

**Universidad Central de las Villas**

**ENSAYOS ANALÍTICOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DEL POLVO DE  
*Pedilanthus tithymaloides* L.**

Autores: Urbano Monteagudo Romero<sup>I</sup>, María Elisa Jorge Rodríguez<sup>II</sup>, Yanelis Saucedo Hernández<sup>III</sup>, Onelys Valdés González<sup>IV</sup>, Oriallis García Muñoz<sup>V</sup>, Idelfonso Castañeda Noa<sup>VI</sup>

<sup>I</sup> Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Máster en Desarrollo de medicamentos de Origen natural. Profesor Instructor. Departamento de Farmacia. Facultad de Química y Farmacia, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, 54830, Villa Clara, Cuba. e-mail: urbanomont@uclv.edu.cu.

<sup>II</sup> Doctora en Ciencias Farmacéuticas. Profesora Titular. Departamento de Farmacia. Facultad de Química y Farmacia, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, 54830, Villa Clara, Cuba.

<sup>III</sup> Doctora en Ciencias Farmacéuticas. Profesora Auxiliar. Departamento de Farmacia. Facultad de Química y Farmacia, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, 54830, Villa Clara, Cuba.

<sup>IV</sup> Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Profesora Instructora. Departamento de Farmacia. Facultad de Química y Farmacia, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, 54830, Villa Clara, Cuba.

<sup>V</sup> Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Farmacia Principal Municipal, Santo Domingo, Villa Clara.

<sup>VI</sup> Jardín Botánico, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, 54830, Villa Clara, Cuba.

## **Resumen**

Introducción. *Pedilanthus tithymaloides* (L.) (Itamo real) es utilizada en la medicina tradicional cubana con una amplia gama de propiedades curativas como antiemética, antiinflamatoria, antibiótica, antiséptica, antihemorrágica, antiviral, antitumoral y abortiva. Esta planta se encuentra incluida en el Programa Ramal de Medicina Tradicional y Natural en forma de tintura y está siendo usada en el tratamiento de infecciones estomatológicas, aftas, estomatitis y gingivitis, lo que pudiera estar asociado a la actividad antiinflamatoria, antiséptica y antioxidante de los taninos presentes en dicha planta. No existen ingredientes activos estandarizados obtenidos a partir de las hojas del *Pedilanthus tithymaloides* (L.) que puedan ser usados en la elaboración de formas farmacéuticas para su dispensación y tampoco hay una monografía analítica, reportada en las farmacopeas recientes que permitan el control de la calidad del mismo como ingrediente terapéutico. Objetivos. El presente trabajo persiguió establecer la monografía analítica del polvo de la planta y proponer como ensayo cuantitativo la Espectrofotometría UV para la determinación de taninos presentes en la planta. Métodos. Se estableció la monografía analítica del sólido pulverulento de la planta, de acuerdo a lo reglamentado en las Farmacopeas internacionales. La técnica espectrofotométrica UV indirecta para la determinación de taninos en *Pedilanthus tithymaloides* fue validada, en base al cumplimiento de los parámetros de linealidad, precisión, exactitud y especificidad. Resultados. La técnica

espectrofotométrica UV empleando la reacción de Folin-Ciocalteu, permitió determinar el contenido de taninos totales (2.09 %), resultado novedoso para la especie vegetal.

Palabras claves: *Pedilanthus tithymaloides* L., Itamo real, taninos, monografía analítica.

### **Abstract**

Introduction. *Pedilanthus tithymaloides* (L.) (Itamo real) is a plant used in Cuban traditional medicine which has various therapeutic actions such as antiemetic, anti-inflammatory, antibiotic, antiseptic, anti-hemorrhagic, antiviral, antitumor and abortive. This plant belongs to traditional and natural medicine regional programs as a tincture being used in the treatment of stomatological infections, stomatitis and gingivitis, that can be associated to the anti-inflammatory activity, antiseptic and antioxidant of the tannins present in this plant. There is no standardized active ingredient from *Pedilanthus tithymaloides* (L.) leaves that can be used in the manufacture of pharmaceutical forms for its use, also there is not an analytic monograph described in the actual pharmacopoeias that permit the quality control of the therapeutic ingredient. Objectives. To establish the analytic monograph of powder plant and to develop the UV spectrophotometry for the quantification of the tannins present in the plant. Methods. The analytic monograph of powder plant was established according to the described in the international pharmacopoeias. The indirect UV technique for the determination of tannins in *Pedilanthus tithymaloides* was validated in basis to the criteria of linearity, precise, accuracy and specificity. Results. The content of total tannins quantified by the UV spectrophotometric using the reaction Folin-Ciocalteu (2.09 %) is a novel result for the vegetal species.

## **Introducción**

Itamo real es el nombre que popularmente se le asigna en Cuba al *Pedilanthus tithymaloides* L. perteneciente a la familia Euforbiáceas. Comúnmente se emplea como planta ornamental y ha sido muy utilizada con fines medicinales pues se le atribuyen propiedades eméticas, antiblenorrágicas, pectorales, odontálgicas, antiherpéticas, antibacterianas, antifúngica, antiinflamatoria y antioxidante, tratamiento de la bronquitis, laringitis y se reconoce su empleo en pacientes diabéticos<sup>(1,2,3)</sup>. La investigación persigue como objetivos: Validar una técnica cuantitativa que permita determinar el contenido total del metabolito de interés de la planta y proponer la monografía analítica de control de calidad del polvo del *Pedilanthus tithymoloides* L. La identificación de la especie vegetal fue realizada en el Jardín botánico de la Universidad Central de las Villas por el especialista Idelfonso Castañeda Noa.

## **Métodos**

Para la obtención del material vegetal se emplearon hojas adultas de Itamo Real (*Pedilanthus tithymaloides* L.). Se pesó 1kg del material vegetal (colectados de los diferentes municipios de la provincia que suministran muestras al laboratorio de control de la calidad de fitofármacos provincial). Las hojas secas a 30°C en estufa fueron molinadas y pasadas a través de una malla de 500 nm, con el objetivo de buscar un tamaño de partícula uniforme y se prepararon las muestras para el proceso de desarrollo y validación de la técnica espectrofotométrica para la cuantificación de taninos totales expresados como ácido tánico.

Estudios analíticos para establecer la monografía de control de calidad del polvo de *Pedilanthus tithymaloides* L.

Los índices de calidad del material vegetal (polvo de *Pedilanthus tithymaloides* L) fueron seleccionados teniendo en cuenta los incluidos en las monografías de control de la calidad de plantas con presencia de taninos reportadas en las farmacopeas relativamente recientes <sup>(4)</sup>. Se desarrollaron los ensayos de descripción macroscópica y microscópica, reacción colorimétrica, Cromatografía en capa delgada (CCD), cenizas totales, cenizas insolubles en ácido sulfúrico, elementos extraños y pérdida por desecación, como ensayo cuantitativo de determinación de taninos presentes en la planta. Desarrollo del ensayo cuantitativo para la cuantificación de taninos totales.

*Preparación de la muestra:* Se pesaron 10 g de droga pulverizada y se trasvasó a un frasco de fondo redondo de 250 mL con 100 mL de agua. Se calentó en un baño de agua durante 30 min. Se enfrió en agua corriente y se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL. Se lavó el frasco de fondo redondo y se reunieron los líquidos de lavado en el matraz aforado y se diluyó a 100 mL con agua. Se decantaron los sólidos y se filtró el líquido a través de un filtro de papel de 125 mm de diámetro. Se desecharon los primeros 50 mL del filtrado. Se realizaron todas las operaciones de extracción y dilución protegidas de la luz.

*Determinación de polifenoles totales.* Se diluyó 5 mL del filtrado hasta 25 mL con agua y se mezcló 1 mL de esta disolución con 250 µL de reactivo Folin-Ciocalteu y 10 mL de agua y se diluyó hasta 25 mL con una disolución de 290 g/L de carbonato de sodio p.A. UNICHEM. Se dejó transcurrir 30 min y se midió la absorbancia a 650 nm ( $A_1$ ), utilizando agua como líquido de compensación.

*Determinación de polifenoles no adsorbidos sobre polvo de piel.* A 10 mL del filtrado se añadió 0,50 g de polvo de piel y se agitó fuertemente durante 60 min. Se filtró y se siguió un procedimiento similar a la determinación de polifenoles totales. Se determinó la absorbancia a 650nm ( $A_2$ ), utilizando agua como líquido de compensación.

*Disolución de Referencia.* Se disolvió 20 mg de ácido tánico en agua y se diluyó hasta 10 mL con el mismo disolvente. Se diluyó 2 mL de la disolución hasta 10 mL con agua y se mezcló 1mL de esta disolución con 250  $\mu$ L reactivo Folin-Ciocalteau y 100 mL de agua y se diluyó hasta 250 mL con una disolución de 290 g/L de carbonato de sodio. Se dejó transcurrir 30 min y se leyó la absorbancia a 650 nm ( $A_3$ ), utilizando agua como líquido de compensación. <sup>(4)</sup>.

Validación de la técnica para la cuantificación de taninos totales.

Se evaluaron algunos parámetros de desempeño establecidos por las normas vigentes <sup>(5,6)</sup>. El procesamiento de los resultados se realizó mediante el *Microsoft Office Excel, 2003*.

Preparación de la solución patrón: Se pesaron 20 mg de ácido tánico, se disolvieron en agua destilada y se enrasó en un matraz aforado de 10 mL con el mismo disolvente. A partir de esta disolución se tomaron 2 mL y se diluyó a 10 mL con agua destilada.

Preparación de las muestra problema: La extracción del concentrado de taninos se realizó utilizando la metodología declarada en la Farmacopea Europea (2005)<sup>(4)</sup>, descrita con anterioridad en el acápite de preparación de muestra.

Linealidad: Se prepararon 5 disoluciones del patrón (ácido tánico), cada una por triplicado, correspondiente a 8, 12, 16, 20, 24  $\mu$ g/mL (a partir de la disolución descrita anteriormente). Se determinó la absorbancia de cada una y se construyeron curvas de

absorbancia contra concentración; se efectuó un análisis de regresión y se calculó el coeficiente de correlación ( $r$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), coeficiente de variación de los factores de respuesta (CVf), las pendientes, interceptos y significación.

Precisión: Este parámetro incluye la repetibilidad y precisión intermedia.

Repetibilidad: Se realizaron las determinaciones espectrofotométricas, procesando seis muestras de concentración 0.8 mg/mL, a las cuales se les aplicó la técnica en condiciones homogéneas, un mismo analista y en un mismo día; se determinó el coeficiente de variación de los resultados.

Precisión intermedia: Se efectuó con seis muestras, por duplicado y se realizó por dos analistas, dos días diferentes y en dos instrumentos diferentes. Se calculó la desviación estándar relativa y se comparó con los criterios establecidos.

Exactitud: Se utilizó el método de adición de patrón, para ello se tomaron tres alícuotas iguales de 250  $\mu$ L. Se les añadieron cantidades crecientes de patrón correspondiente a 3,2; 4,8 y 6,4  $\mu$ g/mL de ácido tánico. Los resultados de la exactitud se expresaron como porcentaje de recobro (R) y coeficiente de variación (CV).

Especificidad: Se llevó a cabo un estudio de las respuestas de los compuestos fenólicos, detectados en la muestra por CCD, como interferencias potenciales en la técnica. Se prepararon soluciones patrón de los compuestos fenólicos: ácido tánico, pirogalol y quercetina y de forma similar, se procedió a realizar la reacción colorimétrica a la muestra problema. Se estudió el comportamiento de absorción en la zona de 300 a 800nm y la respuesta cromatográfica en la técnica CCD.

## **Resultados**

Estudios analíticos para establecer la monografía de control de calidad del polvo de *Pedilanthus tithymaloides* L.

Las hojas de *Pedilanthus tithymaloides* L. son alternas, lampiñas, subsésiles, con la base cuneiforme y el ápice agudo o acuminado, de forma oavada a oblonga de 3.5-8 de largo × 2.5-5 cm de ancho, carnosas, el margen subondulado; el nervio medio engrosado y prominentemente, los pecíolos cortos. La observación microscópica del polvo evidenció la presencia de células epidémicas típicas irregulares con gotas de aceite, cristalíferas; peridermis ondulada. La epidermis mostró numerosos estomas en posición subepidérmica.

El polvo de ítamo real es preparado a partir de las hojas de esta planta, después de ser sometidas a procesos de secado, molinado y tamizado el *Pedilanthus tithymaloides* L. El polvo contiene no menos de 2,09 % de taninos, expresado en base al contenido de ácido tánico ( $C_{76}H_{52}O_{46}$ ). Es un polvo verde pardusco, con un olor muy característico de ítamo real al 20 %.

La reacción colorimétrica de  $FeCl_3$  resultó ser positiva apareciendo un precipitado gelatinoso de color verde carmelitoso instantáneo que demora en desaparecer, lo que demuestra la presencia de polifenoles en el polvo. Se declara 200 mg como la cantidad mínima detectable para esta reacción. La reacción colorimétrica con vainillina resultó ser negativa, al no aparecer la coloración rojiza que mostraba la presencia de taninos condensados. Este resultado muestra la ausencia en la planta de este tipo de metabolito. <sup>(7)</sup>.

A partir de las monografías reportadas en las farmacopeas actuales, donde se proponen condiciones cromatográficas para plantas que contienen taninos, se diseñó



en la investigación la identificación por CCD de dichos metabolitos. La Figura 1 muestra la mancha obtenidas para la muestra bajo las condiciones cromatográficas evaluadas (extracción etanólica del polvo) y para los patrones pirogalol, ácido tánico y quercetina.

En la placa se observó que las manchas correspondientes al pirogalol y la quercetina, aparecen a valores Rf (0.40 y 0,42, respectivamente) superiores que el valor de Rf obtenido para el extracto del polvo de la planta (Rf= 0,25), mientras que el valor de Rf obtenido para el ácido tánico corresponde con el de la muestra. Estos resultados permiten identificar la presencia de compuestos fenólicos en la planta y que estos se acercan estructuralmente a este patrón, razón por la cual el mismo se seleccionó como sustancia de referencia en las determinaciones cuantitativas, usando como soporte la Silicagel GF, como Fase Móvil: Tolueno: Acetona: Acido Fórmico (50:70:1) y como revelador una solución de tricloruro férrico 1 %.

La planta posee 0.5% de elementos extraños, lo cual se explica por la características de la parte de la planta utilizada, hojas, las cuales son de superficie lisa, duras y su recolección se realiza de forma individual para cada rama sin que se anexen elementos extraños del medio.

Los resultados obtenidos en la determinación de los límites de especificación de los ensayos pérdida por desecación, cenizas totales y cenizas insolubles en ácido sulfúrico se muestra en la Tabla 1.

#### Validación de la técnica espectrofotométrica para la cuantificación de taninos totales.

Linealidad: En la curva de calibración obtenida en la técnica espectrofotométrica usada para la determinación de los taninos en el polvo, en base al ácido tánico se

obtuvo la ecuación de la recta  $Abs = 0,0321 \text{ Conc} + 0,0283$  con un coeficiente de correlación de 0,99, un coeficiente de variación de los factores respuesta 4.72 (inferior al 5%) y una desviación Standard de la pendiente de 0.19, menor que el 2% (Figura 2). La fiabilidad de la ecuación se evaluó, además, a través del error típico cuyo valor es muy inferior a la desviación Standard de la variable Y. Con vistas a corroborar los resultados anteriores se realizó un análisis de varianza en el cual se obtuvo un valor de 886.46 (F mucho mayor que el F crítico), estadísticamente significativo. Sin embargo el valor del coeficiente de calidad es muy inferior a 2,5 (0.0) por lo que se puede plantear que el método es lineal en el rango de concentración evaluado. (Figura 2).

Precisión: Este parámetro incluye los términos repetibilidad y precisión intermedia. El coeficiente de variación obtenido para la repetibilidad (1,44%) resultó ser menor que el establecido para este ensayo cuando es realizado a materias primas farmacéuticas (1,5%) lo que indica que la técnica posee buena repetibilidad. Para la precisión intermedia se obtuvo también un coeficiente de variación (2,57%) inferior al establecido (3%). El análisis de varianza realizado muestra que no hay diferencias significativas entre los grupos al obtenerse en la prueba Fischer una  $F_{cal} < F_{Crítica}$ . Esto es ratificado por el Test de Cochran's ( $C_{cal} = 0,57$ ) en el cual se obtuvo una  $C_{cal} < C_{Crítica}$ . El Coeficiente de variación entre los grupos ( $CV(\%) = 2,79$ ) resultó ser menor que el valor obtenido para el coeficiente de variación de Horwitz (4,49) ratificando con esto la veracidad del resto de las pruebas. Los resultados obtenidos en ambos parámetros permiten asegurar que la técnica espectrofotométrica es "precisa".

Exactitud: El porcentaje de recuperación del patrón ácido tánico promedio fue de  $103,04 \pm 1,81\%$ . La  $t_{\text{calc.}} < t_{\text{crit.}}$ , lo cual indica que el porcentaje de recobro obtenido no es significativamente diferente de 100%. El valor de la pendiente de la curva de recuperación  $y = 1,0384x - 0,0677$ , se corresponde con el valor de recobrado promedio anteriormente calculado. Estos valores demuestran una elevada exactitud en las determinaciones de taninos, en base a ácido tánico, con el procedimiento utilizado.

Especificidad: La técnica evaluada carece de especificidad si se considera que su detección está dirigida al contenido total de polifenoles. Sin embargo la misma es utilizada para la cuantificación de taninos considerando que los mismos se caracterizan por la reacción de identificación química de los fenoles y su capacidad de precipitar las proteínas<sup>(8)</sup>. El polvo de piel permite acomplejar a la masa de taninos presente, logrando su precipitación. Con vistas a comprobar lo anterior en las muestras en estudio se realizó una cromatografía en capa delgada (Figura 3) en la cual se observa la ausencia de la mancha en la muestra tratada, lo cual confirma que la cantidad total presente de tanino fue absorbida por el polvo de piel. La planta en estudio posee un límite mínimo de taninos de 2,09 % (Figura 3)

y la quercetina (Q) usando como Soporte la Silicagel GF, como Fase Móvil: Tolueno: Acetona: Acido Fórmico (50:70:1) y como revelador una solución de tricloruro férrico 1 %.

## **Discusión**

La descripción macro y micromorfológica de las hojas de *Pedilanthus tithymaloides* L se corresponde con lo descrito por Sánchez y col.<sup>(9)</sup> La CCD del extracto etanólico de la planta permitió proponer la huella digital del extracto etanólico. La CCD del polvo de

la planta mostró la presencia de los taninos, como metabolitos a los que se le atribuye la acción antiséptica y cicatrizante <sup>(2,9)</sup>. El valor de elementos extraños se encuentra por debajo del valor reportado por la Farmacopea<sup>(4)</sup> para otras plantas y por Caraballo y col.<sup>(10)</sup> para dicho material vegetal. Los valores obtenidos para los ensayos pérdida por desecación y cenizas totales difieren significativamente de los ingredientes activos sintéticos lo que se explica por la composición variada que poseen los de origen natural que incluye en su generalidad compuestos orgánicos e inorgánicos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Caraballo y col.<sup>(10)</sup>

La técnica espectrofotométrica, empleando la reacción de Folin-Ciocalteu, constituye el ensayo cuantitativo de elección para determinar el contenido de taninos presente en plantas medicinales, reportadas en las farmacopeas actuales<sup>(4)</sup>. La planta posee 2.09 % de taninos totales, lo que se corresponde con valores reportados en las farmacopeas actuales para plantas que contienen taninos.

## Referencias bibliográficas

1. ALVAREZ, A. *FITOMED.III Plantas Medicinales*. Cuba. Ministerio de Salud Pública. Plantas Medicinales La Habana: Editorial Ciencias Médicas. 1994; p. 34
2. ABREU, P., MATTHEW, S., GONZÁLES, T., COSTA, D., SEGUNDO, M. A., FERNANDES, E. Anti-inflammatory and antioxidant activity of a medicinal tincture from *Pedilanthus tithymaloides*. *Life Sciences*, 2006. 78(14), pp. 1578–1585.
3. VIDOTTI GJ, ZIMMERMANN A, SARRAGIOTTO MH, NAKAMURA CV, DIAS FILHO BP. . Antimicrobial and phytochemical studies on *Pedilanthus tithymaloides*. *Fitoterapia*.2006, 77(1), pp. 43-6.
4. EUROPEAN PHARMACOPEIA. 5ta ed. Strasbourg, France. Council of Europe. 2005.
5. ICH. Harmonised Tripartite Guideline. “International Conference on Harmonisation; Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology Availability”. Part VIII. Federal Register. FDA. USA, Geneva. 2005
6. CECMED, Validación de métodos analíticos.2007. No 41-2007.
7. OKUDA, T., YOSHIDA, T., HATANO, T. New methods of analyzing tannins, *J. Nat. Prod.* 1989, 52, pp. 1–31.
8. HASLAM, E. *Plant polyphenols–vegetable tannins revisited*, Cambridge University Press, Cambridge. 1989.
9. SANCHEZ, E., PEREZ, A. M., CHAVEZ, D., HECHEVARRIA, I. Caracterización farmacognóstica de *Pedilanthus tithymaloides* L. Poit. *Rev. Cubana Plant Med.* 2005.10(1).

10. CARBALLO, C., ALFARO, T., RODRÍGUEZ, C. A., RAMOS, S. R. Y. PALAZÓN,  
Z. Desinfección química de *Pedilanthus tithymaloides* L. Poit. *Rev. Cubana  
Plant. Med.* 2005.; 10(2).

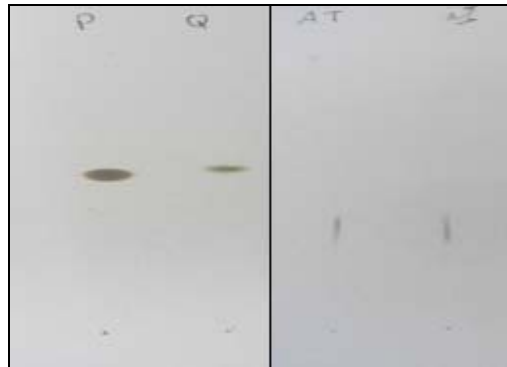


Figura 1. Placa de CCD que muestra las manchas correspondientes a pirogalol (P), quercetina (Q), ácido tánico (AT) y la muestra (MI)

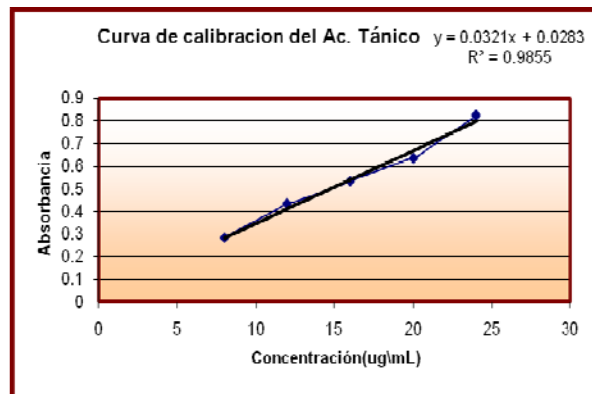


Figura 2. Curva de calibración del ácido tánico.



Figura 3. Placa de CCD que muestra las manchas correspondientes al ácido tánico (AT), la muestra (MI), la muestra tratada con polvo de piel (IPP), al pirogalol (P) y quercetina (Q)

Tabla 1. Resultados obtenidos en la determinación de los límites de especificación para los ensayos específicos que formaran parte de la monografía de calidad del polvo.

<b>Parámetro</b>	<b>Resultados</b>
Descripción macroscópica	La corteza externa es de color castaño oscuro, granulosa (con alto contenido de fibras y esclereidas, inodora, amarga, dura, de textura lisa a rugosa y apariencia fibrosa)
Descripción microscópica	Células epidérmicas típicas irregulares con gotas de aceite, cristalíferas; peridermis ondulada. La epidermis mostró numerosos estomas en posición subepidérmica.
Elementos extraños	0.5 %
Ensayo de identificación: Reacción colorimétrica con FeCl <sub>3</sub>	Precipitado pardo oscuro instantáneo (Presencia de polifenoles)
Ensayo de identificación: Reacción colorimétrica con vainillina	No aparición de la coloración rojiza (Descarta la presencia de taninos condensados)
Cromatografía en capa Delgada	Fase estacionaria: sílice G para CCD, Merck (dimensión 10 x 10 cm) <i>Disolución problema:</i> A 1 mg de droga pulverizada añadir 1 mL de metanol, agitar durante 15 min y filtrar. <i>Disolución de referencia:</i> Disolver 1 mg de pirogalol en 1 mL de metanol. <i>Fase móvil:</i> tolueno, acetona y ácido fórmico (60:60:10 V/V/V) (Mancha en la disolución problema similar en posición a la obtenida con la disolución de referencia (pirogalol).
Pérdida por desecación (%)	X±SD (11,61 ± 0,20) LSE: 12,08 (No mayor que 12)
Cenizas Totales (%)	21,18 ± 1,26 LSE: 24,14% (No mayor que 24)
Cenizas Sulfúricas (%)	29,31% ± 1,90 33,77% (No mayor que 34)
Valoración o contenido (% de taninos totales)	2.09 %

X: Media de 25 determinaciones; SD: Desviación Standard; LSE: Limite superior de especificación.