



CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

Premio de la Academia de Ciencias de Cuba, 2019

Estudio químico y potencialidades biológicas de especies vegetales que crecen en Cuba

Raisa Mangas Marín^{1*} <http://orcid.org/0000-0003-0883-8257>
Yamilet Irene Gutiérrez Gaitén¹ <http://orcid.org/0000-0002-8885-4849>
Alejandro Felipe González¹ <http://orcid.org/0000-0003-2287-254X>
Ramón Scull Lizama¹ <http://orcid.org/0000-0001-6401-221X>
René Delgado Hernández¹ <http://orcid.org/0000-0001-7051-7871>
Lianet Monzote Fidalgo² <http://orcid.org/0000-0002-1958-809X>
Idania Rodeiro Guerra³ <http://orcid.org/0000-0002-2692-6050>

¹ Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana (IFAL-UH). Cuba

² Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). Cuba

³ Instituto de Ciencias del Mar (ICIMAR). Cuba

*Autor para correspondencia: raisam@ifal.uh.cu

Palabras clave

parámetros farmacognósticos; fitoquímica; potencialidades biológicas

RESUMEN

Introducción: Las plantas son una parte fundamental de los sistemas de medicina. Para contar con una fuente vegetal como alternativa terapéutica, es indispensable demostrar científicamente su utilidad. Las especies *Clusia minor* L., *Caesalpinia bahamensis* Lam., *Murraya paniculata* L., *Phania matricarioides* (Spreng.) Griseb. y *Lippia alba* Mill, que crecen en Cuba son utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de diferentes afecciones, sin embargo, los estudios fitoquímicos y farmacológicos que avalen esta utilidad y que permitan establecer su calidad, son escasos o nulos. **Objetivos:** determinar los principales parámetros farmacognósticos para establecer su calidad como droga vegetal, identificar los principales metabolitos presentes en las mismas y evaluar preliminarmente algunas de sus propiedades farmacológicas. **Métodos:** Se determinaron los requerimientos de calidad de algunas de las especies mediante evaluaciones farmacognósticas, se aplicaron métodos fitoquímicos, se caracterizaron estructuralmente los principales compuestos aislados y se evaluaron los efectos antioxidantes, diurético, antilitiásico, antiinflamatorio, antimicrobiano y antiparasitario de algunos de sus extractos. **Resultados:** Se establecieron las especificaciones de calidad de las drogas crudas, extractos y formulaciones diseñadas, así como los marcadores químicos. Se pudieron extraer, aislar, purificar y caracterizar algunos de los principales componentes químicos, constituyendo muchos de ellos nuevos reportes para las especies y el género. Se demostraron el potencial bioactivo de las plantas evaluadas y su baja toxicidad. **Conclusiones:** Las especies estudiadas constituyen un recurso potencial en el campo de los fitoterápicos, ampliando el conocimiento químico-farmacognóstico de la flora cubana y la utilidad terapéutica real de las mismas.



Chemical study and biological potential of plant species that grow in Cuba

ABSTRACT

Keywords

pharmacognostic parameters; phytochemistry; biological potentialities

Introduction: Plants are a fundamental part of medicine systems. To have a plant source as a therapeutic alternative, it is essential to demonstrate its usefulness scientifically. The species *Clusia minor* L., *Caesalpinia bahamensis* Lam., *Murraya paniculata* L., *Phania matricarioides* (Spreng.) Griseb. and *Lippia alba* Mill, which grow in Cuba, are traditionally used for the treatment of different diseases; however, phytochemical and pharmacological studies that guarantee this utility and permit establishing its quality are limited or null. Objectives: to determine the main pharmacognostic parameters to establish its quality as a vegetal drug, to identify the main metabolites and to evaluate some of its pharmacological properties preliminarily. **Methods:** the quality requirements of some of the species as a crude drug were determined through pharmacognostic evaluations, phytochemical methods were applied, the main substances isolated were characterized structurally, and the antioxidant, diuretic, antilithic, anti-inflammatory, antimicrobial, and antiparasitic effects of some of its extracts were evaluated. **Results:** The quality specifications of raw drugs, extracts and designed formulations, as well as the chemical markers were established. Some of the main chemical components could be extracted, isolated, purified and characterized, many of which constituted new reports for the species and genus. The bioactive potential of the plants evaluated and their low toxicity were demonstrated. **Conclusions:** The species studied constitute a potential resource in the field of phytotherapies. The chemical-pharmacognostic knowledge of the Cuban flora and its real therapeutic usefulness were expanded.

INTRODUCCIÓN

En la historia de la humanidad el hombre ha hecho de las plantas un recurso imprescindible en múltiples facetas de su vida.⁽¹⁾ El uso de las plantas para el tratamiento y alivio de síntomas se ha convertido en una práctica común y creciente en la medicina popular.⁽²⁾ Las formulaciones a base de plantas han adquirido espacio y ocupan una posición importante al ser comparadas con los medicamentos de origen sintético.⁽³⁾

La obtención de nuevos agentes terapéuticos se ha desarrollado a través de los estudios fitoquímicos, farmacológicos y toxicológicos tanto de extractos como de compuestos aislados de especies vegetales. A partir de estos estudios, se ha demostrado que los productos naturales de origen vegetal constituyen una fuente de moléculas potencialmente terapéuticas por su amplia diversidad química y biológica.^(1,4,5)

La principal limitación de las plantas medicinales es la falta de estandarización de las materias primas, el procesamiento de los productos finales y la dosificación de las formulaciones.⁽⁶⁾ Ello exige un mayor número de controles de calidad mediante la aplicación de técnicas modernas y el uso de patrones apropiados para asegurar la consistencia o seguridad deseable del producto.⁽⁷⁻⁹⁾ En este sentido los estudios farmacognósticos juegan un papel primordial a través de la

introducción de nuevas tecnologías que permitan verificar la calidad de los productos herbarios y sus preparados.⁽⁸⁾

En la actualidad muchas investigaciones están encaminadas a demostrar los usos etnobotánicos atribuidos a las plantas. Las especies vegetales incluidas en este trabajo y utilizadas en la medicina tradicional para tratar diferentes enfermedades constituyen un ejemplo. La especie *Clusia minor* se usa para el tratamiento de verrugas y del vitíligo,⁽¹⁰⁾ aunque en Cuba solo se emplea como planta ornamental y melífera.⁽¹¹⁾ Los extractos de la madera de *Caesalpinia bahamensis* han sido empleados para el tratamiento de la diabetes, úlcera péptica, algunos padecimientos del hígado y los riñones e Hiperplasia Prostática Benigna.⁽¹²⁻¹⁴⁾ Por su parte, *Murraya paniculata* es reconocida tradicionalmente por sus propiedades astringentes, estimulantes, analgésicas e antiinflamatorias;^(15,16) *Phania matricarioides* es utilizada para afecciones dermatológicas y digestivas y *Lippia alba* para desórdenes estomacales, disentería y por sus propiedades sedantes, analgésicas y antiinflamatorias.^(17,18)

Por estas razones, los objetivos de este trabajo son determinar los principales parámetros farmacognósticos para establecer su calidad como droga vegetal, identificar los principales metabolitos presentes en las mismas y evaluar preliminarmente algunas de sus propiedades farmacológicas.

MÉTODOS

Recolección del material vegetal

Para este estudio se emplearon los frutos verdes y hojas de la especie *Clusia minor* L. (No. de Herbario HAJB 482), recolectados en el Jardín Botánico Nacional. La madera de *Caesalpinia bahamensis* fue colectada en la Cañada Arroyón, San Cristóbal, Artemisa (No. de herbario HAJB85369). *Murraya paniculata* L. se colectó en Ceiba del Agua, Caimito del Guayaban, Artemisa (HFC 85589 (HAJB)). Se trabajó con plantas de *Phania matricarioides* de tres lugares de colecta (Bauta, Artemisa; Cangrejeras, Artemisa; Lisa, La Habana, HFC 88669) y *Lippia alba* procedente de las áreas del Instituto de Farmacia y Alimentos, municipio La Lisa, provincia La Habana, 88670 (HAJB).

Preparación de los extractos y obtención de aceite esencial

Los extractos de las diferentes especies vegetales se obtuvieron por maceración. Para los frutos frescos (200 g) y las hojas secas y molidas (485 g) de *C. minor* se utilizaron disolventes en orden creciente de polaridad: hexano, acetato de etilo y metanol. Adicionalmente, las hojas se extrajeron directamente con etanol. Se obtuvieron extractos acuoso e hidroalcohólico a partir de los tallos de *C. bahamensis* (100 g) y también se realizó una extracción de los mismos por batería con cloroformo, acetato de etilo y metanol. Los extractos hidroalcohólicos se obtuvieron a partir de 20 g de *Murraya paniculata* y *Lippia alba*. Los extractos se concentraron a sequedad bajo presión reducida en un rotoevaporador (Büchi, RE 120) a una temperatura inferior a 40 °C. El aceite esencial de *Phania matricarioides* se obtuvo por hidrodestilación en un equipo cleveger por 5 h.

Parámetros farmacognósticos

Los diferentes ensayos se realizaron según la metodología descrita.^(19,20) Se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas de las drogas, la humedad residual, contenido de cenizas y sustancias solubles en agua y en mezclas hidroalcohólicas al 30 %, 50 % y 80 %. A los extractos se les determinaron sus propiedades organolépticas, pH, índice de refracción, sólidos totales y densidad relativa.^(20,21)

Cuantificación de fenoles totales

Se utilizó el método descrito⁽²²⁾ utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico. Para el ensayo las muestras de *C. minor*, *C. bahamensis* y *P. matricarioides* fueron preparadas a diferentes concentraciones. Se tomaron 20 µL de cada muestra y fueron mezcladas con 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu, 300 µL de Na₂CO₃ 29 % y 1580 µL de agua destilada.

La mezcla se agitó y fue incubada por 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 760 nm en un espectrofotómetro UV-1201 (Shimadzu, Japón). El contenido de polifenoles se calculó por curva de calibración utilizando diferentes concentraciones de ácido gálico como patrón (0,2 mg/mL a 1,2 mg/mL) y se expresó como mg equivalentes de ácido gálico/g de peso seco del extracto (mg EAG/g). El patrón de referencia se preparó en el momento de usar 5 mg/mL.

Cuantificación de flavonoides

El método utilizado fue una modificación al descrito.⁽²³⁾ Como patrón de referencia se empleó la quercetina y para la elaboración de la curva de calibración se utilizaron concentraciones desde 0,00625 mg/mL hasta 0,100 mg/mL. De la solución patrón se tomaron 125 µL y los extractos se mezclaron con 375 µL de etanol 95 %, 25 µL de AlCl₃ 10 %, 25 µL de CH₃COOK 1M y 700 µL de agua destilada. La mezcla fue incubada durante 30 min y la absorbancia fue medida a 415 nm en un espectrofotómetro UV 1201 (Shimadzu, Japón). Como blanco se utilizó 825 µL de agua destilada más el resto de los reactivos utilizados en la técnica. El contenido de flavonoides totales se expresó como mg equivalentes de quercetina/g de extracto seco (mg EQ/g).

Métodos cromatográficos

Cromatografía en capa delgada (CCD). Se realizó sobre placas de sílica gel F254 (Merck, Alemania) en soporte de aluminio. La corrida fue realizada de forma ascendente y se utilizó cloroformo: metanol (9:2, v:v) como fase móvil. La detección de las manchas se realizó a la luz UV 254 nm, UV 366 nm y con vainillina 2 % y calor. Se calculó el factor de retención (R_f) para las manchas observadas.

Cromatografía en columna. Para el fraccionamiento de *C. minor* y *C. bahamensis* se utilizó la cromatografía en columna abierta. Para la primera especie los soportes empleados fueron sílica gel y sephadex LH-20. Para la segunda especie se utilizó un polímero altamente poroso de estireno-divinilbenceno (MCI gel) y la cromatografía ultrarrápida (cromatografía flash).

Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). Esta técnica permitió el análisis de los extractos de las hojas de la especie *C. minor*, la fracción etérea de los extractos de acetato de etilo y clorofórmico de *C. bahamensis*, el aceite esencial de *P. matricarioides* y el extracto hidroalcohólico de *L. alba*.

Se empleó un cromatógrafo de Gases Agilent, serie 6890N, acoplado a un detector selectivo de masas, serie 5953N. La inyección de la muestra se realizó por el modo "split" con una relación de 1:10, siendo la temperatura del inyector, la interfase y el detector 280 °C, 280 °C y 150 °C, respectivamente. El vo-

lumen de inyección empleado fue de 1 µL del extracto previamente obtenido. La separación cromatográfica se realizó en una columna SPB-5 (15 m x 0,25 mm x 0,10 µm) y como gas portador se utilizó helio a un flujo de 1 mL/min. La temperatura del horno se programó a 60 °C (2 min), aumentando 4 °C/min hasta 100 °C. Posteriormente, se comenzó a aumentar la temperatura a razón de 10 °C/min hasta 290 °C, donde se mantuvo durante 5 min. El detector operó en el modo impacto electrónico (IE) (70 eV), a 230 °C. La detección se realizó en el modo de barrido, desde 40-700 uma.

Espectroscopía ultravioleta visible (UV). Los espectros ultravioleta de los extractos de *C. bahamensis* fueron obtenidos en el rango de 200 a 400 nm con el uso de un espectrofotómetro UV-Vis (Lambda 35).

Caracterización estructural

Se le realizó la caracterización estructural a los compuestos aislados a partir de las especies *C. minor* y *C. bahamensis*. Los espectros de RMN se realizaron en los equipos Bruker DRX-300, Bruker DRX-400, Bruker Avance III-300 y Bruker Avance III-400. Se emplearon como disolventes cloroformo deuterado (CDCl₃) y metanol deuterado y como referencia interna tetrametilsilano (TMS). Se realizaron los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C, y los experimentos DEPT, COSY, HSQC y HMBC.

Preparación de la crema

Se prepararon tres lotes de las formulaciones en el laboratorio por el método de fusión,⁽²⁴⁾ usando como ingrediente activo el extracto hidroalcohólico de *L. alba*. Se envasaron en frascos de cristal color ámbar con tapas de baquelita o propileno y fueron evaluados los parámetros físicos-químicos y tecnológicos: propiedades organolépticas, pH y extensibilidad. También se determinó el contenido de fenoles totales y se realizó control microbiológico.⁽²⁵⁾ Se realizó una prueba de aceptación con 60 jueces no adiestrados según la metodología reportada.^(26,27)

El estudio de estabilidad de la crema se desarrolló por un periodo de un año, en condiciones de estante (temperatura: 30 °C ± 2 °C, humedad relativa: 70 °C ± 5 %) y se consideraron los parámetros señalados anteriormente.

Evaluaciones biológicas

Determinación de la capacidad secuestradora de radicales por el método de DPPH. La capacidad antioxidante de los extractos de las especies *C. minor* y *C. bahamensis* se realizó a partir de modificaciones del método descrito.⁽²⁸⁾ El reactivo DPPH en etanol (0,075 mg/mL) fue mezclado con los extractos (10 µg/mL a 2000 µg/mL) hasta un volumen de 2000 µL. Como solución blanca se utilizó etanol absoluto y

como sustancia de referencia etanol absoluto más la solución de DPPH. La reacción se dejó durante 30 min en un espectrofotómetro UV-1201 (Shimadzu, Japón) y posteriormente se leyeron las muestras a 515 nm. Los valores de CE₅₀ se determinaron usando el programa GraphPad Prism Version 5 y fue definida como la cantidad total requerida para disminuir el 50 % de la concentración inicial del radical del DPPH. El efecto secuestrador de cada extracto se calculó como: % DPPH inhibición = (Abs control - Abs muestra)/(Abs control) x 100, donde Abs control representa: Abs de etanol + DPPH y Abs muestra: Abs muestra + DPPH.

Determinación del potencial de reducción total (FRAP).

El ensayo se realizó a los extractos de *C. minor* y *C. bahamensis* siguiendo el procedimiento propuesto.⁽²⁹⁾ El complejo Fe³⁺-TPTZ se colocó en el medio de reacción a un valor de pH bajo. Se tomaron 40 mg de cada uno de los extractos secos y se disolvieron en 1 mL del disolvente correspondiente al extracto. Se prepararon las muestras de cada extracto a diferentes concentraciones. Como sustancia de referencia se utilizó el ácido ascórbico (99 % pureza, Aldrich) en 10 mL de agua bidestilada a las concentraciones de 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 800 µg/mL y 1000 µmol/L, para obtener la curva patrón. Las lecturas se realizaron por triplicado a los 4 min. Los resultados se obtuvieron a partir del cálculo interpolando la densidad óptica (D.O.) de las muestras en la curva patrón correspondiente.

Ensayos *in vivo*

Animales de experimentación. Los animales empleados fueron ratones OF-1 (25-30 g) machos, suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba). Los ratones permanecieron bajo temperatura controlada (23 °C), humedad (40 % a 70 %), ciclo alternativo luz/oscuridad de 12 h, así como alimentación y agua *ad libitum*. Los animales recibieron el cuidado y la atención según las normativas internacionales establecidas⁽³⁰⁾ y aprobadas por el Comité de Ética para los Animales de Experimentación del Instituto de Ciencias del Mar (ICIMAR).

Método de Edema inducido por aceite de crotón en la oreja del ratón. La evaluación se realizó a los extractos de *C. minor* y *L. alba*, así como a la tintura de *M. paniculata* mediante el ensayo de edema inducido en oreja de ratón por el aceite de crotón.⁽³¹⁾ La inflamación fue inducida por la aplicación tópicamente de aceite de crotón (2 mg/20 µL de acetona) en ambas superficies de la oreja derecha de cada ratón (control negativo). La oreja izquierda recibió el vehículo (control). Cada extracto de las especies *C. minor* y *C. bahamensis* fue administrado por vía tópica (0,5 mg a 4 mg/oreja en acetona)

1 h antes del aceite de croton. Se usó como grupo control positivo el grupo tratado con indometacina (3 mg/20 µL de acetona). La inflamación fue seguida durante cinco horas y los animales tratados fueron sacrificados por dislocación cervical. Inmediatamente un disco de 6 mm de diámetro de cada oreja fue extraído con una punchadora de metal y pesado. La inflamación de la oreja se cuantificó como el aumento en peso de la biopsia de la oreja derecha (tratada), menos la oreja izquierda (control) y expresado como peso del edema. El porcentaje de inhibición fue expresado como la reducción del peso respecto al grupo control.

Actividad antimicrobiana y antiparasitaria. Se realizó en modelos *in vitro* relacionados con la actividad/selectividad sobre bacterias, hongos y parásitos. Se utilizó un panel integrado de agentes microbianos en una placa de 96 pocillos. ⁽³²⁾ Los microorganismos fueron: *Escherichia coli* (ATCC8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Candida albicans* (B59630), *Plasmodium falciparum* (Ghana), *Trypanosoma brucei* (Squib-427), *T. cruzi* (Tulahuen CL2), *Leishmania infantum* (MHOM/MA(BE)/67) y *L. amazonensis* (MHOM/77BR/LTB0016).

Efecto diurético y antilidiático. El efecto diurético fue realizado en ratas Wistar hembras mediante el empleo de jaulas metabólicas individuales para la recolección de los volúmenes de orina. ⁽³³⁾ Se evaluaron cinco grupos: solución salina, furosemida (20 mg/kg), hidroclorotiazida (10 mg/kg), extracto hidroalcohólico de *C. bahamensis* (200 mg/kg) y extracto acuoso de *C. bahamensis* (200 mg/kg).

El efecto antilidiático fue evaluado en estos extractos usando el método de inducción de los cálculos renales por etilenglicol y cloruro de amonio. ⁽³⁴⁾

Evaluación de la toxicidad. Se determinó en ratas Wistar la toxicidad aguda dérmica al gel de *M. paniculata*, a una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal ⁽³⁵⁾ y la toxicidad aguda oral al extracto de *C. bahamensis*. ⁽³⁶⁾

Análisis estadístico

El análisis y procesamiento de los datos se realizó con el empleo del programa estadístico GraphPad Prism, versión 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Los valores probabilísticos (p) inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso de extracción seleccionado y el fraccionamiento preliminar de las hojas y frutos de *Clusia minor* fueron satisfactorios al permitir agrupar los metabolitos de acuerdo a su polaridad. En los extractos de mediana y mayor polaridad se obtuvo la mayor acumulación de metabolitos secundarios.

La metodología seleccionada para la obtención del extracto etanólico de las hojas favoreció la extracción de una mayor cantidad de compuestos con una variada polaridad y que estaban presentes en los extractos anteriores. ⁽³⁷⁾

El empleo de las diferentes técnicas cromatográficas en el extracto de acetato de etilo de los frutos permitió el aislamiento y caracterización de tres benzofenonas preniladas: propolona D, hiperibona B y garcinielliptona I. ^(37,38) Aunque las benzofenonas preniladas son muy abundantes en el género *Clusia*, estas constituyen nuevos reportes para la especie y el género. Anteriormente fueron aisladas de propóleos pardos cubanos ⁽³⁹⁾ por lo que su presencia en la especie permite sugerir una relación entre la misma y el propóleos. En el extracto de hexano de las hojas se identificó la friedelina y en el de acetato de etilo, la mezcla β-sitosterol-estigmasterol y el ácido betulínico. ⁽⁴⁰⁾ Estos compuestos, a pesar de ser informada su presencia en el género, es la primera vez que se aíslan de la especie *C. minor* L. El análisis por CG/EM de los extractos de las hojas permitió identificar, por primera vez, 59 compuestos (sesquiterpenos, hidrocarburos de cadena larga, triterpenos y esteroides), de los cuales, 33 resultaron nuevos para este género. Los compuestos mayoritarios fueron la vitamina E, ácido hexadecanoico, epifriedelinol y β-sitosterol. Además, corroboró la presencia de tres de los compuestos aislados, la friedelina y la mezcla β-sitosterol-estigmasterol. ⁽⁴¹⁻⁴³⁾

La cuantificación de fenoles totales a los extractos de las hojas mostró la mayor concentración en el extracto etanólico (200,09 ± 0,83 mg EAG/g), asociado a la extracción directa con etanol. El extracto de acetato de etilo presentó el mayor contenido de flavonoides (100,95 ± 0,50 mg EQ/g extracto). ⁽³⁷⁾ Estos resultados sugieren que en las hojas de la especie prevalecen los flavonoides menos polares y que los más polares se encuentran a muy bajas concentraciones. Esto indica que en el extracto etanólico, además de los flavonoides, están presentes otros compuestos fenólicos. Por su parte, el extracto de acetato de etilo mostró una mayor relación entre estos metabolitos.

Los extractos de las hojas de *C. minor* se evaluaron por primera vez frente a varias propiedades farmacológicas mostrando el extracto de acetato de etilo los resultados más prometedores. Todos los extractos exhibieron capacidad secuestradora del DPPH siendo el etanólico el de mejores resultados (85 % de inhibición, $CI_{50} = 10,3 \pm 3,6 \mu\text{g/mL}$). ⁽⁴²⁾ Estos resultados evidencian que la polaridad de los extractos favoreció la capacidad secuestradora del radical DPPH. Por el método de FRAP la capacidad reductora de los extractos fue dependiente de la concentración, siendo el extracto de acetato de etilo el de mejor poder reductor (> 300 µmol/L EAA). ⁽³⁷⁾ Los extractos de acetato de etilo y etanol fueron los que mostraron los me-

jores resultados en estos ensayos. En la determinación de la actividad antiinflamatoria los extractos presentaron un comportamiento dosis-dependiente siendo el de acetato de etilo el de mayor porcentaje de inhibición del edema (82,3 %).⁽⁴²⁾ Este resultado está relacionado con su variada composición química, así como con el elevado contenido de polifenoles y flavonoides mostrado. Todos los efectos evaluados pudieran atribuirse a algunos de los compuestos identificados.

La evaluación macroscópica de los tallos de la especie *Caesalpinia bahamensis* mostró forma cilíndrica, compacto, con una superficie externa ligeramente rugosa de color grisáceo y una superficie interna fibrosa de color naranja. Micro morfológicamente se apreciaron fibras compuestas por células esclerénquimáticas y paredes secundarias altamente lignificadas, así como vasos xilemáticos del tipo escalari-formes. La determinación por primera vez de los parámetros físico-químicos de calidad a la droga y a los extractos acuoso e hidroalcohólico evidenció que la planta cumple con los requisitos de calidad establecidos para drogas vegetales.⁽⁴⁴⁾

La determinación del contenido de fenoles y flavonoides indicó que los fenoles tienen mayor concentración en el extracto acuoso mientras que los flavonoides predominaron en el hidroalcohólico.⁽⁴⁵⁾ El análisis por CCD de los extractos mostró manchas relacionadas a los flavonoides y otros compuestos de naturaleza fenólica. El perfil de UV mostró bandas a 282 nm y 445 nm⁽⁴⁵⁾, corroborando la presencia de flavonoides.⁽⁴⁶⁾

De la fracción etérea del extracto de acetato de etilo se identificaron 74 compuestos predominando el α -bisabolol, 2,3-butanediol y su isómero, β -sitosterol y α -cadinol.⁽⁴⁷⁾ Se identificaron diez compuestos del extracto clorofórmico (ácidos grasos, terpenoides y fitosteroles) siendo los mayoritarios octacosanol, monopalmitina y ácido palmítico.⁽⁴⁸⁾ Además, se aislaron y caracterizaron cinco compuestos nuevos para la especie a partir del extracto hidroalcohólico, entre ellos, la protosapanina B (componente mayoritario) y la brasilina.

La capacidad antioxidante por DPPH mostró que, aunque todos los extractos presentaron actividad, el metanólico (CI_{50} =11,1 μ g/mL) fue el más activo. Los extractos de acetato de etilo (100,7 μ mol/L EAA) y metanol (37,3 μ mol/L EAA) también mostraron capacidad antioxidante en el ensayo de FRAP.⁽⁴⁵⁾ Se ensayaron el efecto diurético y antilitiásico de los extractos acuoso e hidroalcohólico secos mostrando efecto diurético similar a la hidroclorotiazida y buen efecto antilitiásico lo que pudiera estar asociado a la presencia de fenoles y flavonoides. Estos metabolitos juegan un papel importante, previniendo la deposición de oxalato de calcio en el riñón, asociado a su actividad antioxidante.^(49,50) Los resultados permiten vali-

dar el uso tradicional de la especie como planta antilitiásica, el cual no había sido reportado con anterioridad, conjuntamente con su actividad antioxidante. Adicionalmente, el estudio de toxicidad aguda oral no evidenció signos de toxicidad en los animales de experimentación.

El uso tradicional de la especie *Murraya paniculata* L. en Cuba, implica el empleo de la droga fresca, lo que limita la extensión de su uso, ya que no se cuenta con estudios que avalen la factibilidad del empleo de la droga seca con garantía de su calidad, seguridad y eficacia. La evaluación de los parámetros farmacognósticos de control de la calidad de la droga seca y su tintura permitió establecer sus principales especificaciones de calidad a través del análisis de diferentes lotes. El estudio de estabilidad en estante mostró que las muestras se comportaron estables durante un año bajo las condiciones ensayadas.⁽⁵¹⁾ Por vez primera, se validó en la especie un método por CLAR para la cuantificación de uno de los marcadores químicos de la tintura, el aminoácido L-prolina, que demostró ser lineal, preciso, exacto y específico bajo las condiciones de estudio.⁽⁵²⁾ Se elaboró un gel a partir de la tintura al 20 % que al ser evaluada se mantuvo estable durante los 12 meses de estudio y fue aceptada por los cuatro atributos evaluados (olor, color, frescura y apariencia).⁽⁵¹⁾ La tintura y el gel no evidenciaron signos de toxicidad aguda dérmica en los animales de experimentación y mostraron actividad antiinflamatoria aunque menos que la indometacina. Estos resultados permiten avalar la factibilidad del uso de la droga seca de *M. paniculata*, pudiendo ser utilizada en el tratamiento de afecciones osteomioarticulares.

El estudio de *Phania matricarioides* mostró que desde el punto de vista macroscópico no existen diferencias entre las muestras de los tres lugares de colecta, pero microscópicamente y fitoquímicamente se observaron diferencias apreciables. El contenido de sólidos totales, fenoles y flavonoides totales para el extracto de Cangrejas fue mayor (1,94 %, 41,38 mg/mL y 33,17 mg/mL, respectivamente) que en las otras muestras. En los perfiles por CLAR se observó la presencia de quercetina.⁽⁵³⁾ En el análisis por CG/EM del aceite esencial se identificaron 45 compuestos siendo los mayoritarios el acetato de lavandulilo (40,1 %) y el isobutirato de timilo (13,9 %).⁽⁵⁴⁾ La evaluación de la actividad antiparasitaria mostró que de los microorganismos ensayados el más sensible fue *Tripanosoma cruzi* donde el aceite mostró mayor actividad (CI_{50} = 2,2 g/mL) y selectividad (IS=13).⁽⁵⁴⁾ Todos los extractos manifestaron propiedades antioxidantes por el método de DPPH, aunque la procedente de Cangrejas fue la mejor (CI_{50} = 27,4 μ g/mL), pero estadísticamente no superior a la vitamina C empleada como patrón (CI_{50} = 23,7 μ g/mL). En el ensayo de FRAP también reveló la mayor actividad, posible-

mente por la mayor concentración de quercetina. ⁽⁵³⁾ Los resultados constituyen aportes novedosos al conocimiento de la especie al brindar el primer informe de caracterización química y antiparasitaria de su aceite esencial contribuir con el estudio farmacognóstico al desarrollo de normas de control de la calidad de la planta.

Los parámetros físico-químicos de calidad del extracto hidroalcohólico de la especie *Lippia alba* determinados estuvieron en correspondencia con las especificaciones de calidad previamente establecidas. El análisis por CG/EM permitió identificar 25 compuestos, siendo los mayoritarios ácidos grasos y sus ésteres, alcoholes grasos y terpenoides, la mayoría constituyen nuevos reportes para la especie y el género, y dos de ellos para la familia.

Se diseñó una crema a partir del extracto hidroalcohólico de la planta que mantuvo buena estabilidad química, tecnológica y microbiológica durante los 12 meses de estudio en las condiciones de envase y almacenamiento establecidas. La formulación fue aceptada por los tres atributos evaluados (olor, color y apariencia). La administración aguda dérmica del fitofármaco propuesto no generó efectos tóxicos bajo las condiciones de ensayo y manifestó una buena actividad antiinflamatoria, pudiendo justificar la factibilidad de empleo de *L. alba* en la terapéutica. Los resultados resultan novedosos ya que se elaboró por vez primera un fitofármaco con garantías de calidad, seguridad y eficacia, además se identificaron muchos constituyentes químicos.

El uso extendido de esta alternativa terapéutica incidiría en una disminución importante del consumo de antiinflamatorios, lo que garantizaría un ahorro económico en las importaciones directas y de materias primas para su producción nacional. Esta formulación es un fitofármaco eficaz y seguro que puede ser empleado en el alivio de los signos y síntomas de enfermedades osteomioarticulares de alta incidencia en la tercera edad, lo que ante el avanzado envejecimiento poblacional contribuiría a mejorar la calidad de vida.

Conclusiones

En este trabajo se establecen, por primera vez, los parámetros físico-químicos de calidad de la droga cruda para las especies *C. bahamensis*, *M. paniculata*, *P. matricorioides* y *L. alba*, lo que garantiza la consistencia y seguridad de estas como materias primas. El estudio farmacognóstico realizado a las diferentes especies vegetales permitió proponer los marcadores químicos para el control de calidad de las drogas y formulaciones derivadas de éstas. Además, se informa la posible relación entre la composición química y el potencial bioactivo de las cinco especies estudiadas. Los resultados son novedosos, ya que permiten enriquecer la información

que se tiene de estas especies vegetales y favorecer su posible uso etnobotánico, además de demostrar la baja toxicidad de algunos extractos después de su administración aguda oral y tópica oral. Las evaluaciones biológicas realizadas resultan preliminares, por lo que debe considerarse profundizar el estudio, sin embargo, sugieren el empleo de estas plantas como alternativas antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antiparasitarias, diuréticas y antilitiásicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yunes RA, Filho VC. Química de Produtos Naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia. 5th ed. Itajaí: Editora UNIVALI; 2016. 319 páginas.
2. Canter PH, Thomas H, Ernst E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology-Review. Trends Biotechnol. 2005 abril; 23(4): 180-185.
3. Newman D, Cragg G. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. J. Nat. Prod. 2016 febrero; 79: 629-661.
4. Christen P, Cuendet M. Plants as a source of therapeutic and health products. Chimia (Aarau). 2012; 66(5): 320-323.
5. Mushtaq S, Abbasi BH, Uzair B, et al. Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents. EXCLI J. [Internet]. 2018 mayo [citado 4/10/2018]; 17: 420-451. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.17179/excli2018-1174>.
6. Kr Sachan A, Vishnoi G, Kumar R. Need of standardization of herbal medicines in modern era. Int. J. Phytomed. 2016; 8(3): 300-307.
7. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2013. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/95008>.
8. Butt J, Ishtiaq S, Ijaz B, et al. Standardization of Herbal Formulations at Molecular Level. J. Pharmacog. Nat. Prod. [Internet]. 2018 [citado 12 feb 2019]; 4(1): 8 páginas. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4172/2472-0992.1000150>.
9. Ghosh D. Quality Issues of Herbal Medicines: Internal and External Factors. Int. J. Complement. Alt. Med. 2018; 11(1): 67-69.
10. Lastres M, Ruiz-Zapata T, Castro M, et al. Conocimiento y uso de las plantas medicinales de la comunidad Valle de la Cruz, estado Aragua. Pittieria. 2015; 39: 59-89.
11. Panfet CM. Plantas útiles de la familia Clusiaceae cultivadas en el Jardín Botánico Nacional de Cuba. Rev. Jard. Bot. Nac. 2009-2010; 30-31: 113-117.
12. Volpato G, Godínez D, Beyra A, et al. Uses of medicinal plants by Haitian immigrants and their descendants in the Province of Camagüey, Cuba. J. Ethnobiol. Ethnomed. 2009; 5: 16-24.
13. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. 2da edición. Vol. I, Cuba: Editorial Ciencia y Técnica; 2012. 228-229.
14. Riverón FB, Hernández Y, García A, et al. La colección de plantas medicinales del Jardín Botánico de Holguín, Cuba: su importancia social y científica. Rev. Jard. Bot. Nac. 2015; 36: 219-222.
15. Roig JT. Diccionario botánico de nombres vulgares cubano. Cuba: Editorial Ciencia y Técnica; 1988. 695.

16. Narkhede MB, Ajmire PV, Wagh AE. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activity of ethanol extract of *Murraya paniculata* leaves in experimental rodents. Research article. Int. J. Pharm. Pharmac. Sci. 2012; 4(1): 247-250.
17. Mamun-Or-Rashid AN, Sen MK, Jamal MA, et al. A comprehensive ethno-pharmacological review on *Lippia alba* M. Int. J. Biomed. Mat. Res. 2013; 1(1):14-20.
18. Sousa DG, Sousa SD, Silva RE, et al. Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. Braz. J. Med. Biol. Res. [Internet]. 2015 junio [citado 30 julio 2018]; 48(8): 697-702. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20154710>
19. NRSP 309. Norma Ramal. Medicamentos de origen vegetal. Droga cruda. Métodos de ensayo. 1992; 16-29.
20. Miranda M. Cuéllar A. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. Ciudad Habana: Universidad de La Habana; 2000: 25-49, 74-79.
21. NRSP 312. Norma Ramal. Medicamentos de origen vegetal. Extractos fluidos y tinturas. Métodos de ensayo. 1992:15-19.
22. Farmacopea Británica (British Pharmacopeia) [CD-ROM]. Vol. 1. London: Stationery Office; 2010.
23. Woisky R, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. J. Apic. Res. 1998; 37: 99-105.
24. Iraizoz A, Bilbao O, Barrios MA. Conferencias de tecnología farmacéutica II. La Habana: Enpes; 1990: 124.
25. USP 35- NF 30. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional. Vol. 1; 2012: 54-68.
26. Arcila N, Mendoza Y. Elaboración de una bebida instantánea a base de semillas de amaranto (*Amaranthus cruentus*) y su uso potencial en la alimentación humana. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2006; 23: 114-124.
27. Acevedo IP, García O, Contreras J, et al. Elaboración y evaluación de las características sensoriales de un yogurt de leche caprina con jalea semifluida de piña. Revista UDO Agrícola. 2009; 9(2): 442-448.
28. Tabart J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various test. Food Chem. 2009; 133: 1226-1233.
29. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. Anal. Biochem. 1996; 239(1): 70-76.
30. Commission E. Caring for animals aiming for better science of the European union. En: Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes 2010.
31. Griswold DE, Martin LD, Badger AM, et al. Evaluation of the cutaneous anti-inflammatory activity of fapiranes. Inflamm. Res. 1998; 47: 56-61.
32. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe D, et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". J. Ethnopharmacol. 2006; 106: 290-302.
33. Pérez M, Morón F, Sueiro ML, et al. Validación etnofarmacológica de *Nectandra coriacea* (Sw.) Griseb. y *Caesalpinia bahamensis* Lam. reportadas como diuréticas en el municipio Santa Clara. Rev. Cubana Plant. Med. 2011; 16(2):115-134.
34. Morales V, Osuna HR, Brechú A, et al. Evaluación del efecto antiurolítico del fruto de *Parmentiera aculeata* en rata Wistar. Bot. Sci. 2015; 93(2):1-6.
35. OECD 402. Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo. Guidelines for testing of chemical. Paris; 2002.
36. OECD 423. Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo. Guidelines for testing of chemical. Paris; 2002.
37. Mangas R. Estudio fitoquímico y potencialidades bioactivas de la especie *Clusia minor* L. [tesis doctorado]. La Habana: Universidad de La Habana; 2018. 98 p
38. Mangas R, Bello A, Cuesta O, et al. Polyprenylated benzophenones derivatives from *Clusia minor* L. fruits. Lat. Am. J. Pharm. 2008; 27 (5): 762-765.
39. Márquez I, Campo M, Cuesta-Rubio O, et al. Polyprenylated Benzophenone Derivatives from Cuban Propolis. J. Nat. Prod. 2005; 68: 931-934.
40. Mangas R, Leyva JC, Becerra RM, et al. Phytochemical screening and isolation of triterpenes and sterols from *Clusia minor* L. leaves. Rev. Cubana Plant. Med. [Internet]. 2018 septiembre [citado 10/07/2019]; 23(3): 11 páginas. Disponible en: <http://www.replantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/797>.
41. Mangas R, Montes de Oca R, Bello A, et al. Caracterización por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas del extracto apolar de las hojas de *Clusia minor* L. Lat. Am. J. Pharm. 2008; 27 (5): 747-751.
42. Mangas R, Montes de Oca R, Herrera ME, et al. GC/MS analysis and bioactive properties of extracts obtained from *Clusia minor* L. leaves J. Mex. Chem. Soc. 2018; 62(4): 170-188.
43. Mangas R, Reynaldo G, Dalla MT, et al. Gas Chromatography/Mass Spectrometry characterization and antinociceptive effects of the ethanolic extract of the leaves from *Clusia minor* L. J. Pharm. Pharmacogn. Res. 2018; 7(1): 21-30.
44. Felipe A, Gutiérrez Y, Scull R, et al. Pharmacognostic study and antioxidant capacity of three fractions from the stem of *Caesalpinia bahamensis* Lam. J. Pharmacog. Phytochem. 2019; 8(3): 3079-3083.
45. Anouar EH, Gierschner J, Duroux JL, et al. UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. Food Chem. 2012; 131:79-89.
46. Felipe A, Marrero D, Scull R, et al. Composición química de una fracción apolar del extracto metanólico de la madera de *Caesalpinia bahamensis* Lam. (BRASILETE). Rev. Cienc. Farm. Aliment. 2017; 3(2):1-8.
47. Felipe A, Hernández I., Gutiérrez Y, et al. Phytochemical study of the stem of *Caesalpinia bahamensis* Lam. and characterization of its aqueous and hydroalcoholic extract. J. Pharm. Pharmacog. Res. 2019; 7(1):12-20.
48. Mayee R, Thosar A. Evaluation of *Lantana camara* Linn. (Verbenaceae) for antiurolithiatic and antioxidant activities in rats. Int. J. Pharm. Clin. Res. 2011; 3:10-14.
49. Casado CM, Gutiérrez YI, Varona N. Evaluación de la calidad, seguridad y capacidad antioxidante de *Murraya paniculata* L. Jack y su tintura. Rev. Cub. Plant. Med. 2014; 19(2): 208-217.
50. Varona N, Gutiérrez YI, Casado CM, et al. Validación de un método por CLAR para la cuantificación de L-prolina en la tintura al 20 % de *Murraya paniculata* L. Jack. Rev. Cubana Farm. 2014; 48(2): 296-306.
51. Gutiérrez Y, Scull R, Monzote L, et al. Comparative pharmacognosy, chemical profile and antioxidant activity of extracts from *Phania matricarioides* (Spreng.) Griseb. collected from diffe-

rent localities in Cuba. Plants [Internet]. 2018 diciembre [citado 10/01/2019]; 7(4):13 páginas. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/plants7040110>.

52. Gutiérrez Y, Scull R, Villa A, et al. Chemical Composition, Antimicrobial and Antiparasitic Screening of the Essential Oil from *Phania matricarioides* (Spreng.) Griseb. Molecules [Internet]. 2019 abril [citado 5/06/2019]; 24(8): 11 páginas. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24081615>.

Recibido: 11/07/2020

Aprobado: 26/09/2020

Agradecimientos. A los profesores y trabajadores del grupo NaTuRa de la Universidad de Amberes, en especial, al Prof. Dr. Luc Pieters y Dra. Kenn Foubert por su colaboración en el desarrollo de las investigaciones y a los proyectos VLIR por el apoyo financiero.

Declaración de conflictos de interés. Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Contribución de autoría

1. Conceptualización: Raisa Mangas Marín, Yamilet Gutiérrez Gaitén, René Delgado Hernández, Idania Rodeiro Guerra
2. Curación de datos: Raisa Mangas Marín, Yamilet Gutiérrez Gaitén
3. Análisis formal: Yamilet Gutiérrez Gaitén, Alejandro Felipe González

4. Adquisición de fondos: Raisa Mangas Marín, Yamilet Gutiérrez Gaitén, René Delgado Hernández, Lianet Monzote Fidalgo, Idania Rodeiro Guerra
5. Investigación: Raisa Mangas Marín, Yamilet I. Gutiérrez Gaitén, Alejandro Felipe González, Ramón Scull Lizama, René Delgado Hernández, Lianet Monzote Fidalgo, Idania Rodeiro Guerra
6. Metodología: Raisa Mangas Marín, Yamilet Gutiérrez Gaitén, Alejandro Felipe González, Ramón Scull Lizama, René Delgado Hernández, Lianet Monzote Fidalgo, Idania Rodeiro Guerra
7. Administración del proyecto: Raisa Mangas Marín, Yamilet Gutiérrez Gaitén, René Delgado Hernández
8. Recursos: Raisa Mangas Marín, Yamilet Gutiérrez Gaitén, Alejandro Felipe González, Ramón Scull Lizama, René Delgado Hernández, Lianet Monzote Fidalgo, Idania Rodeiro Guerra
9. Software: -
10. Supervisión: Raisa Mangas Marín, Yamilet Gutiérrez Gaitén, René Delgado Hernández
11. Validación: Yamilet Gutiérrez Gaitén, René Delgado Hernández, Idania Rodeiro Guerra
12. Visualización: Raisa Mangas Marín, Yamilet Gutiérrez Gaitén
13. Redacción – borrador original: Raisa Mangas Marín, Yamilet Gutiérrez Gaitén
14. Redacción – revisión y edición: Raisa Mangas Marín, Yamilet Gutiérrez Gaitén, René Delgado Hernández

Financiación. Estos estudios fueron financiados por la Red de MacroUniversidades de América Latina y el Caribe en una estancia predoctoral de Raisa Mangas Marín CRAI/168-39/2017 y por el proyecto VLIR-USO, ZEIN2016PR418-75155 (2016-2020), Bélgica.

