

## Phytochemical study of native plant species used in traditional medicine in Loja Province

Estudio Fitoquímico de Especies Vegetales Nativas utilizadas en la Medicina Tradicional de la Provincia de Loja

Ordóñez Vivanco, Paola<sup>1</sup>; Vega Esparza, Mónica<sup>2</sup>; Malagón Avilés, Omar<sup>3</sup>

Planta de Productos Naturales. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador

1 [paolaordez@yahoo.es](mailto:paolaordez@yahoo.es)

2 [monicavec@yahoo.com](mailto:monicavec@yahoo.com)

3 [omalagón@utpl.edu.ec](mailto:omalagón@utpl.edu.ec)

March 2006

Download at: <http://www.lyonia.org/downloadPDF.php?pdfID=2.402.1>

# Phytochemical study of native plant species used in traditional medicine in Loja Province

## Resumen

La clase de metabolitos secundarios de extractos totales de 21 plantas de la región sur del Ecuador utilizadas en la medicina tradicional, fueron analizadas por medio de marchas fitoquímicas. Las especies estudiadas fueron: *Ficus subandina* Dugand., *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harás, *Alnus acuminata* Kunth, *Artemisia sodiroi* Hieron, *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers., *Baccharis obtusifolia* Kunth, *Bidens andicola* Kunth, *Cestrum sendtnerianum* C. Martius, *Crotalaria* sp., *Gynoxys verrucosa* Wedd., *Ludwigia peruviana* (L.) H. Hara., *Melilotus indica* (L.) All., *Salvia tiliifolia* Vahl, *Siparuna eggertii* Hieron, *Siparuna muricata* (Ruiz & Pav.) A. Dc., *Solanum americanum* Mill, *Tagetes filifolia* Lag., *Viola odorata* L., *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers., *Callisia repens* (Jacq.) L., *Piper barbatum* Kunth,. Fitoquímicamente se determinó la presencia de alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, esteroides, lactonas sesquiterpénicas, glicósidos cardiotónicos, antraquinonas, a través de pruebas de coloración y precipitación. El fraccionamiento biodirigido de *Piper barbatum* Kunt, contra *Artemia salina*, usando la técnica de Cromatografía en Columna y Cromatografía en Capa Fina permitió la indentificación de esteroides, glicósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas en la fracción bioactiva.

Palabras clave: Metabolitos secundarios, cromatografía en capa fina, cromatografía en columna, fraccionamiento biodirigido.

## Introducción

El Ecuador posee una gran tradición cultural en el aprovechamiento de especies vegetales con fines terapéuticos. La Provincia de Loja cuenta con una gran riqueza vegetal que ha sido escasamente estudiada en este campo, no registrándose actualmente publicaciones sobre el uso de las plantas de la zona sur del Ecuador.

En esta investigación, se reporta la clase de metabolitos secundarios presentes en 21 especies nativas de la región sur del Ecuador, utilizadas en la medicina tradicional, siete especies de la familia *verrucosa*; dos de la familia Solanaceae: *S.americanum* y *C. sendtnerianum*; una de la familia Violaceae la *V. odorata*; tres de la familia Moraceae: *P. subandina*, *S. eggertii*, y *S. muricata*, una de la familia Lamiaceae la *S. tiliifolia*, una de la familia Phytolaccaceae: *G. integrifolia*, una de la familia Piperaceae: *P. barbatum*., una de la familia Betulaceae: *A. acuminata*, dos de la familia Fabaceae: *Crotalaria Sp.* y *M. indica*, una de la familia Commelinaceae la *C. repens* y una de la familia Onagraceae la *L. peruviana*.

El estudio fitoquímico de algunas especies *C. sendtnerianum* (Haraguchi et al. 1999, 2000) *B. andicola* (Tommasi et al. 1998), *V. odorata* (Svangard et al. 2003), *B. genistelloides* (Bohlmann et al. 1979, Kuroyanagi et al. 1985, Jakurovic et al. 1990, Hossen et al. 1992, Suttisri et al. 1994, Melo et al. 2001), *B. latifolia*(Bohlmann et al. 1979, Jakurovic et al. 1990), *S. Spec* (Ulubilen 2003)., *M. indica* (Gupta et al. 1996) han sido motivo de investigación. No se encontraron referencias bibliográficas para las especies: *B. obtusifolia*, *T. filifolia*, *S. americanum*, *A. sodiroi*, *F. subandina*, *S. tiliifolia*, *S. eggertii*, *S. muricata*, *G. integrifolia*, *P. barbatum*, *A. acuminata*, *Crotalaria sp.*, *C. repens*, *L. peruviana* y *G. verrucosa*.

## Materiales y Métodos

### *Obtención de extractos totales*

La materia vegetal fue recolectada y sometida a un examen visual para determinar y eliminar las partes deterioradas e impurezas adheridas a ella. Luego fue colocada en un secadero de bandejas a 37°C por alrededor de 48 horas. Se disminuyó el tamaño de partícula de la planta a aproximadamente 1 cm. con la finalidad de facilitar la penetración del solvente en el tejido vegetal. La extracción de los compuestos se realizó por maceración dinámica, a temperatura ambiente por 5 horas, con una relación solvente/planta 10:1. La velocidad de agitación fue de 1500-2000rpm.

Se utilizó metanol como solvente debido a su alta polaridad ya que es poco selectivo lo que permite obtener un extracto que contenga la mayor parte de los constituyentes químicos de la planta, a excepción de los extractos de *S. americanum* y *F. subandina* que se obtuvieron en

diclorometano y hexano respectivamente, debido a su bajo rendimiento en metanol.

Se empleó una filtración a vacío por medio de una bomba de succión sobre papel filtro. La concentración de los extractos se realizó en un rotaevaporador a 30°C y presión reducida, a una velocidad de 150 rpm, hasta obtener un extracto sólido o semisólido. Después se liofilizaron los extractos. Los extractos secos se mantienen en recipientes de vidrio cerrados en congelación.

#### *Machas fitoquímicas*

##### Alcaloides

Para la determinación de alcaloides se pesan 3g de extracto concentrado y se extraen con 4ml de HCl al 5%, luego se alcaliniza la mezcla con 2ml de NaOH al 20%. Después se extrae primero con 10ml de CHCl<sub>3</sub>, se etiqueta como 1.1 y luego con CHCl<sub>3</sub> / EtOH 3:2, se etiqueta como 1.2. Cada una de estas fracciones se concentran por separado en el rotaevaporador a presión reducida y a una temperatura de 30°C. Se extrae por separado con HCl al 5% y se etiqueta como (1111) y (1112). Finalmente se filtra, y con el filtrado realizar la prueba de alcaloides utilizando el reactivo de Dragendorff (Lock 1994).

##### Esteroides, Saponinas, Flavonoides, Taninos y Antraquininas

Se pesan 6g de extracto metanólico concentrado y se extraen con hexano; se separan las fases: la líquida se etiqueta como (211) y la sólida como (222). La fase líquida se filtra y se etiqueta como (2111) y con esto se realiza una capa bidimensional sobre sílicagel para determinar la presencia de esteroides, utilizando: hexano / acetona 80:20 y hexano / éter etílico / ácido acético 75:25:1 y como revelador Liebermann – Burchard (Lock 1994).

Se extrae la fase sólida (222), con etanol / agua 1:7 en baño María a 60°C por 15 min aproximadamente, se recoge el filtrado y se etiqueta como (2222), con este se realizan las pruebas respectivas para la determinación de: saponinas, flavonoides, antraquinonas y taninos.

- Saponinas (espuma).- Se agita una parte del extracto (2222) vigorosamente por 30 segundos. La presencia de saponinas es indicada por la formación de una espuma persistente por un lapso de 30min (Lock 1994).

- Flavonoides (Shinoda).- A una parte del extracto (2222) se le coloca un pequeño trozo de magnesio y unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, si se desarrolla inmediatamente una coloración es indicativo de la presencia de: flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración (Lock 1994).

- Antraquinonas (Bornträger).- Se hierve una parte del extracto (2222) durante 5min, con 10 ml de KOH al 5% y 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 6%. Después que se filtra la suspensión, se acidula el filtrado con 10 gotas de ácido acético y luego se extrae con 10ml de benceno. La capa bencénica se pone amarilla, se separa; y unos 5ml de solución bencénica se agitan con 2.5ml de NaOH al 10%. Las antraquinonas colorean de rojo la capa alcalina (Lock 1994).

- Taninos (Cloruro Férrico).- Se puede comprobar la presencia de taninos, si al extracto inicial (2222) se agregan unas gotas de solución de FeCl<sub>3</sub> y aparecen colores: azul, azul negro, verde, azul verdoso y precipitado negro verdoso.

##### Glicósidos Cardiotónicos y Lactonas Sesquiterpénicas

Se pesan 3g de extracto concentrado y extraer con 10ml de acetato de plomo al 5%, a 60°C por 15 minutos. Se filtra y al filtrado se agrega dos gotas de ácido acético, luego se extrae 3 veces con 15 ml de CHCl<sub>3</sub>, agitando lentamente para evitar que se formen emulsiones. Se concentra hasta sequedad y se vuelve a extraer con EtOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1ml) 1:1. Se realiza una TLC para la determinación de lactonas sesquiterpénicas utilizando CHCl<sub>3</sub> / acetona 90:10 y como revelador vainillina - sulfúrica. Para la determinación de glicósidos cardiotónicos una TLC utilizando CHCl<sub>2</sub> / MeOH / agua 87: 12: 1 y como revelador Raymond (Lock 1994).

##### Cumarinas

Se pesan 10mg de extracto concentrado y se diluye con 1ml de MeOH y se realiza una TLC en sílicagel utilizando como solvente: Tolueno / Éter 1:1 (saturado con ácido acético al 10%) y como revelador KOH al 5% (Wagner et al. 1994).

##### *Fraccionamiento por polaridad*

Los extractos que presentaron bioactividad se fraccionaron con hexano y acetato de etilo o diclorometano y además se obtuvo el resto. A cada una de estas fracciones se les realizaron ensayos de bioactividad con la finalidad de determinar la fracción en la que se encuentran los componentes responsables de la actividad.

##### *Fraccionamiento biodirigido del Cordoncillo (Piper barbatum)*

Para retirar los azúcares y pigmentos contenidos en el extracto metanólico de *P. barbatum*, se

realizó una filtración utilizando 50g de Lichroprep RP – 18, empacados en una columna de 34cm x 2.5cm; y un sistema eluyente metanol / agua 4:1, variando las proporciones hasta llegar a adicionar metanol puro. Se recogieron 282 fracciones de aproximadamente 5ml cada una.

Después se lavó la columna con DCM y MeOH tratando de eliminar los pigmentos absorbidos sobre la sílica.

Como control de la CC se realizó una TLC (cromatoplas Merck sílicagel G-60) utilizando como eluyente MeOH / agua 4:1, con la finalidad de determinar las fracciones que deben ser reunidas. Las fracciones reunidas se secaron, liofilizaron y se evaluó su bioactividad con la prueba de Toxicidad con *A. salina*.

Se repitió este proceso hasta obtener 1.1g de extracto seco de la fracción que tenía bioactividad. Con el 1.1g obtenido se realizó un fraccionamiento en columna en fase directa. La columna que se empleó para este fin fue de 100cm x 7cm; se empacó con 500g de sílicagel 60 y hexano como eluyente inicial.

Los sistemas eluyentes utilizados en diferentes proporciones fueron: hexano / acetato de etilo: (95:5); (90:10); (85:15); (80:20); (70:30); (60:40); (50:50); (40:60); acetato de etilo/metanol/agua (90:10:1); metanol. La columna se lavó con acetato de etilo/ácido fórmico/ácido acético glacial/agua (100:11:11:27) hasta retirar los pigmentos situados en la parte superior de la columna.

Se recogieron 137 fracciones de aproximadamente 50 ml y una fracción de lavado. Se utilizó TLC (cromatoplas Merck sílicagel G-60), para controlar la ejecución de la columna y la reunión de las fracciones, luego éstas se llevaron a sequedad y se analizó su bioactividad. De los resultados obtenidos en bioactividad se determinó la fracción que presentó mayor toxicidad en el ensayo con *A. Salina* y a ésta se le realizó un fraccionamiento final.

Se reunieron las fracciones fueron activas y se realizó un nuevo fraccionamiento en columna en fase inversa. Para lo cual se utilizaron 0.3803g de muestra y 50g de Lichroprep RP – 18. De las fracciones recogidas se evaluó la citotoxicidad frente a *A. Salina*.

Se realizó una marcha fitoquímica para la determinación de metabolitos secundarios presentes en la fracción activa aislada, mediante TLC (cromatoplas Merck sílicagel G- 60), como se indica a continuación:

#### *Alcaloides*

Se utilizó como eluyente: tolueno / acetato de etilo / etilamina (70:20:10); y como revelador se esparció una solución de Dragendorff y luego una solución de ácido sulfúrico etanólico al 5%. Manchas café o naranja y al UV – 365nm manchas fluorescentes azules o amarillas, indican la presencia de alcaloides (Wagner et al. 1994).

#### *Saponinas*

Se usó como solvente cloroformo / metanol / agua (64:50:10) y como revelador Vainillina – Sulfúrica. La presencia de manchas azules o azules violetas y zonas amarillas (visible) son indicativo de la existencia de saponinas (Wagner et al. 1994).

#### *Glicósidos Cardiotónicos*

Como solvente se utilizó acetato de etilo / metanol / agua (81:81:8), y revelador Lieberman - Buchard. Si se detectan manchas fluorescentes azules, café, verde y amarilla, existen glicósidos cardiotónicos (Wagner et al. 1994).

#### *Esteroides y Lactonas Sesquiterpénicas*

Se realizaron de la misma manera que en la marcha fitoquímica de los extractos totales descrita anteriormente.

## **Resultados y Discusión**

### *Marchas fitoquímicas*

Se presentan en la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Resultado de las marchas fitoquímicas de los extractos totales

N. Científico	Extracto	Resultado
<i>C. sendtnerianum</i>	metanólico	AL, FL,TA,ES,LS
<i>P. barbatum</i>	metanólico	AL,FL,TA,ES,LS,CU
<i>B. latifolia</i>	metanólico	AL, FL,TA,ES,LS,CU
<i>B. obtusifolia</i>	metanólico	ES,LS,CU
<i>B. genistelloides</i>	metanólico	AL,FL,TA,ES,LS,CU,Gca
<i>S. muricata</i>	metanólico	AL,FL,TA,ES,LS,CU,Gca
<i>G. verrucosa</i>	metanólico	AL,FL,TA,ES,LS
<i>B. andicola</i>	metanólico	AL,FL,TA,ES,LS
<i>A. acuminata</i>	metanolico	FL,TA,ES,LS,Gca
<i>L. peruviana</i>	metanolico	AL,FL,TA,ES,LS,SA
<i>M. indica</i>	metanolico	AL,FL,TA,ES,LS,CU,Gca
<i>A. sodiroi</i>	metanolico	AL,TA,ES,LS, Gca
<i>G. integrifolia</i>	metanólico	AL,FL,ES,LS,CU
<i>C. repens.</i>	metanolico	AL,ES,LS
<i>T. filifolia</i>	metanolico	AL,FL,TA,ES,LS
<i>S. americanum</i>	diclorometano	-
<i>Crotolaria sp.</i>	metanólico	AL,FL,TA,ES,LS
<i>S. eggessii</i>	metanolico	AL,FL,TA,ES,LS,SA,AN
<i>S. tiliifolia</i>	metanolico	AL,FLTA,ES,LS
<i>V. odorata</i>	metanólico	AL,FL,TA,ES,LS,CU,Gca
<i>F. subandina</i>	hexano	LS

AL= Alcaloides; SA= Saponinas; TA= Taninos; ES= Esteroides; GCa= Glicósidos cardiotónicos; FL= Flavonoides; CU= Cumarinas; AN= Antraquinonas; LS= Lactonas sesquiterpénicas.

#### *Fraccionamiento por polaridad*

De acuerdo a las pruebas de bioactividad realizadas se determinó que los extractos que son activos en la prueba con *A. Salina* son: *P. barbatum* Kunt (Cordoncillo), *L. peruviana* (Mejorana de campo), *B. latifolia* (Chilca larga) y *C. repens* (Calcha). Con estos extractos se hicieron fraccionamientos por polaridad inicialmente con hexano y luego con acetato de etilo, obteniéndose además una porción de extracto que no se disuelve en los dos anteriores, al cual se le denominó Resto.

Los extractos metanólicos de *L. peruviana* y *B. latifolia* se fraccionaron solamente en hexano y el resto, porque los porcentajes que se obtienen con diclorometano o con acetato de etilo del extracto metanólico fueron muy bajos, del 2% en peso.

El extracto metanólico de *C. repens* se disuelve totalmente en hexano por lo que no fue posible fraccionarlo.

Con estos fraccionamientos se realizó marcha fitoquímica para determinar en ellos la presencia de metabolitos secundarios y también pruebas de bioactividad. Los resultados obtenidos se

presentan en la tabla siguiente:

**Tabla 2.** Resultado de marchas fitoquímicas de los fraccionamientos

N. Científico	Extracto	Resultado
<i>P. barbatum</i>	hexano	LS
<i>P. barbatum</i>	a. etilo	AL,TA,ES
<i>P. barbatum</i>	resto	AL,FL,TA,LS,CU
<i>B. latifolia</i>	hexano	ES
<i>B. latifolia</i>	resto	TA,ES,CU,SA,AN
<i>L. peruviana</i>	hexano	ES,LS
<i>L. peruviana</i>	resto	TA,ES,CU,SA,AN

AL= Alcaloides; SA= Saponinas; TA= Taninos; ES= Esteroides; GCa= Glicósidos cardiotónicos; FL= Flavonoides; CU= Cumarinas; AN= Antraquinonas; LS= Lactonas sesquiterpénicas.

#### *Fraccionamiento biodirigido*

El fraccionamiento biodirigido de la especie *P. barbatum* Kunt, permitió aislar una fracción activa contra *A. salina*. En las pruebas fitoquímicas realizadas a esta fracción se determinó presencia de esteroides, lactonas sesquiterpénicas y glicósidos cardiotónicos.

## Conclusiones

Del total de las especies vegetales investigadas (21 plantas), el 81% presentaron: alcaloides, 90.5% esteroides, 9.5% saponinas, 71.4% flavonoides, 76.2% taninos, 4.8% antraquinonas, 28.6% glicósidos cardiotónicos, 90.5% lactonas sesquiterpénicas y 38% cumarinas.

De acuerdo a las pruebas de bioactividad con *A. salina* fueron clasificados como tóxicos los extractos metanólicos de *B. latifolia* (DL50 78,56 ppm.), *C. repens* (DL50 de 69,97 ppm.); *L. peruviana* (DL50 63,56 ppm.) y *P. barbatum*, (DL50 37,36 ppm.).

En la fracción en hexano de *L. peruviana* se determinó presencia de esteroides y lactonas sesquiterpénicas, mientras que en la fracción restante se encontraron esteroides, saponinas, taninos, antraquinonas y cumarinas. En la prueba de toxicidad contra *A. salina* mostrarán DL50 133.99 ppm. y DL50 149.74 ppm. respectivamente, por lo tanto son tóxicos.

La fracción en hexano de *B. latifolia* presentó un DL50 84.27 ppm., en el análisis fitoquímico dio positiva únicamente la prueba de esteroides. En la fracción resto se encontraron esteroides, saponinas, taninos, antraquinonas y cumarinas, además mostró un DL50 88.02 ppm. Estas fracciones son tóxicas.

La fracción en hexano de la especie *P. barbatum* contiene lactonas sesquiterpénicas, en la fracción en acetato de etilo: alcaloides, esteroides y taninos; y en la fracción resto: alcaloides, flavonoides, taninos, lactonas sesquiterpénicas y cumarinas. La fracción en acetato de etilo mostró un DL50 2.77 ppm., lo que lleva a deducir que los compuestos responsables de la actividad biológica son de naturaleza medianamente polar.

Del fraccionamiento biodirigido de *P. barbatum* se logró aislar una fracción activa con *Artemia Salina*, (DL501034 ppm.); esta fracción en las pruebas fitoquímicas mostró presencia de esteroides, glicósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas.

## Referencias

Bohlmann, F. et al. 1979. Ein neues Diterpen und weitere Inhaltsstoffe aus *Baccharis*-arten. In Serie *Natürlich vorkommende Terpen-Derivativ*. Bohlmann, F. & K.H. Knoll, *Phytochemistry* 18: 995.

Bruneton, J. 2001. *Farmacognosia*. Segunda edición. España: Acribia.

Bruni, A. 1999. *Farmacognosia generale e applicata*. Italia: Piccin.

- Cannell, R. 1998. *Natural Product Isolation*. Totowa: Humana Press.
- Dewick, P. & M. Chimica. 2001. *Biosintesis e Bioattività delle Sostanze Naturali*. Padova: Piccin.
- Dominguez, J. 1973. *Métodos de Investigación fitoquímica*. México: Limusa.
- Gupta, A.K. & S. Bose. 1986. Structure of the D-galacto-D-manan isolated from seeds of *Melilotus indica* All. *Carbohydr. Res.* 153: 69-78.
- Haraguchi, M. et al. 1999. New polyhydroxylated saponin and saponin from the leaves of *Cestrum sendtherianum*". *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 47(4): 582-584 CODEN: CPBTAL; ISSN: 0009-2363.
- Haraguchi, M. et al. 2000. Steroidal saponins from the leaves of *Cestrum sendtenerianum*. *Phytochemistry* 55(7): 715-720.
- Hossen, A., M.V. Pereyra & G.Z. Bustamante. **CUANDO???** *Evaluación in vivo de la actividad hipoglucemiante de plantas medicinales de los valles altos y bajos de Cochabamba*. Fármacos, Alimentos y Cosméticos (PROFAC). Casilla 992. Cochabamba-Bolivia.
- Jakurovic, J. et al. 1990. Sesqui- and diterpenes from *Baccharis species*". *Phytochemistry* 29: 2217-2222.
- Kuroyanagi **NOMBRE???** et al. 1985. Studies on the Constituents of *Baccharis genistelloides*". *Chem.Pharm.Bull.* 33(11): 5075-5078.
- Lock, O. 1994. *Investigación Fitoquímica*. Segunda edición. Perú Pontificia Universidad Católica del Perú Fondo editorial, 1994.
- Melo, S.F. et al. 2001. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. *Mutat Res.* 496(1-2): 33-38.
- Sharapin, N. 2000. *Fundamentos de Tecnología de productos Fitoterapéuticos*. Bogotá : Quebecor-Impreandes.
- Suttisri, R. et al. 1994. Neo-clerodane diterpenoids and other constituents from *Baccharis genistelloides*. *Phytochemistry* 35(2): 443-6.
- Svagard, E. et al. 2003 Primary and 3-D modelled structures of two cyclotides from *Viola odorata*. Available online 9 July 2003. **DONDE????????**
- Tommasi, **NOMBRE????** 1998. Flavonol and Chalcone Ester Glycosides from *Bidens andicola*. *J.Nat.Prod.* 61(8): 973-977.
- Ulubelen, A. 2003. Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species. *Phytochemistry* 64(2): 395-399.
- Wagner, H. S. Bladt & E.M. Zgainski. 1984. *Plant drug analysis*. Germany: Springer-Verlag, 1984.
- Zaragoza, T. et al. 2004. Proyecto PFN-0133. *Bioactividad de aceites esenciales y extractos de plantas medicinales y aromáticas de la región sur del Ecuador*. Ecuador, FUNDACYT- UTPL.