

## FITOQUÍMICA DEL *EUCALYPTUS* SSP.

HUMBERTO GARCÍA CORRALES,<sup>1</sup> ROLANDO QUERT ÁLVAREZ,<sup>2</sup> CLARA BECQUER ROMAGOZA<sup>2</sup> Y MIRTHA CASTIÑEIRA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Forestales (IIF). Calle 174 no. 1723 e/ 17B y 17C, Rpto. Siboney, Playa, La Habana, c.e.: humberto@forestales.co.cu, Cuba.

<sup>2</sup> Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). Calle 222 y Ave. 25, Rpto. San Agustín, La Lisa, La Habana, Cuba.

---

### RESUMEN

*En el presente trabajo se lleva a cabo un estudio fitoquímico del Eucalyptus ssp. Al follaje de esta especie se le realiza una extracción sólido-líquido con el objetivo de obtener su extracto alcohólico y estudiar la influencia del proceso de extracción previa de aceites esenciales, en presencia de sustancias bioactivas. Mediante tamizaje fitoquímico se determina la presencia de metabolitos secundarios. Se estudia además la influencia del pH y se determinan las propiedades físico-químicas: sólidos totales, densidad relativa e índice de refracción. Con ayuda de las técnicas cromatográficas (papel y placa) y la espectroscopía UV-visible, se determinó la presencia de vitaminas E y D<sub>2</sub>, así como la cantidad de β-caroteno.*

### ABSTRACT

*In this work it is carried out a phytochemical study of Eucalyptus ssp. making a solid-liquid extraction to the species foliage in order to obtain the alcoholic extract and study the influence of the essential oils previous extracting process, in front of bioactive substances. It is determined by phytochemical screening the presence of secondary metabolites. It is also studied the pH influence and determined the physical-chemical properties: total solids, relative density and refraction index. Using technical chromatographic technique (paper and thin plate) and UV-visible Spectroscopy was determined the presence of Vitamin E and D<sub>2</sub> in a qualitative way and the quantity of β-carotene.*

### INTRODUCCIÓN

Según lo planteado por Linares (1997), alrededor de 21% del territorio cubano es boscoso. El bosque satisface muchas de nuestras necesidades, ya que suministra madera y celulosa, purifica la atmósfera, embellece el entorno y facilita alimentos y medicamentos. Actualmente a través del bosque se buscan formas alternativas de alimentación directas e indirectas para el hom-

bre. Para la utilización en diferentes industrias es muy importante también el aprovechamiento de los beneficios económicos que el residuo de la tala proporciona [Polis, 1986].

Como residuo fundamental de la tala de bosques se encuentra el follaje verde, que es la parte del árbol que menos se aprovecha en la actualidad. ¿Conoce el hombre toda

la composición química del follaje verde de especies forestales? En este trabajo nos propusimos realizar un estudio fitoquímico del *Eucalyptus* ssp. y el estudio cualitativo de la presencia de vitaminas en el follaje de esta especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Recolección y preparación de la muestra*

Entre abril y junio de 1994 se recolectaron muestras de follaje de la parte media inferior de árboles de *Eucalyptus* ssp. provenientes de una plantación ubicada en áreas cercanas al Instituto de Farmacias y Alimentos de la Universidad de La Habana (IFAL).

El follaje fue lavado una vez separado de la fracción leñosa; luego se conservó en el refrigerador hasta el momento de efectuar el análisis. A una parte del follaje recolectado se le realizó la extracción previa de aceite esencial por el método de hidrodestilación durante 2 h. El residuo y la otra parte del follaje fueron triturados hasta polvo mediante un molino con un tamiz de 2 mm.

### *Extracción y análisis de sustancias bioactivas*

Las muestras fueron sometidas a una extracción sólido-líquido con etanol a 98% por el método Soxhlet. Posteriormente a los extractos obtenidos se les realizó una reextracción líquido-líquido con éter de petróleo 80°-100° y agua (1:1). Cada extracto resultante se dividió en dos fracciones, y a una de cada una se

le ajustó el pH entre 8-10. El tamizaje fitoquímico se llevó a cabo mediante técnicas validadas en el Instituto de Investigaciones Forestales (IIF) y el Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). Los ensayos realizados para cada agrupación se ejecutaron de acuerdo con las técnicas establecidas por Miranda *et al.* (1992) y García (1994).

Las propiedades fisico-químicas –sólidos totales, pH, índice de refracción y densidad relativa– fueron determinadas según Chambrá *et al.* (1984). Las sustancias bioactivas –vitaminas liposolubles y provitamina  $\beta$ -carotenos– se determinaron cualitativamente por cromatografía de placa delgada, según Strohecker (1967), usando como fase estacionaria silicagel 60 F<sub>254</sub>, y como fase móvil una mezcla ciclohexano-éter dietílico (4:1). Se emplearon además patrones de referencia de las diferentes vitaminas, y para corroborar los resultados fueron usados cuatro reveladores diferentes: lámpara fluorescente UV, ácido fosfomolibdico a 10%, ácido sulfúrico (concentrado) y tricloruro de antimonio.

La determinación cuantitativa de  $\beta$ -caroteno se realizó por cromatografía de papel, con éter de petróleo 80°-100° como fase móvil y cuantificada por espectroscopía UV-visible a 452 nm con ayuda de la ecuación:

$$X = [C \cdot V \cdot 100 / m \cdot 1\,000 \cdot (100 - w)] \cdot 100$$

donde

C: Concentración determinada en UV.

m: Masa (g) aplicada al papel cromatográfico.

V: Volumen de éter usada para disolver el  $\beta$ -caroteno.

w: Humedad de la muestra; 100 y 1 000 son factores matemáticos para poder expresar el resultado (mg/100g).

Las cantidades de muestra y patrones aplicados fueron: vitamina A: 0,100 mL; vitamina D: 0,075 mL; vitamina E: 0,100 mL; y muestra: 0,050 mL. Los espectros para muestras y patrones fueron obtenidos en un espectrofotómetro Pharmacia LKB Ultraspecplus.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El follaje verde molido de *Eucalyptus* ssp. sin extracción previa de aceite esencial mantiene su coloración característica después de varios días de recolectado. El color verde claro y el olor característico del eucalipto están presentes; sin embargo, el follaje de *Eucalyptus* ssp. con previa extracción del aceite esencial cambia su coloración de verde a verde carmelitoso, y aunque el olor característico a eucalipto disminuye, aún se detecta. Estos cambios son lógicos, ya que, primeramente, durante el proceso de hidrodestilación (extracción de aceite esencial) el calor puede provocar el arrastre de ciertas sustancias o la degradación de otras, que como parte del follaje le imprimen cierta coloración; en segundo lugar, el aceite esencial eliminado del follaje es el que le imprime la fragancia característica a la mayoría de las plantas aromáticas.

Los extractos alcohólicos obtenidos, tanto para el follaje con extracción como sin extracción previa de acei-

te esencial, son de coloración verde oscuro intenso debido a la gran cantidad de sustancias presentes en la composición y que se han extraído.

En la *Tabla 1* aparecen los resultados para las propiedades físico-químicas de ambos extractos en dos condiciones diferentes de pH. El valor de la densidad relativa en el caso del pH ajustado es mayor que el de la densidad en la solución del pH sin ajustar. Esto puede deberse a que, al añadir base (NaOH a 30%), algunas sustancias saponifican y provocan un aumento en la densidad relativa. La presencia además de aceite esencial no influye en esta propiedad. Por su parte, los valores del índice de refracción no se ven afectados ni por la variación de la acidez ni por la presencia de aceites esenciales. En cuanto a los sólidos totales en ambas muestras, es decir, con aceite esencial o sin él, se observan diferencias en la determinación de diferentes valores de pH. Se considera que lo expuesto anteriormente se deba a que en el caso de los diferentes pH, cuando se añade base para ajustarlo, algunas sustancias pueden saponificar y formar compuestos poco volátiles que hacen que la variación de la masa sea menor. En los casos de las diferencias entre las muestras con aceite esencial y sin aceite, las causas deben estar dadas por la posible pérdida de algunos componentes durante el proceso de extracción de aceite. Obsérvese cómo el valor de sólidos totales en la muestra donde se ha extraído previamente el aceite esencial es menor con respecto al de la muestra donde no se ha extraído.

**TABLA 1**

**Propiedades físico-químicas del extracto alcohólico a partir del follaje verde de *Eucalyptus* ssp.**

Propiedad	Extracto con extracción previa de aceite esencial		Extracto sin extracción de aceite esencial	
	pH ácido	pH básico	pH ácido	pH básico
pH	4,8	9,0	4,6	10,0
Densidad relativa	0,8894	0,9902	0,9901	1,0402
Índice de refracción	1,366	1,318	1,369	1,352
Sólidos totales (%)	2,28	4,02	5,90	9,41

En el tamizaje fitoquímico se analizan diferentes grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos, de acuerdo con los métodos descritos y validados por el IIF y el IFAL. En la *Tabla 2* aparecen los datos correspondientes al extracto alcohólico con previa extracción de aceite esencial y sin extracción en las diferentes condiciones de acidez.

Como se observa, la presencia o no de aceite esencial no influye en los resultados, ya que para ambos casos, en igualdad de condiciones, estos son idénticamente iguales, excepto en el ensayo de Lieberman-Burchard para triterpenos y/o esteroides, donde la intensidad del color no es la misma, pero esto no es significativo. Además, el ensayo de Kedde es negativo en ambos casos, o sea, tanto en el extracto con aceite como en la muestra sin aceite esencial. No obstante, no se puede decir categóricamente que no haya presencia del metabolito, porque este tipo de análisis es muy sensible y las reacciones son bastante

selectivas; pero pueden existir interferencias de otros grupos o compuestos. La gama de productos naturales presentes en una planta puede ser muy variada y completamente diferente, aunque aún no han podido ser estudiados en su totalidad.

De todo lo anterior podemos deducir que por este método es posible detectar una serie de metabolitos secundarios en el extracto alcohólico de *Eucalyptus* ssp., ya que los ensayos indican la presencia de saponinas, aminoácidos libres, quinonas, triterpenos y/o esteroides, alcaloides y flavonoides. Específicamente este extracto contiene un alto contenido de saponinas, pues el ensayo realizado da intensamente positivo y la capa de espuma formada es alta y muy persistente. De igual forma, el análisis efectuado para determinar flavonoides es positivo, y ambos ensayos no se ven influidos por el pH del medio. Analicemos entonces cómo influye el pH en la identificación del resto de los grupos.

**TABLA 2**  
**Resultados del tamizaje fitoquímico para el extracto alcohólico**

Propiedad	Extracto con extracción previa de aceite esencial		Extracto sin extracción de aceite esencial	
	pH ácido	pH básico	pH ácido	pH básico
Espuma (saponinas)	+++	+++	+++	+++
Bortargen (quinonas)	++	+	++	+
Dragendorff (alcaloides)	+	+++	+	+++
Ninhidrina (aminoácidos libres)	+	+++	+	+++
Lieberman-Burchard (triterpenos y/o esteroides)	+ (verde oscuro)	+ (verde oscuro)	+ (verde)	+ (verde)
Shinoda (flavonoides)	+++	+++	+++	+++
Kedde (glicósidos)	—	—	—	—

Es lógico encontrar una disminución en la sensibilidad del ensayo para quinonas en medio básico, las que se descomponen con cierta facilidad en medio básico fuerte. En cuanto a la presencia de alcaloides a pH básico, es de esperar una señal alta debido a que se ven favorecidas las formaciones de sales. Los alcaloides poseen además en su núcleo un nitrógeno con ciertas características básicas. (Hay que tener en cuenta que los alcaloides son producidos por casi todas las partes de la planta, y que todas ellas y no todos los alcaloides son iguales. Es decir, no son los mismos alcaloides los que pueden encontrarse en las hojas

que los que pueden estar en la corteza o en la madera.

En relación con los aminoácidos, se aprecia que cualquier variación de pH puede influir en las reacciones que estos experimentan, o sea, una variación de la acidez del medio puede desplazar el equilibrio de reacción hacia la forma aniónica (pH básico) o hacia la catiónica (pH ácido) del aminoácido. Esto condiciona que la determinación de aminoácido libre cambie con la acidez del medio en un sentido o en otro. En la reacción de identificación con ninhidrina es necesario que el medio sea básico para la observación de la coloración azul.

La Fig. 1 corresponde a la placa cromatográfica revelada en la lámpara UV. Nótese la presencia de manchas que deben corresponder

a las vitaminas; pero este resultado no es categórico, por tanto es necesario realizar algunas otras pruebas.

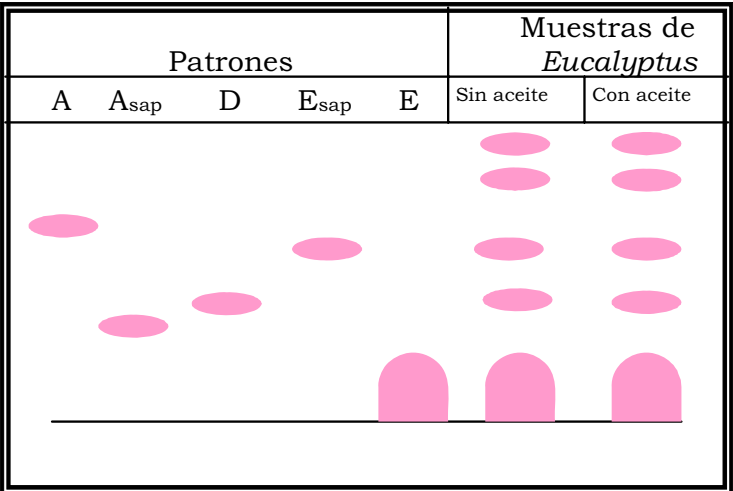


Fig. 1. Placa cromatográfica de silicagel 60 F<sub>254</sub> revelada en lámpara UV

En la Fig. 2 se muestra la placa cromatográfica revelada con ácido fosfomolibdico a 10%. En ella se observan manchas azules sobre fondo amarillo, y se puede además ver cómo las manchas grandes coinciden en R<sub>f</sub> con el succinato (tocoferol no saponificado), las cuales aparecen ahora en forma de diferentes manchas. También encontramos unas que no coinciden con ningún patrón y tienen un R<sub>f</sub> alto. Como era de esperar, no aparecen manchas que coincidan con el patrón de vitamina A, y sí existe una cercana en R<sub>f</sub> al patrón de vitamina D y otra coincidente en R<sub>f</sub> con el patrón de tocoferol saponificado.

Para comprobar estos resultados se utilizó otro revelador, tricloruro de antimonio (reactivo de Carr Price's) (Fig. 3), donde las distintas vitaminas reflejan colores diferentes al reaccionar con el reactivo. Los tocoferoles son amarillos, la vitamina D carmelita, la A es azul y el β-caroteno una provitamina (vitamina A en forma vegetativa). Por lo tanto, el azul claro al final de la placa pudiera ser el correspondiente a este último, pero no se dispone de patrones para su comprobación. Debido a esta duda nos apoyamos en otras técnicas específicas para carotenos y vitaminas.

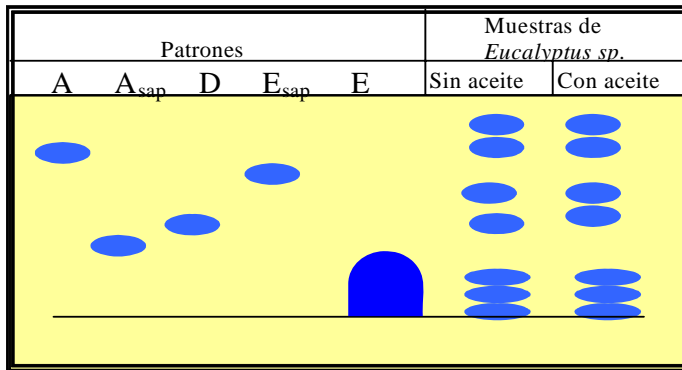


Fig. 2. Placa cromatográfica de silicagel 60 F<sub>254</sub> revelada con ácido fosfomolibdico a10%

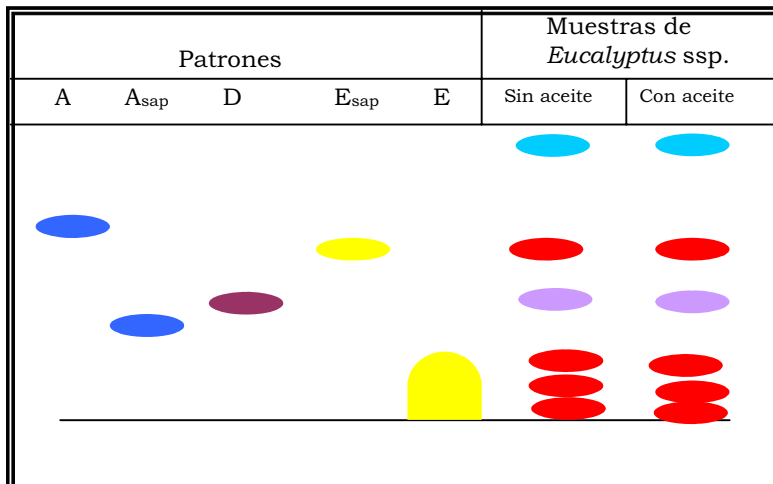


Fig. 3. Placa cromatográfica de silicagel 60 F<sub>254</sub> revelada con tricloruro de antimonio (SbCl<sub>3</sub>)

En las Figs. 4, 5, 6 y 7 aparecen los espectros UV de las vitaminas E, D y la muestra de *Eucalyptus ssp.* En ellos se puede ver que a 452 nm existe un máximo de absorción coincidente con el máximo de ab-

sorción del β-caroteno; pero para asegurar más la hipótesis de la existencia del β-caroteno y cuantificarlo, se realizó una cromatografía de papel con éter de petróleo como fase móvil (Fig. 8).

Obsérvese la coloración amarilla del frente del solvente correspondiente al  $\beta$ -caroteno. Su cuantificación por espectroscopía UV-visi-

ble a 452 nm, y mediante la expresión 1 de la sección de Materiales y Métodos, fue de 18,5 mg/100g de concentrado bioactivo.

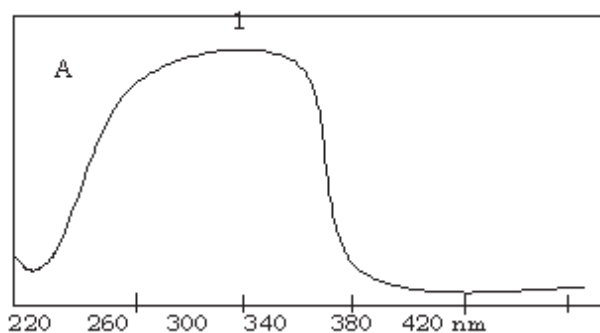


Fig. 4. Espectro UV-visible del patrón de vitamina D

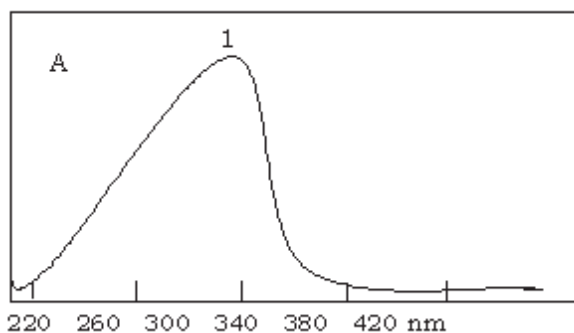


Fig. 5. Espectro UV-visible del patrón de vitamina E

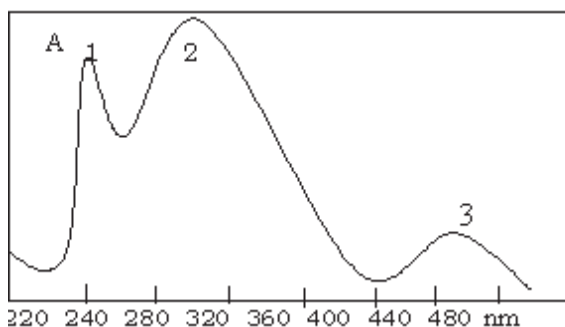


Fig. 6. Espectro UV-visible de la muestra de *Eucalyptus* ssp.



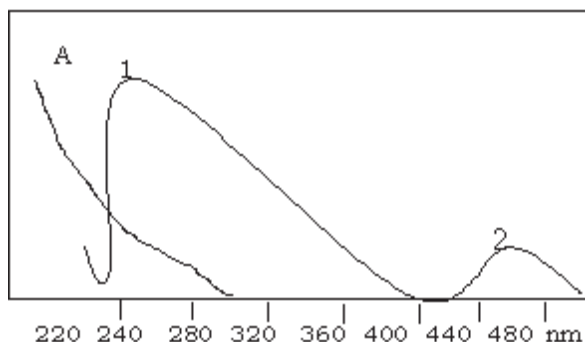


Fig. 7. Espectro UV-visible de la muestra de *Eucalyptus* ssp. después de la separación por cromatografía de papel

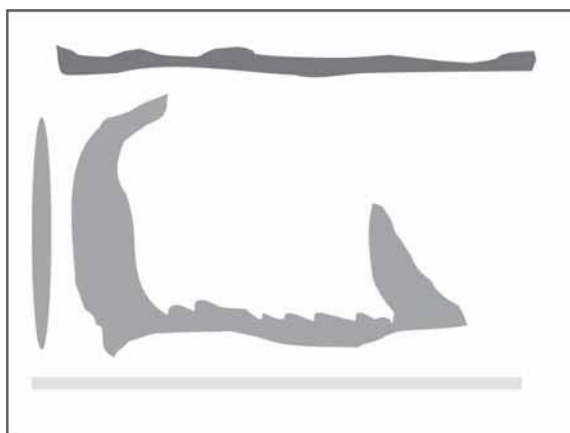


Fig. 8. Cromatograma de papel correspondiente a la separación de  $\beta$ -caroteno usando como fase móvil éter de petróleo

## CONCLUSIONES

- La extracción de aceite esencial no influye en la composición química cualitativa del follaje verde de *Eucalyptus* ssp.
- En el follaje de *Eucalyptus* ssp. podemos encontrar vitaminas E, D y  $\beta$ -caroteno.
- La gama de metabolitos secundarios presentes en el follaje de *Eucalyptus* ssp. es amplia, e incluye saponinas, aminoácidos libres, quinonas, alcaloides, triterpenos y/o esteroides, flavonoides, taninos, grasas y azúcares reductores.

- El valor de pH sí influye en la detección de algunos metabolitos.

## BIBLIOGRAFÍA

CHAMBRA, S. C.; F. C. VISO; E. N. MSHIN ET AL.: *Phytochemical Screening of Tanzania Medicinal Plants*, University of Dar es Salam, Tanzania, 1984, pp. 157-159.

GARCÍA, H.: *Metodología para análisis fitoquímico de especies forestales*, Documento interno, Insti-

tuto de Investigaciones Forestales, La Habana, 1994.

LINARES, E.: *Política forestal de Cuba*, La Habana, 1997.

MIRANDA, M.: *Manual de prácticas de laboratorio de análisis farmacognóstico*, IFAL, Universidad de La Habana, 1992, pp. 23-33.

POLIS, O.: *Uso del follaje verde en la URSS*, Asociación Científica Productiva Silva, Letonia, 1986.

STROHECKER, R.: *Análisis de vitaminas, métodos comprobados*, Ed. Paz Montalvo, 1967.