

Caracterización por HPLC y FTIR de los extractos acuosos de tres especies diuréticas del centro-oeste argentino

María F. Garro¹, María A. Gette¹, Marta E. Petenatti¹, Mariana C. Popovich¹, Gerardo Camí², Elbio Saidman³, Luis A. Del Vitto¹, Elisa M. Petenatti^{1*}

¹ Herbario UNSL/Proyecto 22/Q-016, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional San Luis, Ejército de los Andes 950, D5700HHW San Luis, República Argentina.

² Área de Química Inorgánica, FQByF, UNSL.

³ Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos, FQByF, UNSL.

* Autor a quien dirigir la correspondencia: elipete@unsl.edu.ar

Resumen

Euphorbia serpens Kunth var. *microphylla* Müll. Arg. (Euphorbiaceae), *Amaranthus muricatus* (Moq.) Hieron. (Amaranthaceae) y *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. (Anacardiaceae) son plantas usadas tradicionalmente en el Cono Sur de América como diuréticas. Las dos primeras son hierbas denominadas vulgarmente “yerbas meonas”, mientras que la última, un árbol perennifolio, es conocido como “molle de beber” o “molle dulce”. El objeto de este trabajo es caracterizar los extractos acuosos de estas drogas vegetales, identificando y cuantificando manitol por HPLC, debido a que este alcohol sería el principal responsable de la actividad diurética que han mostrado las tres plantas. Se realizó además, la caracterización fisicoquímica de las especies vegetales por comparación de los espectros de FT-IR. Los cromatogramas obtenidos por HPLC muestran picos con tiempos de retención a 35,44 min (estándar) característicos para manitol, y el área por debajo de las respectivas curvas permitió establecer concentraciones respecto a materia seca entre 23,056 g Kg⁻¹ en *E. serpens* var. *microphylla*; 4,638 g Kg⁻¹ en *L. molleoides*; y 2,080 g Kg⁻¹ en *A. muricatus*. Estas cifras explican las diferencias en la potencia diurética descrita en la bibliografía para las especies en estudio. Los espectros IR presentan una relación de áreas de las bandas CO/CH que resultó distintiva para las dos especies (8,42 para *E. serpens* var. *microphylla*; 9,28 para *A. muricatus*; y 11,18 para *L. molleoides*). El valor mayor correspondiente a *L. molleoides* indica mayor cantidad de compuestos oxigenados. Los datos espectrales obtenidos permiten contribuir a la caracterización de los extractos acuosos de estas especies y aportan datos para un control de calidad efectivo de las drogas vegetales y los medicamentos herbarios que los contengan en su formulación.

HPLC and FTIR Characterization of Aqueous Extracts of Three Diuretic Plant Species from West Central Argentina

Summary

Euphorbia serpens Kunth var. *microphylla* Müll. Arg. (Euphorbiaceae), *Amaranthus muricatus* (Moq.) Hieron. (Amaranthaceae), and *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. (Anacardiaceae) are traditionally used in Southern South America as diuretic plants. The first two are herbs commonly called “yerbas meonas”, while the latter,

Palabras clave: Manitol - HPLC - FT-IR - *Euphorbia serpens* var. *microphylla* - *Amaranthus muricatus* - *Lithraea molleoides*.

Key words: Mannitol - HPLC - FT-IR - *Euphorbia serpens* var. *microphylla* - *Amaranthus muricatus* - *Lithraea molleoides*.

an evergreen tree, is known as “molle de beber” or “molle dulce”. This work tends to characterize the aqueous extracts (AEs) of these plant drugs, identifying and quantifying mannitol by HPLC, since this alcohol would be primarily responsible for the diuretic activity shown in the three plants. Furthermore, to characterize the species by comparing their FT-IR spectra. The HPLC spectra show the characteristic areas for mannitol at retention time (Tr) 35.44 min, while the area under the respective curves allowed to establish varying concentrations among 23.056 g Kg⁻¹ on the basis of dry matter in *E. serpens* var. *microphylla*, 4.638 g Kg⁻¹ in *L. molleoides*, and 2.080 g Kg⁻¹ in the case of *A. muricatus*. These figures explain the differences in diuretic potency described in the literature for these species. The FTIR spectra show CO/CH relations which are characteristic for each species (8.42 for *E. serpens* var. *microphylla*; 9.28 for *A. muricatus*; and 11.18 for *L. molleoides*); the higher value corresponding to *L. molleoides* indicates a greater amount of oxygenates. The spectral data obtained allow us to contribute to the characterization of AEs of these species, and provide data for effective quality control

Introducción

La acción diurética que muestran algunas especies de plantas se debe a principios varios, entre los que se destacan los aceites esenciales, los flavonoides, los saponósidos y las sales de potasio; en algunas drogas pueden coincidir varios de ellos, y a veces, resulta difícil determinar en qué medida cada uno es responsable de esa bioactividad (Wright y col., 2007).

Entre otras plantas diuréticas de la medicina tradicional del Cono Sur (Bandoni y col., 1976), tres especies argentinas se usan con frecuencia: *Euphorbia serpens* Kunth var. *microphylla* Müll. Arg. (Euphorbiaceae), *Amaranthus muricatus* (Moq.) Hieron. (Amaranthaceae) y *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. (Anacardiaceae) (Cheruse y col., 1983; Debenedetti y col., 2000; Del Vitto y col., 1997; Garro y col., 2012; López y col., 2007).

El objeto de este trabajo es caracterizar los extractos acuosos (EA) de estas drogas, identificando y cuantificando manitol por HPLC porque este alcohol, que se comporta como un diurético osmótico, sería el principal responsable de la actividad diurética que muestran las tres plantas (Garro y col., 2012). Por otra parte, se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica de las especies vegetales por comparación de los espectros de FTIR.

Materiales

Se recogieron partes aéreas de cada una de las especies a partir de poblaciones naturales en los departamentos Coronel Pringles y General Pueyrredón, San Luis, entre 750 y 950 m.s.m., en el verano de 2010. El material fue secado en estufa de aire forzado a

40 °C, hasta humedad higroscópica, y luego, molido con molino a cuchillas.

Cada especie fue documentada mediante la confección de ejemplares de herbario, preservados en el Herbario de la Universidad Nacional de San Luis, e identificadas de la siguiente manera: 1) *Euphorbia serpens* Kunth var. *microphylla* Müll. Arg. (Euphorbiaceae), UNSL #533; 2) *Amaranthus muricatus* (Moq.) Hieron. (Amaranthaceae), UNSL #538; 3) *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. (Anacardiaceae), UNSL #515.

Métodos

Los EA se obtuvieron a partir de 5 g de parte aérea (solo hojas en *L. molleoides*) desecada y molida de cada especie, extraídos con 100 ml de agua hirviente, según la Farmacopea Nacional Argentina, 7ª Ed. (2005), con posterior liofilización (Rificor® LT-16). La muestra liofilizada se disolvió en acetonitrilo-agua con una dilución final (1:25). Se inyectaron alícuotas de 20 µL en un equipo HPLC-UV/DAD Ultimate 3000 Autosampler (Dionex®), con una columna Gemini C18 (Phenomenex®), y se usó como fase móvil acetonitrilo:agua (20:80) a 1 mL/min. Se trabajó a una longitud de onda de 280 nm y los espectros UV fueron registrados en el intervalo de 200-400 nm. Los datos fueron procesados con un software Chromeleon®.

Los espectros FT-IR se obtuvieron utilizando un espectrómetro Protégé 460 (Nicolet®), con un divisor de haz de luz de CsI, y se midieron con una resolución de 4 cm⁻¹, entre 4.000 y 460 cm⁻¹. Se prepararon pastillas de KBr, con una concentración de muestra del 5 % en peso.

La relación de áreas CO/CH se midió empleando el área bajo la banda de los estiramientos C-O de los grupos carbonilos (entre 1.750-1.600 cm^{-1}) y los estiramientos C-H alifáticos a alta frecuencia (entre 2.960-2.100 cm^{-1}); se establecieron así pautas de equivalencia y similitud entre las especies.

Todos los reactivos empleados fueron de pureza analítica y HPLC de acuerdo con la metodología aplicada.

Resultados

Euphorbia serpens var. *microphylla* es una hierba anual, postrada, tapizante, latescente, con pequeñas hojas ovadas a orbiculares y tallos engrosados en los nudos; es conocida vulgarmente como “yerba meona” (también “meona”, “meonita”, “yerba de la golondrina”, “cola de novia”, “leche de paloma”, “pichoa rastrera”, “lechuguilla”, “rompepedras”, “tupasú cambú”); su parte aérea se emplea principalmente como diurético y antilitiásico, y su látex es considerado como antiverrucoso y antiherpético; se extiende por el norte y centro argentino hasta el norte de la Patagonia, además de Brasil, Paraguay y Uruguay. A su vez, la variedad típica se ha naturalizado en casi todo el mundo (Del Vitto y col. 1997; Filipov, 1997; Roig, 2001; Ruiz Leal, 1972; Subils, 1977).

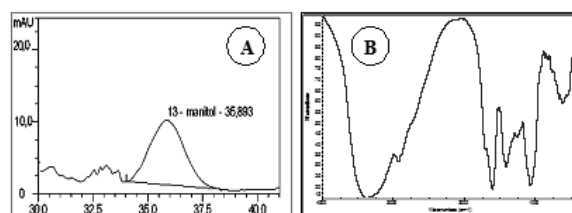
Amaranthus muricatus es una hierba perenne, postrada o erguida, con hojas lanceolado-lineares, brillantes en el haz; es conocida vulgarmente con el nombre de “hierba meona” (también “meona”, “piquillo” o “ataco”), considerada diurética y laxante; es nativa de Sudamérica austral y se ha naturalizado en gran parte del mundo (Del Vitto y col., 1997; Filipov, 1997; Martínez-Crovetto, 1964; Pedersen, 1987; Roig, 2001).

Lithraea molleoides es un árbol perennifolio de mediano porte, con hojas compuestas por 3-5 folíolos lanceolados, verde brillante en el haz, flores verde-amarillento, inconspicuas y frutos oscuros en la madurez. Es conocida vulgarmente como “molle de beber” o “molle dulce” (también “molle”, “molle blanco” o “chichita”); forma asociaciones boscosas en ambientes serranos del centro y norte de la Argentina, y se extiende hasta el sur de Brasil, Paraguay y Uruguay. Su follaje es empleado como diurético, mientras que sus frutos son utilizados como edulcorante y digestivo; tanto las exudaciones gomorresinosas, consideradas antiartríticas, como la

madera, causan dermatitis de contacto, esta última es conocida regionalmente como “flechadura del molle” (Del Vitto y col., 1997; 2011; Muñoz, 2000).

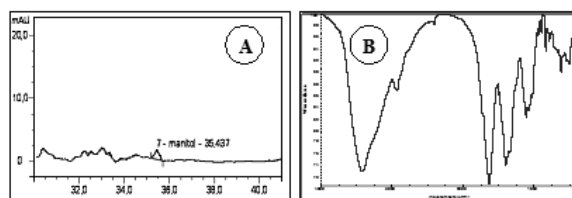
Los cromatogramas HPLC evidenciaron picos característicos con tiempos de retención (Tr) muy similares en todas las muestras (Figuras 1, 2 y 3 y Tabla 1): 34,90 min para el extracto acuoso de *E. serpens* var. *microphylla*; 35,42 min para *A. muricatus*; y 35,07 min para *L. molleoides*, mientras que el estándar de D-manitol (Sigma Aldrich®) presentó un Tr = 35,44 min. El agregado externo de este compuesto permitió confirmar su presencia por co-elución en los tres extractos vegetales. Se puede considerar al manitol como un marcador bioactivo para las especies en estudio dado que es el compuesto responsable de la actividad diurética. Su cuantificación puso en evidencia una concentración descendente desde *E. serpens* var. *microphylla* (2,305 g/100 g de materia seca) >> *L. molleoides* (0,463 g/100 g) > *A. muricatus* (0,208 g/100 g) (Tabla 1).

Figura 1.- Perfiles de HPLC y FTIR de *E. serpens* var. *microphylla*



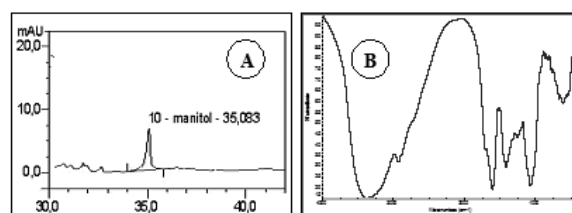
A: HPLC; **B:** FTIR.

Figura 2.- Perfiles de HPLC y FTIR de *A. muricatus*



A: HPLC; **B:** FTIR.

Figura 3.- Perfiles de HPLC y FTIR de *L. molleoides*



A: HPLC; **B:** FTIR.

Tabla 1.- Concentración de manitol y relación de áreas de las bandas CO/CH

| Especie | Tiempo de retención HPLC | Manitol HPLC (ppm en m.s.) | Relación CO/CH FTIR |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|------------------------|
| <i>E. serpens microphylla</i> | 34,90 | 23.056,5 | 8,42 |
| <i>A. muricatus</i> | 35,42 | 2.080,0 | 9,28 |
| <i>L. molleoides</i> | 35,07 | 4.637,6 | 11,18 |

Referencia: m.s.: materia seca.

Por su parte, los perfiles FTIR presentan bandas típicas para este alcohol en la zona de la “huella dactilar”, entre 850-1.000 cm^{-1} (Figuras 1, 2, y 3), mientras que la relación de áreas de las bandas CO/CH resulta distintiva para cada especie: 8,42 para *E. serpens* var. *microphylla*; 9,28 para *A. muricatus*; y 11,18 para *L. molleoides* (Tabla 1); estos valores indican que el mayor contenido en compuestos oxigenados corresponde a *L. molleoides*, y los menores, a *A. muricatus* y *E. serpens* var. *microphylla*.

Discusión y conclusiones

En las tres especies de plantas estudiadas (*Euphorbia serpens* var. *microphylla*, *Amaranthus muricatus* y *Lithraea molleoides*), empleadas entre otros usos como diuréticas en la Argentina, se ha comprobado la existencia de manitol, un alcohol destacado como diurético osmótico, que es propuesto como uno de los marcadores bioactivos de estas plantas. Su concentración, medida mediante HPLC, resultó significativa en *E. serpens* var. *microphylla*, mientras que las otras dos especies mostraron un contenido relativamente bajo; estos contenidos se corresponden con los resultados hallados por Debenedetti y col. (2000) para *A. muricatus*, y la moderada actividad diurética demostrada por Garro y col. (2012) para *L. molleoides*.

La relación de áreas de las bandas CO/CH de los espectros FTIR resultó característica para cada especie vegetal. Las determinaciones realizadas permiten contribuir a la caracterización de estas drogas, aportan al control de calidad efectivo, tanto de las drogas crudas como de sus derivados fitoterápicos.

Agradecimientos

Los autores manifiestan su agradecimiento al Comité editorial y los evaluadores anónimos por las importantes sugerencias, y al apoyo financiero de los Proyectos 22/Q016 SPU-ME y 2-1014 SECyT-UNSL.

Referencias bibliográficas

- Bandoni, A.L.; Mendiando, M.E.; Rondina, R.V.D.; Coussio, J.D. (1976). “Survey of Argentine medicinal plants. Folklore and phytochemical Screening, II”. *Economic Botany* 30(2): 161-185.
- Cheruse, J.; Baldini, O.; Blanc, L. (1983). “Ensayo farmacodinámico preliminar de *Euphorbia serpens* H.B.K. (Euphorbiaceae)”. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 2(1): 19-22.
- Debenedetti, S.L.; Miño, J.; Rojo, A.; Acevedo, M.C.D. (2000). “Ensayo del efecto diurético de los extractos acuosos de *Amaranthus muricatus* (Moquin) Gill. ex Hicken, *Bauhinia candicans* Benth. y *Smilax campestris* Griseb.” *Acta Farmacéutica Bonaerense* 19(1): 17-20.
- Del Vitto, L.A.; Petenatti, E.M.; Petenatti, M.E. (1997). “Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina) Primera parte: Plantas nativas”. *Multequina* 6: 49-66.
- Del Vitto, L.A.; Petenatti, E.M.; Petenatti, M.E. (2011). *Flores y plantas de la Reserva Provincial “Mogote Bayo” y Costa de la Sierra de Comechingones, Merlo, San Luis, Argentina*. Fundación Espacios Verdes, Buenos Aires: 42.
- Farmacopea Nacional Argentina (7ª ed.) (2005).

- Ministerio de Salud, ANMAT, INAME. Buenos Aires. 512 p.
- Filipov, A. (1997). "La farmacopea natural en los sistemas terapéuticos de los indígenas pilagá". *Parodiana* 10: 19-34.
- Garro, M.F.; Petenatti, M.E.; Petenatti, E.M.; Del Vitto, L.A.; Pelzer, L.; Saad, J.R.; María, A.O. (2012). "Pharmacobotanical characterization and diuretic activity of 'molles' of the Cuyo region, Argentina". *Biocell* 36(3): A-144.
- López, P.; Anesini, C.; Cogoi, L.; Ferraro, G. (2007). "Estudio de la actividad antioxidante de extractos de *Lithraea molleoides* (Anacardiaceae)". *BLACPMA* 6: 352-353.
- Martínez-Crovetto, R. (1964). "Estudios etnobotánicos, I. Nombres de plantas y su utilidad, según los indios Tobas del E del Chaco". *Bonplandia* 1: 279-333.
- Muñoz, J.D. (2000). "Anacardiaceae" en: Hunziker, A.T. (dir.) *Flora Fanerogámica Argentina*. Museo Botánico, Córdoba, Argentina, Fasc. 65: 1-28.
- Pedersen, T.M. (1987). "Amaranthaceae" en: Troncoso, N.S.; Bacigalupo, N.M. (dir.) *Flora Ilustrada de Entre Ríos, Argentina*. INTA, Buenos Aires: Colección Científica 6(3a): 160-203.
- Roig, F.A. (2001). *Flora medicinal mendocina*. Ed. EDIUNC, Mendoza, Argentina: 1-177.
- Ruiz Leal, R.A. (1972). "Flora popular mendocina". *Deserta* 3: 3-296.
- Subils, R. (1977). "Las especies de *Euphorbia* de la República Argentina". *Kurtziana* 10: 83-248.
- Wright, C.I.; Van-Buren, L.; Kroner, C.I.; Koning, M.M.G. (2007). "Herbal medicines as diuretics: a review of the scientific evidence". *Journal of Ethnopharmacology* 114(1): 1-31.