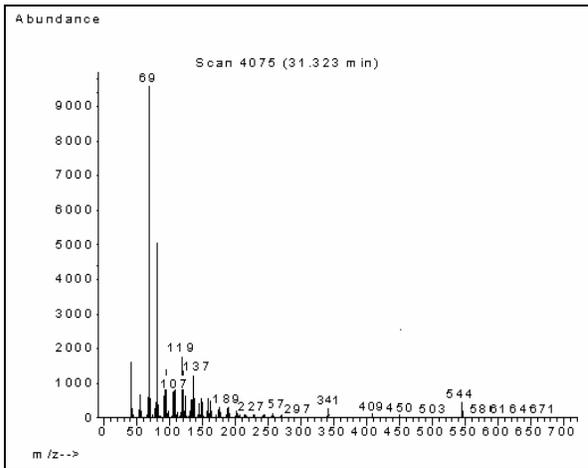
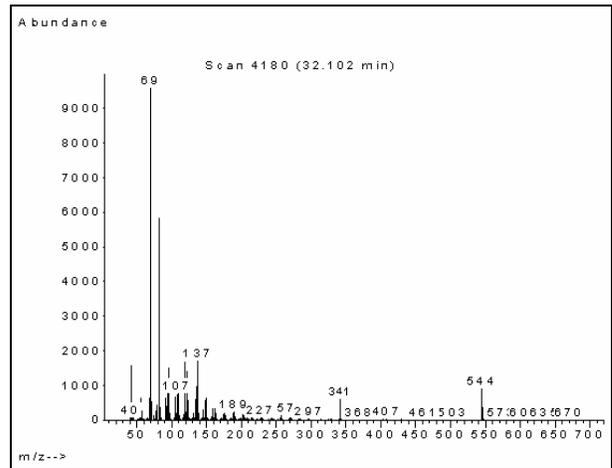
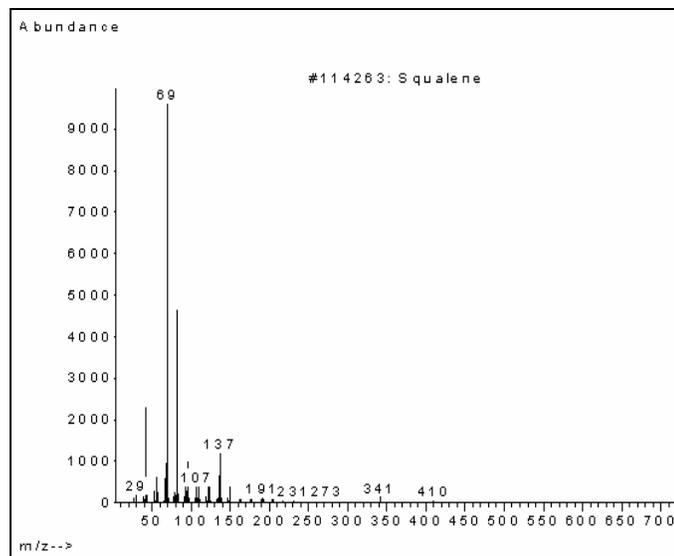


A



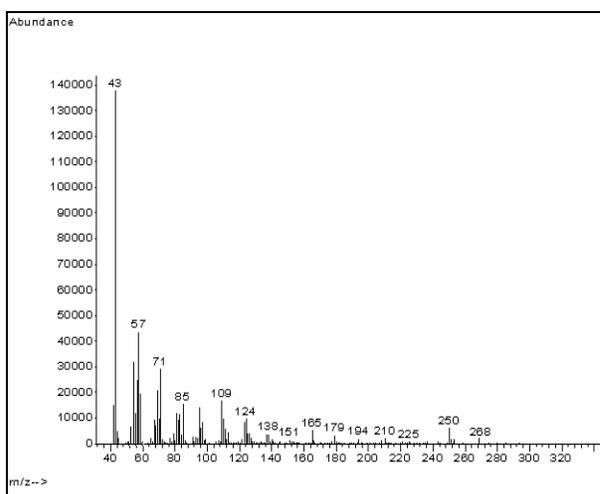
B

Anexo 5.9. Espectro de masas del ciclooctacosano
A: Sugerido para el extracto, B: Ofrecido por la base de datos del equipo

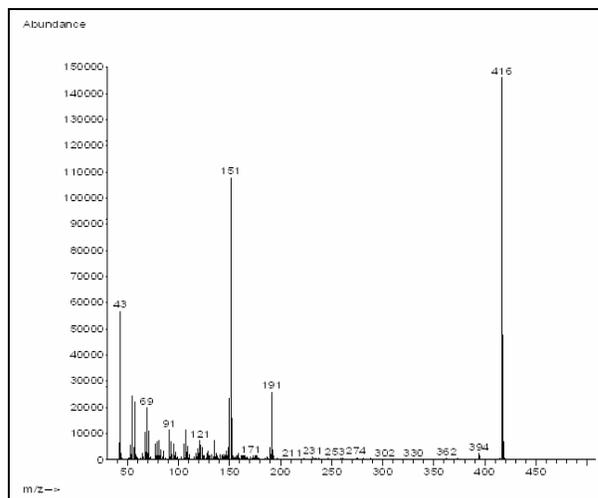
**A****B****escualeno**

Anexo 5.10. Espectros de masas de los compuestos A y B no identificados en el extracto hexánico de la colecta de Enero/08 y del escualeno

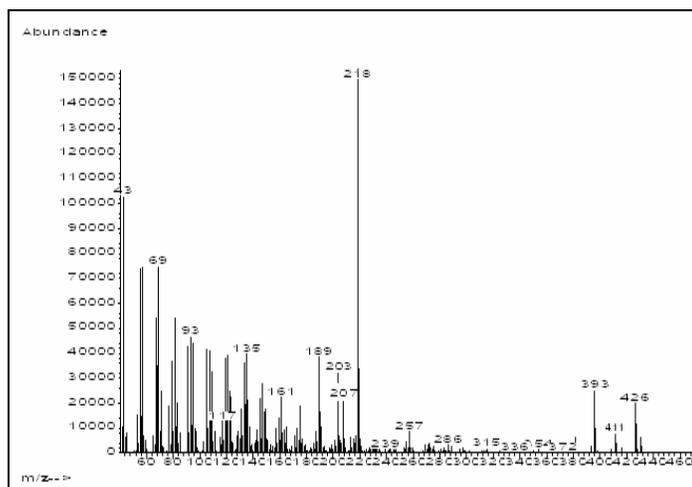
ANEXO 6. Espectros de masas de algunos compuestos identificados en el extracto AcOEt de Marzo/07



Anexo 6.1. Espectro de masas de 6,10,14- trimetil-2-pentadecanona

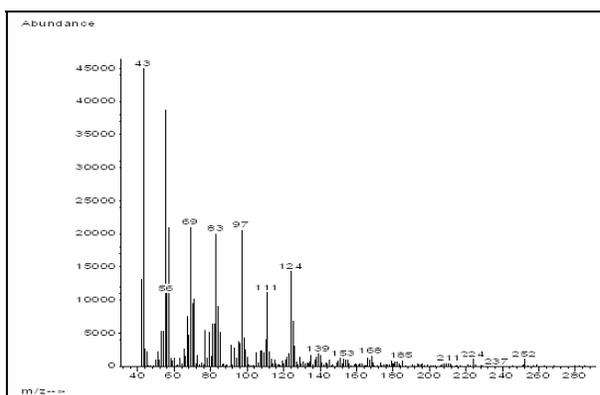


Anexo 6.2. Espectro de masas del β -tocoferol

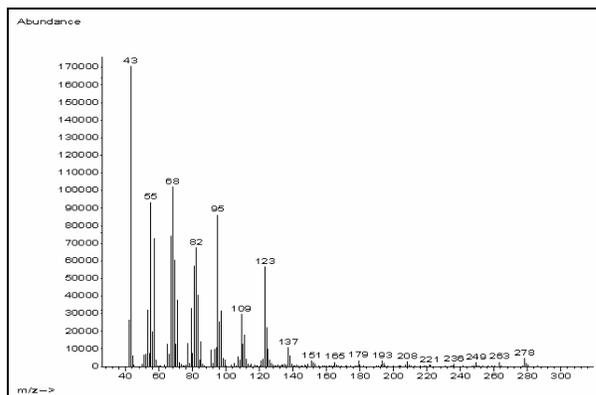


Anexo 6.3. Espectro de masas de la α -amirina

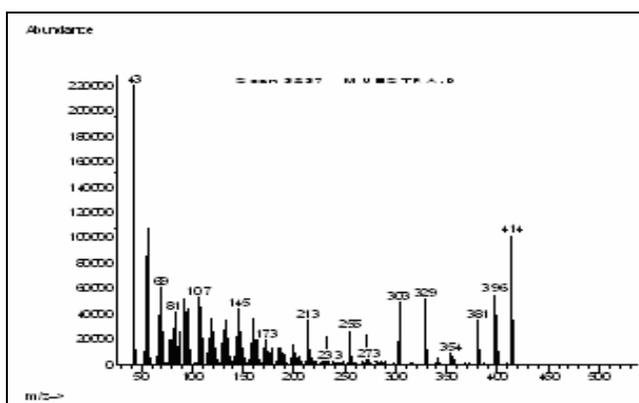
ANEXO 7. Espectros de masas de algunos compuestos identificados en el extracto AcOEt de Agosto/07



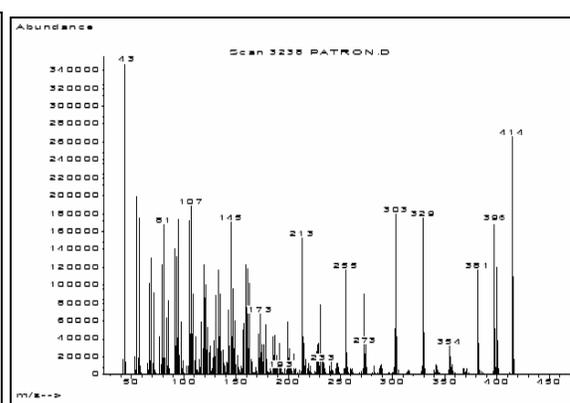
Anexo 7.1. Espectro de masas del 1-octadeceno



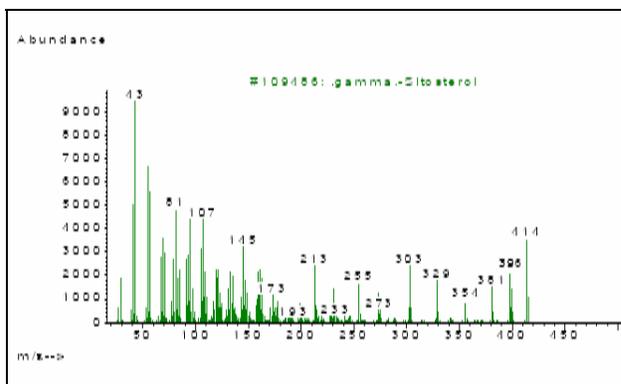
Anexo 7.2. Espectro de masas del neofitadieno



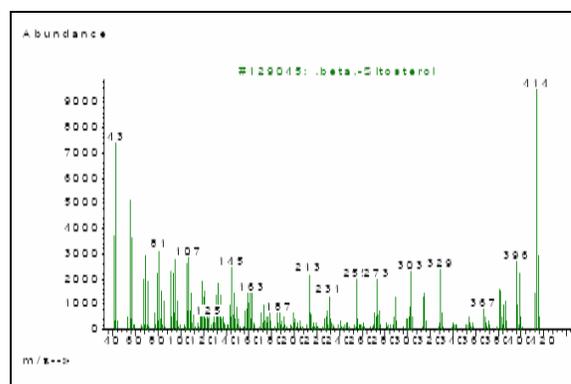
A



B



C

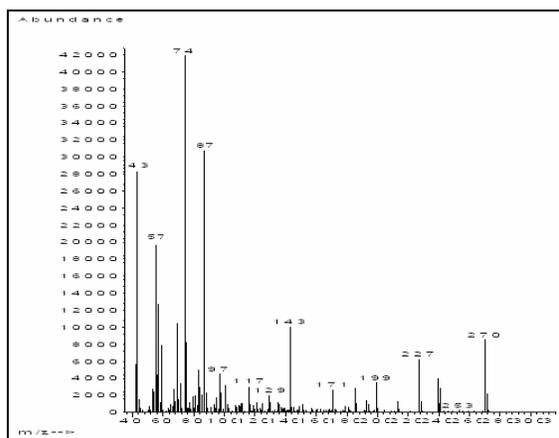


D

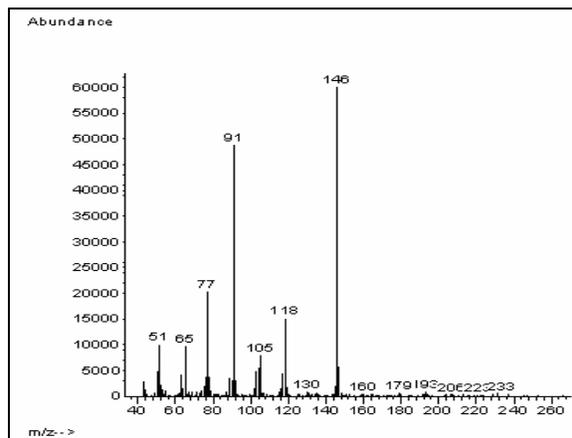
Anexo 7.3. Espectros de masas del sitosterol

A: Espectro de masas del γ -sitosterol identificado en la muestra (Extracto de AcOEt de Agosto/07); **B:** Espectro de masas del patrón de γ -sitosterol; **C:** Espectro de masas del γ -sitosterol de la base de datos del equipo; **D:** Espectro de masas del β -sitosterol de la base de datos del equipo

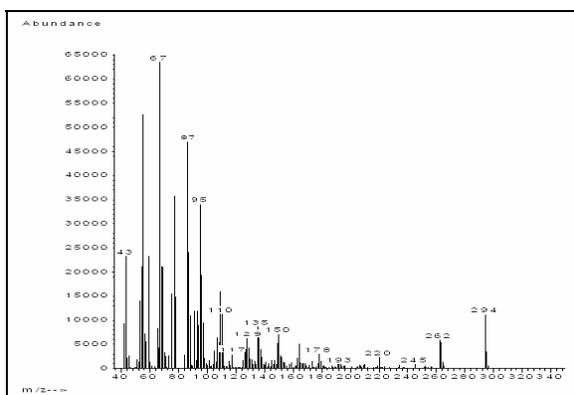
ANEXO 8. Espectros de masas de algunos compuestos identificados en el extracto AcOEt de Octubre/07



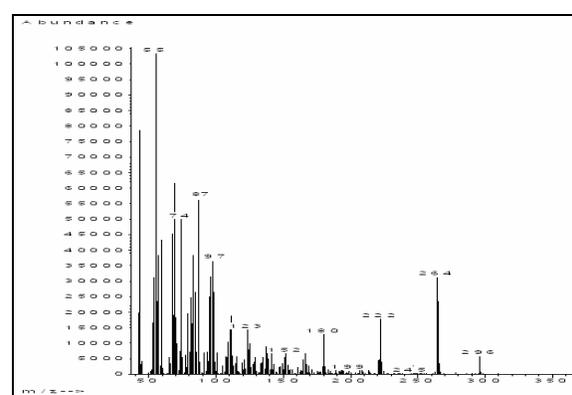
Anexo 8.1. Espectro de masas del palmitato de metilo



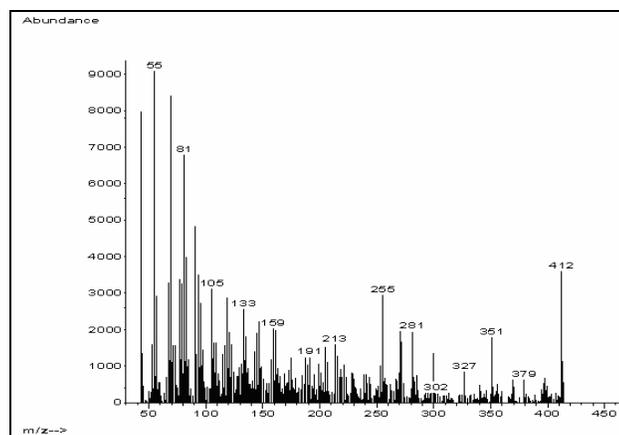
Anexo 8.2. Espectro de masas del ácido 4-oxazolecarboxílico-4,5-dihidro-2-fenil-1-metil etil éster



Anexo 8.3. Espectro de masas del linoleato de metilo

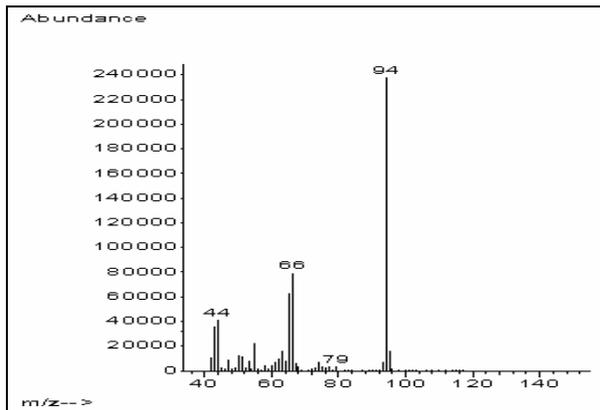


Anexo 8.4. Espectro de masas del oleato metilo

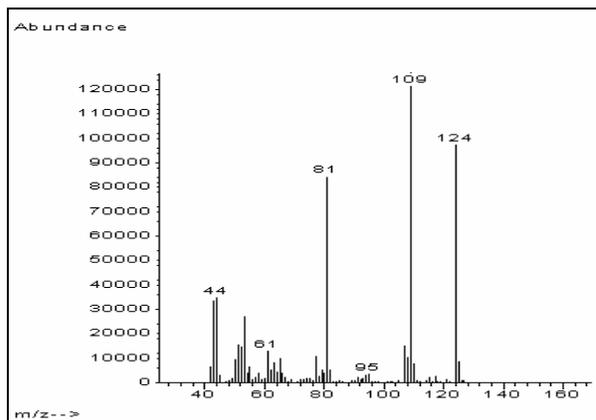


Anexo 8.5. Espectro de masas del estigmasta-5,22-dien-3-ol

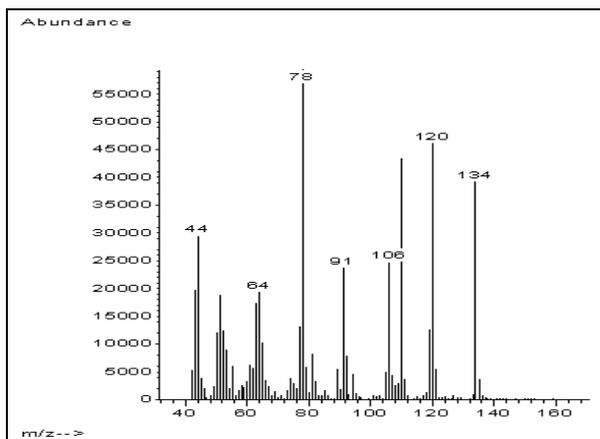
ANEXO 9. Espectros de masas de algunos compuestos identificados en el extracto AcOEt de Enero/08



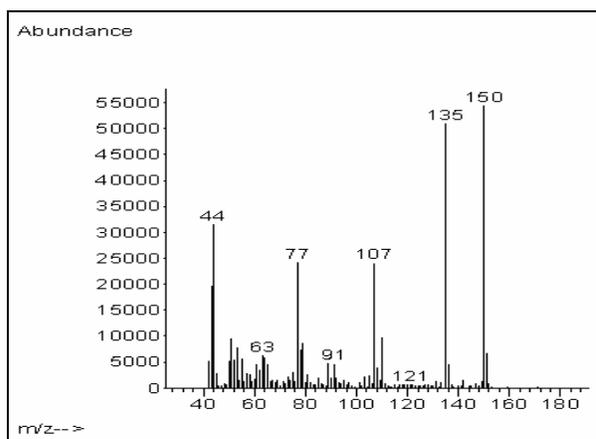
Anexo 9.1. Espectro de masas del fenol



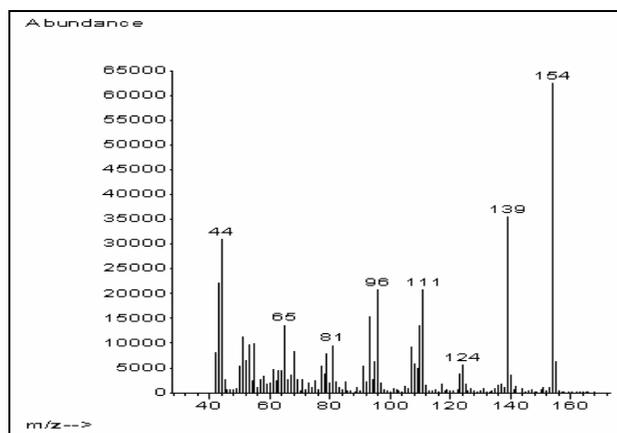
Anexo 9.2. Espectro de masas del 2-metoxi fenol



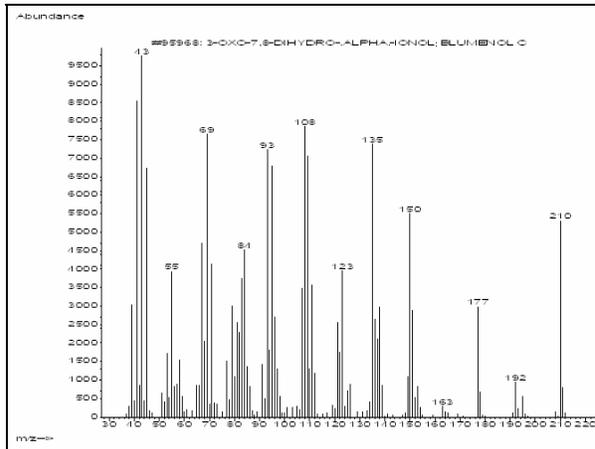
Anexo 9.3. Espectro de masas de la 2-coumaranona



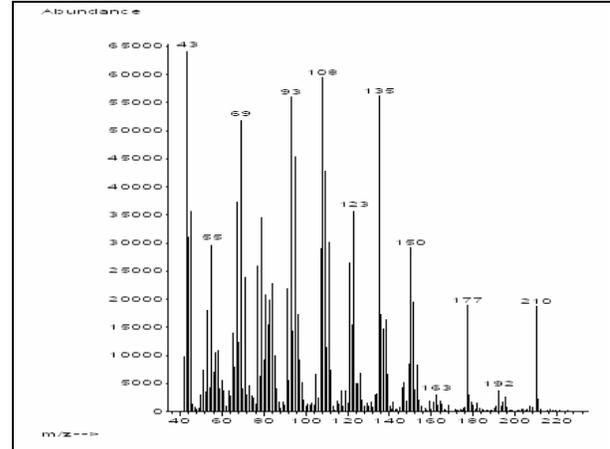
Anexo 9.4. Espectro de masas del 2-metoxi vinilfenol



Anexo 9.5. Espectro de masas del 2,5-dimetoxi fenol

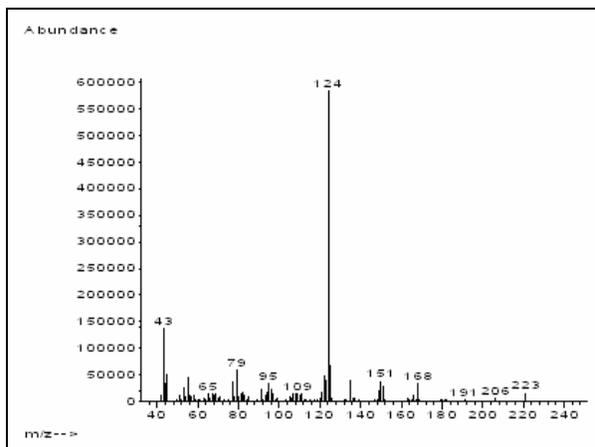


A

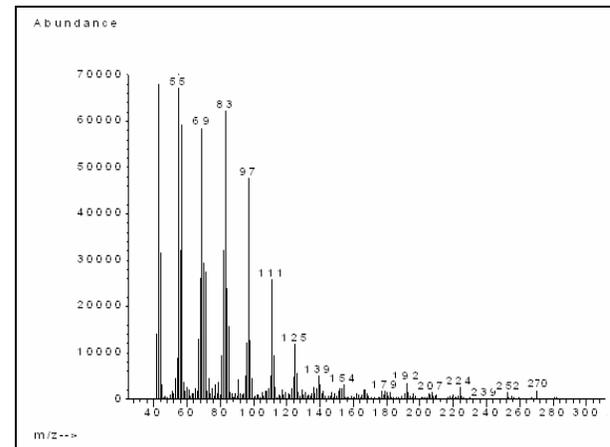


B

Anexo 9.6. Espectro de masas del blumenol C
A: Ofrecido por la base de datos del equipo, **B:** Sugerido para el extracto hexánico

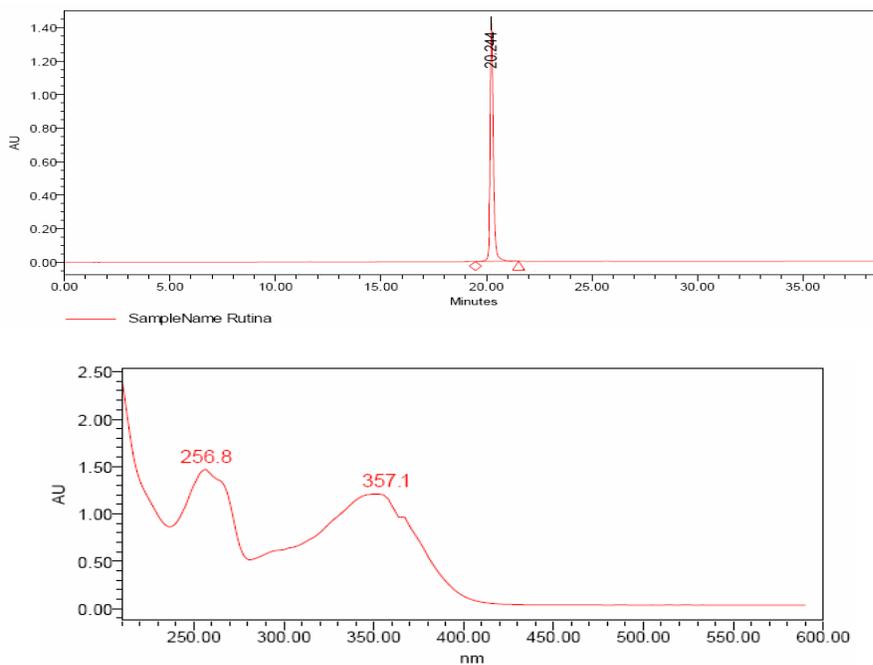


Anexo 9.7. Espectro de masas del vomifolol

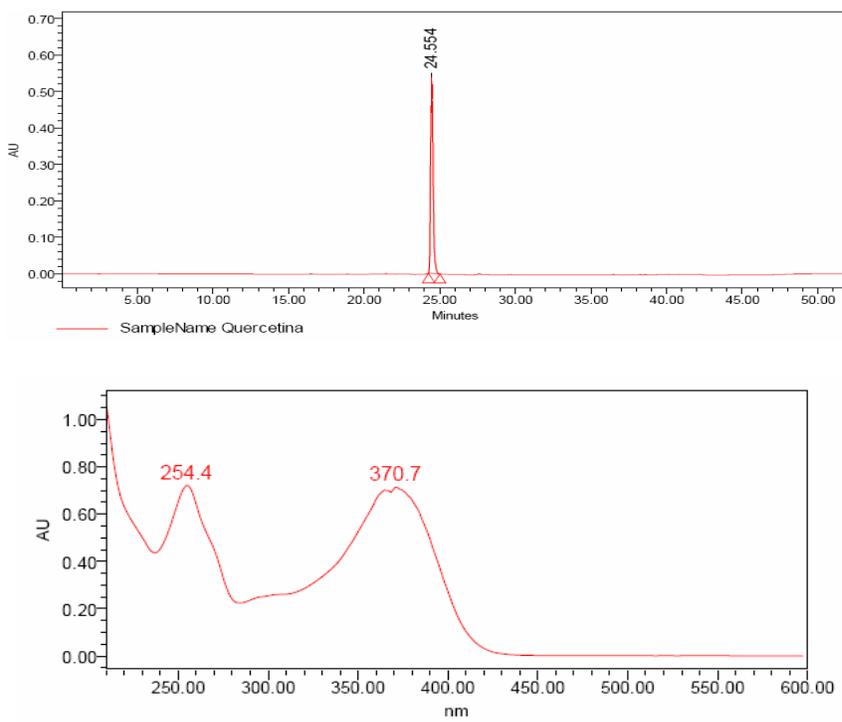


Anexo 9.8. Espectro de masas del 1-octadecanol

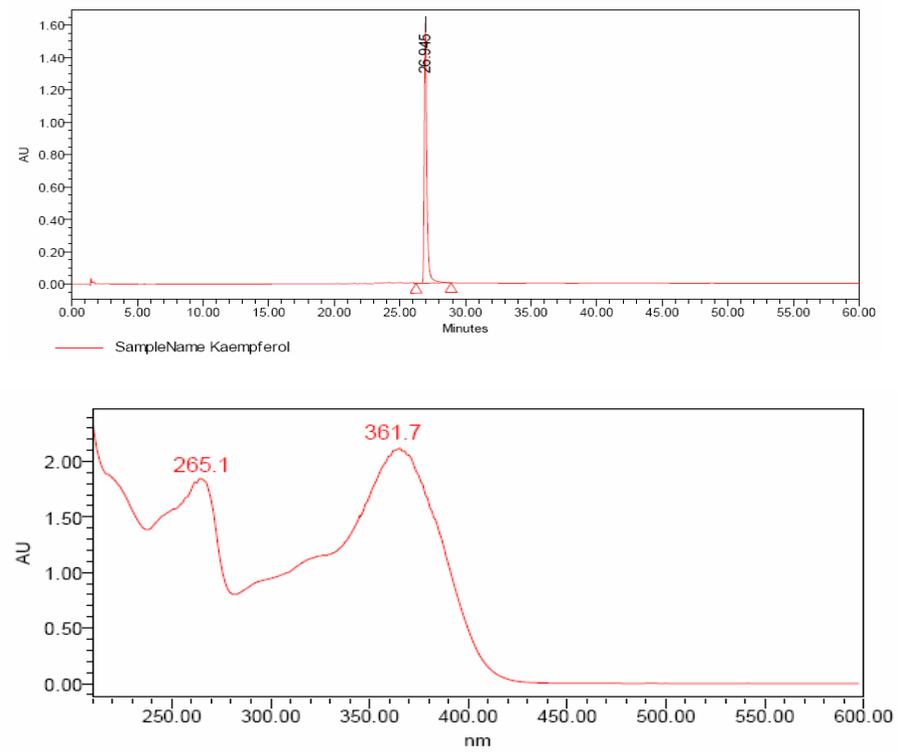
Anexo 10. Cromatogramas y espectros UV de los patrones ensayados en el análisis por CLAR



Anexo 10.1. Cromatograma de la rutina y su espectro UV

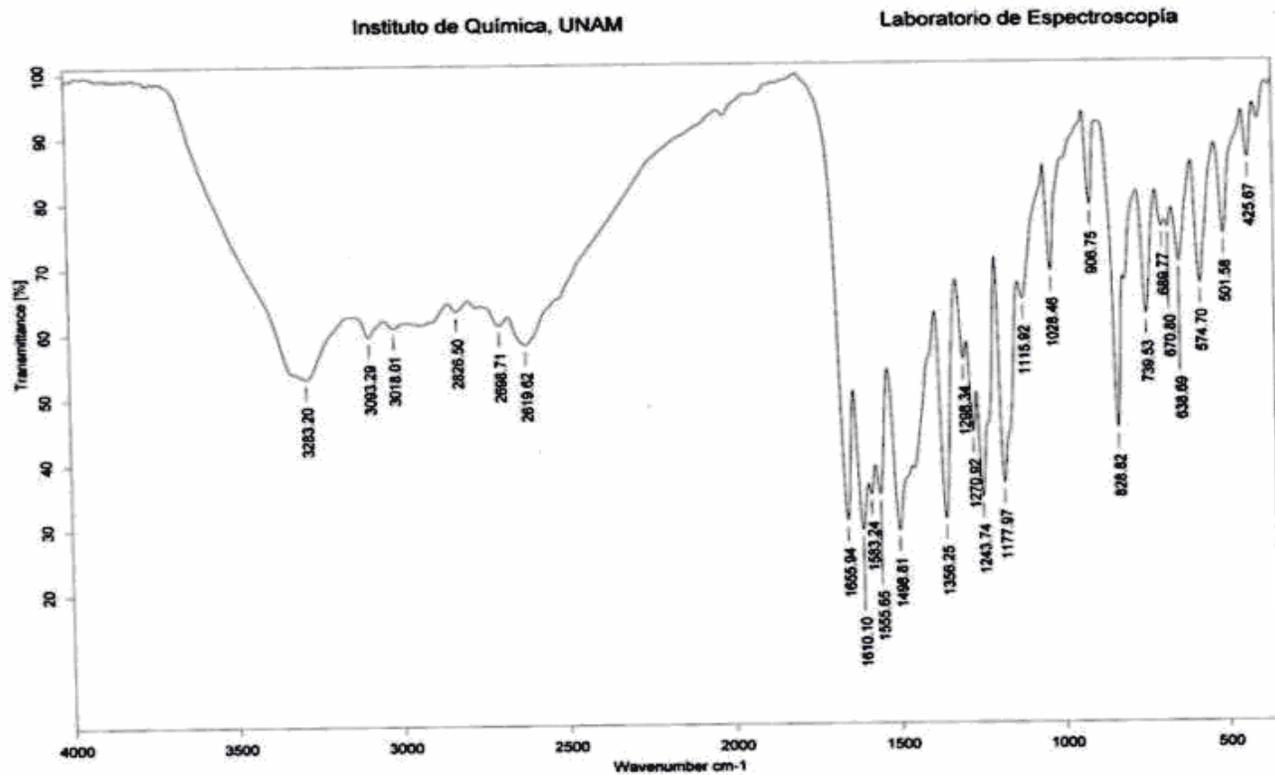
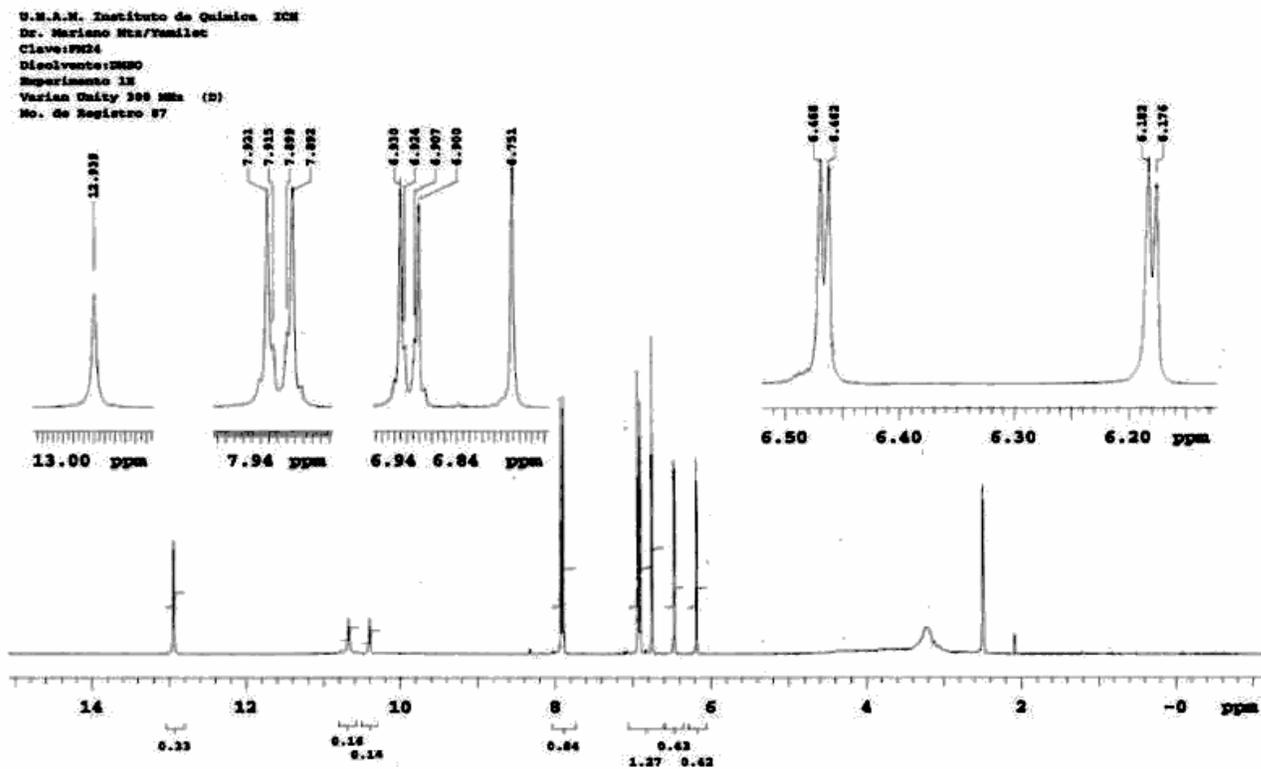


Anexo 10.2. Cromatograma de la quercetina y su espectro UV



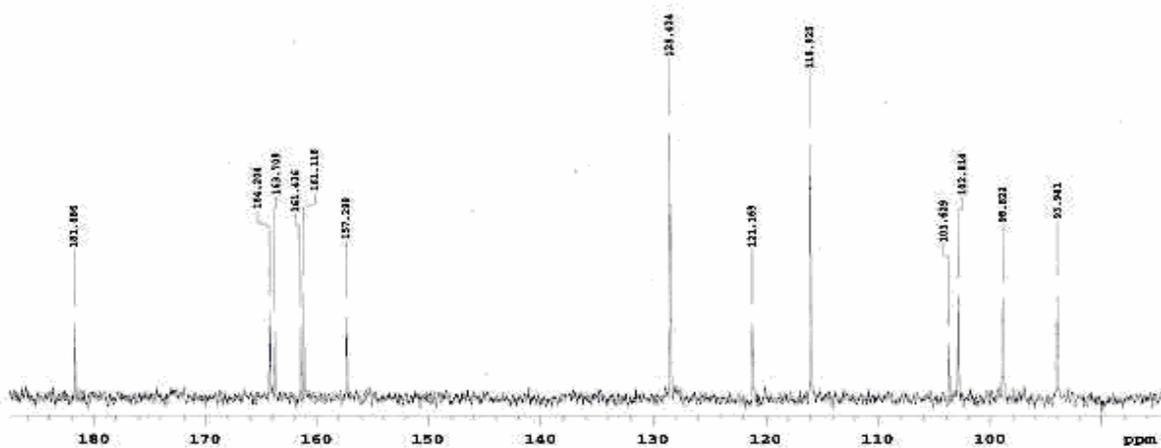
Anexo 10.3. Cromatograma y espectro UV del Kaempferol

Anexo 11. Espectro IR del compuesto 1

Anexo 12. Espectro RMN-¹H del compuesto 1

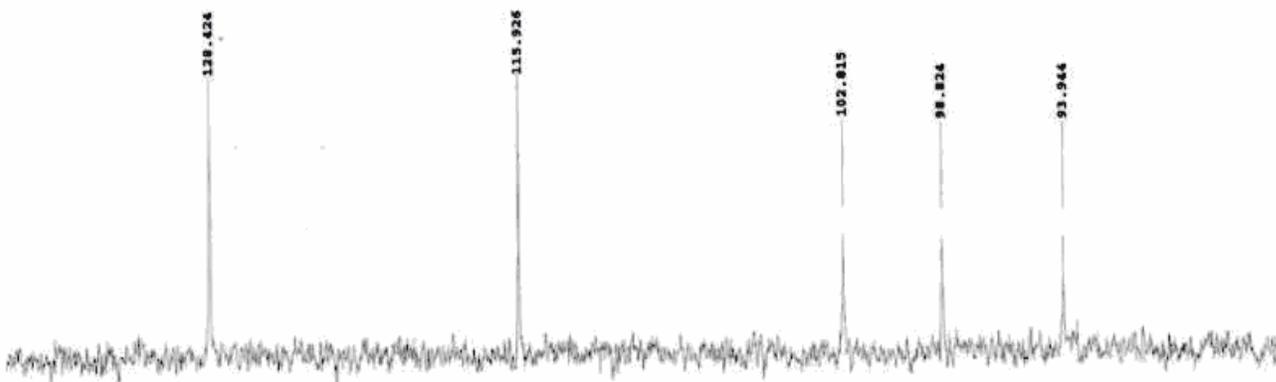
Anexo 13. Espectro RMN-¹³C del compuesto 1

U.N.A.M. Instituto de Química ICH
Dr. Mariano Mtz/Yanilet
Clave:FM24
Disolvente:DMSO
Experimento 13C
Varian Unity 75 MHz (D)
No. de Registro 87
26-01-10



Anexo 14. Experimento DEPT del compuesto 1

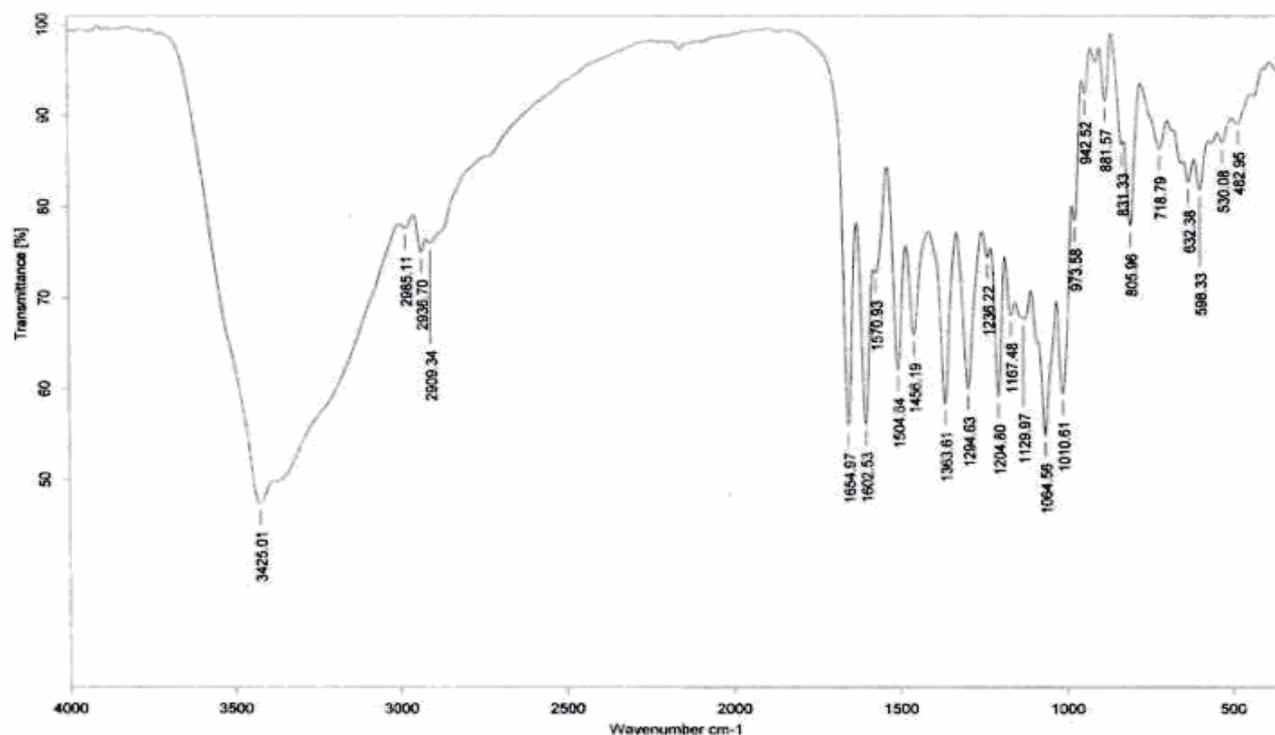
U.N.A.M. Instituto de Química ICH
Dr. Mariano Mtz/Yanilet
Clave:FM24
Disolvente:DMSO
Experimento DEPT
Varian Unity 75 MHz (D)
No. de Registro 87
26-01-10



Anexo 15. Espectro IR de los compuestos 2 y 4

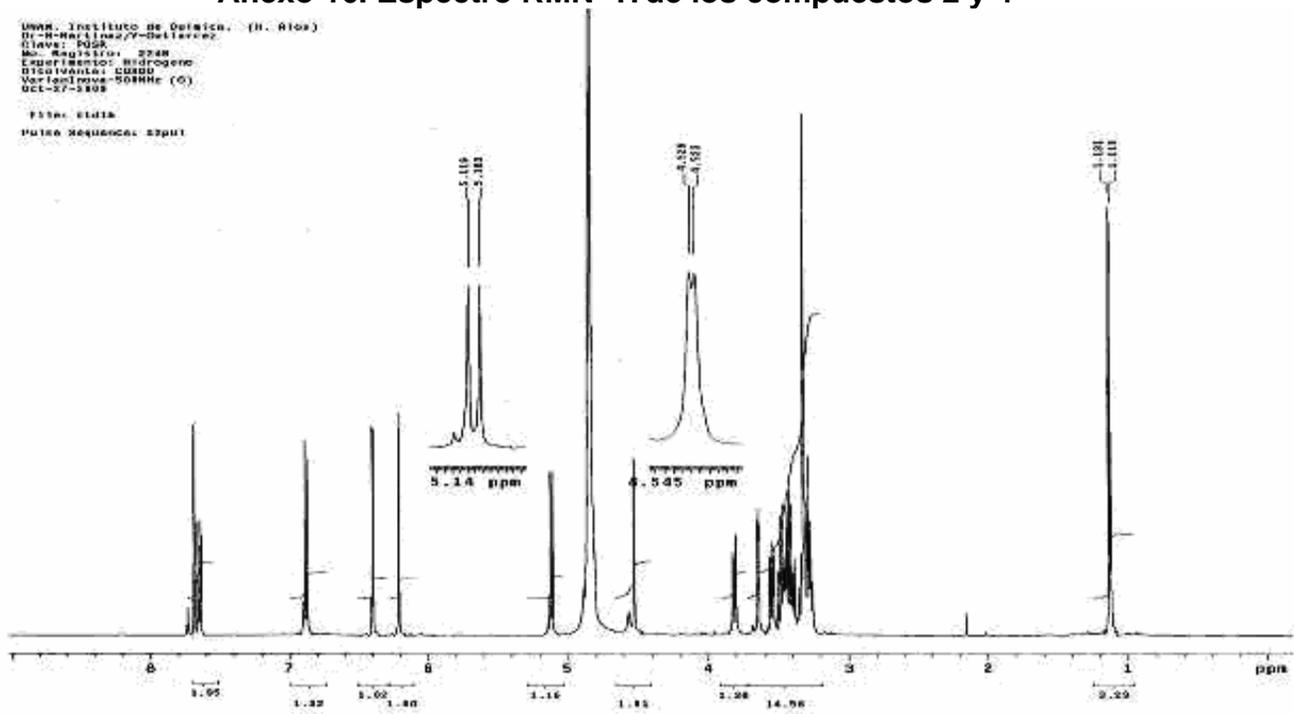
Instituto de Química, UNAM

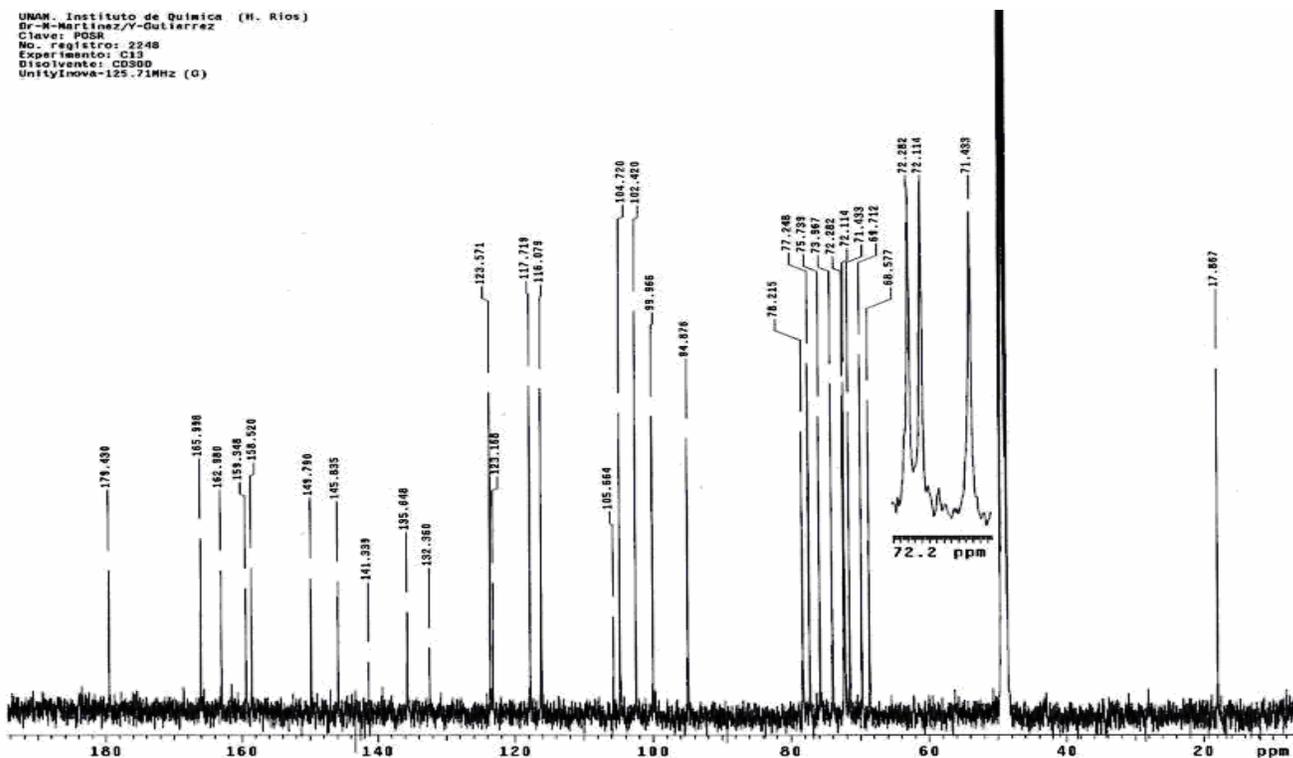
Laboratorio de Espectroscopía

Anexo 16. Espectro RMN-¹H de los compuestos 2 y 4

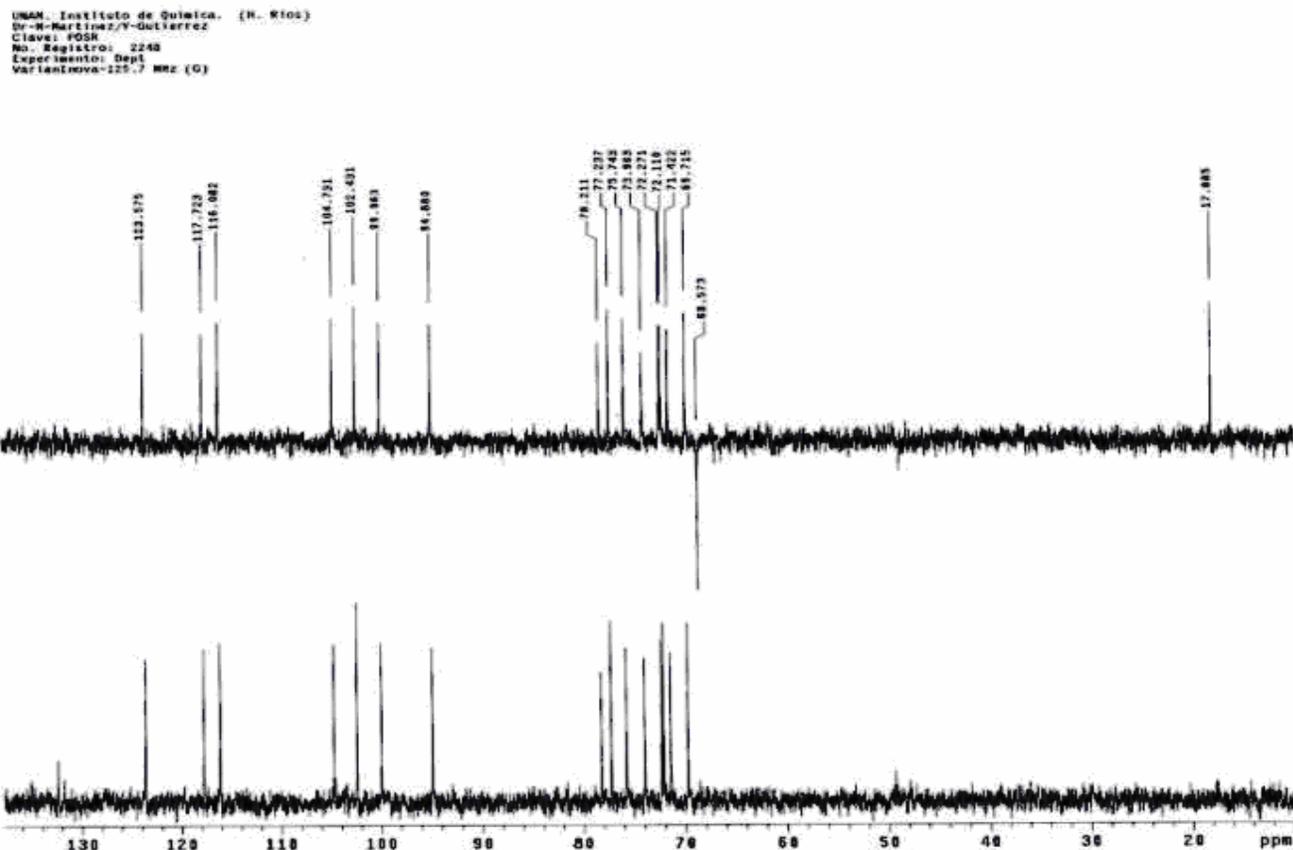
UNAM, Instituto de Química, (H. Alós)
 Dr. M. Martínez-Velázquez
 Clave: PQ2K
 No. Registro: 2248
 Experimento: Hidrogeno
 Disco/Muestra: C0800
 Variable/nuv: 500MHz (C)
 QCC-27-3305

F13N1 81214
 F13N1 80208K 81214

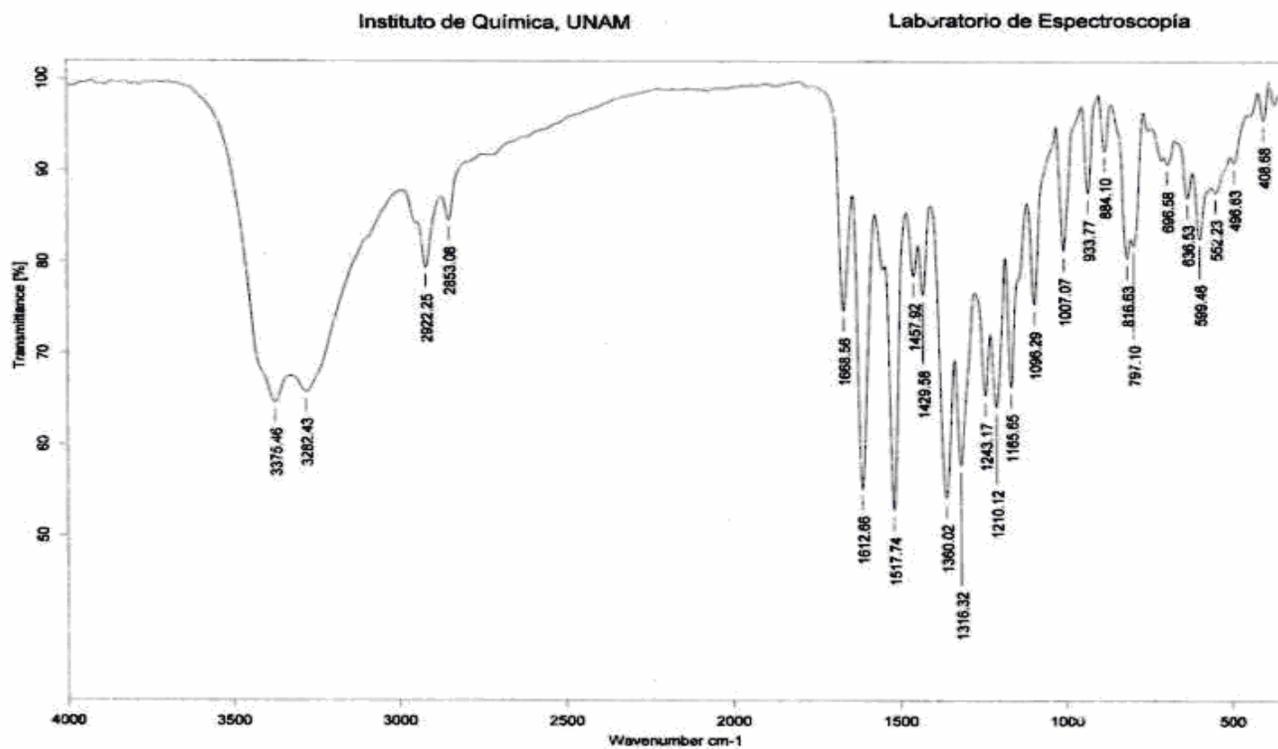
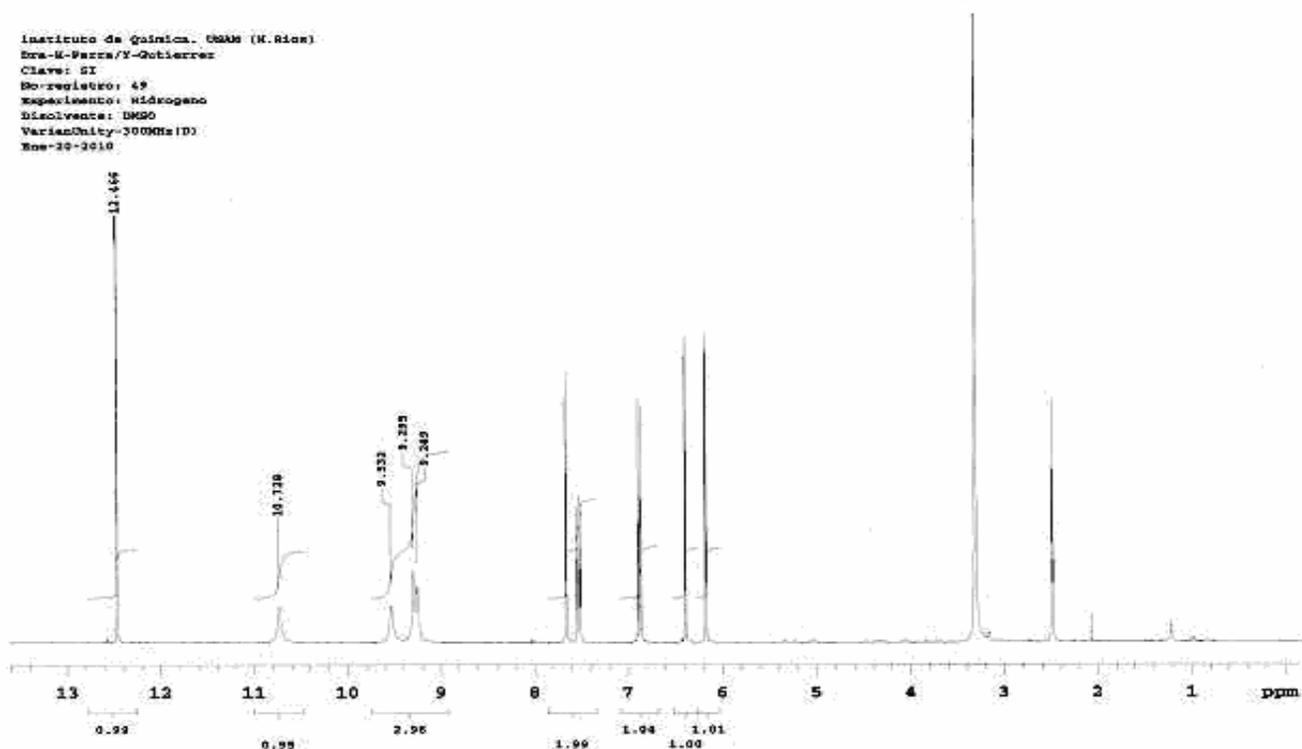


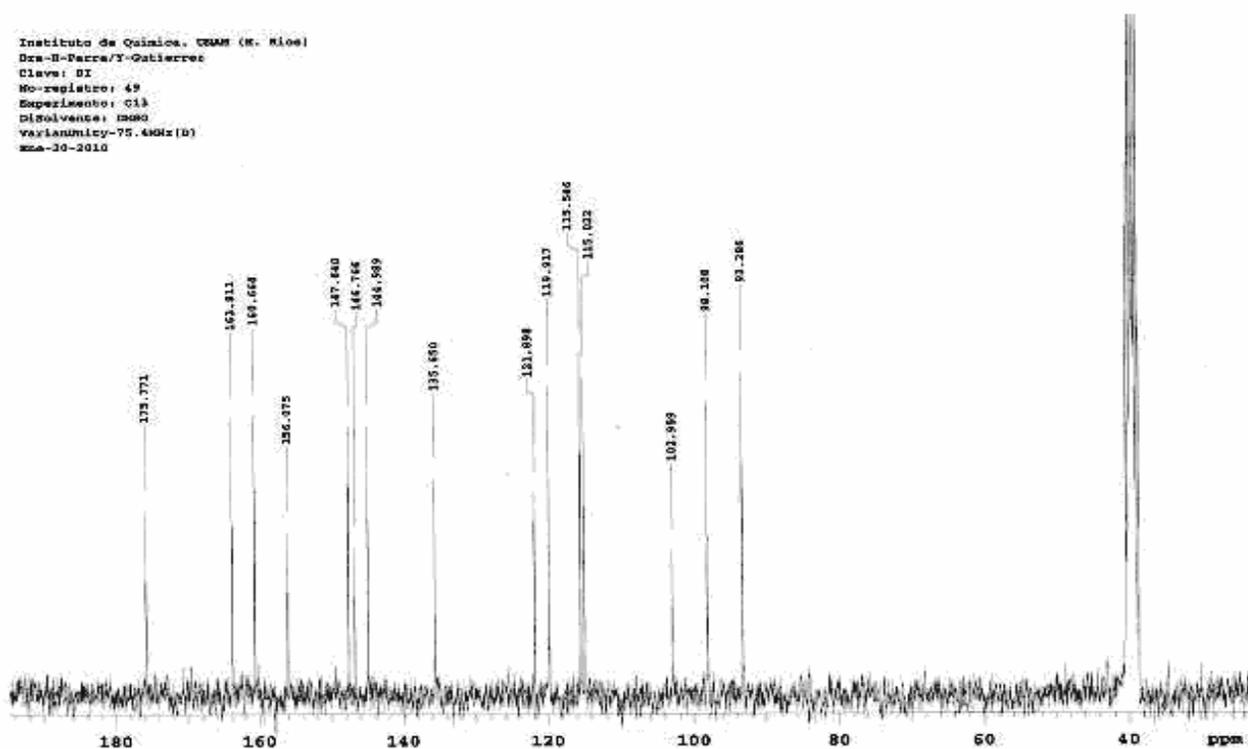
Anexo 17. Espectro RMN-¹³C de los compuestos 2 y 4

Anexo 18. Experimento DEPT de los compuestos 2 y 4

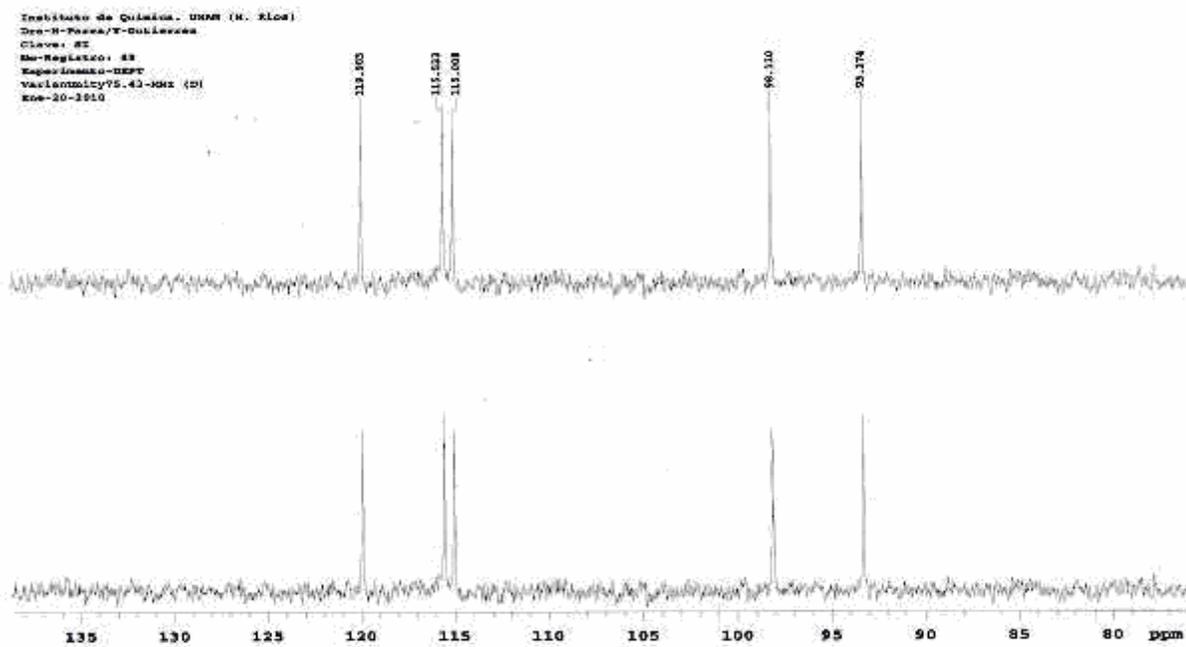


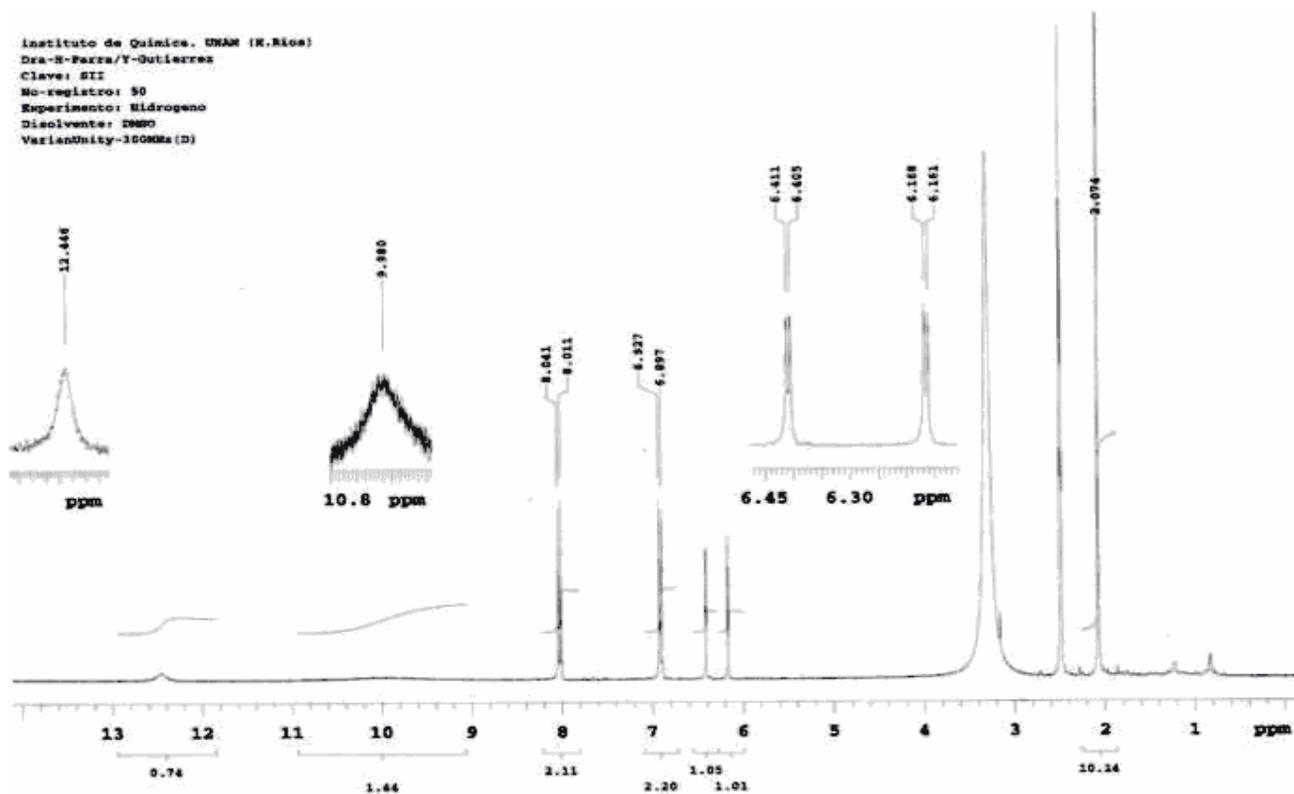
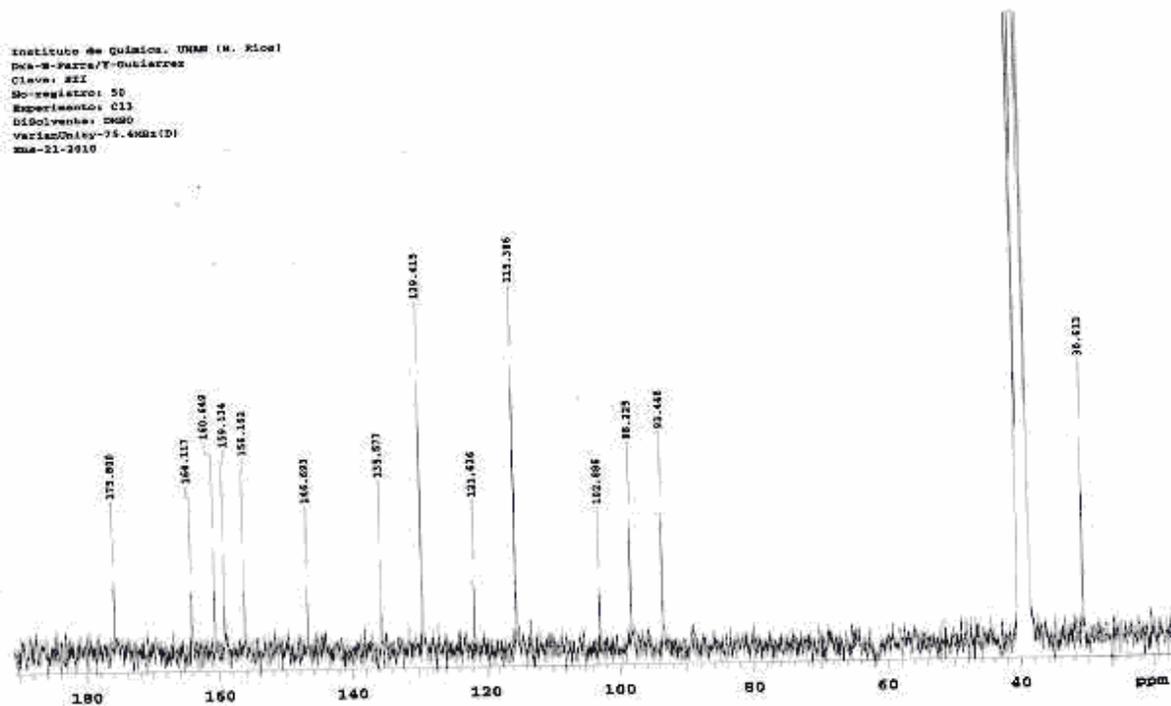
Anexo 19. Espectro IR de los compuestos 3 y 6

Anexo 20. Espectro RMN-¹H de los compuestos 3 y 6

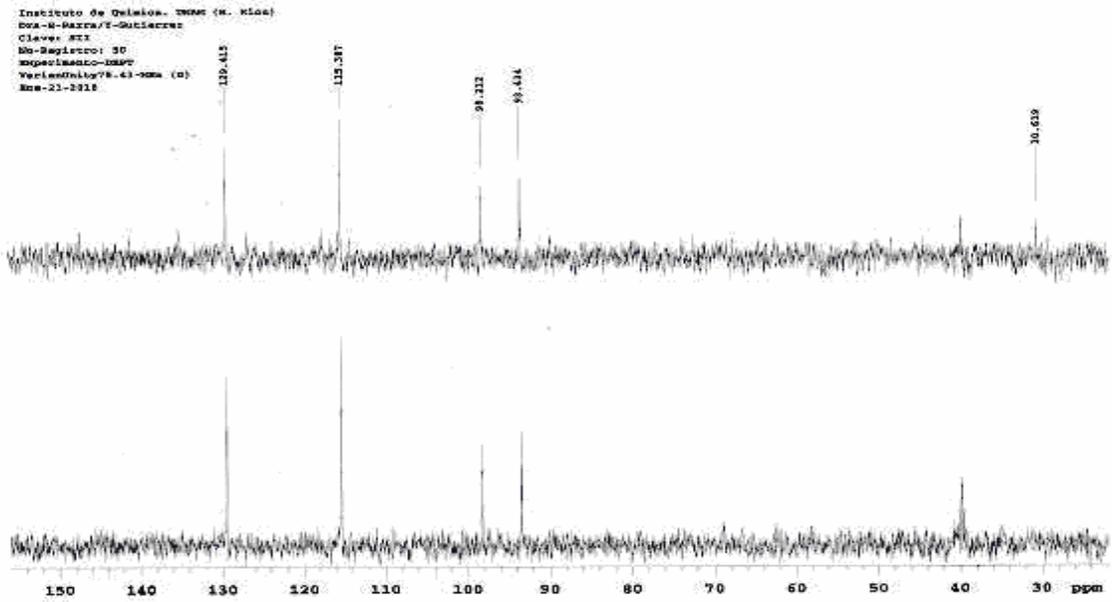
Anexo 21. Espectro RMN-¹³C de los compuestos 3 y 6

Anexo 22. Experimento DEPT de los compuestos 3 y 6

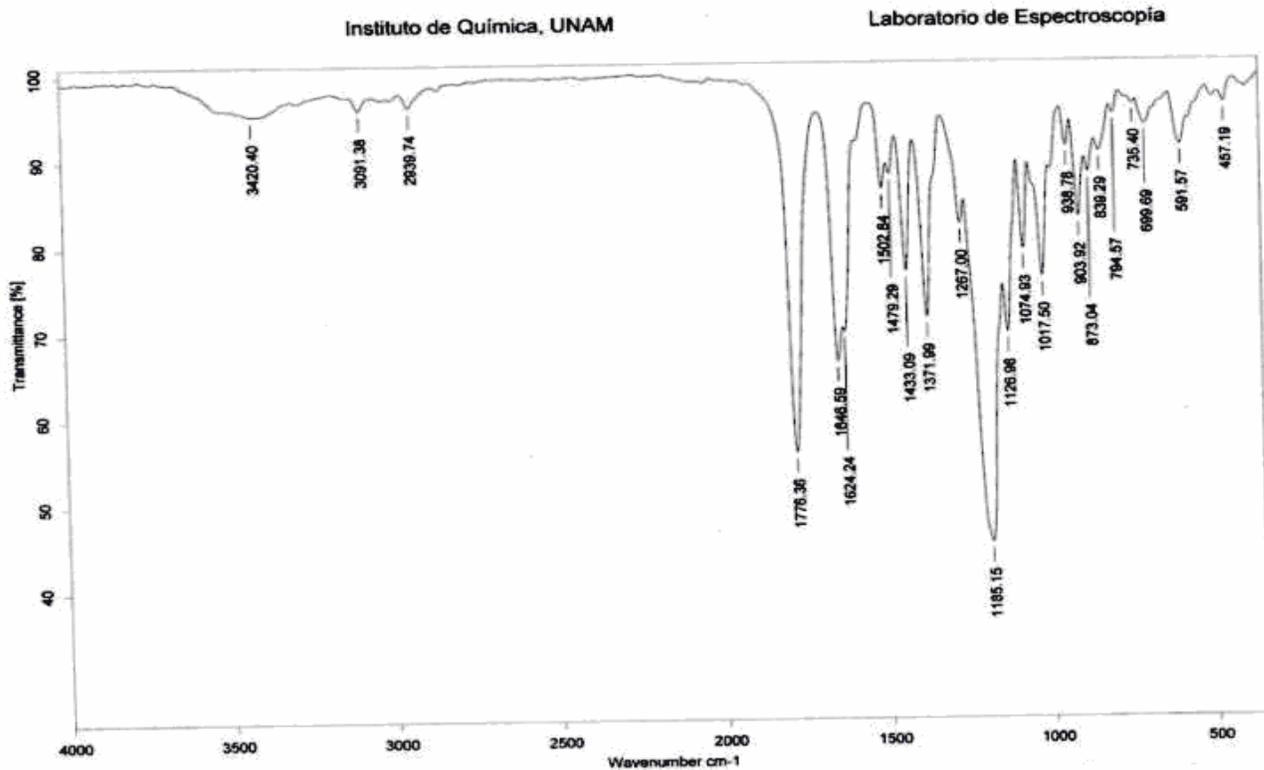
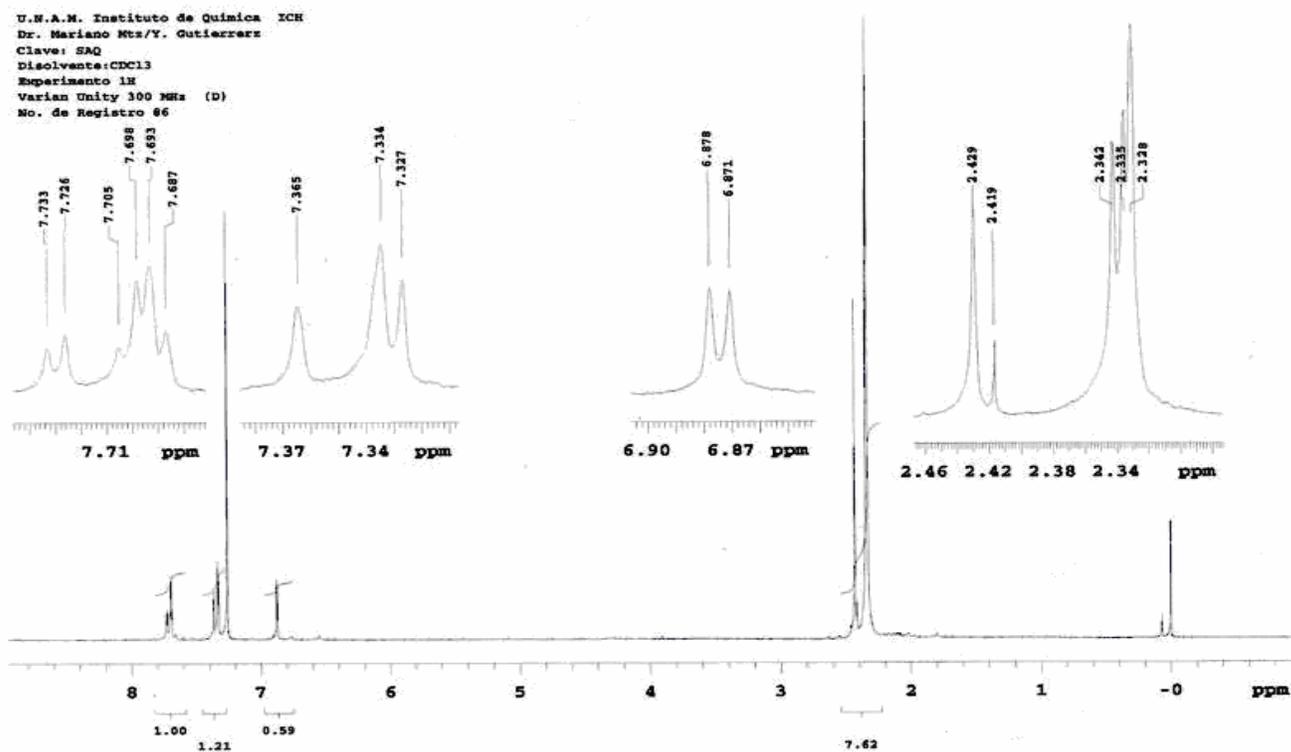


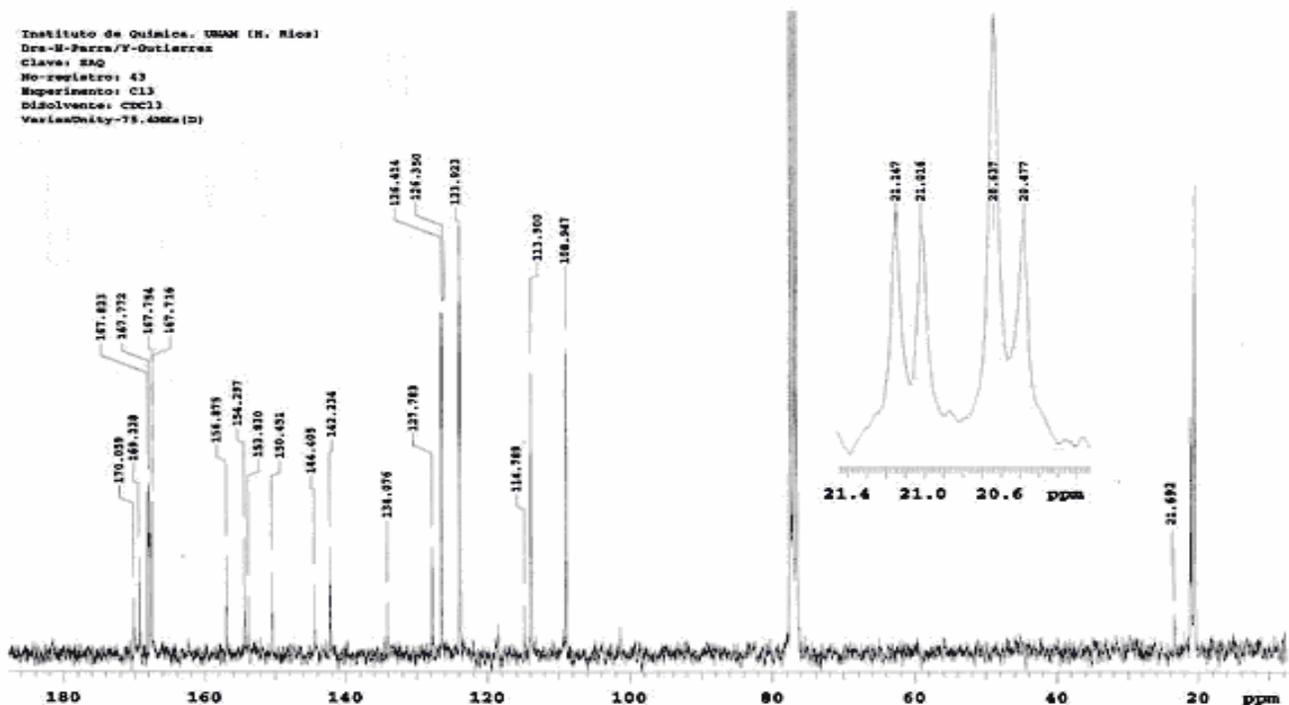
Anexo 23. Espectro RMN-¹H del compuesto 5Anexo 24. Espectro RMN-¹³C del compuesto 5

Anexo 25. Experimento DEPT del compuesto 5

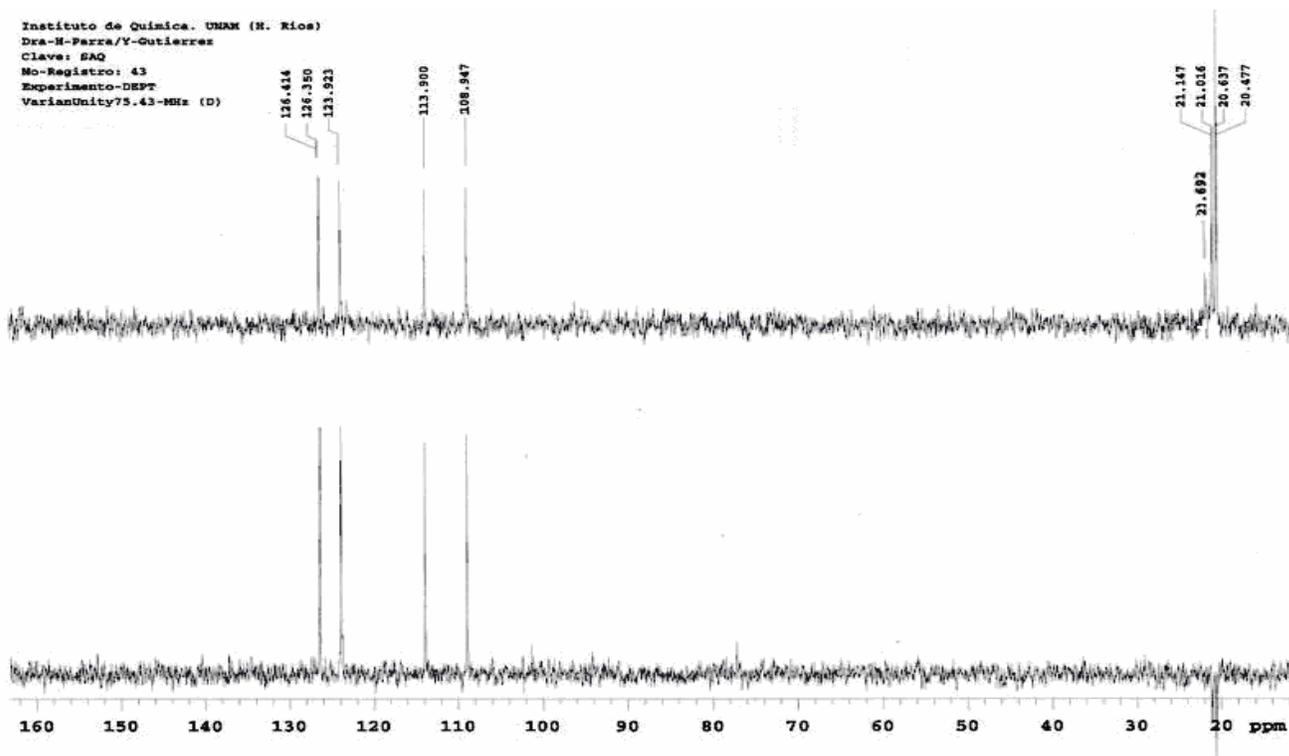


Anexo 26. Espectro IR de los compuestos 7 y 9

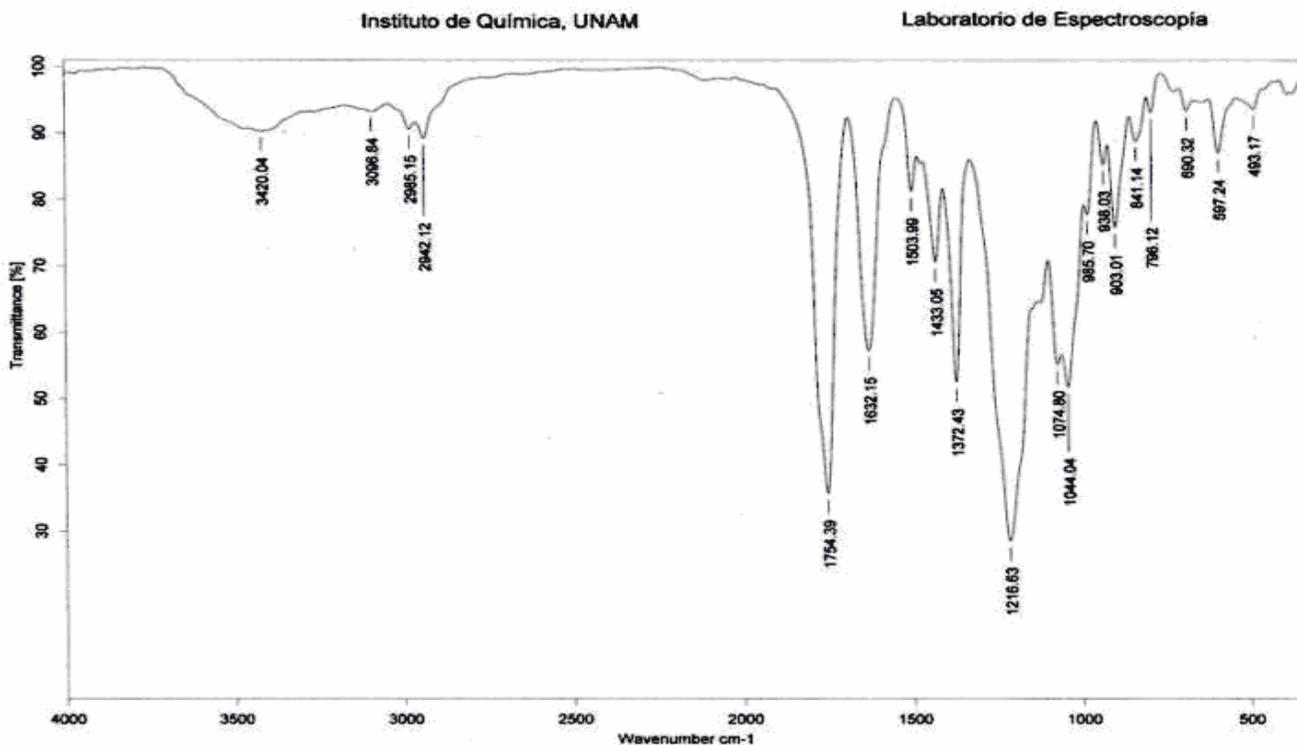
Anexo 27. Espectro RMN- ^1H de los compuestos 7 y 9

Anexo 28. Espectro RMN-¹³C de los compuestos 7 y 9

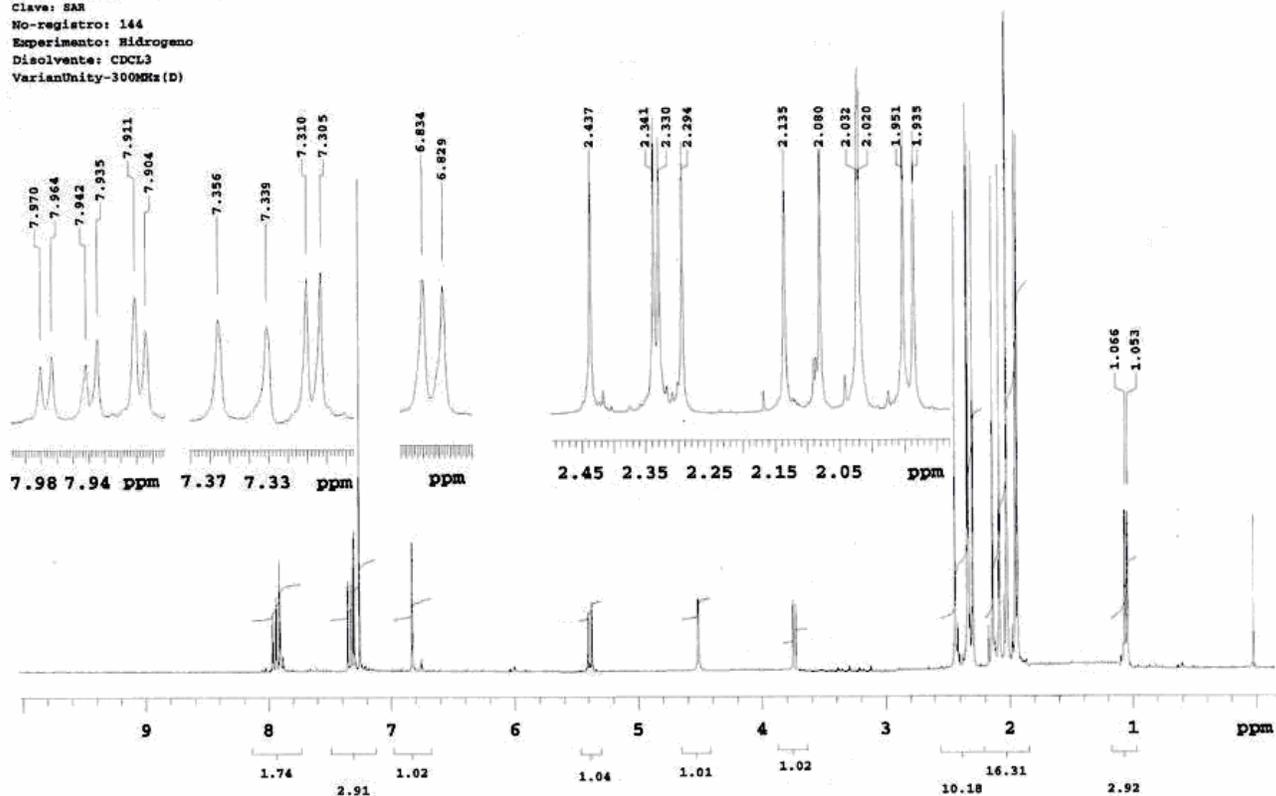
Anexo 29. Experimento DEPT de los compuestos 7 y 9



Anexo 30. Espectro IR de los compuestos 8 y 10

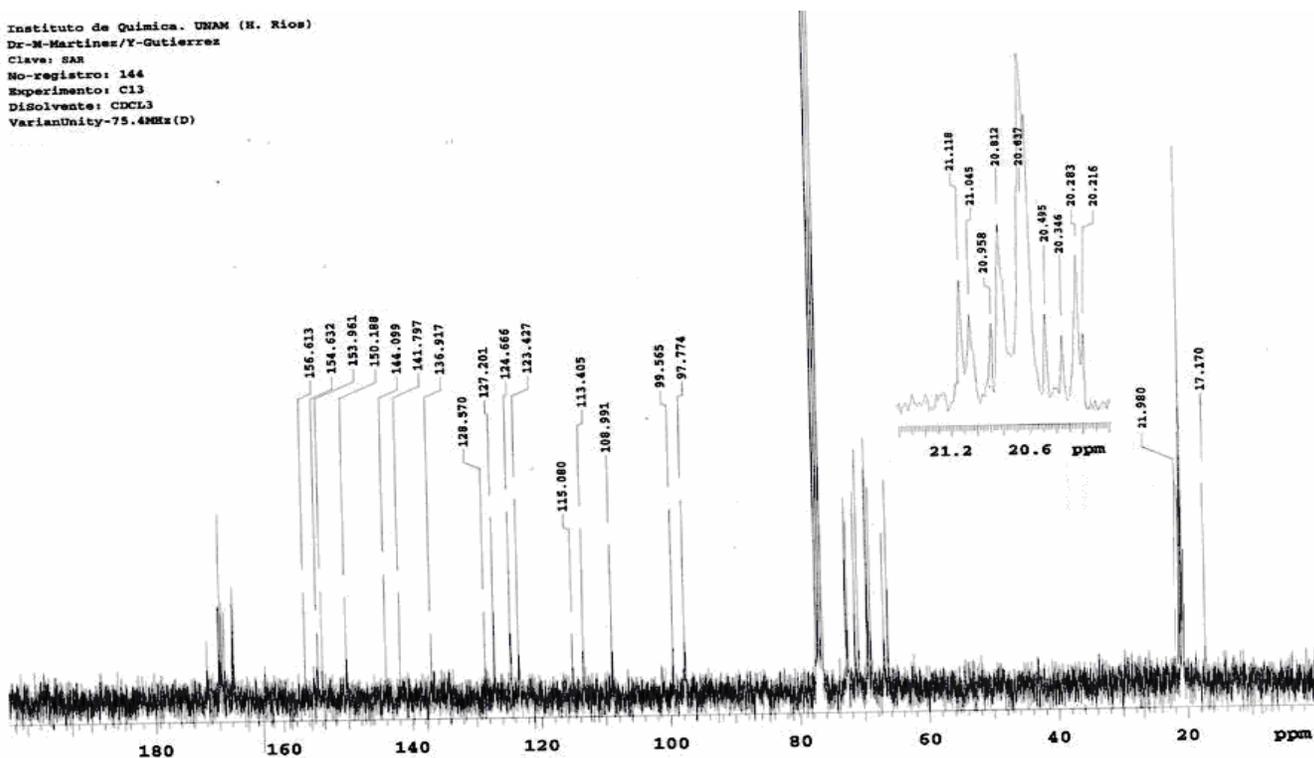
Anexo 31. Espectro RMN-¹H de los compuestos 8 y 10

instituto de Química, UNAM (H. Ríos)
 Dr. M. Martínez/Y. Gutiérrez
 Clave: SAR
 No-registro: 144
 Experimento: Hidrogeno
 Disolvente: CDCl₃
 VarianUnity-300MHz (D)

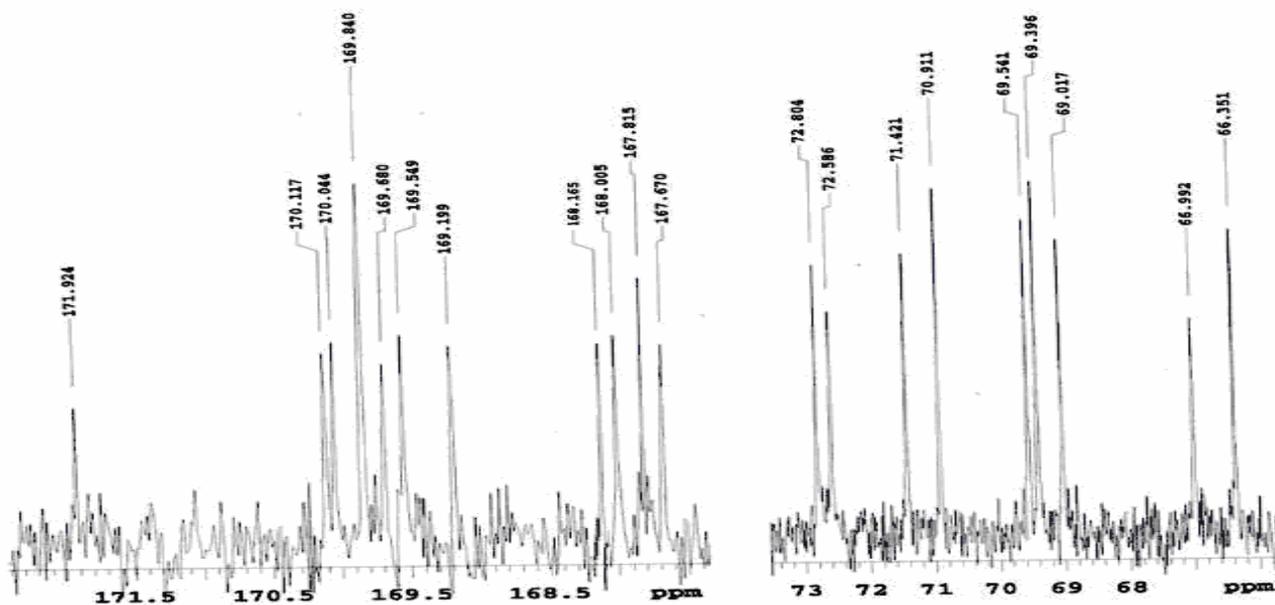


Anexo 32. Espectro RMN-¹³C de los compuestos 8 y 10

Instituto de Química, UNAM (H. Ríos)
 Dr-M-Martínez/Y-Gutiérrez
 Clave: SAR
 No-registro: 144
 Experimento: C13
 Disolvente: CDCL₃
 VarianUnity-75.4MHz(D)

Espectro RMN-¹³C

Instituto de Química, UNAM (H. Ríos)
 Dr-M-Martínez/Y-Gutiérrez
 Clave: SAR
 No-registro: 144
 Experimento: C13
 Disolvente: CDCL₃
 VarianUnity-75.4MHz(D)



Ampliación de 65-73ppm y de 167-172ppm

Anexo 33. Experimento DEPT de los compuestos 8 y 10

