



**Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas
Facultad de Química - Farmacia
Departamento de Farmacia**

**Tesis para optar por el Título de Licenciado en
Ciencias Farmacéuticas**

**Evaluación farmacognóstica y fitoquímica de las
hojas de *Eugenia Clarensis* (Britton & P.Wilson).**

Autor: Rogelio Puerto Abrahan

Tutor: Dra. Liliana Vicet Muro

Msc. Dany Siverio Mota

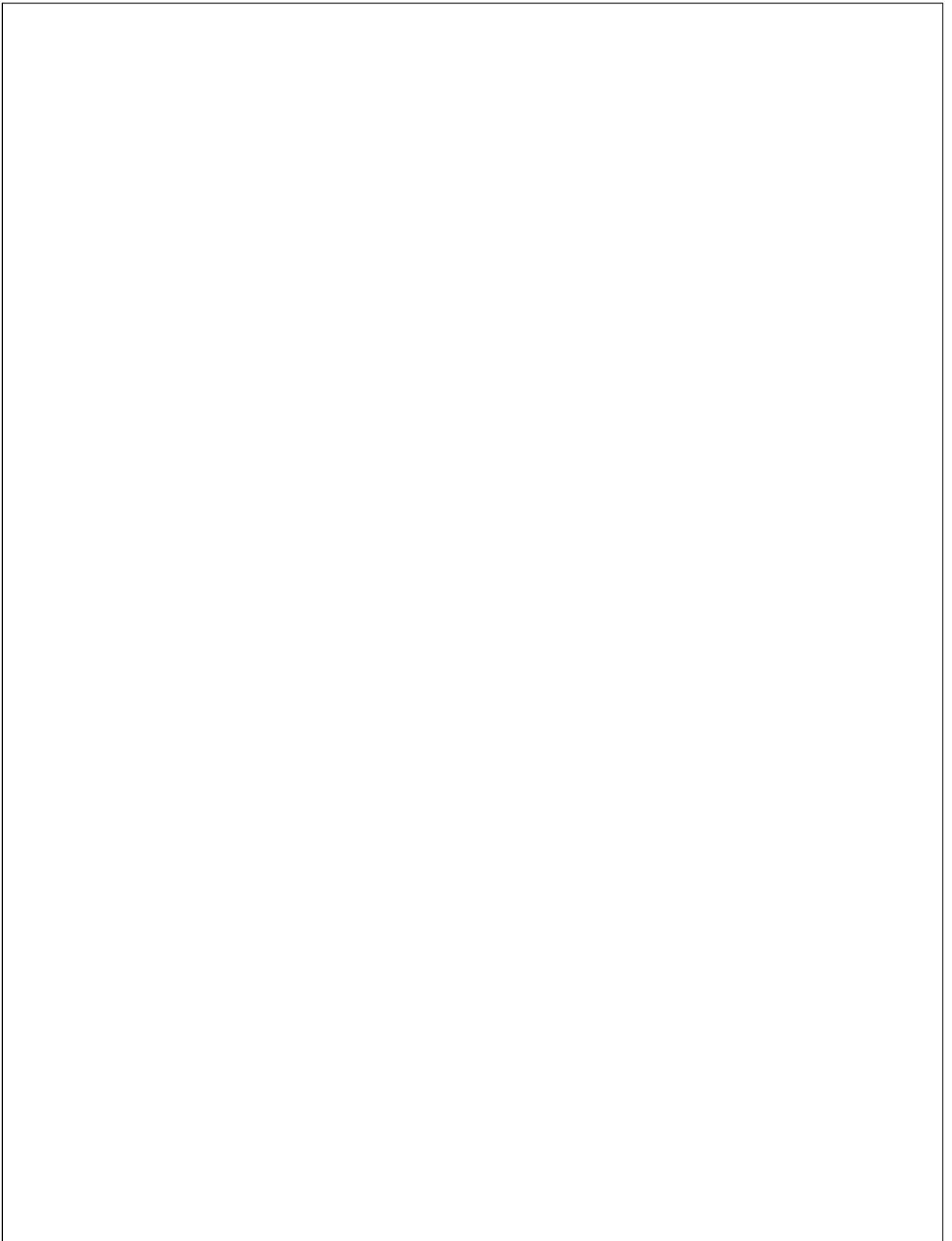
Santa Clara

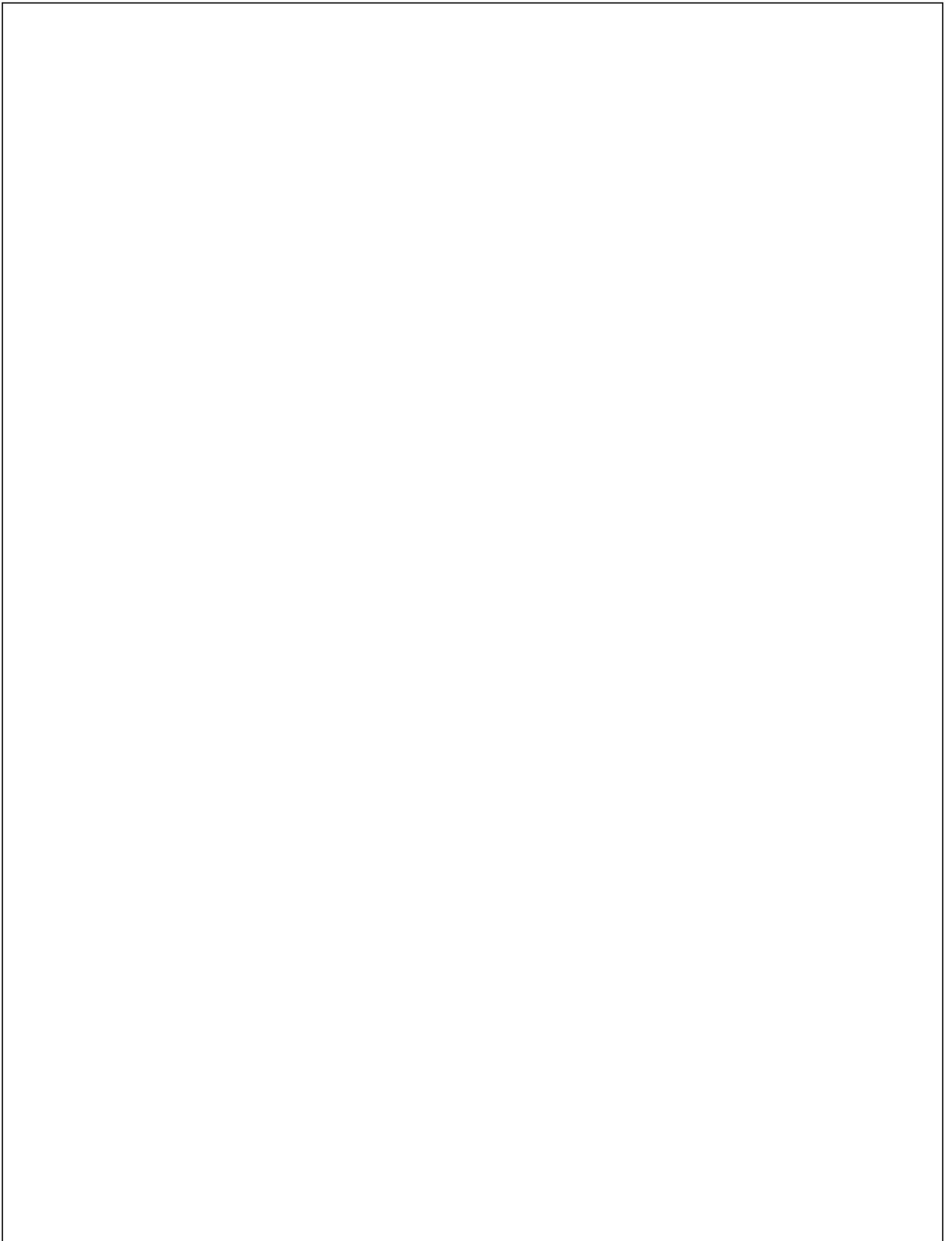
2014

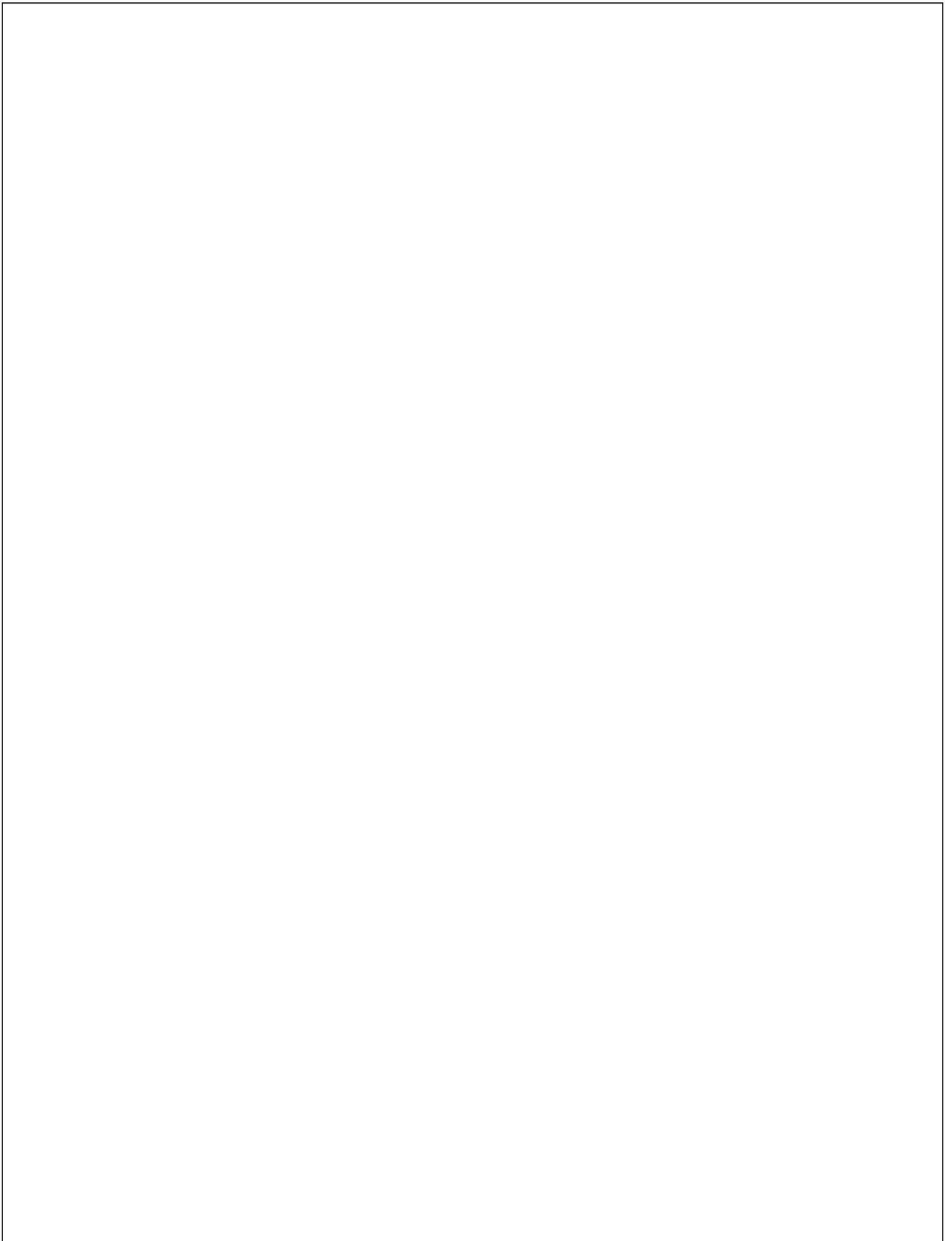
Exergo

Dedicatoria

Agradecimiento









Resumen

Eugenia clarensis (Britton & P.Wilson) es una de las especies de la familia Myrtaceae, que por ser endémica de nuestro país carece de estudios científicos que justifiquen aplicaciones farmacéuticas. En este trabajo se llevó a cabo la evaluación farmacognóstica y fitoquímica de las hojas de la planta *Eugenia clarensis*. Se realizó la estandarización del secado por dos vías: a la sombra y en la estufa a 30°C, considerándose el método de secado en la estufa el más adecuado de acuerdo a los parámetros evaluados. Se determinaron los índices numéricos de la droga cruda secada en la estufa a 30°C, los cuales se encontraron dentro de los límites establecidos para este tipo de material vegetal. La evaluación fitoquímica incluyó un tamizaje cualitativo de los posibles metabolitos presentes en los diferentes extractos de la planta, revelando la presencia fundamentalmente de flavonoides, fenoles y taninos, ácidos grasos, triterpenos y/o esteroides, cumarinas y/o lactonas. Adicionalmente se caracterizaron tres extractos para evaluar su posible utilización en el tamizaje farmacológico. En este sentido, el extracto alcohólico mostró los mayores índices de fenoles y flavonoides totales con 14.18 mgEAG/mL y 4.71 mgER/mL, respectivamente; mostró también el mejor perfil cromatográfico y por tanto, las mayores potencialidades como posible droga antiinflamatoria y analgésica. Finalmente, se realizó un fraccionamiento del extracto alcohólico a través de varios procedimientos que incluyeron el tratamiento con carbón activado y procesos de cristalización. Este fraccionamiento permitió obtener una fracción con relativa pureza para someterse a caracterización química. Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento fitoquímico de esta planta, sentando las bases para las investigaciones encaminadas al desarrollo de nuevos ingredientes activos para la industria farmacéutica.

Abstract



Abstract

Eugenia clarensis (Britton & P.Wilson) is a species of the family Myrtaceae, that is endemic in our country without scientific studies proving pharmaceutical applications. This work was performed pharmacognostic and phytochemical evaluation of the leaves of *Eugenia clarensis*. Standardization of drying was performed in two ways: in the shade and in the oven at 30 ° C, considering the best drying method on the oven according to the evaluated parameters. Numerical index were determined in the crude drug dried in the oven at 30 ° C, which are inside the limits for this kind of plant material. Phytochemical evaluation included qualitative screening of possible composition in different plant extracts, It basically revealing the presence of flavonoids, phenols and tannins, fatty acids, triterpenes and / or steroids, coumarins and / or lactones. Additionally, three extracts was characterized in order to evaluate it potential use in pharmacological screening. Alcoholic extract showed the highest levels of phenols and total flavonoids, 14.18 mgEAG / mL and 4.71 mgER / mL, respectively; this extract also showed the best chromatographic profile and the greater potentialities as a possible anti-inflammatory and analgesic drug. Finally, the alcoholic extract was fractionated by different procedures including treatment with activated charcoal, and crystallization processes. This fractionation yielded a fraction with relative purity for further chemical characterization. The results contribute to the phytochemical knowledge of this plant, laying the groundwork for research aimed at developing new active ingredients for the pharmaceutical industry.

ÍNDICE

Índice

Introducción	1
Objetivo General:.....	2
Objetivos Específicos:.....	3
Capítulo I: Revisión bibliográfica.....	4
1.2. Flora de Cuba.....	4
1.3. Familia Myrtaceae.....	5
1.3.1. Generalidades.....	5
1.3.2. Características	6
1.3.3. Importancia económica.....	6
1.4. Género Eugenia.....	7
1.4.1. Origen, distribución geográfica	7
1.4.2. Descripción Botánica.....	7
1.4.3. Interés farmacológico.....	8
1.4.4. Antecedentes de estudios fitoquímicos	9
1.5. Eugenia clarensis (Britton & P. Wilson).	9
1.5.1. Origen, distribución geográfica	9
1.4.2. Clasificación botánica.....	9
1.5.2. Descripción Botánica.....	10
1.6. Estudios fitoquímicos.....	10
1.7. Consideraciones finales.....	12
Capítulo II: Materiales y Métodos.....	13
2.1. Materiales y Reactivos empleados.....	13
2.2. Preparación del material vegetal	14
2.2.1. Recolección del material vegetal	14
2.2.2. Evaluación Macroscópica de las hojas de <i>Eugenia clarensis</i>	14
2.2.3. Estandarización de secado.....	14
2.3. Determinación de índices numéricos.....	15
2.3.1. Contenido de humedad.....	15
2.3.2. Determinación de cenizas.....	16

2.3.3. Determinación de sustancias solubles	18
2.4. Caracterización físico-química de los extractos.....	19
2.4.1. Obtención de los extractos	19
2.4.2. Características organolépticas.....	19
2.4.3. Determinación del pH.....	19
2.4.4. Determinación del índice de refracción	20
2.4.5. Determinación de la densidad relativa.....	20
2.4.6. Análisis capilar	20
2.4.7. Determinación de sólidos totales.....	21
2.4.8. Evaluación fitoquímica de los extractos	21
2.5. Fraccionamiento del extracto etanólico	23
Capítulo III: Resultados y Discusión	25
3.2. Preparación del material vegetal	25
3.2.1. Recolección del material vegetal	25
3.2.2. Estandarización de secado.....	26
3.3. Determinación de índices numéricos	30
3.4. Caracterización físico-química de los extractos obtenidos de las hojas de <i>Eugenia clarensis</i>	32
3.5. Evaluación fitoquímica.....	34
3.5.1. Evaluación por Cromatografía en Capa Delgada	36
3.5.2. Análisis de los metabolitos de interés a los extractos.....	38
3.6. Fraccionamiento del extracto etanólico	39
3.6.1. Tamizaje fitoquímico de las hojas de <i>Eugenia clarensis</i>	41
3.6.2. Evaluación por Cromatografía en Capa Delgada (CCD).....	43
3.6.3. Evaluación por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	44
Conclusiones	49
Recomendaciones	50
Referencias Bibliograficas.....	52



INTRODUCCIÓN



Introducción

Los medicamentos herbarios, formaron la base de la atención de salud en todo el mundo desde los primeros días de la humanidad y siguen utilizándose ampliamente con una considerable importancia en el comercio internacional, no solo cuando los constituyentes de plantas se usan directamente como agentes terapéuticos sino también como materiales de base para la síntesis de los medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos. Se mantiene en aumento el reconocimiento de su valor clínico, farmacéutico y económico.⁽¹⁾ Por consiguiente, la reglamentación de la explotación y la exportación, junto con la cooperación y la coordinación internacionales, son esenciales para su conservación a fin de asegurar su disponibilidad para el futuro.⁽²⁾

A pesar de que los medicamentos herbarios se han usado durante muchos siglos, solo una cantidad relativamente pequeña de especies de plantas se ha estudiado para las posibles aplicaciones médicas. Se dispone de datos sobre la seguridad y la eficacia de un número aún menor de ellas, sus extractos y principios activos y las preparaciones que las contienen.⁽³⁾

La industria farmacéutica actual se ha basado en los conocimientos tradicionales para la síntesis y elaboración de fármacos, y el proceso de verificación científica de estas tradiciones continúa hoy en día, descubriéndose constantemente nuevas aplicaciones.⁽⁴⁻⁶⁾

Se estima que alrededor del 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional herbolaria en la atención primaria de la salud. En Asia, millones de personas mantienen su salud mediante el uso de hojas, raíces y cortezas de árboles. De hecho, el 25% de las medicinas prescritas por los médicos europeos y estadounidenses se derivan de plantas existentes en los bosques. Según reconocidos investigadores, prácticamente todas esas plantas se han descubierto gracias a la información derivada de su uso en medicina tradicional. El uso de las plantas medicinales y el rol que deben cumplir en la medicina actual lo determina la Organización Mundial de la Salud desde el año 1978, la cual estructuró en 1985 un Programa de Medicina Tradicional Herbolaria, reconociendo la existencia de 119 sustancias químicas de origen vegetal

que pueden considerarse fármacos importantes, útiles en más de 60 categorías terapéuticas y obtenidas principalmente de 91 especies.⁽⁷⁾ Así mismo el Ministerio de Salud Pública de Cuba tiene establecido un Programa de Investigaciones de Medicina Tradicional, que fue aprobado en 1986, para estudiar las plantas medicinales más utilizadas por la población y evaluar con métodos científicos actuales sus efectos farmacológicos y tóxicos. Esto permitirá incorporar a la llamada medicina moderna los medios medicinales tradicionales con verdadera efectividad, ganando prestigio en la práctica médica actual.⁽⁸⁾

Cuba posee relativa riqueza en plantas medicinales, las que fueron estudiadas por el destacado botánico Juan Tomás Roig. La mayor parte de las especies utilizadas por la población con fines medicinales, no son oriundas del país. En realidad, los estudios sobre las propiedades terapéuticas de las plantas autóctonas cubanas, están aún en ciernes.⁽⁹⁾

La especie *Eugenia clarensis* (Britton & P.Wilson) es una planta endémica de Cuba, que pertenece a la familia Myrtaceae y crece en la región central del país provincia Villa Clara (Motenbo). Se desconoce su utilización, aunque estudios desarrollados con gran número de mirtáceas sugieren que la especie posee potencialidades como agente antiinflamatorio.⁽¹⁰⁾

A partir de ello, el presente trabajo parte del siguiente **Problema Científico:** No se refiere en la literatura ningún estudio farmacognóstico y fitoquímico que avale la utilidad de la especie *Eugenia Clarensis* (Britton & P.Wilson) en la medicina natural.

Se plantea la siguiente **Hipótesis:** Si se realizan estudios farmacognósticos y fitoquímicos, se podrán emitir criterios sobre la posible utilidad de la especie *Eugenia Clarensis* (Britton & P.Wilson) en la medicina natural.

Para la realización del presente estudio se proponen los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Evaluar desde el punto de vista farmacognóstico y fitoquímico el material vegetal procedente de las hojas de *Eugenia clarensis* (Britton & P.Wilson).

Objetivos Específicos:

- Estandarizar el método de secado del material vegetal procedente de hojas de *Eugenia clarensis* (Britton & P.Wilson).
- Determinar índices farmacognósticos del material vegetal procedente de hojas de *Eugenia clarensis* (Britton & P.Wilson).
- Caracterizar extractos procedentes de hojas de *Eugenia clarensis* (Britton & P.Wilson) a través de determinaciones físico-químicas.
- Fraccionar el extracto etanólico a través de procedimientos que conduzcan a fracciones enriquecidas en los componentes mayoritarios.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Capítulo I: Revisión bibliográfica

1.2. Flora de Cuba

La diversidad vegetal de Cuba es impresionante. Por un lado, el número de plantas vasculares alcanza unas 7020 especies, de estas aproximadamente 6000 son plantas con flores, con un 50% de endemismo; por otro lado, la vegetación exhibe cerca de 30 tipos distintos de formaciones vegetales ^(11, 12) lo cual hace que el archipiélago cubano se incluya en una de las zonas claves (“hotspot”) de biodiversidad en el planeta. ⁽¹³⁾

La flora de Cuba se caracteriza no sólo por la variedad, sino por su endemismo, es decir, especies exclusivas de esta isla. Son varios los factores que han influido favorablemente en el alto endemismo, la gran diversidad de la flora y fauna cubanas y la existencia de impresionantes paisajes naturales y la formación de ese mosaico ecológico de gran riqueza y diversidad, como son: insularidad múltiple, clima tropical lluvioso, gran extensión de serpentinas y calizas, notables extensiones de arenas cuarcíticas y una estructura geomorfológica de particular interés, principalmente por tener un elevado porcentaje de rocas carbonatadas en las que se desarrollan procesos cárnicos de todo tipo y donde se formó todo un impresionante sistema cavernario. ⁽¹⁴⁾

Los huracanes, las corrientes marinas y las aves, han sido los principales transportadores de semillas desde tierras lejanas, que más tarde poblaron el territorio nacional de árboles de madera dura, palmas, arbustos y otras especies. ⁽⁹⁾

Los colonizadores trajeron plantas textiles y oleaginosas; cereales, legumbres, tubérculos, hortalizas y frutas como el mango, plátano, cítricos: naranja, limón y otras variedades. La especie vegetal exótica más útil introducida en Cuba es la caña de azúcar, la que junto a la palma real constituyen los elementos florales más típicos de la geografía cubana. Otros especímenes de gran utilidad a la economía son el tabaco, oriundo de Cuba, y el café, nativo de Etiopía, el arroz, de la lejana Asia, el maíz y el cacao, de la América continental, viandas, y otros. ⁽⁹⁾

Las regiones cubanas donde predominan las ofiolitas son conocidas por tener más endemismos vegetales que regiones aledañas. Los endemismos cubanos en estas zonas se distribuyen en 106 familias, diez de ellas acumulan casi el 55% de los taxones infra genéricos. Esas familias, con treinta o más endemismos cubanos colectadas en esos lugares son, en orden decreciente: *Rubiaceae*, *Myrtaceae*, *Euphorbiaceae*, *Asteraceae*, *Melastomataceae*, *Leguminosae*, *Orchidaceae*, *Arecaceae*, *Poaceae* y *Verbenaceae*. En los géneros con veinte o más endemismos totales se distinguen: *Eugenia*, *Calyptanthes*, *Rondeletia*, *Phyllanthus*, *Psychotria*, *Buxus*, *Leucocroton*, *Ossaea*, *Coccoloba*, *Croton* y *Gesneria*.⁽¹⁵⁾

1.3. Familia Myrtaceae.

1.3.1. Generalidades

Las Mirtáceas (*Myrtaceae*) son una familia de árboles o arbustos perennifolios, ricos en aceites esenciales, perteneciente al orden Myrtales. Alrededor de 130 géneros y unas 2 900 especies pertenecen a regiones tropicales y subtropicales, algunas en Europa.⁽¹⁶⁻¹⁹⁾

En cuanto al tratamiento supragenérico de las *Myrtaceae*, Niedenzu⁽²⁰⁾ clasificó los géneros descritos en dos subfamilias: *Leptospermoideae* y *Myrtoideae*. Este tratamiento a nivel de subfamilia ha continuado haciéndose complejo con la transferencia a la familia *Myrtaceae* de los géneros *Heteropyxis* y *Psiloxylon*,^(21, 22) ello ha determinado la segregación de la familia *Myrtaceae* en 4 subfamilias: *Myrtoideae*, *Psiloxylloideae*, *Leptospermoideae*, *Chamaelaucioideae*.⁽²³⁾

Los representantes cubanos de la familia *Myrtaceae* se incluyen en la subfamilia *Myrtoideae*, la cual agrupa plantas con hojas mayormente opuestas, epíginas, frutos carnosos, mayormente en baya y distribuida en regiones tropicales de todo el mundo. Comprende tres subtribus: *Myrciinae*, *Eugeniinae* y *Myrtinae*.⁽²³⁾

1.3.2. Características

Son árboles o arbustos, raramente subarbustos; plantas hermafroditas o a veces (*Eucalyptus*) con algunas flores estaminadas. Hojas simples, opuestas, raramente subalternas (excepto en algunos de los géneros introducidos que poseen hojas alternas), enteras (raramente crenadas), pelúcido-punteadas, con glándulas generalmente resinosas y aromáticas; pecioladas, sin estípulas. Inflorescencias racemosas o cimosas, con frecuencia paniculadas o modificadas como glómérulos, dicasios o agrupaciones umbeliformes o las flores solitarias, bracteadas, axilares o raramente subterminales, flores abrazadas por un par de bractéolas; lobos del cáliz comúnmente 4–5, libres o imbricados o rompiéndose irregularmente durante la antesis, o el cáliz caliptrado y circuncísil, comúnmente persistente; pétalos pequeños a grandes o ausentes, comúnmente blancos; estambres comúnmente en número indefinido, libres, insertos sobre el margen del receptáculo, filiformes, anteras ditecas, dehiscentes por aperturas longitudinales, polen triquetro; ovario ínfero, con 2–varios lóculos, óvulos 2 o numerosos, estilo simple, estigma capitado o peltado. Frutos carnosos en forma de bayas y drupas, o secos en forma de cápsulas, aquenios o pixidios en algunas especies introducidas; embrión variable. (16-19, 24-29)

1.3.3. Importancia económica

La familia tiene gran importancia económica al encontrarse en ella plantas de gran interés y utilidad por sus frutos comestibles, obtención de especias, aceites, maderas, etc. Igualmente numerosas especies tienen gran importancia como plantas ornamentales.

Los representantes de la familia *Myrtaceae* se utilizan con frecuencia en la medicina popular; especialmente los aceites esenciales de varias especies se han estudiado para diversas actividades biológica destacándose las acciones antifúngicas y antibacterianas. Resultados similares se han obtenido a partir de otras plantas aromáticas, y parece que la bioactividad se asocia con la presencia de compuestos fenólicos o con un alto nivel de terpenos oxigenados. Los aceites esenciales y extractos de varias plantas son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos

relacionados con la piel y ocurrencias de las caries, incluyendo bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.

Los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, polifenoles y flavonoides) en hierbas y especias de esta familia, junto con los aceites esenciales, atraen una atención creciente debido a su actividad antioxidante y su uso como agentes aromatizantes. Adicionalmente, los aceites de algunas especies también han demostrado actividades citotóxicas, antioxidante, antinociceptivo y anti-inflamatorio. Estos resultados evidencian el gran potencial de la familia *Myrtaceae* en el descubrimiento de nuevos fármacos. ⁽³⁰⁾

1.4. Género *Eugenia*

1.4.1. Origen, distribución geográfica

Eugenia es un género de plantas con flores perteneciente a esta familia. Se distribuye en regiones tropicales y sub-tropicales. Existen aproximadamente unas 1000 especies, principalmente en las regiones tropicales de América, los Andes, Oriente de Bolivia Departamento de Santa Cruz, el Caribe, bosques costeros de Brasil. También se pueden encontrar en Nueva Caledonia y Madagascar. Comprende 3122 especies descritas y de estas, solo 1011 aceptadas. ⁽¹⁰⁾

1.4.2. Descripción Botánica

Las plantas pertenecientes a este género son arbustos o árboles pequeños a grandes; crecimiento joven glabro o más comúnmente delgada a densamente cubierto, los pelos simples o 2-braquiales. Hojas opuestas, persistentes (en Mesoamérica, deciduas en *E. nesiotica*), cartáceas a coriáceas, las glándulas conspicuas a inconspicuas en una o en ambas superficies. Inflorescencias axilares o caulifloras, sésiles o racemosas, o las flores solitarias. Flores 4-meras; bractéolas persistentes o deciduas en la antesis, separadas o fusionadas y formando un involucre por debajo del botón y la flor; hipanto no prolongado más allá de la punta superior del ovario; cáliz 4-lobado, los lobos dispuestos en 2 pares opuestos iguales a marcadamente desiguales, frecuentemente persistentes en el fruto; pétalos 4, conspicuos; estambres numerosos, las anteras c. 0.5

mm y elipsoidales, o 1.5-3 mm y lineares (*E. feijoi* y *E. magniflora*); ovario 2-ocular, los óvulos numerosos, rara vez 2. Frutos en bayas; pericarpo delgado o carnoso; semillas 1, rara vez 2 o 3, la cubierta de la semilla membranácea o coriácea (en *E. lithosperma* , en Mesoamérica, ósea, 1-2 mm de grueso), el embrión eugenioide, los cotiledones, radícula y plúmula fusionados. ⁽¹⁰⁾

1.4.3. Interés farmacológico

Muchas de las especies de este género, también conocido bajo el sinónimo *Syzygium*, han sido citadas por tener efectos fisiológicos importantes. Por ejemplo, se ha informado que las hojas de *E. uniflora* tienen efectos diuréticos y anti-inflamatorias⁽³¹⁾, antihipertensivas⁽³²⁻³⁴⁾; contra la gota⁽³¹⁾, hipoglicémicas ⁽³⁵⁾Los frutos de esta planta también han sido informados por sus efectos antihipertensivos ⁽³⁴⁾. Mientras que las raíces de *E. punissifolia* han mostrado efecto hipoglucémico. ⁽³⁶⁾

Entre las especies de este género una de las más estudiadas ha sido *E. jambolana* (*Syzygium cumini*), la cual ha sido reportada por tener efecto hipotensor, ⁽³⁷⁾ las hojas y flores son consideradas diuréticas ^(38, 39) y antidiarréicas, ⁽⁴⁰⁾ también se refiere su acción inhibitoria de la actividad de HIV-1 proteasa⁽⁴¹⁾ y sus semillas han mostrado efectos anticonvulsantes ⁽⁴²⁾

Esta especie es frecuentemente usada en el tratamiento de la diabetes, en tal sentido ha sido mostrado que diferentes preparaciones farmacéuticas de varias partes de la planta, tales como, cortezas, frutos semillas y hojas, disminuyen los niveles de glucosa en sangre en animales de experimentación ^(34-37, 43) y ha sido reportada también como antiinflamatoria y/o antibacteriana.

Otra representante importante del género es la especie *Eugenia caryophyllus* (Spreng) conocida como clavo de olor, en estudios recientes mostró un moderado efecto antioxidante para extractos metanólicos de sus flores ⁽⁴⁴⁾

El aceite de esta planta fue evaluado frente a siete microorganismos patógenos: dos bacterias gram-positivas; *Staphylococcus cohnii cohnii*, *Micrococcus spp.*, and cinco gram-negativas; *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,

Proteus mirabilis, y *Enterobacter cloacae*, disminuyendo significativamente el crecimiento de todos los microorganismos testados a excepción de *Proteus mirabilis* ⁽⁴⁵⁾

1.4.4. Antecedentes de estudios fitoquímicos

Estudios químicos refieren la posible presencia de alcaloides en extractos metanólicos del clavo de olor (*Eugenia caryophyllus* (Spreng.)) al dar positivo el ensayo de Dragendorff en un tamizaje fitoquímico preliminar. ⁽⁴⁴⁾

Los aceites esenciales de *Eugenia* spp. se caracterizan por la diversidad química. Se estima que de las especies de este género analizadas hasta el momento, se han identificado más de 300 compuestos. ⁽⁴⁶⁾

Sin embargo, muchas sustancias se encontraron sólo en pequeñas cantidades, por lo tanto el número de compuestos con niveles significativos es sólo 69. En general, hay una predominio de sesquiterpenos cíclicos, junto con monoterpenos como una fracción menor. ⁽⁴⁶⁾

Los estudios publicados en cuanto a la composición química de las especies de *Eugenia* no son tan numerosos hasta la fecha y se enfocan principalmente a los aceites esenciales, cabe mencionar que de la especie *Eugenia clarensis* no existe hasta el momento ningún reporte de estudios fitoquímicos.

1.5. *Eugenia clarensis* (Britton & P. Wilson).

1.5.1. Origen, distribución geográfica

La especie *Eugenia clarensis* (Britton & P. Wilson) Endémica de Santa Clara sabanas de Motembo. ⁽⁴⁷⁾

1.4.2. Clasificación botánica⁽⁴⁸⁾

- Reino : *Plantae*
- División : *Magnoliophyta*
- Clase : *Magnoliopsida*
- Orden : *Myrtales*
- Familia : *Myrtaceae*
- Género : *Eugenia*

- *Especie : Eugenia clarensis*
- *Nombre binomial: Eugenia clarensis (Britton & P.Wilson)*
- *Nombre vulgar: No tiene*
- *Nombre científico actual: Eugenia clarensis (Britton & P.Wilson)*
- *Sinónimos más utilizados en Cuba: Eugenia Subdística*

1.5.2. Descripción Botánica

Arbusto de hasta 6m., ramitas pubérulas; hojas oblongas a oblongo-oblanceoladas, subcoriáceas, de 1-2,5 c., agudas en el ápice, la base obtusa, nervios laterales inconspicuos, tuberculadas en el haz y punteadas en el envés; flores solitarias o 2-4; pedicelos de 2-4 mm., pubescentes; cáliz pubescentes, glóbulos ciliados, acuminados; baya globosa; glandulosa, de un 1cm. ⁽¹⁰⁾

1.6. Estudios fitoquímicos

La Fitoquímica es una disciplina científica que tiene como objeto el aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y determinación de los componentes activos de las plantas medicinales, su cuantificación y análisis de los efectos beneficiosos y perjudiciales a la salud humana. Su clasificación se realiza de acuerdo al grupo funcional químico orgánico a que pertenece y estudia los métodos analíticos para comprobar su calidad. ^(49, 50)

Las plantas producen una diversidad de sustancias, producto del metabolismo secundario, algunas responsables de la coloración y aromas de flores y frutos, otras vinculadas con interacciones ecológicas, como es el caso de la atracción de polinizadores. Actualmente, se ha demostrado que la mayoría de ellos participan en el mecanismo de defensa de las plantas. Entre estos últimos, se consideran a las fitoalexinas, por mencionar algunos. La razón de ser de estos metabolitos, llamados también fitoquímicos, permite una gama de usos en la agricultura y en la medicina. Adicionalmente, las múltiples funciones que presentan en los vegetales permite la búsqueda de nuevos agroquímicos naturales, como insecticidas, herbicidas, reguladores de crecimiento, etc. Por el potencial que representan estos metabolitos, las

investigaciones no solo se han dirigido a la elucidación de estructuras químicas y evaluación de su actividad biológica mediante bioensayos, sino hacia la obtención por cultivo *in Vitro*.^(49, 50)

Para determinar la composición química de las plantas medicinales y conocer sus constituyentes biológicamente activos pueden seguirse metodologías que van desde un análisis fitoquímico preliminar hasta estudios químicos sistemáticos bio guiados. Puesto que este último tipo de estudio requiere una inversión considerable de tiempo y recursos, lo ideal es iniciar con estudios fitoquímicos preliminares que permitan hacer una discriminación de las plantas a estudiar en términos de su composición química, con el fin de seleccionar únicamente aquellas más interesantes para posteriores estudios sistemáticos.^(49, 50)

Estos estudios fitoquímicos preliminares persiguen evaluar la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos en una especie vegetal, a saber: alcaloides, antraquinonas y naftoquinonas, esteroides y triterpenos, flavonoides, taninos, saponinas, coumarinas, lactonas terpénicas y cardiotónicos.

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados del tamizaje farmacológico.

Dado que cada uno de los grupos de compuestos está relacionado con actividades biológicas específicas, partiendo de los resultados obtenidos en el estudio fitoquímico preliminar es posible orientar investigaciones posteriores para determinar la actividad biológica de las especies en cuestión y los principios activos involucrados.^(49, 50)

Así cuando una planta revela acción sobre el sistema nervioso central durante el tamizaje farmacológico y presencia de alcaloides en el tamizaje fitoquímico, es bastante probable que la acción farmacológica se deba a la fracción alcaloidal. De la misma manera, el hecho de evidenciarse acción antiinflamatoria en el tamizaje

farmacológico y la presencia de flavonoides en el tamizaje fitoquímico, puede dar lugar a procesos de aislamiento y sometimiento a pruebas más específicas de estos compuestos. Efectos catárticos pueden ser asociados a las antraquinonas. Asimismo, la presencia de glicósidos cianogénicos durante la marcha fitoquímica puede dar lugar a descartar la planta por la alta toxicidad de este tipo de metabolito. (Los métodos usados para los estudios fitoquímicos dependen fundamentalmente del objetivo del estudio que se persigue. Si no se tiene ninguna información química de las sustancias que se espera aislar se procede generalmente con una extracción y un fraccionamiento muy gruesos y se seleccionaran las técnicas dependiendo de las observaciones sobre la marcha. El fraccionamiento de los crudos totales comienza generalmente con la distribución entre solventes inmiscibles. Esto puede representar un proceso largo y costoso . De los métodos más empleados tanto para la purificación de extractos y finalmente de los compuestos la cromatografía tiene lugar prioritario, así mismo, es utilizada como monitor de las estrategias de aislamiento en sus variante analítica (49, 50)

1.7. Consideraciones finales

- Los estudios químicos de las *Myrtaceae* americanas sólo han comenzando. Se han analizado relativamente pocas especies, y la mayor parte de los trabajos a han estado limitados a la composición de aceites esenciales de las hojas.
- De la especie *Eugenia clarensis* no existe hasta el momento ningún reporte de estudios fitoquímicos.
- El tamizaje fitoquímico es ampliamente usado para evaluar la composición de las drogas vegetales y ofrece una visión de la composición química de la planta orientando las investigaciones químicas y biológicas posteriores.
- La presencia de flavonoides y fenoles en la familia *Myrtaceae* resulta común, lo cual sugiere una posible presencia de estos metabolitos en el género *Eugenia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo II: Materiales y Métodos

Se realizó un estudio farmacognóstico y fitoquímico en el Departamento de Farmacia, Facultad Química-Farmacia de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, en el período comprendido entre los meses de enero y junio de 2014.

2.1. Materiales y Reactivos empleados

Los reactivos utilizados se relacionan a continuación:

Reactivos empleados	Marca
Etanol 89%	UNI-Chem
Etanol absoluto	UNI-Chem
Éter de petróleo	UNI-Chem
n-hexano	UNI-Chem
Acetato de etilo	MERCK
Cloroformo	UNI-Chem
Ácido acético glacial	UNI-Chem
Ácido fórmico 90%	AnalaR
Solución amoniacal	UNI-Chem
Diclorometano	UNI-Chem
Ácido sulfúrico concentrado	UNI-Chem
Ácido clorhídrico	UNI-Chem
Butanol	UNI-Chem

2.2. Preparación del material vegetal

2.2.1. Recolección del material vegetal

Las hojas de *Eugenia clarensis* (Britton & P.Wilson) fueron recolectadas en horas de la mañana en áreas del " Centro de Estudios del Jardín Botánico de la Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas ", en el mes de enero de 2014. El material recolectado fue trasladado en bolsas de nylon al Laboratorio de Química Farmacéutica y lavado con abundante agua potable. Previo al procesamiento del material, se realizó la comprobación botánica de la especie por el MsC. Idelfonso Castañeda Noa, profesor auxiliar del citado centro de estudios. Ejemplares de la planta se compararon con muestras identificadas en el herbario localizado en la citada institución, bajo el número 2385.

2.2.2. Evaluación Macroscópica de las hojas de *Eugenia clarensis*

Se tomó una muestra de ensayo y se observó a simple vista y con ayuda de una lupa; la morfología, el color y el olor, y otros aspectos que pueden resultar de interés para la identificación de la planta.

2.2.3. Estandarización de secado

El secado se realizó por dos vías: a la sombra en secadores de malla plástica sobre las cuales se esparcían las hojas; y mediante calor artificial utilizando estufa (Binder USA) a 30°C extendiendo las hojas en capas delgadas sobre bandejas metálicas. El registro de secado se siguió con una frecuencia de 8 horas entre una pesada y otra hasta obtener peso constante, en todos los casos el material se removió varias veces para favorecer el secado homogéneo y evitar fermentaciones o contaminaciones microbiológicas. Las mediciones se realizaron en balanza analítica digital Sartorius (*modelo-TER4S*, Alemania). En todos los casos se realizaron tres réplicas para cada lote.

Parámetros evaluados: Para la estandarización del secado se evaluaron los siguientes parámetros: características organolépticas de la droga, tiempo de secado, humedad residual y composición química.

Se evaluó la influencia del método de secado en la posible composición química de las hojas de *Eugenia clarensis*, siguiendo la técnica establecida para el tamizaje fitoquímico por Miranda y Cuéllar. ⁽⁵¹⁾

Se realizaron los ensayos para lípidos, alcaloides, coumarinas, quinonas, triterpenos y esteroides, resinas, azúcares reductores, saponinas, compuestos fenólicos y taninos, aminoácidos, flavonoides, glicósidos cardiotónicos, mucílagos y principios amargos, realizando tres réplicas en cada caso.

Se utilizó la maceración con agitación continua como metodología de extracción y se emplearon de manera sucesiva tres disolventes de diferente polaridad: éter de petróleo, etanol al 90% y agua destilada, macerando durante 24 horas para cada disolvente; Se realizaron los ensayos para los grupos de metabolitos fundamentales establecidos para cada disolvente.

Previo al tamizaje fitoquímico cada lote de la planta fue molinada en un micromolino de cuchillas marca IKA (modelo MF 10B) Alemania a escala de laboratorio a 6 000 rpm, con tamiz interno del equipo de 3mm.

2.3. Determinación de índices numéricos.

Una vez estandarizado el secado se procedió a la determinación de los índices numéricos al lote correspondiente al secado en la estufa a 30°C y previamente molinada, según se establece en la Norma Ramal de Salud Pública # 309. "Droga cruda. Métodos de ensayo". ⁽⁵²⁾

2.3.1. Contenido de humedad.

Esta determinación se realizó por el método azeotrópico según se especifica en la norma citada.

Procedimiento: A un balón de 500mL se transfirieron 200mL de tolueno, se le añadieron 2mL de agua, se destiló en el equipo de determinación de agua por el método del tolueno hasta que el volumen de agua en el tubo colector permaneció constante y se midió el volumen inicial de agua (V_1). Se dejó enfriar el tolueno (tolueno

saturado). De la muestra de ensayo pulverizada y tamizada, se pesaron 10g, con un error máximo de 0.5mg y se transfirieron al balón que contenía el tolueno saturado; se destiló hasta que el volumen del agua en el tubo colector permaneció constante y se midió el volumen final (V_F).⁽⁵²⁾

Expresión de los resultados: El contenido de humedad (H) de la muestra de ensayo expresada en porciento se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$Ht = \frac{V_f - V_1}{M} * 100(\%) \text{ (vol/mL)}$$

Donde: V_f volumen de agua final (mL)

V_1 : volumen de agua inicial (mL)

100: factor matemático para los cálculos

2.3.2. Determinación de cenizas.

2.3.2.1. Determinación de cenizas totales.

Procedimiento: En un crisol de porcelana, previamente tarado, se pesó 1g de la muestra pulverizada y tamizada.

Se calentó suavemente la muestra de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar y posteriormente se incineró en un horno mufla a una temperatura de 750°C, durante dos horas. Se enfrió el crisol en una desecadora y se pesó. Se repitió el proceso a partir de la incineración, hasta obtener masa constante, hasta que no difieran en más de 0.5mg/g dos pesadas consecutivas. Para obtener masa constante el tiempo de calentamiento y pesada se hizo a intervalos de 30 minutos.⁽⁵²⁾

Expresión de los resultados: La cantidad de cenizas totales (C_t) en base anhidra se calculó por la fórmula siguiente:

$$C_1 = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} * 100 (\%) \quad C_t = \frac{C_1 * 100}{100 - H}$$

Donde: C_1 cenizas totales en base hidratada.

M: masa del crisol vacío (g).

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

M₂: masa del crisol con la ceniza (g).

2.3.2.2. Determinación de cenizas solubles en agua.

Procedimiento: A las cenizas obtenidas anteriormente, se le añadieron de 15 a 20mL de agua. El crisol se tapó y se hirvió suavemente a la llama del mechero durante 5 minutos. La solución se filtró a través de papel de filtro libre de cenizas, con cenizas determinadas o declaradas. El filtro con el residuo se transfirió al crisol inicial, se carbonizó en un mechero y luego se incineró en un horno mufla a 750°C durante dos horas. Posteriormente se colocó en una desecadora y cuando alcanzó la temperatura ambiente se pesó. Se repitió el procedimiento hasta alcanzar masa constante. ⁽⁵²⁾

Expresión de los resultados: La cantidad de cenizas solubles en agua (C_A) en base anhidra se calculó por las fórmulas siguientes:

$$C^1 = \frac{M^2 - M^4}{M^1 - M} * 100(\%) \text{ CA} = \frac{C_1 * 100}{100 - H}$$

Donde: C₁ % cenizas solubles en agua en base hidratada

M masa del crisol vacío (g)

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

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

M₄: masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

100: factor matemático para el cálculo

H: humedad de la materia (%)

2.3.2.3. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

Procedimiento: A las cenizas obtenidas según 2.3.2.1, se le añadieron de 15 a 20mL de ácido clorhídrico 10%. El crisol se tapó y se hirvió suavemente durante 5 minutos. La solución se filtró a través de un papel de filtro libre de cenizas, con cenizas determinadas o declaradas, se lavó el residuo con agua caliente hasta que al añadirle al filtrado acidulado con ácido nítrico, 1 ó 2 gotas de solución de nitrato de plata

0.1mol/L, no mostrara presencia de cloruros. El filtro con el residuo, se transfirió al crisol inicial, se carbonizó en el mechero y luego se incineró en un horno mufla a una temperatura de 750°C durante dos horas. Posteriormente se colocó en una desecadora y cuando alcanzó la temperatura ambiente se pesó. Se repitió el procedimiento hasta alcanzar masa constante. ⁽⁵²⁾

Expresión de los resultados: La cantidad de cenizas insolubles en ácido clorhídrico (Ct) en base anhidra se calculó por las fórmulas siguientes:

$$C_1 = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} 100 (\%) \qquad Ct = \frac{C_1 * 100}{100 - H}$$

Donde:

- C₁: % cenizas insolubles en ácido clorhídrico base hidratada
- M: masa del crisol vacío (g)
- M₁: masa del crisol con la muestra de ensayo (g)
- M₂: masa del crisol con la ceniza (g)
- 100: factor matemático para los cálculos
- H: % humedad

2.3.3. Determinación de sustancias solubles

Se determinaron las sustancias solubles a los extractos hidroalcohólico, etanólico y acuoso.

Procedimiento: De la muestra de laboratorio previamente molinada, se pesaron 5g y se transfirieron a un frasco cónico de 250mL con tapa; se añadieron 100mL de etanol al 70%, etanol absoluto y agua destilada según lo establecido en la monografía. Se agitó durante seis horas y se dejó en reposo hasta el día siguiente; se agitó durante 30 minutos, se dejó reposar alrededor de 30 minutos y se filtró por papel. Se tomó una alícuota de 20mL, se evaporó sobre baño de agua, se desecó a 105°C en una estufa durante tres horas, se enfrió y se pesó. (52)

Expresión de los resultados: El por ciento de sustancias solubles en base anhidra (S_s) se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$SS = \frac{R * 500}{M * (100 - H)} * 100$$

Donde: H: humedad de la muestra (%)

500 y 100 factores matemáticos para los cálculos

R: residuo de la muestra (g)

M: masa de la muestra (g)

2.4. Caracterización físico-química de los extractos

2.4.1. Obtención de los extractos

De la muestra de laboratorio previamente pulverizada y tamizada, se pesaron 5g y se transfirieron a frasco cónico de 250mL con tapa; se añadieron 100mL de etanol al 70%, etanol absoluto y agua destilada respectivamente según lo establecido en la monografía.

Para la caracterización de los extractos se determinaron los siguientes parámetros según se establece en la Norma Ramal de Salud Pública #312: “Extractos, fluidos y tinturas. Métodos de ensayo”.⁽⁵³⁾

2.4.2. Características organolépticas

2.4.2.1. Determinación del olor

Se tomó una tira de papel secante de aproximadamente 1cm de anchura por 10cm de longitud y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo. Se dejó evaporar y se determinó su olor.⁽⁵³⁾

2.4.2.2. Determinación del color

Se tomó un tubo para ensayos bien limpio y seco, se llenó hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observó el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas.⁽⁵³⁾

2.4.3. Determinación del pH

Se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizará la determinación del valor del pH de la muestra. Se introdujo directamente los detectores del pH-metro en la muestra y se realizó la lectura.⁽⁵³⁾

2.4.4. Determinación del índice de refracción

Se colocó sobre el prisma de medición una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio sin cantos agudos, se ajustó el equipo seleccionando la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro. Se realizaron tres lecturas y se calculó el promedio de las mismas.⁽⁵³⁾

2.4.5. Determinación de la densidad relativa

Se determinó la densidad relativa a las tres muestras de ensayo con un densitómetro (Density Specific Gravity Meter, DA-130N, Kyoto).

2.4.6. Análisis capilar

Procedimiento: Se vertieron 20mL de la muestra de ensayo en un vaso para precipitado de 100mL de aproximadamente 5cm de diámetro y 70cm de altura y se introdujo en la cámara protectora.

Se colocó una banda de papel de filtro (Whatman # 1) de 4cm de ancho por 15cm de longitud verticalmente de manera que su borde superior esté fijado a una varilla metálica que permitiera la suspensión de la tira de papel y su extremo inferior esté sumergido dentro de la muestra de ensayo pero sin tocar el fondo ni las paredes del recipiente.

Se cerró la cámara y se dejaron transcurrir dos horas; finalizada ésta se retiró el papel y se dejó secar. Una vez seco se procedió a su inspección visual y caracterización.⁽⁵³⁾

Examen e interpretación de la imagen. Para el análisis e interpretación de la imagen se tuvieron en cuenta los aspectos siguientes: color, altura, descripción de las diferentes partes, cambios de coloración con vapores de amoníaco y examen bajo la luz ultravioleta.

2.4.7. Determinación de sólidos totales

Procedimiento: De la muestra de ensayo previamente homogeneizada se transfirieron 5mL a una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada; la cápsula se colocó en baño de agua y se evaporó hasta que el residuo estuvo aparentemente seco; posteriormente se pasó a una estufa a una temperatura de $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante tres horas.

Se retiró la cápsula de la estufa, se colocó en una desecadora hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesó. Se repitió el proceso anterior las veces necesarias, hasta obtener masa constante.(53)

Expresión de los resultados: Los sólidos totales (St) se calcularon mediante la fórmula siguiente:

$$St = \frac{Pr-P}{v} * 100$$

Donde: Pr: masa de la cápsula más el residuo (g)

P: masa de la cápsula vacía (g)

V: volumen de la porción de ensayo (mL)

100 factor matemático

2.4.8. Evaluación fitoquímica de los extractos

Con el objetivo de profundizar en la composición química de los extractos evaluados en el acápite anterior se realizó la evaluación fitoquímica de estos, para lo cual se llevó a cabo un tamizaje fitoquímico y se evaluaron los extractos por Cromatografía en Capa Delgada, para proponer las posibles propiedades farmacológicas de la planta. Adicionalmente se determinó la concentración de fenoles y flavonoides totales en cada uno de los extractos.

2. 4.8.1. Tamizaje fitoquímico

Para evaluar la posible composición química de los extractos de *Eugenia clarensis* en cuanto a metabolitos secundarios se llevó a cabo el tamizaje fitoquímico siguiendo la técnica descrita por Miranda y Cuéllar.(51)

2.4.8.2. Evaluación por Cromatografía en Capa Delgada (CCD)

Cada extracto se evaluó en CCD empleando las fases móviles Acetato de Etilo - Ac. Fórmico - Ac. Acético - H₂O (10:1:1:2:7), n- hexano : Acetato de Etilo (7:3) y (5:5), n- butanol: Ac. Acético: H₂O (4:1:5) fase superior. Los cromatogramas se examinaron bajo luz UV 254nm y UV 366nm previo al revelado con soluciones de AlCl₃ 1%/ Etanol para Flavonoides, FeCl₃ para Fenoles y/o esteroides, Vainillina-sulfúrica.⁽⁵⁰⁾

2.4.8.3. Análisis de los metabolitos de Interés

2.4.8.3.1. Determinación de fenoles totales.

El contenido de fenoles totales se realizó según la técnica descrita por Nurmi en el 1996 y ratificada posteriormente por Liu en el 2002

Procedimiento: La cantidad de fenoles se estimó mezclando una alícuota de los extractos con 5mL del reactivo de Folin-Ciocalteau, se le adicionó carbonato de sodio (4 mL, 7.5%), se completó con agua destilada a 10 mL, se dejó incubar por 1h y se leyó la absorbancia a 765 nm. Dichas lecturas se interpolaron en una curva de calibración preparada con Ácido Gálico, la cual está caracterizada por la ecuación de regresión: $y = 0.0196x + 0.0323$, $r^2 = 0.9942$. Los resultados fueron expresados mg de Acido. Gálico/mL de extracto (mg/mL de Ac. Gálico/mL).^(54, 55)

2.4.8.3.2. Determinación de flavonoides totales.

La evaluación del contenido de flavonoides totales se fundamenta en el uso de reactivos de deslizamiento en el ultravioleta visible, habitualmente se utiliza AlCl₃ y se lee la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm.

Procedimiento: La cantidad de flavonoides se evaluó mezclando una alícuota de (0.2mL) de los extractos anteriormente preparados con 4 mL de agua destilada, a la solución obtenida se le agregó nitrito de sodio (0.3 mL, 5%), se dejó incubar 5 minutos, se adicionó cloruro de aluminio(0.3 mL, 10%) y se dejó en reposo a temperatura ambiente por (6 min), después de lo cual se agregó hidróxido de sodio (2 mL, 1M), se aforó con agua destilada a 10 mL, y se leyó la absorbancia a 510 nm Las lecturas de esta variable se interpolaron en la curva de calibración preparada con rutina,

caracterizada mediante la ecuación de regresión: $y = 7,6x + 0.0714$, $r^2 = 0.9976$. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de rutina por mL de extracto (mgER/mL).^(55, 56)

2.5. Fraccionamiento del extracto etanólico

El extracto alcohólico se sometió a un proceso de fraccionamiento con el objetivo de profundizar en la caracterización de la naturaleza de sus componentes y que pudiera conducir al aislamiento de alguno de sus componentes mayoritarios. Inicialmente el extracto fue sometido a un proceso de tratamiento con carbón activado a fin de eliminar las clorofilas presentes. En este proceso fueron evaluadas tres proporciones de carbón activado para lo cual se tomaron cuatro alícuotas del extracto de 25ml cada una. Tres de ellas, se trataron con carbón activado al 1%, 3% y 5% para eliminar clorofila, nombrándolas variante A, B, y C respectivamente. Se mantuvieron en contacto con el carbón activado durante 30 segundos, tras lo cual, las cuatro muestras se filtraron sobre papel de filtro y se concentraron a sequedad en rotoevaporador, calculando el rendimiento del proceso considerando el peso del residuo seco. El residuo se disolvió en 10ml de etanol absoluto.

Con el objetivo de analizar la influencia en la composición química del extracto etanólico de las variantes A, B y C para eliminar clorofila se realizó la evaluación fitoquímica de estos, para lo cual se llevó a cabo un tamizaje fitoquímico según metodología descrita en el epígrafe 2.4.8. Se determinó el contenido de fenoles y flavonoides totales a fin de evaluar el comportamiento de estos frente al carbón activado. Adicionalmente los extractos tratados se evaluaron a través de técnicas cromatográficas.

En el caso de la CCD se emplearon como la fase móvil, una mezcla de n-hexano : Acetato de Etilo (7:3) y como reveladores , luz UV y soluciones de $AlCl_3$ (1%/ Etanol) para Flavonoides y Vainillina-sulfúrica para Fenoles y terpenos.⁽⁵⁰⁾

Se desarrolló una cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) (Agilen, serie 1100) con el objetivo de evaluar si el tratamiento con carbón activado modificaba el perfil cromatográfico, para esto se compararon las áreas y tiempos de retención de los picos más significativos entre el extracto etanólico y los extractos obtenidos con las variantes A, B, C utilizadas para eliminar la clorofila. Se emplearon las siguientes condiciones solventes (A: acetonitrilo, B: agua(0.05% ácido fosfórico) con el gradiente que se describe: primeros minutos desde 5% A hasta 60%, 5 minutos siguientes de 60% de A hasta 100%. Tiempo de corrida 20 minutos, Tamaño de la columna RESTEK ultra C18 (150x3.2mm).

Una vez evaluada la proporción de carbón activado más adecuada para la eliminar las clorofilas, se continúa el fraccionamiento con la Variante A evaporando a sequedad 8mL restantes y disolviendo en Metanol caliente, se filtro para eliminar la porción insoluble (precipitado A) y el filtrado se sometió a cristalización en frío ($T=4^{\circ}\text{C}$) por dos horas, transcurrido este tiempo se dejó en cristalización durante 72 h adicionales a temperatura ambiente, tras lo cual se separó el sobrenadante (SN_1) y el precipitado (P_1) por filtración a gravedad.

El sobrenadante (SN_1) se concentró a sequedad en baño de agua, se lavó con Acetato de Etilo, posteriormente se disolvió en Metanol caliente y se dejó en cristalización obteniendo, tras filtración, la fracción denominada EC_0 .

Paralelamente el precipitado (P_1) se disolvió en Metanol caliente por 24h para cristalización, transcurrido este tiempo se filtro y se separo. El sobrenadante (SN_2) tras evaporarse el solvente se disolvió en una mezcla Metanol: acetona (1:1) para su cristalización obteniéndose por decantación las fracciones (EC_1)y (EC_2),

El precipitado (P_2) obtenido en el paso anterior se disolvió en mezcla etanol absoluto: acetona rindiendo la fracción (EC_3).

Todas las fracciones obtenidas fueron evaluadas por CCD sobre cromatofolios de gel de sílice, se empleó una mezcla de n- hexano: Acetato de Etilo (7:3) como fase móvil.

Los cromatogramas se examinaron bajo luz UV $_{254\text{nm}}$ y UV $_{366\text{nm}}$, previo al revelado con soluciones de vainillina-sulfúrica y AlCl_3 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo III: Resultados y Discusión

3.2. Preparación del material vegetal

3.2.1. Recolección del material vegetal

La recolección se realizó en horas tempranas de la mañana, y se ejecutó de forma manual, como técnica recomendada para plantas silvestres, siguiendo las buenas prácticas para este proceso establecidas por la OMS de esta manera se garantizó la calidad del material vegetal. Se procuró tomar las partes de interés, y dejar ramas suficientes que garantizaran el normal desarrollo de la planta y un uso sostenible de este recurso. Se comprobó que las plantas se recuperaron tras la recolección; lo cual resultó ventajoso desde el punto de vista medioambiental al reducir el impacto sobre la biodiversidad de la zona.

El material vegetal se colectó en buen estado vegetativo y exento de materias extrañas, identificándose a través de herramientas taxonómicas por el MsC. Idelfonso Castañeda Noa, profesor auxiliar del Centro de Estudios del Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, como *Eugenia clarensis* (Britton & P.Wilson). La identificación se realizó mediante observación directa de la planta, comparándolas con descripciones pormenorizadas de la planta en la literatura especializada de la especie vegetal en estudio. Adicionalmente, se comparó con la muestra correspondiente a la serie HPVC 2385 del Herbario ULV del citado Centro de Estudios, correspondiendo en su totalidad con las características botánicas para la citada especie.

Un estudio taxonómico exhaustivo basado en la morfología al estereoscopio muestra que las hojas son simples de color verde oscuro y olor agradable, pecioladas, opuestas. Se ve visible el nervio central, los laterales no se observan claramente y se clasificada como palminervia. De forma elíptica, cuspidada, con base obtusa, de borde entero, lampiña, persistentes, de cartáceas a coriáceas propios de este género botánico. (10)Se observan claramente vesículas conteniendo los aceites esenciales, las glándulas conspicuas a inconspicuas en una o en ambas superficies.

Las hojas recolectadas se lavaron cuidadosamente con agua potable garantizando la limpieza del material vegetal.

3.2.2. Estandarización de secado

El proceso de secado es uno de los pasos más importantes en el tratamiento de las drogas vegetales. El exceso de agua puede provocar en estas el crecimiento microbiano, la presencia de hongos o insectos y el deterioro, seguido de la hidrólisis de los principios activos.⁽⁵¹⁾

El secado del material en estudio se realizó por dos vías: a la sombra y mediante calor artificial en la estufa a temperatura controlada de 30°C, no utilizándose el método de secado al sol dado que algunas especies de la familia *Myrtaceae* como la *Mosiera bullata* (Britton & P.Wilson) Bisse reportan resultados negativos en este método de secado.⁽⁵⁷⁾ Adicionalmente la presencia de aceites esenciales común en este género limita el uso de este método.

El momento final del proceso se estableció al obtener peso constante, tras lo cual la droga se trituró en un molino de cuchillas y se determinaron las características organolépticas del polvo, las cuales se muestran en la figura 1, observándose que el polvo secado en la sombra presenta un color más oscuro a diferencia del secado a la estufa que conservaron el color verde propio de la muestra; en cuanto al olor el polvo secado en la sombra y en la estufa mantuvieron su olor característico aromático.



Sombra



Estufa

Figura 1: Características organolépticas del polvo para los diferentes métodos de secado.

En la tabla 1 se observan los resultados del tiempo de secado y humedad residual para los dos métodos de secado empleados en el estudio.

Tabla 1: Resultados del análisis de secado de las hojas de *Eugenia clarensis*.

Método de secado	Tiempo de secado (días)	(%) Humedad residual (media \pm SD)
Sombra	7	9.10 \pm
Estufa	4	5.33 \pm 0.516

Las hojas de la planta sometidas al secado a la sombra tardaron en secarse 7 días, muy superior al alcanzado por el método en estufa, con 4 días. Estos resultados pueden deberse fundamentalmente a las variaciones en cuanto a la humedad ambiental en el período de estudio pues el peso del material vegetal fluctuaba mucho de un día a otro, sugiriendo que en esos periodos el material ganaba humedad lo cual justificaba su incremento en peso, lo cual motivó que se extendiera el proceso hasta 7 días.

El tiempo transcurrido en el secado a la estufa (4 días) estuvo influenciado por el control continuo de temperatura, lo cual garantiza un secado homogéneo. En el periodo en estudio (Febrero 2014) ocurriendo cambios bruscos de temperatura entre el día y la noche, con variaciones de hasta aproximadamente 10°C, propio de días invernales en nuestro país.

Los límites de humedad establecidos en las farmacopeas varían significativamente unos de otros, oscilando frecuentemente entre 8 y 14% según la farmacopea que se utilice como referencia, correspondiéndose los valores más altos a las drogas compuestas por cortezas, tallos y raíces.⁽⁵¹⁾

Los valores obtenidos para el porcentaje de humedad residual en los dos métodos evaluados estuvieron dentro de los límites establecidos por farmacopeas internacionales y normas nacionales de droga vegetales, no excediendo en ninguno de los casos el 10%, garantizando de este modo una calidad adecuada del material posterior al secado. En ambos métodos el secado permitió eliminar suficiente cantidad de humedad para favorecer la conservación de la calidad de la droga y prevenir el

deterioro de la misma, ya sea por enmohecimiento, acción de enzimas y/o bacterias o posibles alteraciones químicas por este concepto. Esta operación resulta ventajosa pues adicionalmente a que se fijan los constituyentes, se facilitan los procesos de trituración necesarios para obtener una forma más conveniente para su comercialización y almacenamiento. ⁽⁴⁵⁾

También se evaluó cualitativamente la composición química de cada lote siguiendo la técnica establecida para el tamizaje fitoquímico por Miranda y Cuéllar ⁽⁵¹⁾ reflejándose los resultados en la tabla 2.

No se encontraron reportes en la literatura, de estudios fitoquímicos anteriores realizados a la especie, por lo cual el presente estudio constituye la primera investigación relacionada con esta especie botánica. De igual manera cuando se comparan estos resultados con otras especies del género *Eugenia* vemos que la mayoría de los trabajos fitoquímicos han sido enfocados al estudio de los aceites esenciales, no así a la composición de los extractos. ⁽⁵⁶⁾

Al hacer un análisis comparativo de estos resultados no se encontraron diferencias significativas entre los métodos sombra y estufa pues se observó en ambos la presencia fundamentalmente de triterpenos y/o esteroides, fenoles y/o taninos y flavonoides, similar a lo reportado por otras especies de la familia *Myrtaceae*, como *Eucalyptus ssp.* ^(46, 58) y *Psidium guajava.* ^(30, 59-61) Resultan interesantes los resultados obtenidos para el caso de las quinonas no referidos con anterioridad para este género botánico.

Al comparar con los resultados correspondientes con la droga fresca se observaron diferencias en cuanto a Azúcares reductores, Flavonoides en el extracto acuoso no se evidencia su presencia de la droga fresca; en los extractos etéreo y etanólico al 90% se obtienen resultados similares a excepción de las coumarinas menos evidente en la droga fresca. Lo cual puede deberse a una mayor dilución de estos constituyentes en

los extractos provenientes del material fresco que no alcanza el límite de detección de los ensayos utilizados.

Tabla 2: Resultados del tamizaje fitoquímico para los diferentes métodos de secado y el material vegetal fresco.

Extracto	Metabolito	Estufa	Sombra	Fresca
Etéreo	Alcaloides	-	-	-
	Ácidos grasos	+	+	+
	Coumarinas	++	++	++
	Triterpenos y/o esteroides	+	+	+
Etanólico	Resinas	+	+	+
	Triterpenos y/o esteroides	+	+	+
	Saponinas	+++	++	-
	Alcaloides	++	++	+
	Glicósidos cardiotónicos	D	D	D
	Azúcares reductores	+	+	+
	Coumarinas	++	++	+
	Fenoles y/o taninos	+	+	+
	Quinonas	+++	+++	+++
	Flavonoides	+	+	D
Aminoácidos	-	-	-	
Acuoso	Saponinas	-	-	-
	Azúcares reductores	++	++	-
	Flavonoides	+	+	-
	Aminoácidos	+	+	+
	Fenles y/o taninos	+	+	+
	Mucílago	-	-	-
	Principios amargos	-	-	-

Leyenda: +++ (ensayo muy positivo), + (ensayo positivo), - (ensayo negativo), D (ensayo dudoso)

Finalmente el análisis de todos los parámetros evaluados sugiere que el método más adecuado para el secado de este material vegetal es el método a la estufa (30°C) pues conserva las características organolépticas de la droga, el proceso se realiza en un menor tiempo y se garantiza un menor porcentaje de humedad residual y conserva la composición de la planta al menos desde el punto de vista cualitativo es conveniente destacar en este sentido que sería importante evaluar el contenido del aceite esencial para ambos métodos para dar una respuesta definitiva de la influencia del método de secado en cuanto a este metabolito tan importante para la especie.

3.3. Determinación de índices numéricos

Una vez secado el material vegetal se determinaron algunos parámetros e índices de calidad del material correspondiente al lote secado en la estufa a 30°C, por resultar este método el más adecuado en la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en el trabajo experimental.

Tabla 3: Resultado de los índices numéricos para las hojas secadas en estufa de la *Eugenia clarensis*.

Índices numéricos	Valor (%)± SD
Humedad	5.33 ± 0.516
Cenizas totales	2.350 ± 0.083
Cenizas solubles en H ₂ O	0.568 ± 0.082
Cenizas insolubles en HCl	0.594 ± 0.039

Para esta planta se observa que el valor de humedad residual es de un 5.33%, lo cual se acepta pues está dentro de los límites establecidos para drogas de esta naturaleza.

Se determinó el contenido de cenizas totales, utilizando para ello la droga seca y molinada, obteniéndose un valor de 2.350% que se encuentra dentro de los límites que establecen las normas.^(41, 62)

Por lo general, las cenizas totales se componen de carbonatos, fosfatos, sulfatos, silicatos y sílice.⁽⁶³⁾ El contenido de cenizas totales es importante e indica, en cierta medida, el cuidado que se ha tenido en la preparación de la droga.

En el caso en estudio se tuvo especial cuidado en la selección y tratamiento del material vegetal, lavando con agua potable y eliminando toda la materia extraña. No existen referentes en la literatura de este parámetro para la especie vegetal en estudio.

Adicionalmente se determinó el contenido de cenizas solubles en agua, utilizando las cenizas totales obtenidas en el apartado anterior, obteniendo un valor de 0.568%

El valor de las cenizas insolubles en ácido clorhídrico (tabla 3), indica el porcentaje que presenta la especie vegetal representado por el contenido de material inorgánico extraño (tierra, arena) obteniendo un valor de 0.594%. Estas cenizas suelen componerse sobre todo de sílice; y una cantidad elevada de estas, indican contaminación con productos térreos, no correspondiéndose con nuestro caso.

En la tabla 4 se muestra el valor de las sustancias solubles para los disolventes evaluados. Esta determinación es de gran importancia pues posibilita conocer la capacidad extractiva de los solventes utilizados, en este caso el solvente hidroalcohólico mostró los mejores resultados con un valor de 22.394 %, seguido del etanólico con 12.559% y el agua con 11,559. Estos resultados demuestran la alta capacidad extractiva de los disolventes, considerándose buenas alternativas para la obtención de extractos a partir de este material vegetal.

Tabla 4. Resultados de la determinación de sustancias solubles para los disolventes empleados.

Extractos	Valor de sustancias solubles (%)
Extracto etanólico	12.559 ± 0.156
Extracto hidroalcohólico	22.394 ± 0.122
Extracto acuoso	11.559 ± 0.212

Mediante el empleo de los métodos físico-químicos de análisis descritos anteriormente puede determinarse y establecerse de manera preliminar los índices de calidad de la droga evaluada. Adicionalmente el estudio aporta elementos que permiten completar su identificación. Todos estos índices una vez estandarizados y determinadas las especificaciones de calidad pueden constituir valores de referencia para estudios posteriores con este material vegetal.

3.4. Caracterización físico-química de los extractos obtenidos de las hojas de *Eugenia clarensis*

Para caracterizar los extractos, estos fueron obtenidos empleando maceración con agitación continua durante 24 horas como metodología de extracción, determinando los parámetros mencionados en el capítulo anterior para los extractos etanólico, hidroalcohólico y acuoso procedentes de las hojas de *Eugenia clarensis* considerando la alta capacidad extractiva de dicho disolventes.

Al analizar las características organolépticas de los tres extractos se puede plantear que todos los extractos mantienen su olor característico, además se puede observar que el extracto etanólico presenta un color verde oscuro, a diferencia del resto que muestran un color amarillo siendo el hidroalcohólico más oscuro y el acuoso más claro, con ligera opalescencia para estos últimos. En ninguno de estos se evidenció la presencia de precipitados, de partículas, ni hubo separación de capas.

En la tabla 5 se muestran los valores de densidad relativa, índice de refracción, pH y sólidos totales para los cuatro extractos procedentes de las hojas de *Eugenia clarensis*.

Tabla 5. Resultado de la caracterización físico-química de los extractos

Extractos	Densidad elativa g/cm³	Índice de refracción	pH	Sólidos totales (mg/100mL) MEDIA ±SD
Etanólico	0,7995	1.362	4,713	0.594 ± 0.007
Hidroalcohólico	0,8858	1,363	5,831	1.060 ± 0.006
Acuoso	0,9981	1,334	5,918	0.547 ± 0.010

Se observa que el extracto acuoso posee el mayor valor de densidad relativa y presenta el menor valor de índice de refracción, aunque los valores para los tres extractos son similares. Todos los extractos poseen valores de pH cercanos a 7, lo cual los hace viables desde el punto de vista biológico.

Aunque estos parámetros no están normados para estos extractos podemos plantear que son adecuados tomando en consideración la correspondencia con otras drogas oficiales.⁽⁴²⁾

El análisis capilar se realizó a los extractos, etanólico, hidroalcohólico y acuoso; teniendo en cuenta los aspectos siguientes: color, altura, descripción de las diferentes partes, cambios de coloración con vapores de amoníaco y examen bajo la luz ultravioleta.⁽⁴³⁾

En la figura 2 se observan las imágenes de esta determinación para los cuatro extractos analizados.

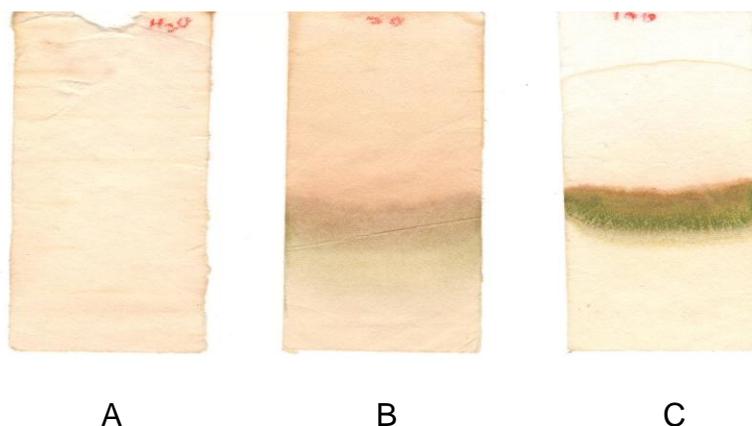


Figura 2: Análisis capilar de los extractos procedentes de las hojas de *Eugenia clarensis*. A) Acuoso. B) Hidroalcohólico. C) Etanólico

Los resultados del análisis capilar muestran que el extracto etanólico es vivamente coloreado, el hidroalcohólico poco coloreado y el acuoso muy poco coloreado. Todos los extractos son altos (altura de más de 8cm), para el extracto etanólico la franja es lineal, a diferencia de los demás extractos que es festonada. En cuanto a los cambios de coloración con vapores de amoníaco se puede plantear para los tres extractos colores que van desde amarillo claro, amarillo intenso, siendo más intensos los cambios en el extracto etanólico. En cuanto a la fluorescencia al someterlos a la luz ultravioleta se puede plantear que el extracto etanólico mostró fluorescencia amarilla intensa, rojo intenso oscuro y amarillo menos intenso para la sub-franja, banda y

subbanda respectivamente; para el extracto hidroalcohólico presento fluorescencia violácea y roja para la sub-franja y la banda respectivamente y para el extracto acuoso fluorescencia amarilla y violácea.

En relación a los sólidos totales, se observa que el extracto hidroalcohólico presenta el mayor, seguido por el etanólico y acuoso, pero dado el fácil procesamiento del solvente etanólico y las menores posibilidades de contaminación microbiana y la similitud en los demás parámetros con respecto al extracto hidroalcohólico se consideran ambos extractos como una buena alternativa.

3.5. Evaluación fitoquímica

Se realizó la evaluación fitoquímica de los extractos, etanólico, hidroalcohólico y acuoso, con el objetivo de profundizar en la composición química de los extractos para lo cual se llevó a cabo un tamizaje fitoquímico y se evaluaron los extractos por Cromatografía en Capa Delgada, para proponer las posibles propiedades farmacológicas de la planta.

El tamizaje fitoquímico es ampliamente usado para evaluar la composición de las drogas vegetales, pero es importante señalar que los resultados obtenidos mediante estas técnicas ofrecen solo una visión de la composición química de la planta a estudiar y que no puede tomarse en ningún caso como un resultado concluyente, ya que en la presencia o ausencia de un metabolito pueden influir la concentración de los mismos, la solubilidad en el disolvente empleado y las interferencias de otros componentes.

Los resultados obtenidos en la realización de los ensayos para la determinación de metabolitos secundarios presentes en los extractos analizados se muestran en la tabla 6. Se obtuvieron respuestas positivas para una gran diversidad de grupos funcionales, el análisis reveló la presencia de fenoles y/o taninos, para los tres extractos, los triterpenos y/o esteroides solo estuvieron presentes en los extractos hidroalcohólico y etanólicos, igual revelado tuvieron las coumarinas y quinonas, los flavonoides solo estuvieron presentes en el extracto etanólico, los azúcares reductores estuvieron

presentes en los extractos hidroalcohólico y etanólicos con mayor evidencia en el caso del hidroalcohólico, también se observó su presencia en el extracto acuoso, lo cual resulta lógico dada la gran polaridad de estos compuestos.

Para el caso de los alcaloides y las saponinas estas solo estuvieron presentes en el extracto hidroalcohólico lo cual aporta gran interés para estudios fitoquímicos futuros dada la importancia de estos metabolitos para otras acciones.

En sentido general, pudo observarse que en el caso del extracto etanólico las evidencias eran más nítidas para la mayoría de los ensayos realizados.

Tabla 6. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos procedentes de las hojas de la planta.

Ensayo	Metabolito	Etanólico	Hidroalcohólico	Acuoso
Dragendorff	Alcaloides	-	++	-
Baljet I-II	Coumarinas	+++	++	-
Resinas	Resinas	+	+	-
Espuma	Saponinas	-	+++	-
Kedde I-II	Glicósidos cardiotónicos	-	D	-
Cloruro férrico	Fenoles y/o taninos	+++	+	+
Shinoda	Flavonoides	++	D	-
Liebermann-Buchard	Triterpenos y/o esteroides	++	+	-
Fehling _{A-B}	Azúcares reductores	+	++	++
Bortrager	Quinonas	++	+++	-
Ninhidrina	Aminoácidos libres	-	-	+

Leyenda: +++ (ensayo muy positivo), + (ensayo positivo), - (ensayo negativo) D (dudoso)

Los metabolitos secundarios detectados en los extractos evaluados pudieran desempeñar una amplia gama de efectos biológicos. Dentro de ellos, por ejemplo, resulta interesante la presencia de terpenos, dado que muchos de ellos han

demostrado actividad antitumoral, citotóxica y antifúngica. Igualmente los taninos resultan atractivos ya que estos se caracterizan por su acción antibacteriana, anticancerígena. ⁽⁶⁴⁾

Diversos estudios llevados a cabo en los últimos años, han puesto de manifiesto el poder antioxidante de algunos compuestos fenólicos presentes en distintas bebidas y frutas (zumos de fruta, vino, té, tomate, naranja y pomelo). Esta propiedad se asocia a su capacidad de capturar radicales libres, que hace que presenten un efecto positivo frente a distintas perturbaciones de la calidad de los alimentos y de la salud. En este último sentido, son numerosos los trabajos que muestran su efecto protector frente a determinadas enfermedades como alteraciones cardiovasculares y cancerígenas. ^(65, 66)

Las saponinas por su parte son poderosos agentes tensoactivos. Cuentan con propiedades detergente, edulcorantes, expectorantes, diurética, antiinflamatoria y se ha reportado que sirven como materia prima para la síntesis de hormonas esteroidales como estrógenos, anticonceptivos orales, andrógenos y otros ⁽⁶⁷⁾

Por último, en relación a las cumarinas dentro de los compuestos lactónicos, pudieran aportar a los extractos provenientes de *Eugenia clarensis* posible actividad estrogénica, insecticida, antiviral, antiinflamatoria y anticancerígena considerando el perfil farmacológico reportado para estos metabolitos. ⁽⁶⁷⁾

3.5.1. Evaluación por Cromatografía en Capa Delgada

El primer paso a seguir en el control de calidad de un producto fitoterapéutico es definir cuales grupos de sustancias pueden estar presentes, para de esta manera lograr la identificación de la planta (marcadores) y de aquellas sustancias capaces de ejercer las actividades farmacológicas (principios activos).

No siempre se conoce la constitución química de la planta; cuando esto sucede es indispensable realizar su perfil cromatográfico; a los extractos, en condiciones definidas de análisis, esto formará un diseño característico debido a la migración diferencial de sus constituyentes, llamado huella digital del extracto.

Para evaluar los extractos por Cromatografía en Capa Delgada se utilizaron las fases móviles: Acetato de Etilo - Ac. Fórmico - Ac. Acético - H₂O (10:1:1:2:7), n- hexano: Acetato de Etilo (7:3) y (5:5), n-butanol: Ac. Acético: H₂O (4:1:5)

En el caso de extracto acuoso se observó poca separación en todas las condiciones evaluadas quedando retenidos en el sitio de aplicación en la mayoría de los casos, no mostrando ningún elemento identificativo interesante por lo que fue reservado para futuros estudios

En el caso de los extractos etanólico e hidroalcohólico los mejores searaciones se observaron para la fase móvil n-hexano: Acetato de Etilo (7:3). Los resultados cromatográficos descritos se resumen en las tablas 7 y 8 para los extracto etanólico e hidroalcohólico, respectivamente.

Tabla 7: Resultados cromatográficos para el extracto etanólico con la fase móvil n-hexano: Acetato de Etilo (7:3)

	Rf	visible	UV		Vapores de amoniaco		ALCL ₃		vainillina	
			254nm	366nm	visible	366 nm	vis	366nm	vis	366 nm
1	0	parda	parda	parda	amarillo	amarilla	amarillo	Amarillo fluorescente	violáceo	parda
2	0.08			rosa		roja			violáceo	Amarilla naranja
3	0.16			Rosa-naranja		Roja-naranja			violáceo	parda
4	0.24			roja		roja			violáceo	parda
5	0.36			rosa		rosa			1ro rosa después violáceo	Amarilla naranja
6	0.6	Verde	parda	Roja		Roja			Verde olivo intenso	parda
7	0.65		parda	naranja		amarilla		Amarilla		

En la exposición a la luz UV₂₅₄ solo se observaron dos bandas en el extracto etanólico una retenida en el sitio de aplicación y otra cercana al frente del solvente, esta última con Rf de 0.6 con comportamiento típico de clorofilas bajo la incidencia de luz UV₃₆₆,

adicionalmente se observan en el extracto etanólico otras bandas rosas-naranjas (Rf: 0.08, 0.16, 0.24, 0.36) frente a UV₃₆₆ que no se observan en el extracto hidroalcohólico y que resultan muy interesantes desde el punto de vista fitoquímico.

Tabla 8: Resultados cromatográficos para el extracto hidroalcohólico con la fase móvil n-hexano: Acetato de Etilo 7:3

	Rf	visible	UV		Vapores de amoniaco		ALCL3		vainillina	
		(color)	254nm	366nm	visible	366 nm	vis	366nm	vis	366 nm
1	0	parda	parda	parda	amarillo	amarilla		Amarillo fluorescente	violáceo	pardo
2	0.06								violáceo	Amarilla naranja
3	0.26								violáceo	parda
4	0.38								violáceo	parda

Al evaluar los cromatogramas frente a los vapores de amoniaco⁽⁵¹⁾ solo se incrementa la intensidad del color amarillo de las bandas retenidas en el sitio de aplicación, comportamiento típico de sustancias de naturaleza flavonoide, efecto observado en ambos extractos con similar intensidad. Similar comportamiento ocurre en el revelado con AlCl₃.

Para el caso de la vainillina se observó similar comportamiento que entre ambos extractos mostrándose la coloración violácea indicativa de una amplia gama de compuestos donde se incluyen los terpenos en general y algunos compuestos fenólicos⁽⁵¹⁾ lo cual corrobora los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico.

3.5.2. Análisis de los metabolitos de interés a los extractos

Está ampliamente probado que los diversos tipos de fenoles presentan efectos terapéuticos importantes, tales como propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes, antimutagénicas y anticarcinogénicas, entre otras.⁽⁶⁸⁾ Estos efectos se han probado en una amplia variedad de especies vegetales, sin embargo en algunas otras se desconocen las características cuantitativas, cualitativas y biológicas de sus compuestos fenólicos.

En la literatura existen varios estudios donde señalan que regularmente los extractos orgánicos polares tienen de 3 a 4 veces más fenoles totales que los extractos acuosos, ^(69, 70) lo cual está en correspondencia con los resultados obtenidos en el presente estudio. Pudo observarse que las concentraciones tanto en los fenoles como los flavonoides disminuye al ir aumentando contenido acuoso del disolvente, siendo similares para el etanol absoluto y la mezcla hidroalcohólica (70%) y muy inferiores para el extracto acuoso, esto pudiera indicarnos que tanto los fenoles como los flavonoides presentes en las hojas de *Eugenia clarensis* no resultan muy polares, sugiriendo que estos pudieran estar en forma de agliconas, no tan hidroxiladas ⁽⁵²⁾

Tabla 9: Resultados de la concentración de fenoles y flavonoides totales en los extractos de hojas de *Eugenia clarensis*

Extractos	Fenoles totales (mgEAG/mL de extracto)	Flavonoides totales (mgER/mL de extracto)
Etanólico	14.185 ± 0.090	4.712 ± 0.107
Hidroalcohólico	13.207 ± 0.436	3.210 ± 0.023
Acuoso	5.520 ± 0.499	1.118 ± 0.017

La cantidad de fenoles totales, flavonoides y taninos tienen una relación directa con el poder reductor y actividad antirradical de los extractos. Consecuentemente, se puede establecer que la actividad antioxidante ⁽⁶⁸⁾ sugeridas para la especie pudieran ser más marcadas en el extracto etanólico.

Serios estudios han incluyendo a los flavonoides como antioxidantes potentes con efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos ^(71, 72)

De esta evaluación, podemos suponer que los extractos de hojas de *Eugenia clarensis* dada la concentración de fenoles totales y flavonoides podrá tener consecuentemente una posible actividad antiinflamatoria y antioxidante. ⁽⁷³⁾

3.6. Fraccionamiento del extracto etanólico

El extracto alcohólico al resultar el de mayor contenido de Fenoles y Flavonoides, principales metabolitos de interés se sometió a un proceso de fraccionamiento con el

objetivo de profundizar en la caracterización de su naturaleza y que pudiera conducir al aislamiento de los compuestos mayoritarios. Inicialmente el extracto fue sometido a un proceso de tratamiento con carbón activado a fin de eliminar las clorofilas presentes que pudieran interferir con el aislamiento y purificación de los componentes de interés. Se conoce que el Carbón Activado es un producto muy utilizado para despigmentar extractos y productos alimenticios como los vinos eliminando clorofilas y otros pigmentos y mejorando las propiedades organolépticas de los mismos.

Como resultado de este tratamiento se obtuvieron tres extractos despigmentados los cuales fueron rotoevaporado a sequedad hasta obtener extractos secos. En la tabla 10 se muestran los resultados del rendimiento de dichos extractos para las tres variantes utilizadas.

Tabla 10: resultados del rendimiento del extracto etanólico y las variantes A, B y C

Rendimiento de las Variantes		
Variante	Rendimiento	%
ET	14.65	100
1%	10.51	71.74
3%	6.77	46.21
5%	5.25	35.84

Pudo observarse que el rendimiento en peso seco disminuye notablemente al aumentar la proporción de Carbón Activado desde un 71.74 % para la variante A hasta un 35.84% para la variante C , modificándose también las propiedades organolépticas. Para el caso del extracto seco resultante de la Variante A, se observó un extracto de color amarillo intenso, amorfo, de olor agradable, indicativo de compuestos aromáticos, lo cual es característico de las especies de este género botánico, pero que para la especie en estudio no han sido identificados. Igualmente pudo comprobarse de este estudio organoléptico que a medida que se aumenta la proporción de CA utilizado disminuye el olor aromático y también el color amarillo intenso obteniéndose en el caso de la variante C un sólido amorfo de color amarillo blanquecino prácticamente inodoro, lo cual pudiera indicar que algún componente queda retenido en el CA.

El uso de este procedimiento si bien elimina casi el 100% de la clorofila presente, también puede arrastrar consigo a otros elementos o compuestos de las matrices en estudio, que pueden ser importantes desde el punto de vista fitoquímico como suelen ser los compuestos fenólicos.

Por tal motivo los extractos resultantes de este proceso se sometieron a un exhaustivo análisis para evaluar la influencia de las diferentes propiedades del CA sobre estos metabolitos.

3.6.1. Tamizaje fitoquímico de las hojas de *Eugenia clarensis*

Inicialmente se realizó la evaluación fitoquímica de los extractos secos, obtenidos a partir del tratamiento con las Variantes A, B y C disolviendo los residuos en 10 ml de etanol absoluto, confirmando los resultados anteriormente discutidos, (tabla 11) manifestando una disminución significativa de la evidencia de la mayoría de los ensayos realizados.

Tabla 11: Resultados del tamizaje fitoquímico de extractos etanólico y los extractos etanólico tratado con las Variantes A, B y C.

Ensayo	Metabolitos	Muestra Total	Carbón Activado		
			A (1%)	B (3%)	C (5%)
		Resultados	Resultados	Resultados	Resultados
Resina	resina	+	+	+	+
Espuma	Saponina	-	-	-	-
Dragendorff	Alcaloides	-	-	-	-
Kedde	Glicosidos C	-	-	-	-
FeCl	Fenol y Taninos	++++	+++	++	+
Shinoda	Flavonoides	+++	++	+	+
Liebermann	Triterp y estero	+++	++	+	+
Bortrager	Quinonas	+++	++	+	+
Baljet	Cumar y Lacton	++++	+++	++	+
Fehling	Azucares reduct	++	+	+	+
Ninhidrina	a.a Libres	-	-	-	-

Leyenda: +++ (ensayos muy positivo con mayor nitidez), ++ (ensayo muy positivo), + (ensayo positivo), - (ensayo negativo), NP (no procede), D (ensayo dudosos)

Los resultados obtenidos en la realización de los ensayos para la determinación de fenoles y flavonoides Totales para los extractos obtenidos con Variantes A, B y C se muestran en la tabla 12

Tabla 12: Resultados obtenidos para la determinación de fenoles y flavonoides Totales para los extractos obtenidos con Variantes A, B y C

Variantes	Fenoles totales (mgEAG/mL)	Flavonoides totales (mgER/mL)
Extracto Total	14.185 ± 0.090	4.712 ± 0.107
Variante A (1% CA)	6.932 ± 0.016	2.728 ± 0.026
Variante B(3% CA)	3.208 ± 0.112	1.350 ± 0.032
Variante C(5% CA)	1.587 ± 0.105	0.469 ± 0.033

Tomando como referencia los valores del extracto etanólico al compararlo con los obtenidos en las variantes A, B y C, se observa una disminución significativa del contenido de fenoles totales en un 51.131% con respecto a la Variante A y de un 77.385 % y 88.812% para las variantes B y C respectivamente.

De igual modo que para fenoles disminuye significativamente el contenido de flavonoides totales en un 42.105%, 71.35% y 90.047% para las variantes A, B y C respectivamente.

Este estudio deja como mejor alternativa desde este punto de vista preliminar la variante A, para seguir el fraccionamiento aun cuando los fenoles totales y los flavonoides disminuye ligeramente para esta variante, por lo que puede tenerse en cuenta para estudios futuros trabajar con porcentos más pequeños de Carbón Activado.

3.6.2. Evaluación por Cromatografía en Capa Delgada (CCD)

El estudio de la influencia de la proporción de CA incluyó además un análisis por CCD. En la variante A en la exposición a la luz UV se observó similar comportamiento que el extracto etanólico original pero sin evidencia alguna de la presencia las bandas rojas propias de clorofilas demostrándose la factibilidad del método para eliminar este tipo de compuesto, igual comportamiento se observa en el resto de las variantes utilizadas.

Al evaluar los cromatogramas frente a los vapores de amoníaco solo se incrementa la intensidad del color amarillo de las bandas retenidas en el sitio de aplicación, comportamiento típico de sustancias de naturaleza flavonoide en el extracto etanólico y las variantes A y B, siendo en esta última menos evidente y prácticamente imperceptible en la variante C. Similar comportamiento ocurre en el revelado con $AlCl_3$. Es considerable destacar que en el caso de la variante C la baja evidencia cromatográfica de la presencia de flavonoides en las muestras está en correspondencia con el bajo contenido de flavonoides detectado en la técnica espectrofotométrica utilizada, por lo cual puede considerarse esta variante si se quiere obtener una fracción enriquecida en el resto de los componentes, igualmente pudieran evaluarse otros

procedimientos que pudieran conducir a la recuperación de los flavonoides retenidos en el carbón activado para su posterior evaluación química y biológica.

En el resto de los reveladores las variantes evaluadas mostraron similar composición que el extracto original a excepción de la banda 6 con Rf 0.6 correspondiente a la clorofila, igualmente aparecen menos visibles la banda 2 con Rf 0.08.

Para el caso de la vainillina se observó igual comportamiento que el extracto etanólico pero disminuye ligeramente la intensidad de la coloración para la variante C. La coloración violácea indicativa de terpenos en general corrobora los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico y despierta el interés por el aislamiento de este tipo de compuesto dada su posible implicación en importantes acciones farmacológicas.

3.6.3. Evaluación por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La técnica de HPLC que se realizó bajo las condiciones expuestas en el epígrafe 2.5 anterior proyectó los resultados que pueden observarse en la figura 4.

Cuando se comparan el perfil cromatográfico del extracto etanólico inicial a las dos longitudes de onda evaluadas vemos como este permanece inalterado en cuanto a los tiempos de retención no apareciendo o desapareciendo ninguna señal, lo cual sugiere que dichos compuestos pueden tener naturaleza tipo flavonoide que tiene este comportamiento típico. ⁽⁵⁰⁾

Se observó como disminuyeron significativamente las áreas de los picos (tabla 13) en relación con las del extracto etanólico original a medida que se aumenta el porcentaje de carbón activado empleado en el tratamiento.

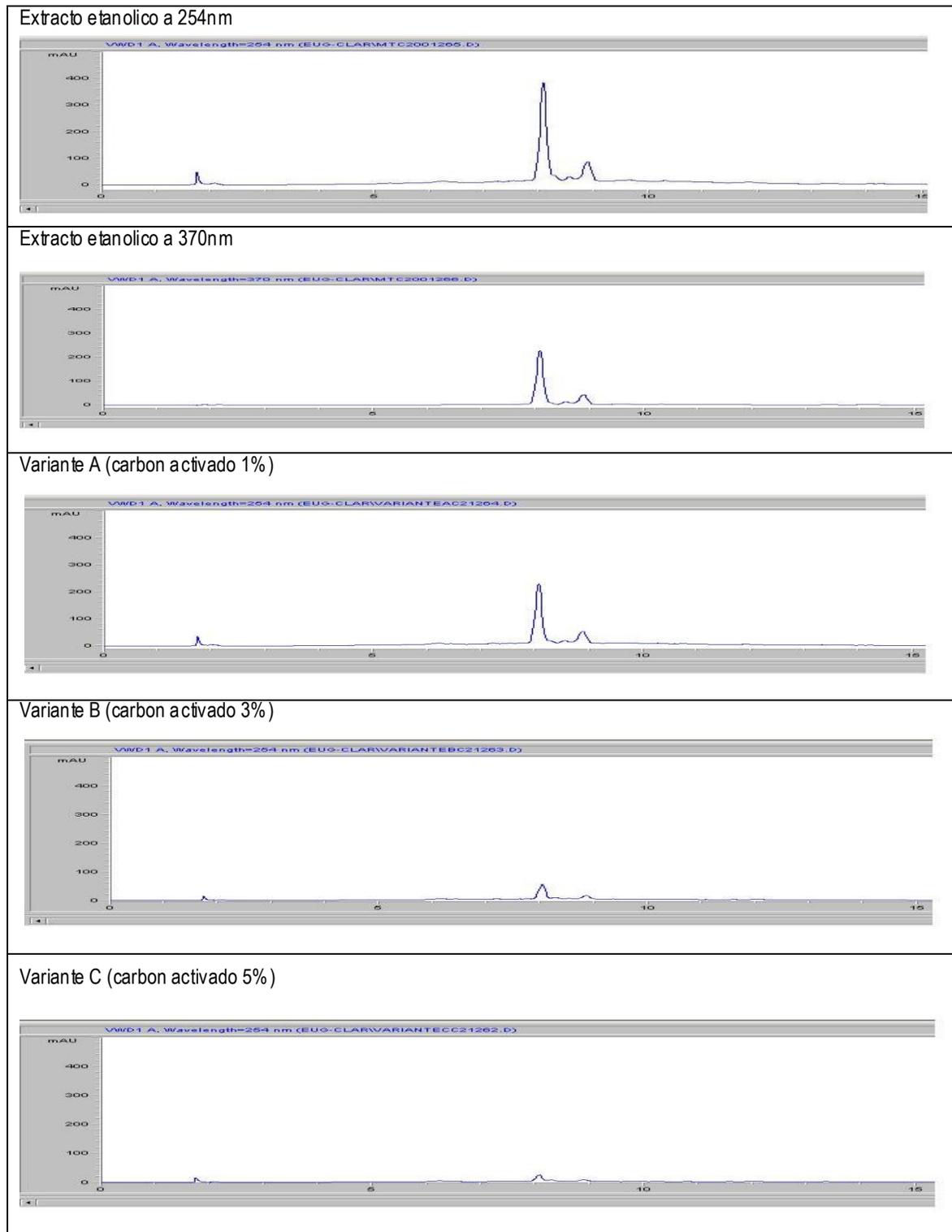


Figura 4: Cromatogramas del extracto y las variantes A, B y C utilizando CLAE

Estos resultados parecen explicar lo observado en el seguimiento por CCD para las sustancias retenidas en el punto de aplicación (Rf: 0) no así para las sustancias con Rf 0.08 y 0.36 que permanecen prácticamente inalterables a CCD, por lo cual se infiere que no fueron detectadas en las condiciones empleadas en el análisis por CLAE. Este análisis sugiere que deberán estudiarse otras condiciones cromatografías que permitan detectar dichos componentes en las técnicas CLAE que nos permitan su cuantificación total.

Tabla 13 Resultados del tiempo de retención y áreas de las señales observadas en el estudio cromatográfico por CLAE

#	Extracto etanólico		Variante A		Variante B		Variante C	
	tr	Área	tr	Área	tr	Área	tr	Área
1	1.735	173.50	1.730	131.83	1.726	50.88	1.739	22.28
2	8.061	3334.26	8.054	1962.73	8.022	418.76	8.059	152.30
3	8.872	698,78	8.867	411.98	8.838	111.31	8.882	63.82

Una vez evaluada las porciones más adecuadas de CA se continua el fraccionamiento con la Variante A evaporando a sequedad 8 ml restantes y redisolviendo en Metanol caliente, se filtro para eliminar la porción insoluble (precipitado A) y el filtrado se sometió a cristalización en frio ($T=4^{\circ}\text{C}$) por dos horas (h), transcurrido este tiempo se dejo en cristalización durante 72 h tras lo cual se separó el sobrenadante (SN1) y el precipitado (P1) quedando sobre el papel de filtro.

El sobrenadante (SN1) se concentro a sequedad en baño de agua, se lavo con Acetato de Etilo, posteriormente se redisolvió en Metanol caliente y se dejo en cristalización obteniendo tras filtración la fracción denominada EC_0 .

El precipitado A resultante de redissolver el extracto despigmentado Variante A presenta una coloración parda, es prácticamente insoluble en agua, diclorometano, etanol

absoluto, representa una pequeña proporción del extracto original, por lo que se desechó del estudio fitoquímico. Se continúa trabajando con el sobrenadante con características más interesantes, el cual no cristalizó con el tratamiento en frío pero al evaporarse el solvente permitió separar dos fracciones con similar interés desde el punto de vista fitoquímico.

EC₀ de color pardo naranja homogéneo insoluble en Acetato de etilo con ausencia del componente mayoritario con Rf 0.3 y de naturaleza menos polar al quedarse retenido en el punto de aplicación dando una coloración pardo oscuro frente a la sustancia reveladora, vainillina sulfúrica, no dando indicio de su posible naturaleza fenólica, siendo preservado para posteriores estudios fitoquímicos.

A partir de este momento el estudio se enfocó en el precipitado P1 de aspecto cristalino con tonalidades de coloración que van desde el pardo hasta el amarillo pálido indicativo de una mezcla de compuestos lo cual fue confirmado por el análisis cromatográfico donde se observan tres manchas, destacándose la banda de Rf 0.36 correspondiente con el componente mayoritario de color rosado violáceo frente a la vainillina y amarillo naranja al UV-vis(366) lo cual puede indicarnos una posible naturaleza flavonoides o terpenoide lo indicado para este tipo de revelado en la literatura.⁽⁵¹⁾

En los cromatogramas se observó también la presencia de otras dos bandas de menor Rf 0.1 y 0.14 de color morado que pudiera tener naturaleza sesquiterpenoide que han sido muy reportada para otras especies del género *Eugenia*.⁽⁶⁸⁾

Centrándonos en lograr la separación de este compuesto mayoritario se prosiguió el análisis con sucesivas recristalizaciones en mezclas de etanol absoluto: Acetona y Metanol Acetona logrando 3 fracciones EC₁, EC₂ y EC₃. Las cuales fueron cromatografiadas a fin de valorar su composición.

EC₁ resultó ser un sólido cristalino de color amarillo intenso de aspecto brillante que rindió 12 mg muy soluble en etanol absoluto y metanol, con mayor proporción del componente mayoritario pero aun impurificado con otras tres sustancias de aparente naturaleza terpenoide (serquitérpenoide) dada su reacción frente a la vainillina que al

considerar los resultados para el ensayo de Baljet puede ser una lactona sesquiterpénica aunque no se tiene reportes de este tipo de compuestos en la literatura.

EC₂ resultó ser un precipitado viscoso con igual composición que EC₁ pero menos enriquecido del compuesto mayoritario, que dado su poco rendimiento fue reservado para futuros estudios.

EC₃ resultó ser un sólido amorfo de color amarillo pálido con un rendimiento de 8 mg, cuyo análisis revela mayor pureza del componente mayoritario, pudiendo ser este un buen candidato para para futuros análisis de purificación y caracterización de dicho componente.

Estudios futuros más profundos deberán realizarse para una caracterización definitiva de los componentes del extracto.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. El método de secado en la estufa resultó el más adecuado considerando los parámetros evaluados.
2. Los índices numéricos determinados al material vegetal procedente de las hojas de *Eugenia clarensis* se encuentran dentro de los límites establecidos para este tipo de material vegetal en los materiales de referencia.
3. Se caracterizaron 3 extractos procedentes de la droga cruda y se establecieron sus especificaciones de calidad.
4. El extracto alcohólico mostró los mayores índices de fenoles y flavonoides totales con 14.18 mgEAG/mL y 4.71 mgER/mL, respectivamente y mostró también el mejor perfil cromatográfico.
5. El fraccionamiento permitió obtener una fracción con relativa pureza para someterse a futura caracterización química.

RECOMENDACIONES

Recomendaciones

1. Evaluar la posible actividad antioxidantes y antiinflamatorio del extracto etanólico de las hojas de la planta.
2. Completar el estudio fitoquímico de la planta con el objetivo de aislar y caracterizar los compuesto presentes en el extracto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias Bibliograficas

1. Jayasuriya DC. A review of legislation concerning medicinal plants.1990.
2. Jayasuriya DC. The regulation of medicinal plants - a preliminary review of selected aspects of national legislation.1990.
3. Heide L. Traditionelle Arzneipflanzen in der Gesundheitsversorgung der dritten Welt-Möglichkeiten und Grenzen. Zeitschrift für Phytotherapie. 1991;12:1-8.
4. Standley J, Williams L. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany. 1975;24(11):93 - 354.
5. Lyle E, Simón J. Species and medicinal plants: Recent Advances in Botany. Horticulture & Pharmacology. 1989;4 267:58-9.
6. Girón L, Freire A, Alonzo A, Cáceres A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. J Ethopharmacol. 1991;34:173.
7. González M, Ramírez D. Antecedentes y situación reguladora de la medicina herbaria en Cuba. BLACPMA. 2007;6(4):118-24.
8. Pérez I, Field A, Churches A, Herrera R, Eagle M, García L. Acute Toxicity and diuretic effect of the *Commelina elegans* H.B.K (tube). Rev Cubana Farm. 2006;40:101.
9. www.BedinCuba.com/TodosobreCuba/Flora. Todo sobre Cuba.
10. Alain H, editor. Flora de Cuba. La Havana: Contr. Ocas. Mus. Hist. Nat. Colegio "De La Salles" 13, .
; 1957.
11. Vales M, Alvarez A, Montes L, Avila A, editors. Estudio Nacional sobre la Diversidad Biológica en la República de Cuba. . La Habana.: PNUMA, CenBio, IES, AMA, CITMA, La Habana. CESYTA, Madrid.; 1998.
12. Capote RP, Berzaín. R. Clasificación de las formaciones vegetales de Cuba. Rev Jard Bot Nac Univ Hab. 1984;5(2):27-75.
13. Mittermeier RA, Myers N, Mittermeier CG. Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Mexico City, mexico: Cemex Conservation International.1999.
14. [cubainfodetails.aspx.htm](#), [Plantas_endémicas_de_Cuba.htm](#).EcuRed
2011.
15. López Almirall A. Contribución al catálogo de flora cubana: endemismos de suelos derivados de ofiolitas. Bot Complut. 2013;37:135-52.
16. Berg O, McVaugh R. Revisio myrtacearum americae.The genera of American Myrtaceae an interim report. 1968;27:1-472, 354-418, 1855-56.
17. Standley T, Ross E. Myrtaceae. South-Eastern Queensland 2. 1986:119-218.
18. Sánchez P, Vindas P. Flora de Nicaragua: Myrtaceae Brenesia 1989;31:53-73.
19. Sánchez P, Vindas P. Myrtaceae. 1990;62:1-146.
20. Niedenzu F. Myrtaceae. In K Prantl & A Engler, Nat Pflanzenfam. 1893;3(7):57-105.

Referencias bibliográficas

21. Briggs B, Johnson L, ;. Evolution in the Myrtaceae. Evidences from inflorescence structure. Proc Linn Soc New South Wales. 1979(102:157-256.
-).
22. Schmid R. Comparative anatomy and morphology of Psiloxylon and Heteropyxis, and the subfamilial and tribal classification of Myrtaceae. 1980(29:559-95.).
23. Urquiola Cruz AJ, Acosta Ramos Z. Los géneros Mosiera Small, Psidium L., Calycolpus Berg y Pimenta Lindl. . (Myrtinae-Myrtaceae) para la Flora de la República de Cuba 2007.
24. Missouri Botanical Garden: Flora de Nicaragua.Myrtaceae. Wikipedia: Tropicos.org; Consultado el 20 de febrero 2010.
25. Landrum LR. The Myrtle family (Myrtaceae) in Chile. Proc Calif Acad Sci. 1988;45:277-317.
26. Legrand CMDH. Lista preliminar de las Mirtáceas Argentinas. Darwiniana. 1941;5:463-86.
27. Legrand CMDH. Contribuciones mirtológicas argentinas. Correcciones o adiciones a «Lista preliminar de Mirtáceas. 1950.
28. Legrand CMDH. Análisis de un trabajo de Mirtáceas. «E. Kausel. Mirtáceas sudamericanas nuevas o críticas. Bradea. 1973; 1:309-12.
29. Rosides C. Guía de Consultas Diversidad Vegetal. FACENA (UNNE) EUDICOTILEDONEAS ESCENCIALES. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE).34-42.
30. Pascoalb AC, Salvador MJ. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties by MariaE´ lida Alves Stefanello. CHEMISTRY & BIODIVERSITY
2011;8
31. Schmeda-Hirschmann G, Theoduloz C, Franco L, Ferro E, de Arias AR. Preliminary pharmacological studies on Eugenia uniflora leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. . Journal of Ethnopharmacology,. 1987(21: 183-186.).
32. Pharmacological basis for the empirical use of Eugenia uniflora L. (Myrtaceae) as antihypertensive. Journal of Ethnopharmacology. 1999(66: 33-39).
33. Ethnobotanical observations on Paraguayan Myrtaceae. Journal of Ethnopharmacology. (22: 73-79.).
34. Amat AGY, M. E. Medicinal plants and ethnopharmacology in the province of Misiones (Argentina). . Acta Farmacéutica Bonaerense. 1991(10: 153-159.).
35. Arai I, Amagaya S, Komatsu Y, Okada M, Hayashi T, Kasai M, et al. Improving effects of the extracts from Eugenia uniflora on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. . Journal of Ethnopharmacology,. 1999(68: 307-314.).
36. Arruda L, Freitas A, Granjeiro OP, Aquino EG, Martins MF. Estudo dos efeitos farmacológicos induzidos pelo extrato aquoso de raízes de Eugenia punissifolia (HBK) DC. VIII Symposium on Brazilian Medicinal Plants, Manaus, AM, Brazil, . 1984.
37. Romero MJ. Acción cardiovascular de extractos acuosos de hojas de Syzygium jambos (L.) Alston. Revista Costarricense de Ciências Médicas. 1995(16: 17-25.).

Referencias bibliográficas

38. Silva Neto CR, Lopes RA, Pozetti GL. Efeitos do extrato de folhas secas de jambolão (*Syzygium jambolanum*) sobre a excreção renal de água, sódio e potássio em ratos. Resultados preliminares. Revista da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. 1986(23: 213-215.).
39. Silva Neto CR, Lopes RA, Pozetti GL. Utilização de extrato de botão floral de jambolão (*Syzygium jambolanum*) na excreção renal de água e eletrólitos em ratos. Pesquisa Homeopatica. 1989(4: 15-21.).
40. Mukherjee PK, Saha K, Murugesan T, Mandal SC, M, Saha BP. Screening of anti-diarrhoeal profile of some plant extracts of a specific region of West Bengal, India. . Journal of Ethnopharmacology,. 1997(60: 85-8).
41. Kusumoto IT, Nakabayashi T, Kida H, Miyashiro H, Hattori M, Namba T, et al. Screening of various. 1995.
42. De Lima TCM, Klueger PA, Pereira PA, Macedo-Neto WP, Morato GS, Farias MR. Behavioural effects of crude and semi-purified extracts of *Syzygium*. 1998.
43. Achrekar S, Kaklij GS, Pote MS, Kelkar SM. Hypoglycemic activity of *Eugenia jambolana* and *Ficus bengalensis*:. 1991.
44. Kohli KR, Singh R. HA clinical trial of Jambu (*Eugenia jambolana*) in Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus, . J Res Ayurveda Siddha. 1993;XIV(3-4):89-97.
45. Chaudhuri N, Pal AK, Gomes S, Bhattacharya A. Anti-inflammatory and related action of *Syzygium cumini* seed extract. Phytother Res. 1990; 4(1):5–10.
46. Bhuiyan MA, Mia MY, Rashid MA. Antibacterial principles of the seeds of *Eugenia jambolana*. . Bangladesh J Biol. 1996(25:239–241.).
47. http://collections.si.edu/search/results.htm?q=record_ID%3Anmnhbotany_10856921&repo=DPLADigital Public Library. 1935.
48. Taxonomy Details for *Eugenia clarensis*. Search Taxonomy (default is case-insensitive STARTS WITH); 2013.
49. QUE ES LA FITOQUIMICA? 2011 [updated <http://susanfitoquimica.blogspot.com/2011/05/que-es-la-fitoquimica.html>].
50. Lock de Ugaz O. ANALISIS FITOQUIMICO DE METABOLITOS SECUNDARIOS.
51. Miranda Martínez M, Cuéllar Cuéllar A. Farmacognosia y productos naturales. La Habana:2012.
52. Ochamendi E. Durand. Normas Ramales de Salud Pública # 309 (NRSP # 309) “Droga cruda. Métodos de ensayo”. La Habana:1992.
53. Ochamendi E. Durand. Norma Ramal de Salud Pública #312: “Extractos, fluidos y tinturas. Métodos de ensayo”. . La Habana:1992.
54. De Armas Mesa Y. Composición química y actividad antioxidante del aceite esencial y extractos orgánicos de las hojas de *Mosiera bullata*. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2014.
55. Gracia Nava MA. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES EN EXTRACTOS

Referencias bibliográficas

56. García Salmerón L. Estudio preliminar de la cinética de acumulación de fenoles y flavonoides totales en la especie *Capraria biflora* L. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2011.
57. Concepción Marrero G. Evaluación farmacognóstica y fitoquímica de las hojas de *Mosiera bullata* (Britton & P.Wilson) Bisse. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas
2013.
58. García Bacallao L, Rojo Domínguez D, García Gómez L, Hernández MA. Plantas con propiedades antiinflamatorias. . *Rev Cubana Invest Bioméd* 2002(21(3)).
59. Dutta S, Das S. A study of the anti-inflammatory effect of the leaves of *Psidium guajava* Linn on experimental animal models. *Pharmac Res.* 2010(2:313-7.).
60. . KHALAF NA, SHAKYA A, AL-OTHMAN KA, EL-AGBAR ZF, H. . Antioxidant Activity of Some Common Plants. *Turk J Biol.* 2008;32 51-5.
61. follow@pharmacognosy. Introducción a la Farmacognosia y la Química de los productos naturales. .
62. Carvajal Rojas L, Hata Uribe Y, Sierra Martínez N, Rueda Niño D. Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de *Cupatá* (*Strychnos schultesiana* krukoff). . *Revista Colombia Forestal* 2009;12(162):161-70.
63. Enríquez Flores A, Prieto Vela E, De los Ríos Martínez E, Ruiz Reyes G. Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe "Jengibre" de la ciudad de Chanchamayo - Región Junín. Perú. *Rev Med Vallejiana.* 5(1):50-64.
64. Calderon PJ. "Factors Influencing the formation of precipitates and hazes by gelatin and condensed and hidrolizable tannins". USA: *J Arg Food chem.* 1968.
65. Lindley MG. The impact of food processing on antioxidants in vegetableoils, fruits and vegetables. . *Trends Food Sci Technol.* 1998.(9): 336-40.
66. Papas AM. Diet and antioxidant status. Antioxidant status, diet, nutrition, and health. . Boca Raton, London, New York, Washington. 1999.
67. Claus MP. "Chemistry and Biological Activities of Plants of the Genus *Neurolaena*". Costa Rica:1996.
68. De Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. . *Biochemical Systematics and Ecology.* 1999.(27: 445-459.).
69. Moreno S, Scheyer T, Romano S, CVOjnov AA. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. . *Free Radical Res.* 2006(40): 223-31.
70. Canadanovic-Brunet JM, Djilas SM, Cetkovic GS, Tumbas VT, Mandic AI, Canadanovic VM. Antioxidant activities of different *Teucrium montanum* L. extracts. *Int J Food Sci Technol.* 2006.(41): 667-73.
71. Middleton EJ, Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. *The Flavonoids.* . Chapman and Hall, London,. 1994. : 619-52.

Referencias bibliográficas

72. Rice-Evans C. Free radicals and antioxidants in normal and pathological processes: In Oxidative stress, lipoproteins and cardiovascular dysfunction. Portland Press, London, . 1995.:1-32.
73. MARTÍNEZ VÁSQUEZ JB. "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE SEMILLAS DE HELIOCARPUS TEREBINTHINACEUS". HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA.: UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA; 2007.