

# Estudio farmacognóstico de *Hymenocallis caribaea* (Amaryllidaceae)

## Pharmacognostic study of *Hymenocallis caribaea* (Amaryllidaceae)

Eva Salas Olivet<sup>1,\*</sup>, Darlyn de la Caridad Sánchez-Milán<sup>1</sup>, Armando Cuéllar Cuéllar<sup>1</sup>, Raisa Mangas Marín<sup>1</sup>, José Ariel Arencibia<sup>1</sup> y José Angel García-Beltrán<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Calle 222, N° 2317, San Agustín, La Lisa, La Habana, Cuba. C.P. 13600. <sup>2</sup>Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana, Carretera El Rocio, km 3½, Calabazar, Boyeros, La Habana, Cuba. C.P. 19230. \*Autor para correspondencia (e-mail: [evaso@ifal.uh.cu](mailto:evaso@ifal.uh.cu))

### RESUMEN

*Hymenocallis* es un género de plantas herbáceas y bulbosas, perteneciente a la familia *Amaryllidaceae*. En esta familia se incluyen especies de plantas ornamentales, que han sido empleadas en la medicina tradicional. Dentro de la familia, las plantas de la subfamilia *Amaryllidoideae* se caracterizan por sintetizar un gran número de alcaloides estructuralmente diversos, a muchos de los cuales se les atribuyen actividad antitumoral, antiviral, antimalárica, inhibidora de la acetilcolinesterasa e inmunoestimulante. Los análisis científicos que avalan el uso etnobotánico de *H. caribaea* son escasos, lo que favoreció la realización de su estudio farmacognóstico y toxicológico. Se determinaron los principales parámetros físicos y químicos a las hojas y bulbos de la especie, así como a sus extractos hidroalcohólicos y acuosos. Los resultados obtenidos permitieron comprobar que la mayoría de las determinaciones se encuentran dentro de los límites establecidos en las monografías oficiales para las drogas vegetales. El análisis de ambos órganos vegetales por espectroscopía de infrarrojo cercano mostró valores en correspondencia con los parámetros de humedad y cenizas obtenidos inicialmente. Se logró la caracterización de los extractos desde el punto de vista físico y químico. La determinación cualitativa de la composición química sugirió la presencia de fenoles, flavonoides, saponinas y en especial de alcaloides. Los resultados alcanzados permitieron establecer los parámetros de calidad de la droga cruda y sus extractos.

**Palabras clave:** extracto acuoso, extracto hidroalcohólico, tamizaje fitoquímico

### ABSTRACT

*Hymenocallis* is a genus of herbaceous and bulbous plants, belonging to the *Amaryllidaceae* family. This family includes species of ornamental plants, which have been used in traditional medicine. Within the family, plants of the *Amaryllidoideae* subfamily are characterized by synthesizing a large number of structurally diverse alkaloids, to many of which are attributed antitumor, antiviral, antimalarial, acetylcholinesterase and immunostimulant inhibitor activity. Scientific analyses that support the ethnobotanical use of the *H. caribaea* are scarce, which favored the pharmacognostic and toxicological study for the first time. The main physical and chemical parameters were determined on the leaves and bulbs of the species, as well as their hydroalcoholic and aqueous extracts. The results obtained allowed us to verify that in most of the determinations they are within the limits established in the official monographs for plant drugs. The analysis of both plant organs by near infrared spectroscopy showed values corresponding to the moisture and ash parameters initially obtained. The characterization of the extracts from the physical and chemical point of view was achieved. The qualitative determination of the chemical composition suggested the presence of phenols, flavonoids, saponins and especially alkaloids. The results achieved allowed establishing the quality parameters of the raw drug and its extracts.

**Keywords:** aqueous extract, hydroalcoholic extract, phytochemical screening

**Citación:** Salas, E., Sánchez-Milán, D.C., Cuéllar, A., Mangas, R., Arencibia, J.A. & García-Beltrán, J.A. 2020. Estudio farmacognóstico de *Hymenocallis caribaea* (Amaryllidaceae). *Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana* 41: 109-117.

**Recibido:** 29 de noviembre de 2019. **Aceptado:** 20 de agosto de 2020. **Publicado en línea:** 4 de noviembre de 2020. **Editor encargado:** Luis Manuel Leyva.

### INTRODUCCIÓN

El uso tradicional de las plantas como remedios para curar las enfermedades forma parte de la historia y de la evolución de la propia humanidad. Los productos de origen natural son una de las principales fuentes de obtención de la gran mayoría de los fármacos aprobados para uso clínico (Morón 2010, Angulo & al. 2012).

La utilización de productos naturales y/o sus principios activos se ha convertido en una práctica común y creciente. Las formulaciones a base de plantas han adquirido espacio y ocupan una posición importante al ser comparadas con los medicamentos de origen sintético. Se ha estimado que el 60 % de la población mundial utiliza prácticas de medicina tradicional, como las plantas medicinales, para el tratamiento de diferentes dolencias (Newman & Cragg 2016, Yunes & Filho 2016). En la mayoría de los países no existe un marco legal sobre las plantas medicinales y los medicamentos herbarios, por lo que

se adoptan diversos enfoques en la autorización y comercialización de los mismos (OMS 2002, 2013). Por los problemas anteriores y al considerar la tradición histórica y popularidad sobre el uso de las plantas medicinales y medicamentos herbarios, el Centro Estatal para el Control de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) como Autoridad Reguladora de Medicamentos de Cuba, estableció nuevas políticas y el marco legal para asegurar la calidad, seguridad y eficacia de los mismos (MINSAP 2015).

La familia *Amaryllidaceae* incluye muchas especies que han sido empleadas en la medicina tradicional, de las que algunas se corresponden con plantas ornamentales (Urquiola & González 2009). En la familia, a partir de las plantas de la subfamilia *Amaryllidoideae*, a la cual pertenece el género *Hymenocallis*, se han identificado un gran número de alcaloides estructuralmente diversos (Bizama & del Rosario 2018). Muchos de estos metabolitos, se ha demostrado son los

responsables de la actividad antitumoral, antiviral, antimamaria, inhibidora de la acetilcolinesterasa e inmunoestimulante que presentan algunas especies de este género (Bizama & del Rosario 2018).

De acuerdo con tales antecedentes y los escasos estudios a nivel mundial y específicamente en Cuba, tanto de la familia Amaryllidaceae como de *Hymenocallis*, en el presente estudio se caracterizaron desde el punto de vista farmacognóstico las hojas y bulbos de *Hymenocallis caribaea* (L.) Herb. y se determinaron los principales parámetros farmacognósticos que permiten establecer la calidad de las drogas crudas y de sus extractos acuosos e hidroalcohólicos al 50 %. Adicionalmente, se determinó la composición química cualitativa de las hojas y bulbos de la especie estudiada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección y procesamiento del material vegetal

El material vegetal fue recolectado en junio del 2018, en San Agustín, municipio La Lisa, provincia La Habana. Durante toda la investigación, se utilizó el mismo material vegetal y de la misma procedencia. La especie se encontraba en floración, se seleccionaron de forma general las hojas y bulbos que no presentaron alteraciones morfológicas visibles, ni daños por insectos o patógenos, ni quemaduras solares. La identidad de la especie objeto de estudio se determinó según Urquiola & González (2009). Se depositó un espécimen testigo, *D. Sánchez-Milán HFC 90077*, en el Herbario "Prof. Dr. Johannes Bisse" (HAJB) del Jardín Botánico Nacional de la Universidad de La Habana.

Para el desarrollo de la investigación se separaron las hojas del bulbo y fueron lavados con agua potable, hipoclorito de sodio al 1 % por un tiempo de 5 minutos y agua potable para retirar la solución de hipoclorito de sodio empleada. Con el objetivo de favorecer el proceso de secado se cortaron los materiales vegetales en trozos pequeños utilizando tijeras de corte estériles.

Los materiales vegetales fueron sometidos a un proceso de secado en estufa (YLD-6000 AASET, China) a una temperatura de 40 °C con recirculación de aire. En el estudio se utilizaron 200 g de muestra por cada réplica, que se colocaron esparcidas dentro de la estufa en bandejas esmaltadas. Se registraron las observaciones de la droga, relacionadas con la proliferación de hongos o ennegrecimiento. Se realizaron pesadas sucesivas cada 24 horas (durante el tiempo que duró el proceso de secado) y se determinó la pérdida en peso por desecación promedio de las tres réplicas hasta masa constante.

Los materiales secos se redujeron a un tamaño de partícula menor de 2 mm, en un molino de cuchilla (FUMAR, Italia). Posteriormente, se almacenaron en recipientes de cristal de color ámbar, cerrados herméticamente a temperatura ambiente y se colocaron en una desecadora provista de sílica gel activada hasta el momento de su utilización. Las diferentes determinaciones se realizaron para ambos órganos vegetales (hojas y bulbos) según la metodología descrita en

las Normas Ramales de Salud Pública (NRSP-309 1992) y por Miranda & Cuéllar (2000).

### Determinación del contenido de humedad residual

Para la determinación de la pérdida de peso por desecación, se empleó el método gravimétrico a tres réplicas, utilizando 2 g de muestra en cada una. Se utilizó una temperatura de 105 °C en estufa (YLD-6000 AASET, China). Las pesadas se realizaron en una balanza analítica (Sartorius, Alemania) hasta masa constante, tal como recomiendan Miranda & Cuéllar (2000). Los cálculos se realizaron según la fórmula:  $Hg = [(M1-M2)/(M2-Mx)] \times 100$ , donde Hg es la pérdida en peso por desecación (%), M2 la masa de la cápsula con la muestra de ensayo fresca (g), M1 la masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g), y Mx la masa de la cápsula vacía (g).

### Determinación de cenizas

Para todas las determinaciones de cenizas se empleó una balanza analítica (Sartorius, Alemania) y un horno mufla (Furnace SX2-12TP, China). Se pesaron 2 g de los materiales vegetales previamente pulverizados y tamizados (2 mm), realizando cuatro réplicas. Se empleó una plancha de calentamiento (IKAC-MAG, Alemania). Las muestras se enfriaron en una desecadora y se pesaron hasta masa constante. Los intervalos entre calentamiento y pesadas fueron de 30 minutos (Miranda & Cuéllar 2000). Los resultados se obtuvieron por la siguiente expresión:  $CT = [(M2-M)/(M1-M)] \times 100$ , donde CT son las cenizas totales en base hidratada (%), M2 la masa del crisol con las cenizas (g), M la masa del crisol vacío (g), y M1 la masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

### Determinación de cenizas solubles en agua

Las determinaciones se llevaron a cabo a partir de dos de las réplicas de las cenizas totales, disolviéndose en 15 ml de agua destilada (Miranda & Cuéllar 2000). Los cálculos se realizaron por la fórmula siguiente:  $Ca = [(M2-Ma)/(M1-M)] \times 100$ , donde Ca son las cenizas solubles en agua en base hidratada (%), M2 la masa del crisol con las cenizas totales (g), Ma la masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g), M1 la masa del crisol con la muestra en ensayo (g), y M la masa del crisol vacío (g).

### Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10 %

Se determinaron partiendo de dos de las réplicas de las cenizas totales obtenidas, a las que se le añadieron 2 ml de ácido clorhídrico al 10 %. Se empleó una estufa (YLD-6000 AASET, China). (Miranda & Cuéllar 2000). Los cálculos se realizaron por la fórmula siguiente:  $B = [(M2-M)/(M1-M)] \times 100$ , donde B son las cenizas insolubles en HCl en base hidratada (%), M2 la masa del crisol con las cenizas totales (g), M la masa del crisol vacío (g), y M1 la masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

### Determinación de sustancias solubles o extraíbles

Para esta determinación se realizaron tres réplicas en las que se utilizaron como disolventes agua y mezclas hidroalcohólicas al 50, 70 y 95 % (etanol y agua). Las pesadas se realizaron

en una balanza analítica (Sartorius, Alemania). Se tomaron de la muestra de ensayo, previamente pulverizada, 5 g por cada réplica y 100 ml de disolvente. Se agitaron durante seis horas empleando una zaranda (Retomed, China) y se dejaron reposar hasta el día siguiente. Se tomó una alícuota de 20 ml de cada extracto que se transfirió a una cápsula previamente tarada y se evaporó en baño de agua, utilizando una plancha de calentamiento modelo (IKAC-MAG, Alemania). Se desecó en una estufa (YLD-6000 AİSET, China) durante 3 horas. Los resultados se realizaron mediante la fórmula siguiente:  $Ss = (R \cdot 500 \cdot 100) / [M \cdot (100 - H)]$ , donde Ss son las sustancias solubles (%), R el residuo de la muestra (g), M la masa de la muestra (g), y H la humedad de la muestra (%).

#### **Análisis por espectroscopía de infrarrojo cercano**

La espectroscopía de infrarrojo cercano es una técnica que se utiliza para ofrecer un análisis cuantitativo sin consumir o destruir la muestra, lo que requiere una preparación mínima o nula de la misma. A su vez, es capaz de detectar los enlaces C-H, N-H, O-H y S-H en matrices orgánicas, y es fundamental en el análisis de los materiales orgánicos, tales como: proteínas, grasas y humedad, entre otros (Cueva 2013). El análisis por esta técnica se realizó con el empleo de un espectrofotómetro de infrarrojo cercano (FOSS DS 2500, China). Las determinaciones realizadas fueron: contenido de humedad residual, cenizas totales, proteínas, fibras, grasas y almidón. Se tomaron 10 g de las drogas (hojas y bulbos) previamente secadas, trituradas y pesadas en una balanza analítica (Sartorius, Alemania), de forma tal que cubriera toda la superficie interna del cristal del equipo. Se realizaron comparaciones de las medidas espectrofotométricas de la muestra de ensayo con una base de datos estándar acoplada al equipo.

#### **Identificación de metabolitos secundarios mediante tamizaje fitoquímico**

Para realizar el tamizaje fitoquímico se maceraron las hojas y bulbos de las plantas de *Hymenocallis caribaea* y se utilizaron disolventes en orden creciente de polaridad (éter dietílico, etanol y agua). Todos estos procedimientos se realizaron según la metodología descrita por Miranda & Cuéllar (2000).

Para ello se pesaron 10 g de material vegetal y se adicionaron 110 ml de éter dietílico, hasta cubrir la superficie del mismo. El macerado se dejó reposar durante 48 horas y posteriormente se procedió a filtrarlo, donde el filtrado se recolectó para su posterior análisis y el residuo fue sometido a un proceso de secado a 40 °C en estufa con recirculación de aire (YLD-6000 AİSET, China). El extracto etéreo obtenido se le realizó el ensayo de Sudán, Baljet, Lieberman B y Dragendorff, para la posible identificación de metabolitos tales como: compuestos grasos, agrupamiento lactónico y/o coumarinas, triterpenos y esteroides, y alcaloides, respectivamente.

Luego de las 48 horas, el residuo vegetal sometido anteriormente al proceso de maceración, fue secado y pesado en una balanza analítica (Sartorius, Alemania) hasta obtener masa constante. Posteriormente se adicionaron 110 ml de etanol al 96 % hasta cubrir el material vegetal. Se dejó en reposo

durante 48 horas y transcurrido este tiempo, el menstuo se filtró y el filtrado se recolectó para su posterior análisis. El residuo fue sometido a un proceso de secado para retirar el solvente a 40 °C en estufa con recirculación de aire (YLD-6000 AİSET, China). El extracto etanólico se le realizó el ensayo de Baljet, Lieberman B. y Dragendorff para reconocer la posible presencia de los metabolitos secundarios mencionados anteriormente. Por otra parte, a este extracto también se le realizaron los ensayos de Antocianidina, Cloruro Férrico, Fehling, Shinoda, Borntrager, Kedde, Nihidrina, Resinas, Catequinas y Espuma, para detectar mediante una reacción colorimétrica la posible presencia de antocianinas, compuestos fenólicos, azúcares reductores, flavonoides, quinonas, glicósidos cardiotónicos, aminoácidos libres o aminos, resinas, catequinas y saponinas.

Cuando el residuo proveniente de la extracción hidroalcohólica estuvo seco, se pesó en balanza analítica (Sartorius, Alemania) hasta obtener masa constante y se procedió a agregarle de 90 a 110 ml de agua destilada hasta cubrir totalmente el material vegetal y se dejó en reposo durante 48 horas. Acontecidas las 48 horas se filtró el menstuo, donde el residuo nuevamente fue sometido a un proceso de secado hasta masa constante en estufa con recirculación de aire (YLD-6000 AİSET, China) a 40 °C para retirar el solvente. El material desecado se pesó y se desechó. Al filtrado se le realizaron los ensayos de Dragendorff, Antocianidina, Cloruro Férrico, Fehling, Shinoda y Saponinas, para detectar los metabolitos anteriormente detallados. Además se le realizaron los ensayos de Principios amargos y Mucilagos, con el objetivo de detectar si estas sustancias estaban presentes en el extracto acuoso.

#### **Obtención de los extractos**

Los extractos se prepararon a partir de 20 g de las hojas y los bulbos, previamente secos y molidos. A partir de las hojas se obtuvo un extracto hidroalcohólico, mientras que a partir de los bulbos fue acuoso. Para la obtención del extracto hidroalcohólico el método de extracción utilizado fue la maceración durante 7 días a una temperatura de  $30 \pm 2$  °C. El material vegetal se extrajo con 100 ml de etanol al 50 % (v/v). Se siguió el procedimiento descrito en la norma cubana NRSP-312 (1992) y por Miranda & Cuéllar (2012). El método de extracción que se empleó para la obtención del extracto acuoso fue la decocción, durante 30 minutos. Se utilizó como menstuo 120 ml de agua destilada y una plancha de calentamiento (IKAC-MAG, Alemania) a una temperatura de 80 °C. Ambos extractos se conservaron a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

#### **Análisis físicos y químicos de la calidad de los extractos**

Se determinaron los parámetros físicos y químicos a los extractos según lo establecido en la NRSP-312 (1992) y en la metodología descrita por Miranda & Cuéllar (2000). Las características organolépticas se evaluaron en un frasco de vidrio transparente, limpio y seco en el cual se depositaron los extractos. Se observaron el color, la transparencia, la posible presencia de partículas y la separación en capas. Para la determinación del olor se tomó una tira de papel secante de

aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo, de la cual se introdujo un extremo en los extractos y se percibió el olor del producto. Para la determinación del índice de refracción se utilizó un refractómetro (ABBE digital, China) con corrección de temperatura y esta se realizó por triplicado a temperatura ambiente. El pH se determinó por triplicado, utilizando un pH-metro (Basic 20\* Crizon, España), previamente ajustado con solución tampón a pH = 4,01.

Las determinaciones de la densidad relativa se realizaron por triplicado empleando agua destilada como disolvente y un picnómetro de 10 ml. Se utilizó una balanza analítica Sartorius (Alemania), para realizar las pesadas. Los resultados se calcularon mediante la fórmula siguiente:  $D = [(M1-M)/(M2-M)] \times 100$ , donde D es la densidad relativa (g/ml), M1 el peso del picnómetro con la muestra de ensayo (g), M el peso del picnómetro vacío (g), y M2 el peso del picnómetro con el agua (g).

Para la determinación de sólidos totales se siguió el siguiente procedimiento. En cápsulas previamente taradas se añadieron 5 ml de los extractos. Se colocaron en baño de agua hasta obtener un residuo aparentemente seco para lo que se utilizó una plancha de calentamiento (IKAC-MAG, Alemania). Posteriormente, se mantuvieron durante 3 horas en una estufa (YLD-6000 AASET, China). Seguidamente se colocaron en una desecadora hasta alcanzar temperatura ambiente. Se estableció un tiempo de secado de 60 minutos entre las pesadas. Los resultados se expresan mediante la fórmula siguiente:  $St = [(Pr-P)/V] \times 100$ , donde St son los sólidos totales, Pr la masa de la cápsula más el residuo (g), P la masa de la cápsula vacía (g), y V el volumen de la porción de ensayo (ml).

#### Análisis estadístico

Los resultados correspondientes al control de calidad de las muestras y extractos de *Hymenocallis caribaea* se procesaron por el programa *IBM SPSS Statistics v.22.0* (IBM Corp. Release 2013). Para la comparación de las medias se utilizó

una prueba t de muestras independientes y se empleó un nivel de significación del 95 %.

#### RESULTADOS

Las hojas alcanzaron su peso constante a las 120 horas de secado, es decir, a los cinco días, con una pérdida en peso de agua de 76,07 %. En el caso de los bulbos, se secaron completamente a los diez días (240 horas) después de iniciado el proceso, con una pérdida en peso de agua de 88,16 %. Una vez culminado el proceso, ambos órganos se lograron desmenuzar fácilmente. Además, mostraron una apariencia homogénea, presentándose una coloración verde opaca en las hojas y blanco opaco, en el caso de los bulbos.

La humedad residual y las sustancias solubles en agua de las hojas resultaron inferiores a las de los bulbos (Tabla I). Sin embargo, las cenizas totales, las solubles en agua y las insolubles en HCl al 10 % fueron superiores en las hojas (Tabla I). Tanto para las hojas como para los bulbos, el porcentaje de sustancias solubles en etanol al 50 % fue superior al porcentaje de las sustancias solubles en etanol al 70 % y 95 % (Tabla I). No existieron diferencias significativas en los parámetros evaluados en las hojas y los bulbos (Tabla I).

Las determinaciones realizadas mediante espectroscopía de infrarrojo cercano no fueron significativas (Tabla II). El comportamiento de la humedad residual y el contenido de almidón resultó superior en los bulbos; no obstante, el porcentaje de cenizas, proteínas, grasas y fibras fue superior en las hojas (Tabla II).

Al efectuar los análisis correspondientes a los extractos etéreos (Tabla III), los resultados fueron similares para ambos órganos. Se mostró la presencia de alcaloides, triterpenos y/o esteroides y compuestos grasos. Sin embargo, no se evidenció la existencia de núcleos lactónicos y coumarinas. Para todos los ensayos, las hojas presentaron una mayor intensidad de la coloración, lo que pudiera atribuirse a un mayor contenido de estos metabolitos.

**TABLA I**  
**Parámetros físicos y químicos de las drogas crudas de *Hymenocallis caribaea***  
**TABLE I**  
**Physical and chemical parameters of the raw drugs of *Hymenocallis caribaea***

Parámetros (%)	Media ± Desviación Estándar		t	p
	Hojas	Bulbos		
Humedad residual	8,36 ± 0,15	11,20 ± 0,20	-19,676	0,000
Cenizas totales	10,16 ± 0,29	3,33 ± 0,22	32,499	0,000
Cenizas solubles en agua	7,10 ± 1,69	0,73 ± 0,35	6,393	0,003
Cenizas insolubles en HCl al 10 %	2,13 ± 0,38	1,25 ± 0,35	2,950	0,042
Sustancias solubles en agua	28,93 ± 0,79	36,98 ± 0,18	-17,208	0,000
Sustancias solubles en etanol al 50 %	32,40 ± 0,35	33,58 ± 0,17	-4,007	0,016
Sustancias solubles en etanol al 70 %	31,47 ± 0,19	26,97 ± 0,06	39,430	0,000
Sustancias solubles en etanol al 95 %	9,57 ± 0,26	10,05 ± 0,07	-3,008	0,037

**TABLA II**

**Determinaciones realizadas por espectroscopía de infrarrojo cercano de *Hymenocallis caribaea***

**TABLE II**

**Determinations made by near infrared spectroscopy of *Hymenocallis caribaea***

Parámetros (%)	Media ± Desviación Estándar		t	p
	Hojas	Bulbos		
Humedad	8,53 ± 0,15	11,46 ± 0,11	-27,283	0,000
Cenizas	9,92 ± 0,17	2,96 ± 0,09	62,671	0,000
Proteínas	20,58 ± 0,16	10,15 ± 0,02	112,036	0,000
Grasas	3,48 ± 0,12	0,27 ± 0,03	44,949	0,000
Fibras	15,52 ± 0,02	5,86 ± 0,12	137,533	0,000
Almidón	17,22 ± 0,24	42,68 ± 0,35	-103,911	0,000

**TABLA III**

**Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos etéreos de *Hymenocallis caribaea***

Leyenda: + ensayo positivo, ++ ensayo muy positivo, - ensayo negativo, ± ensayo dudoso.

**TABLE III**

**Results of the phytochemical screening of the ether extracts of *Hymenocallis caribaea***

Legend: + positive test, ++ very positive test, - negative test, ± doubtful test.

Ensayos	Metabolitos	Hojas	Bulbos
Sudán	Compuestos grasos	±	+
Baljet	Lactonas y/o coumarinas	-	-
Lieberman-Burchard	Triterpenos y/o esteroides	+	+
Dragendorff	Alcaloides	++	++
Mayer	Alcaloides	+	+
Wagner	Alcaloides	+	+

**TABLA IV**

**Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de *Hymenocallis caribaea***

Leyenda: + ensayo positivo, ++ ensayo muy positivo, - ensayo negativo.

**TABLE IV**

**Results of the phytochemical screening of the hydroalcoholic extracts of *Hymenocallis caribaea***

Legend: + positive test, ++ very positive test, - negative test.

Ensayos	Metabolitos	Hojas	Bulbos
Baljet	Lactonas y/o coumarinas	+	+
Lieberman-Burchard	Triterpenos y/o esteroides	+	-
Dragendorff	Alcaloides	++	++
Mayer	Alcaloides	+	+
Wagner	Alcaloides	+	+
Espuma	Saponinas	-	++
Resina	Resina	+	-
Ninhidrina	Aminoácidos	+	+
Fehling	Sustancias reductoras	+	+
Shinoda	Flavonoides	+	-
FeCl <sub>3</sub>	Fenoles y/o taninos	+	+
Borntrager	Quinonas	-	-
Antocianidinas	Antocianidinas	+	+
Catequinas	Catequinas	+	-
Kedde	Glicósidos cardiotónicos	-	-

TABLA V

**Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos acuosos de *Hymenocallis caribaea***

Leyenda: + ensayo positivo, ++ ensayo muy positivo, - ensayo negativo.

TABLE V

**Results of the phytochemical screening of the aqueous extracts of *Hymenocallis caribaea***

Legend: + positive test, ++ very positive test, - negative test.

Ensayos	Metabolitos	Hojas	Bulbos
Dragendorff	Alcaloides	++	++
Mayer	Alcaloides	+	+
Wagner	Alcaloides	+	+
Espuma	Saponinas	-	++
Fehling	Azúcares reductoras	+	+
Shinoda	Flavonoides	+	-
FeCl <sub>3</sub>	Fenoles y/o taninos	+	+
Mucílagos	Mucílagos	+	+
Principios amargos y astringentes	Principios amargos y astringentes	-	+

TABLA VI

**Parámetros físicos y químicos de los extractos obtenidos de *Hymenocallis caribaea***

TABLE VI

**Physical and chemical parameters of the extracts obtained from *Hymenocallis caribaea***

Parámetros	Media ± Desviación Estándar		t	p
	Extracto hidroalcohólico 50 % (hojas)	Extracto acuoso (bulbos)		
Índice de refracción	1,57 ± 0,01	1,34 ± 0,03	12,598	0,000
pH	4,65 ± 0,04	3,66 ± 0,01	41,168	0,000
Densidad relativa (g/ml)	0,91 ± 0,02	1,03 ± 0,02	-7,348	0,000
Sólidos totales (%)	2,71 ± 0,21	8,2 ± 0,28	-32,318	0,000

En los extractos alcohólicos (Tabla IV) se observó una reacción positiva para alcaloides, azúcares reductores, aminoácidos, antocianidinas, compuestos fenólicos, lactonas y/o coumarinas, que igualmente en este caso, fue más intensa en el extracto de las hojas. En estos extractos se observaron diferencias en la composición química de ambos órganos. En las hojas se sugirió, adicionalmente, la presencia de núcleos triterpénicos y/o esteroidales, resinas, flavonoides y catequinas. La presencia de saponinas solo fue evidente en el extracto de los bulbos. En ninguno de los dos órganos hubo presencia de quinonas y compuestos cardiotónicos.

Por su parte, los extractos acuosos (Tabla V) revelaron la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, azúcares reductores y mucílagos. A diferencia de los extractos anteriores, el extracto de los bulbos mostró una mayor intensidad en los diferentes ensayos, donde, además, se evidenciaron principios amargos y saponinas con una marcada incidencia positiva. La presencia de flavonoides solo se detectó en el extracto de las hojas.

El análisis organoléptico de los extractos (Tabla VI) mostró una coloración y olor característicos de cada órgano vegetal. El extracto de las hojas presentó una apariencia translúcida y una coloración verde que pudiera asociarse a la presencia de clorofila en este órgano. Sin embargo, el extracto de los bulbos tuvo una coloración blanca opaca y una apariencia lechosa que pudieran estar relacionadas con el elevado contenido de agua que presenta este órgano, unido a las características de los metabolitos que se extraen con el disolvente empleado. En ninguno de los extractos hubo presencia de partículas suspendidas ni separación de capas. En la Tabla VI se presentan las determinaciones de los parámetros físicos y químicos en el análisis de los extractos.

**DISCUSIÓN****Parámetros físicos y químicos determinados a las drogas crudas**

En las determinaciones realizadas, tanto en las hojas como en los bulbos de *Hymenocallis caribaea*, los valores obtenidos (Tabla II) se corresponden con los intervalos exigidos en Normas y Farmacopeas (Zhi-Cen 1980, WHO 1998, Miranda & Cuéllar

2000), las que establecen un contenido de humedad residual del 8-14 %, en dependencia del material vegetal. Estos valores demuestran que las drogas cumplen con este requisito de calidad y confirman el mayor contenido de agua que presentan los bulbos con respecto a las hojas. El contenido de humedad residual resulta de gran utilidad para evaluar el proceso de secado empleado. Un valor elevado durante su determinación indica un exceso de agua en la droga, lo que puede dar lugar a la proliferación de microorganismos e insectos, así como a la oxidación e hidrólisis de los constituyentes químicos de la muestra y, por tanto, al deterioro de la droga (Sahil & *al.* 2011, Miranda & Cuéllar 2012).

El contenido de cenizas totales de los bulbos (3,33 %) se encontró dentro de los límites de especificaciones establecidos por las Farmacopeas para la mayoría de las plantas medicinales, el cual debe ser menor del 5 % (Zhi-Cen 1980, WHO 1998). En el caso de las hojas (Tabla I), el contenido obtenido (10,16 %) fue elevado; sin embargo, se encuentran dentro de los valores exigidos por la Farmacopea China donde se refiere un límite máximo del 15 % (Commission CP 2015). Además, se debe tener en cuenta que *Hymenocallis caribaea* no se había estudiado desde el punto de vista farmacognóstico, por lo que este valor no informado anteriormente, pudiera ser característico de la especie en dependencia de las condiciones del suelo donde se desarrolle. Las cenizas totales representan un indicativo de la calidad del material estudiado, ya que constituye un elemento indispensable para determinar la identidad y pureza de la droga al informar la posible adulteración con materia inorgánica o cuerpos extraños que posea la misma o la cantidad de dichos elementos en su contenido, tal como plantean Evans (2009), Miranda & Cuéllar (2012) y Chanda (2014).

Por otra parte, el porcentaje de cenizas que se disuelven en agua se evaluó con el objetivo de garantizar la seguridad de la droga. Esta determinación permite también determinar la pureza de la droga con que se trabaja y estimar la cantidad de compuestos inorgánicos presentes. Los resultados mostraron que las cenizas solubles en agua para los bulbos fueron de 0,73 % (Tabla I), valor que se encuentra dentro de los límites establecidos, por debajo del 2 % para plantas medicinales. Sin embargo, en las hojas el valor obtenido (7,10 %) excede el límite establecido, lo que pudiera ser atribuible a las características del suelo en el que se desarrollaron las plantas analizadas, donde la disponibilidad de nutrientes puede variar, en dependencia del órgano (Zhi-Cen 1980, WHO 1998).

La cantidad de cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10 % obtenidos de *Hymenocallis caribaea* pueden considerarse adecuados (Tabla I). Tanto en el bulbo como en la hoja, se obtuvieron valores bajos (1,25 % y 2,13 % respectivamente), los cuales se encuentran alrededor del 2 % exigidos por Zhi-Cen (1980) y WHO (1998). Este parámetro permite determinar los posibles metales pesados presentes y, por consiguiente, la posible toxicidad de la especie. De este modo se infiere la deficiente calidad de la materia prima de

partida a la hora de realizar la elaboración de una preparación farmacéutica a partir de la misma según la USP-32 (2010).

Para las hojas el mayor poder extractivo lo logró la mezcla hidroalcohólica al 50 %, aunque la mezcla hidroalcohólica al 70 % y el agua mostraron valores muy cercanos a esta (Tabla I). En el caso del bulbo, el agua fue el menstuo que favoreció la mejor extracción de los constituyentes presentes. Al emplear como disolvente la mezcla hidroalcohólica al 50 % se lograron valores cercanos a los obtenidos con el agua. Sin embargo, para ambos órganos la mezcla hidroalcohólica al 95 % fue la que presentó los menores valores, los que encontraron muy por debajo respecto a los otros disolventes empleados. Independientemente de los diferentes menstuos empleados, de los dos órganos estudiados, los bulbos fueron los que presentaron el mayor contenido de estas sustancias. Estos resultados sugieren que en las hojas de *Hymenocallis caribaea* prevalecen compuestos de mediana polaridad, mientras que en los bulbos resultan abundantes los compuestos más polares.

#### **Análisis por espectroscopía de infrarrojo cercano**

Respecto a los análisis por espectroscopía de infrarrojo cercano, los resultados obtenidos para los parámetros de humedad y cenizas de ambos órganos vegetales (Tabla II) se correspondieron con los obtenidos en la Tabla I. Solo se observaron pequeñas diferencias que pudieran estar asociadas a la metodología utilizada.

Los valores del contenido de proteínas fueron de 20,58 % en las hojas y de 10,15 % en los bulbos. A partir de estos resultados se puede deducir que en las hojas de la planta debe haber un contenido de aminoácidos más elevado que en los bulbos, debido a que las proteínas están formadas por la unión de varios aminoácidos, unidos mediante enlaces peptídicos. Altos niveles de nitrógeno en el suelo aumentan el contenido proteico a nivel de las hojas y demás partes de la planta, lo que pudiera ser una de las causas de los resultados obtenidos (Bilbao 2014, Nelson & Cox 2018).

La determinación de este parámetro en la especie mostró valores bajos para las hojas y los bulbos, siendo en estos últimos prácticamente nulo. El bajo contenido de grasas en *Hymenocallis caribaea* puede resultar beneficioso en la industria farmacéutica, ya que pudieran desarrollarse preparaciones para diferentes patologías, a la vez que ayudarán a prevenir la obesidad y las enfermedades cardiovasculares (Carrillo & *al.* 2011). Al respecto, es importante considerar que las grasas son consideradas como el nutriente que más contribuye al aporte energético de la dieta, seguido de las proteínas por lo que resulta importante conocer su presencia (Bilbao 2014).

El contenido de fibra vegetal en las hojas fue superior al de los bulbos (Tabla II). Sin lugar a dudas, estos resultados son muy importantes, aunque los valores no son elevados, dado que la ingestión de fibras produce un aumento de la motilidad intestinal y de la producción de ácidos grasos volátiles.

Además, actúa como agente higroscópico y permite una disminución de la presión intraluminal del colon (Bilbao 2014).

El contenido de almidón en los bulbos fue muy elevado, mientras en las hojas resultó mucho menor (Tabla II). Las diferencias observadas pueden atribuirse a la forma de almacenamiento del almidón en la planta, la cual varía en entre los diferentes órganos (Miranda & Cuéllar 2012).

#### Identificación de metabolitos secundarios por tamizaje fitoquímico

La detección de alcaloides en todos los extractos sugirió la abundancia de este tipo de metabolitos en los órganos y en el vegetal estudiado, y confirman la presencia de los mismos en este género de plantas (Cortés 2015, Martín & al. 2012). Los estudios fitoquímicos del género *Hymenocallis* han revelado, además, la presencia de flavonoides en los extractos y fracciones de algunas de sus especies (Karthikeyan & al. 2016), por lo que los resultados obtenidos están en correspondencia con lo referido en la literatura.

#### Análisis físicos y químicos de la calidad de los extractos

La mezcla hidroalcohólica al 50 % y el agua fueron los menstruos que lograron el mayor rendimiento de sustancias solubles para las hojas y los bulbos, respectivamente (Tabla I). Por estas razones se seleccionaron para continuar su estudio.

Los resultados obtenidos en cuanto al índice de refracción (Tabla VI) muestran que no existen diferencias entre las muestras evaluadas. Este es superior en cuanto al índice de refracción (1,360) referido en el extracto etanólico de las hojas de *Allium schoenoprasum* L., especie comúnmente conocida como cebollín (Pesantes & al. 2019). Sin embargo, es muy similar al índice de refracción (1,360) del extracto del bulbo de esta misma planta (Pesantes & al. 2019). El índice de refracción es un parámetro indicativo de la calidad de los extractos, pues ofrece un criterio indirecto de la concentración de los mismos, incluso, es una medida de su estabilidad y una constante característica de cada sustancia (Carmona & al. 2009).

Los extractos tienen un pH con tendencia ácida, ya que los valores variaron entre 4,65 y 3,66 (Tabla VI). Estos son similares a los obtenidos en los extractos etanólicos de hojas y bulbos de *Allium schoenoprasum*. La densidad del extracto de las hojas de la especie en estudio es ligeramente superior al obtenido en los extractos de las hojas del cebollín, mientras que la densidad del extracto de los bulbos fue similar en ambas especies (Pesantes & al. 2019).

El contenido de sólidos totales (Tabla VI) fue evaluado por ser de gran relevancia y un requisito importante en el análisis del control de la calidad de los extractos que se obtienen de plantas medicinales. En este estudio el extracto acuoso de los bulbos fue el que logró el mayor porcentaje de estas sustancias respecto al extracto hidroalcohólico de las hojas. Ello concuerda con el obtenido en los extractos etanólicos de las hojas (1,02 %) y los bulbos (2,73 %) del cebollín (Pesantes & al. 2019).

#### CONCLUSIONES

Se determinaron los principales parámetros farmacognósticos de las hojas y los bulbos de la especie *Hymenocallis caribaea*, los cuales permitieron establecer las características del secado y los principales parámetros físicos y químicos de la droga cruda y sus extractos para esta época de recolección. La composición química cualitativa de las hojas y los bulbos de la especie son similares y los principales metabolitos identificados fueron los alcaloides, compuestos fenólicos y azúcares reductores. De este modo, las drogas cumplen con los requisitos de calidad establecidos en las normas cubanas e internacionales para el uso de productos naturales, por lo que las mismas pudiesen ser empleadas en la preparación de nuevos productos en la medicina natural. No obstante, se recomienda realizar un análisis toxicológico de los órganos ensayados.

#### AGRADECIMIENTOS

A los revisores anónimos y editores de la Revista del Jardín Botánico Nacional por sus comentarios y sugerencias.

#### CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

E. Salas concibió la idea original, diseñó y dirigió la investigación, analizó los datos, escribió la primera versión del manuscrito y corrigió las versiones posteriores. D.C. Sánchez-Milán recolectó el material vegetal, realizó los experimentos y el trabajo de laboratorio, analizó los datos y contribuyó en la escritura de la versión inicial. J.A. Arencibia contribuyó en la corrección de la versión final del artículo. J.A. García-Beltrán identificó la especie objeto de estudio. Todos los autores contribuyeron en la discusión de los resultados y revisión crítica del manuscrito.

#### CUMPLIMIENTO DE NORMAS ÉTICAS

*Conflicto de intereses:* Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

*Aprobación de ética:* Todos los autores han llevado a cabo el trabajo de campo y la generación de datos de forma ética, incluida la obtención de permisos adecuados.

*Consentimiento para la publicación:* Todos los autores han dado su consentimiento para publicar este trabajo.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angulo, A.F., Rosero, R. & Gonzales, M. 2012. Estudio etnobotánico de las plantas medicinales utilizadas por los habitantes del corregimiento de Genoy, Municipio de Pasto, Colombia. *Rev. Univ. Salud* 14(2): 168-185.
- Bilbao, T. 2014. Dietética. Editorial Universitaria Félix Varela. La Habana, Cuba.
- Bizama, L. & del Rosario, I. 2018. Quimiotaxonomía de *Amaryllidaceae* chilenas alcaloides como marcadores taxonómicos. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Chile.
- Carmona, R., López, O.D. & Gonzáles, M.L. 2009. Relación entre índice de refracción y sólidos totales en extractos acuosos de *Calendula officinalis* L. (caléndula) y *Ocimum sanctum* L. (albahaca morada). *Rev. Cub. Plant. Med.* 14(3): 23-28.
- Carrillo, L., Dalmau, J., Serra, J., Martínez, R., Álvarez, M., Solà, R. & Alberich, F. 2011. Dietary fats and cardiovascular Health. *Clinica e Investigación en Arteriosclerosis* 23(1): 1-36.
- Chanda, S. 2014. Importance of pharmacognostic study of medicinal plants: An overview. *J. Pharmacog. Phytochem.* 2(5).

- Commission CP. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. 2015. Chinese Medical Science and Technology Press. Peking, China.
- Cortes, N., Alvarez, R., Osorio, E.H., Alzate, F., Berkov, S. & Osorio, E. 2015. Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five *Amaryllidaceae* plants. *J. Pharmaceut. Biomed.* 102: 222-228.
- Cueva, R.E. 2013. Aplicación de la espectroscopia NIR para la determinación de parámetros críticos en la fabricación de comprimidos en la industria farmacéutica. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España.
- Evans, W.C. 2009. Chapter 16. Quality control. Pp. 121-125. En: Trease and Evans' Pharmacognosy. 16th Ed. W. B. Saunders. London, UK.
- IBM Corp. Release. 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. IBM Corp. Armonk, New York, USA.
- Karthikeyan, R., Koushik, O.S. & Babu, P.S. 2016. Anti-Inflammatory Activity of Ethanolic Extract of Flowers *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. by HRBC Membrane Stabilization Method. *Transl Biomed* 7(2): 60.
- Martín, J., Raymúndez, M.B., Vallès, J., Garnatje, T. & Raimúndez, E. 2012. Palynological study of the Venezuelan species of the genus *Hymenocallis* (*Amaryllidaceae*). *Plant Syst. Evol.* 298: 695-701.
- MINSAP [Ministerio de Salud Pública]. 2015. Salud Pública Resolución No. 381. *Gaceta Oficial de la República de Cuba* 17 (Extraordinaria): 291-293, de fecha 20 de mayo de 2015.
- Miranda, M. & Cuellar, A. 2000. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.
- Morón Rodríguez, F.J. 2010. ¿Son importantes las plantas medicinales en la actualidad? *Rev. Cub. Plant. Med.* 15(2): 1-2.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. 2018. Principios de Bioquímica de Lehninger. 7ma Ed. Artmed Editora.
- NRSP [Normas Ramales de Salud Pública]-309. 1992. Droga cruda. Métodos de ensayo. Pp. 16-29. En: Norma Ramal. Medicamentos de origen vegetal. MINSAP. La Habana, Cuba.
- NRSP [Normas Ramales de Salud Pública]-312. 1992. Extractos fluidos y tinturas. Métodos de ensayos. Pp. 15-19. En: Norma Ramal. Medicamentos de origen vegetal. MINSAP. La Habana, Cuba.
- Newman, D.J. & Cragg, G.M. 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79(3): 629-661.
- OMS [Organización Mundial de la Salud]. 2002. Medicina tradicional: necesidades crecientes y potencial (No. WHO/EDM/2002.4). Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza.
- OMS [Organización Mundial de la Salud]. 2013. Tradicional Medicine Strategy 2014-2023. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza.
- Pesantes, O.G., Bustamante, K.E., Miranda, M. & Gutiérrez, Y.G. 2019. Estudio químico y evaluación biológica del extracto etanólico de *Allium schoenoprasum* L. Regel & Tiling (Cebollín). *Rev. Cub. Farm.* 52(1): e98.
- Sahil, K., Sudeep, B. & Akanksha, M. 2011. Standardization of medicinal plant materials. *Inter. J. Res. Ayurveda Pharm.* 2(4): 1100-1109.
- Urquiola, A. & González, S. 2009. *Amaryllidaceae*. En: Greuter, W. & Rankin, R. (ed.). Flora de la República de Cuba. Serie A. Plantas Vasculares. Fascículo 15(3). A. R. Gantner Verlag KG. Ruggell, Liechtenstein.
- USP [United States Pharmacopeia]-32. 2010. The United States Pharmacopeia. United States Pharmacopeial Conventions Inc. Rockville, MD, USA.
- WHO [World Health Organization]. 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. WHO/PHARM/92.559. Ginebra, Suiza.
- Yunes, R.A. & Filho V.C. 2016. Química de Produtos Naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia. 5th Ed. Editora UNIVALI. Itajaí.
- Zhi-Cen, L. 1980. General control methods for vegetable drugs. World Health Organization. Ginebra, Suiza.