

## CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *BOURRERIA HUANITA* (LLAVE & LEX.) HEMSL.

(ESQUISUCHIL O ÁRBOL DEL HERMANO PEDRO)

<sup>1,2</sup>Cruz S.M., <sup>1</sup>García E.P., <sup>4</sup>Letrán H., <sup>4</sup>Gaitán I., <sup>2</sup>Medinilla B.,

<sup>5</sup>Orozco R., <sup>3</sup>Samayoa M.C., <sup>1,6</sup>Cáceres A.

sullycv@hotmail.com

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), <sup>2</sup>Depto. de Farmacognosia y Fitoquímica, <sup>3</sup>Depto. de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica; <sup>4</sup>Unidad de Bioensayos, Escuela de Química Biológica; <sup>5</sup>Unidad de Análisis Instrumental (UAI), Escuela de Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, <sup>6</sup>Laboratorio de Productos Naturales Farmaya S.A

### 1. RESUMEN

La extraordinaria biodiversidad vegetal de la región y la reducida información técnica científica existente de la flora nativa, sugiere la necesidad de realizar estudios sobre especies vegetales que han sido poco estudiadas y se les atribuye propiedades medicinales. Un caso particular es el del esquisuchil (*Bourreria huanita*), una Boraginaceae reconocida en Mesoamérica por sus propiedades medicinales desde la época prehispánica, comúnmente utilizada de manera tradicional y popular por su efecto antimicrobiano y antiinflamatorio de la infusión de flores, para curar lesiones cutáneas bacterianas o virales, para la fiebre, como tranquilizante y ansiolítica, en enfermedades cardíacas, presión arterial, usada como colirio desinfectante, calmante de dolores menstruales y antiabortivo, además se le atribuye propiedad analgésica y anticancerígena. Según la revisión realizada no existe ninguna información sobre su química y actividad biológica, por lo que se realizó la caracterización mediante ensayos químicos y biológicos de los extractos vegetales y aceites esencial de la flor. La muestra fue colectada en Antigua Guatemala, identificada por un botánico y se realizaron ensayos morfoanatómicos, organolépticos y fisicoquímicos para evaluar la calidad y pureza de la droga vegetal.

Se realizó la prueba de sólidos totales para seleccionar el mejor disolvente obteniendo como resultado etanol al 50% con un rendimiento del extracto de 38.1%. Se extrajo el aceite esencial mediante hidrodestilación utilizando un aparato tipo Neoclevenger, presentando 30 constituyentes siendo los mayoritarios farnesil cetona (8.38%), ácido-2OH fenileno benzoico (8.37%),  $\le$ -feniletilsalicilato (5.60%), 6,10 dimetil 2-undecanona (5.29%) y heneicosano (5.20%) los cuales podrían ser de interés en la industria de alimentos. De extracto crudo etanólico se realizaron las particiones líquido-líquido con disolventes de diferente polaridad (hexano, cloroformo y acetato de etilo), la partición con mayor porcentaje de rendimiento fue la hexánica (4.0%). Mediante el tamizaje fitoquímico se detectaron los metabolitos secundarios presentes en *B. huanita*, que según los ensayos realizados en materia vegetal fueron: Alcaloides, flavonoides y antocianinas, taninos y cumarinas. Los metabolitos secundarios presentes, según el tamizaje fitoquímico en extractos etanólicos fueron flavonoides y antocianinas, sesquiterpenlactonas, esteroides y triterpenoides, taninos, cumarinas, saponinas y aceites volátiles; en extractos diclorometánicos los metabolitos detectados fueron esteroides y triterpenoides, cumarinas y aceites volátiles.

Se realizó la evaluación de la actividad biológica y se determinó que el extracto etanólico presentó actividad antibacteriana contra *E. coli* a 0.5 mg/mL. Ninguno de los extractos vegetales evaluados presentó actividad antimicótica, citotóxica ni larvicida. Se espera establecer contacto con otros centros de investigación para realizar pruebas farmacológicas sobre el sistema nervioso.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales se han empleado con fines curativos desde hace miles de años. Guatemala es rica en diversidad biológica y cultural, cuenta con una flora nativa de interés medicinal y aromática, siendo un ejemplo de ello el esquisuchil o también conocido como árbol del hermano Pedro (*B. huanita*), a la cual la población le atribuye propiedades milagrosas siendo estas en el tratamiento de afecciones nerviosas, cardíacas, virales, infecciosas, etc., pero no se conocen estudios que validen el uso popular de dicha especie.

En el presente estudio se realizó la caracterización química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial y los extractos vegetales obteniendo resultados que contribuyen al estudio de la flora nativa, ya que se detectaron los metabolitos secundarios presentes de interés como es el caso de flavonoides utilizados como antioxidantes; aceites esenciales de amplia aplicación en perfumería, cosmética y medicina; cumarinas y taninos como cicatrizantes, antitumorales y antifúngicos. Los resultados permiten determinar los parámetros de calidad y pureza en la droga vegetal, como el contenido de cenizas, sólidos totales, determinación de mejor disolvente y determinación de rendimiento del aceite esencial, lo cual permite sentar las bases para el desarrollo de una monografía de calidad.

Se determinó que la especie presenta una actividad antimicrobiana moderada contra bacterias patógenas, lo cual valida su uso como agente antiinfeccioso. Se establecieron los vínculos con la Universidad del Valle de Itajaí, Brasil, para complementar la investigación con ensayos farmacológicos relacionados con el sistema nervioso.

## 3. METODOLOGÍA

**Selección de la especie:** Mediante criterios etnobotánicos y etnofarmacológicos se seleccionó la especie por no haber sido estudiada previamente, ser nativa, de uso tradicional y popular.

**Obtención y colecta del material vegetal:** Se colectó la flor de *B. huanita*, en la Finca Belencito, Antigua Guatemala mediante la colaboración del Dr. Miguel Torres, la muestra fue depositada en el Herbario del Laboratorio de Productos Naturales Farmaya S.A., con número de voucher 895, se tomó una muestra representativa de 250-500 g de material vegetal, de los cuales se llevó a cabo la extracción y pruebas de laboratorio (estudio fitoquímico y ensayos biológicos).

**Estudio del rendimiento y caracterización de aceites esenciales:** La determinación de porcentaje de rendimiento de aceites esenciales se realizó mediante la extracción por hidrodestilación utilizando un equipo Neoclevenger según la Farmacopea Europea (2001), realizando 6 repeticiones para determinar el porcentaje de rendimiento del aceite esencial (Solis *et al*, 2005). Para la cuantificación se procedió a una caracterización por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas, el cual se realizó con la colaboración del Depto. de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC. Este consistió en el análisis del aceite esencial utilizando un cromatógrafo de gases masas HP5890 Serie 2 DM 5971A. Columna HP 5 25 m x 0.2 mm de DI. Se utilizó para la identificación la Librería Wiley 275.1. Tiempo de corrida: 29 min, temperatura de columna 50°C, temperatura del puerto 250°C, temperatura del Detector 280°C. Se inyectaron 2ml del aceite en 1 mL de metanol grado HPLC.

**Obtención de extractos y evaluación de la actividad biocida:** Del material vegetal seco y molido se obtuvo un extracto diclorometánico y etanólico mediante percolación, el cual se concentró en rotaevaporador. A los extractos así obtenidos se les determinó la actividad biológica por las siguientes técnicas: actividad antimicrobiana contra *Streptococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Escherichia coli* ATCC 25922 (Mitscher *et al.*, 1972), citotóxica por el modelo de *Artemia salina* (Solis *et al.*, 1993) e insecticida contra larvas de *Aedes aegypti* (Mishra *et al.*, 1987).

**Caracterización fitoquímica de los extractos:** Al extracto etanólico se le realizó una partición líquido-líquido con disolventes de polaridad creciente (hexano, cloroformo, acetato de etilo). A los extractos madre y las particiones, se les realizó un tamizaje fitoquímico para determinar los metabolitos secundarios presentes en los extractos, así como el análisis fisicoquímico para determinar la calidad y pureza de la droga vegetal (cenizas totales y ácidas, mejor disolvente y humedad) (Sharapin, 2000; Solis *et al.*, 2005; Wagner & Bladt, 1996).

#### 4. RESULTADOS

La muestra de *B. huanita* fue colectada en la Finca Belencito, Antigua Guatemala, de un material cultivado, del cual se obtuvieron los siguientes resultados de los análisis fisicoquímicos:

##### **Cenizas totales y cenizas ácidas:**

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó un porcentaje de cenizas totales de  $6.69 \pm 0.21\%$  y de cenizas ácidas del  $1.6 \pm 0.007\%$ .

##### **Determinación del mejor disolvente:**

Basados en el porcentaje de sólidos totales extraídos por etanol de diferentes grados, se determinó que el mejor disolvente de extracción fue el etanol al 50%, que dio un rendimiento de 1.13%, seguido del etanol al 70% (0.96%) y etanol al 95% (0.74%).

##### **Rendimiento de extractos y particiones:**

Al extraer secuencialmente con diclorometano y etanol, se determinó que el mejor rendimiento es el extracto etanólico al 50% que dio un rendimiento de 38.1%, mientras que el extracto diclorometánico dio un rendimiento de 1.8%.

A partir del extracto etanólico crudo de *B. huanita*, se determinó que el mayor porcentaje de rendimiento lo presentó la partición hexánica (4.0%), seguida de la cloroformica (3.0%) y de acetato de etilo (2.5%).

**Análisis del aceite esencial:** Para determinar el porcentaje de rendimiento de aceite esencial en la droga vegetal seca, se realizaron 6 repeticiones, obteniéndose un rendimiento promedio de  $0.05 \pm 0.02\%$ .

Se realizó el análisis del aceite esencial utilizando el equipo y las condiciones previamente descritas. En la Gráfica 1 se observa el cromatograma del aceite esencial de *B. huanita*, del cual se identificaron 30 constituyentes siendo los mayoritarios farnesil cetona (8.38%), ácido-2OH fenileno benzóico (8.37%),  $\pm$ -feniletilsalicilato (5.60%), 6,10 dimetil 2-undecanona (5.29%) y heneicosano (5.20%) (Tabla 5).

Gráfica 1. Caracterización del aceite esencial de *B. huanita*

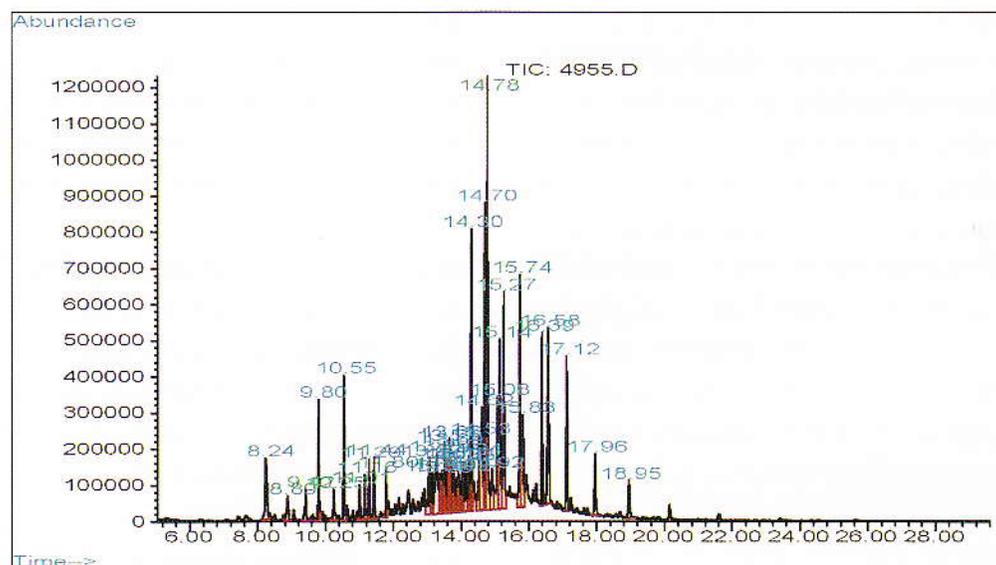


Tabla 1. Caracterización del aceite esencial de *B. huanita*

	Tiempo Retención	Componente identificado	Área %
1	8.24	1,8 cineol	2.30
2	8.89	Nonanal	0.85
3	9.42	Nonanal	0.94
4	9.80	$\alpha$ -terpineol	2.32
5	10.55	5 metil-2-metiletenofenol	2.75
6	11.44	Metil-eugenol	1.22
7	13.06	1-butilheptil benceno	1.71
8	13.14	1-propil octil benceno	1.00
9	13.29	1-etilnonil benceno	3.39
10	13.39	$\beta$ -bisaboleno	0.91
11	13.65	1pentilheptilbenceno	1.40
12	13.69	1- butil octil benceno	1.40
13	13.77	1propilnonil benceno	1.24
14	14.05	Benzoato de bencilo	1.27
15	14.25	1-pentil octil benceno	1.31
16	14.30	6,10 dimetil 2-undecanona	5.29
17	14.53	Ácido bis 1,2 bencendicarboxílico	1.63
18	14.62	2-penta decanona	4.06
19	14.71	Ácido-2-OH-fenileno benzoico,	8.37
20	14.78	farnesil cetona	8.38
21	14.92	Ac. hexadecanoico	1.54
22	15.08	Heptadecano	4.02
23	15.26	$\beta$ -feniletilsalicilato	5.60
24	15.75	Heneicosano	5.20
25	15.83	2-Nonadecanona	3.25
26	16.39	Docosano	3.57
27	16.58	Ácido linoleico	5.00
28	17.12	n-eicosano	3.43
29	17.96	tetracosano	1.67
30	18.96	pentacosano	1.23
		Total	86.25

**Evaluación de la actividad biocida:** En la fase de tamizaje se observó actividad en el extracto diclorometánico contra *B. subtilis*, y el extracto etanólico mostró inhibición de *M. smegmatis*, *B. subtilis* y *E. coli*. En los extractos que se evidenció actividad al tamizaje, se determinó la concentración

inhibitoria mínima (CIM), encontrándose que el extracto etanólico presentó actividad contra *E. coli* a 0.5 mg/mL (Tabla 2). Ninguno de los extractos vegetales y aceite evaluados presentó actividad larvicida contra *A. aegypti* ni citotóxica contra *A. salina*.

**Tabla 2. CIM de los extractos obtenidos por extracción fraccionada**

Muestra	Extracto	A	B	C	D	E	F
<i>B. huanita</i>	Diclorometano	+	+	+	>1	+	+
	Etanol	+	+	>1	>1	+	0.5

Fuente: Datos experimentales. Microorganismos = A: *S. aureus* ATCC 25923, B: *S. typhi* ATCC 14028, C: *M. smegmatis* ATCC 607, D: *B. subtilis* ATCC 6051, E: *C. albicans* ATCC 10231, F: *E. coli* ATCC 25922.

**Tamizaje fitoquímico de los extractos:** Al comparar el contenido de familias fitoquímica de la droga vegetal y los extractos etanólico y diclorometánico, es evidente que el extracto etanólico es el más diverso (7 familias químicas), seguido de la droga vegetal y el extracto diclorometánico (Tabla 3); prácticamente todas las familias químicas fueron detectadas en cualquier de

los extractos y droga vegetal. La partición más diversa fue la de cloroformo, seguida de hexano y acetato de etilo. Sesquiterpenlactonas, saponinas y aceites estuvieron presentes en las tres particiones, mientras que alcaloides, taninos y esteroides no se evidenciaron en ninguna de las particiones (Tabla 4).

**Tabla 3. Resultados del tamizaje fitoquímico**

Metabolitos	<i>B. huanita</i>		
	A	B	C
Alcaloides	+		
Flavonoides	+	+	
Taninos	+	+	
Cumarinas	+	+	+
Sesquiterpenlactonas		+	
Saponinas		+	
Esteroides y triterpenoides		+	+
Aceites volátiles		+	+

A: Droga vegetal, B: Extracto etanólico, C: Extracto diclorometánico

**Tabla 4. Tamizaje fitoquímico de particiones**

Metabolitos	<i>B. huanita</i>		
	A	B	C
Alcaloides			
Flavonoides		+	+
Taninos			
Cumarinas	+	+	
Sesquiterpenlactonas	+	+	+
Saponinas	+	+	+
Esteroides y triterpenoides			
Aceites	+	+	+

A: Hexano, B: Cloroformo, C: Acetato de etilo

## 5. CONCLUSIONES

- 5.1 La mayor cantidad de sólidos totales se obtuvo por la extracción con etanol al 50% presentando el mayor porcentaje de rendimiento (38.1%).
- 5.2 La partición con mayor porcentaje de rendimiento fue la hexánica (4.0%)
- 5.3 El aceite esencial presentó 30 constituyentes siendo el mayoritario farnesil cetona (8.38%), ácido-2OH fenileno benzoico (8.37%),  $\le$ -feniletilsalicilato (5.60%), 6,10 dimetil 2-undecanona (5.29%) y heneicosano (5.20%)
- 5.4 El extracto etanólico presentó el mayor número de metabolitos secundarios (7) flavonoides y antocianinas, taninos, cumarinas, sesquiterpenlactonas, saponinas, esteroides y aceites volátiles; seguido de la droga vegetal (4) que presentó alcaloides el cual no se detectó en los extractos y el extracto diclorometánico que presentó únicamente cumarinas, esteroides y aceites volátiles.
- 5.5 Los metabolitos secundarios presentes, según resultados de CCF en la partición hexánica fueron saponinas, principios amargos, cumarinas y aceites volátiles y en la partición clorofórmica se detectaron la mayor cantidad de metabolitos (flavonoides y antocianinas, saponinas, principios amargos, cumarinas y aceites volátiles) y en la partición de acetato de etilo no se evidenciaron cumarinas.
- 5.6 Los extractos etanólicos presentaron mayor actividad inhibitoria que los extractos diclorometánicos.
- 5.7 El extracto etanólico presentó actividad antibacteriana contra *E. coli* a 0.5 mg/mL y ninguno de los extractos vegetales evaluados presentó actividad citotóxica ni larvicida.
- 5.8 El aceite esencial no evidenció actividad biocida en las pruebas realizadas.

## 6. RECOMENDACIONES

- 6.1 Extraer el aceite esencial de otras localidades, para comparar las diferencias de rendimiento y composición química incluyendo otras variables.
- 6.2 Realizar el aislamiento y elucidación de las estructuras químicas de los compuestos presentes en la especie.
- 6.3 Desarrollar una monografía farmacopeica de la especie para establecer las especificaciones de calidad y facilitar su desarrollo.
- 6.4 Establecer contacto con grupos de investigadores para evaluar otras actividades farmacológicas en la especie para continuar con la validación del uso popular de las plantas medicinales, particularmente sobre el sistema nervioso.
- 6.5 Evaluar otras partes de las especies para determinar si se presentan diferencias en la composición química y actividad biológica.

## 7. REFERENCIAS

1. Brancato, FP. y Golding, NS. 1953. The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *Mycologia* 45:848-864.
2. Cáceres, A. 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria. Guatemala.
3. European Pharmacopoeia. 2001. 4<sup>th</sup> Edition and supplements. Strasbourg: Conseil de L' Europe.
4. Mishra, S.K. *et al.* 1987. Insecticidal and nematicidal properties of microbial metabolites. *J Indust Microbiol* 2:267-276.
5. Mitscher, L.A. *et al.* 1972. Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction rationale and methodology. *Lloydia* 35:157-166.
6. Ortiz, H. 2006. Actividad antifúngica de los extractos etanólicos de la flor de *Bourreria huanita* y la hoja de *Lippia graveolens* y sus particiones hexánica, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa contra los hongos *Sporothrix schenckii* y *Fonsecae pedrosoi*. Tesis de Química Biológica. Universidad de San Carlos de Guatemala. 70 p.
7. Sharapin, N. 2000. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello y CYTED. 247 p.
8. Solis, P. Guerrero, N., Gatusso, S., Cáceres, A. 2005. Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos. Proyecto de Desarrollo de Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitoterápicos. Organización de los Estados Americanos y la Agencia Interamericana de Cooperación para el Desarrollo. OEA/AICD/AE089/03. 132p.
9. Solis, P.N. *et al.* 1993. A microwell citotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Med.* 59:250-252.
10. Standley, P.C. & Steyermark J.A. 1946. Flora of Guatemala. Fiediana: Botany 24(4): 315.
11. Torres, M.F. 2002. El Esquisúchil, Árbol del Hermano Pedro. Folleto ilustrado Excelgrafic. Santa Lucía Milpas Altas, Sacatepéquez. Publicado por la Iglesia San Francisco El Grande, La Antigua Guatemala; y Tras las Huellas del Hermano Pedro de Betancur. Guía del Peregrino. Suplemento ordinario de la Revista Galería:1 (2), Fundación G&T, Guatemala.
12. Wagner, H. & Blatt, S. 1996. Plant Drug Análisis. Springer Verlag. Berlin. 320 p.
13. WHO. 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: WHO.115 p.