

ESTUDIO DEL RHAMNUS GOUDOTIANA

Resumen del Trabajo de Tesis presentado por JAIR GARCÍA para optar al título de Químico Farmacéutico, de la Universidad Nacional de Colombia.

Presidente de Tesis: Dr. ELBERTO GALVIS G.

INTRODUCCION

Al elaborar el presente trabajo, el fin que se persigue con ello, no es otro que el de contribuir de una manera modesta, al conocimiento de la inmensa riqueza de la flora colombiana.

La escogencia para este estudio, de la especie RHAMNUS GOUDOTIANA, se debe a que pertenece a un género cuyas especies como el Rhamnus purshiana (Cáscara Sagrada) y el Rhamnus frangulae (Frángula o Arraclán), son plantas de las cuales se obtienen drogas de uso en farmacia y no se hallan en la flora del país; siendo por tanto el deseo de dar a conocer, por medio de este estudio, las generalidades y componentes de esta planta, como una base para la adopción de la especie en calidad de sucedáneo de la Cáscara Sagrada y del Frángula.

En cuanto a su distribución geográfica en Colombia, personalmente se pudo constatar, al subir a los cerros cercanos a Bogotá, que la especie se encuentra en cantidad suficiente; en el Herbario Nacional Colombiano reposa gran cantidad de especímenes de esta especie de Rhamnus, recolectados en los bosques colombianos; por medio de la literatura consultada, se obtuvo conocimiento que la especie Rhamnus goudotiana, se extiende desde el Perú hasta Venezuela, en los bosques andinos; por consiguiente se consideró que la especie era merecedora de un estudio.

ESTUDIO BOTANICO

1. CLASIFICACION BOTANICA (1):

Tipo: Fanerógama.
Subtipo: Angiosperma.
Clase: Dicotiledónea.
Subclase: Dialipétala.
Serie: Disciflora.
Subserie: Isostemona.
Orden: Celastrales.
Familia: Rhamnaceae.
Género: Rhamnus.
Especie: Goudotiana.

La clasificación del género *Rhamnus* fue hecha por Linnaeus, Syst., ed. I. 1735. (*Rhamnaceae* A. L. de Jussieu, *Genera Plantarum*: 376. 1785). (2).

2. SINONIMOS (3):

Alaternus, Mil. Gard. Dict. ed. VI. 1752.
Ampeloplis, Rafin, *Sylva Tellur.*; 33. 1838.
Atulandra, Rafin. 1 c.: 31. 1838.
Atadinus, Rafin. 1. c.: 30. 1838.
Gervispina (Dill.) Moench. Meth.; 686, 1794.
Endotropis, Rafin. *Sylva Tellur.* 31. 1831.
Frangula. Tourn., ex Hall. Enum. Hevl. i: 164, 1742. et Mill Gard. Dict. ed. VI. 1752.
Forgerouxa, Neck., Elem. ii: 124. 1790.
Girtanneria, Neck., Elem. ii: 121. 1790.
Ettlingeria, Neck., 1. c.: 124. 1790.
Lithoplis, Rafin. *Sylva Tellur.*: 32. 1838.
Marcorella, Neck. Elem. ii: 122. 1790.
Paliurus, Tourn. ex Mill. Gard. Dict., ed. VI. 1752.
Perfonon, Rafin. *Sylva Tellur.*: 29. 1838.
Sarcaphalus, Rafin. 1. c. 1838.
Verlangia, Phil. in *Linnaea* 'XXVIII, 218. 1856.

3. DESCRIPCION BOTANICA DEL GENERO RHAMNUS:

Las *Rhamnaceas* son generalmente plantas leñosas con hojas simples estipuladas, peninervadas. Las flores son actinomorfas hermafroditas o por excepción unisexuales. Son tetrámeras o pentámeras. El

eáliz, la corola y el androceo son concrecentes en su base, de tal razón que van a formar una copa profunda y glandulosa, por lo menos en su parte superior. En el borde de la copa se separan los sépalos, los pétalos, muy pequeños y los estambres epipétalos. El ovario está libre en la copa (perigineo) o rara vez soldado (epigineo), es plurilocular y forma un óvulo apotropo. El fruto cuando es carnoso es una drupa.

Descripción botánica de la especie R. Goudotiana.

En el Index Kewensis se cita una descripción hecha por Triana et Planchon en Ann. Sc. Nat. (Ser. V, xvi; 379. 1872).

No se encontró en la literatura una descripción detallada de esta especie, pues la descripción que dan Triana et Planchon en el Prodrum Florae Novo-granatensis (5), es muy somera. Se anota también que en el Botanical Museum of Harvard University de Massachusetts y en el Pharmacy College of Massachusetts no existe descripción botánica acerca de esta especie.

En el Herbario Nacional Colombiano por fortuna se encuentra buena cantidad de especímenes, que fueron estudiados bajo la dirección del doctor J. M. Idrobo, para sacar la descripción siguiente:

El *Rhamnus goudotiana* se presenta como arbustos de 1-2 mts., hasta árboles de 7 mts. de alto; generalmente muy ramosos, corteza gris más bien lisa y cinérea, transversalmente fisurada, casi siempre cubierta de líquenes y musgos. En los sitios muy secos su altura no alcanza más de 3 mts., pero en los lugares húmedos de los bosques puede llegar a alcanzar hasta unos 7 mts. de altura (fide Elbert L. Little Jr.). Las ramillas terminales, son diminutamente tomentosas hacia el ápice con diámetro de 3 mm.

Hoja: las hojas son alternas, simples estipuladas. Lámina foliar algo brillante por la haz y opacas más pálidas por el envés, delgadas, cartacias, rígidas; algunos especímenes jóvenes tienen hojas densamente pubérulas por el envés, escasamente pubérulas en los nervios laterales y costa media; los pecíolos son diminutamente tomentosos, como las ramillas y yemas foliares, densamente vellosos.

Las nervaduras laterales generalmente tienen de 17-20 nervios, excepcionalmente de 15-20 nervios, algunos curvos ascendentes; prominentes por el envés e impresos por la haz; presentan reticulación de los nervios terciarios y cuaternarios, diminuta pero conspicua en el envés. Las láminas son generalmente elípticas, pero a veces se encuentran angostamente elípticas hasta oblongas, con un tamaño promedio de 3.8 cm. de largo y 1.8 cm. de ancho; con base obtusa y ápice cuspidado y algu-

nas veces diminutamente micronado; el borde de la hoja es entero, algo revoluto en seco, inconspicuamente serrulado.

Flor: las flores son bisexuales, de una hasta tres, axilares en las ramillas terminales con pedicelos pubérulos hasta el hipantio, con una longitud de 1 mm. en la flor en botón, hasta 10 mm. en la flor adulta, con diámetro de 0.5 - 0.6 mm.

El hipantio es pubérulo con 1 mm. de alto por 1.5 - 2 mm. de ancho, con cinco lóbulos del cáliz triangulares, gruesos, de 2 mm. de largo, 1.5 mm. de ancho en la base, glabros o escasamente pilosos por fuera, completamente glabros por dentro, valvados. Pétalos cinco alternos con los lóbulos del cáliz, blancos o rojizos, cortamente unguiculados orbiculares con escotadura en el ápice, de 1.3 mm. de largo, naviculados, encerrando cada uno un estambre y estos como consecuencia en igual número.

Los filamentos estaminales tienen una longitud de 0.8 mm., más anchos en la base y arrancan del borde del disco del hipantio. Las anteras se presentan biloculares introsas, longitudinalmente dehiscentes, oblongas de 0.6 mm. de largo. Ovario súpero globoso, glabro, cubierto por el hipantio, trilobular (en tres flores examinadas), con carpelos unilobulados y placentación basal. El estilo es grueso de 1 mm. de largo, con estigma trilobular.

Fruto: el fruto es drupáceo de color rojo al madurar, esférico de cinco mm. de diámetro, trilobo, con un pedicelo de 10 mm. de largo y 0.5 - 0.6 mm. de ancho, remanente al hacer un corte transversal del hipantio. Carpelos en número de tres, con semillas en cada lóculo.

La semilla posee un endosperma copioso y embrión recto con radícula corta.

Esta especie colombiana de *Rhamnus goudotiana*, difiere de las otras especies conocidas hasta ahora en los Andes, por los pedicelos delgados de sus frutos, que son de tres a cinco veces más largos que los pecíolos de las hojas.

DISTRIBUCION GEOGRAFICA EN COLOMBIA:

Para este estudio, se examinaron 16 especímenes existentes en el Herbario Nacional Colombiano. El tipo nomenclatural de esta especie según los autores, se coleccionó en los alrededores de Bogotá y posiblemente está depositado en el Herbario de París o en otro herbario europeo, ya que este espécimen no se encuentra en las colecciones del Herbario Nacional Colombiano. La especie se ha encontrado desde Venezuela hasta el Perú en los bosques andinos.

En cuanto a Colombia, de acuerdo con el libro "Formaciones Vegetales de Colombia" (6), publicado por el Departamento Agrológico del

Instituto "Agustín Codazzi", informan que el desarrollo de esta especie de *Rhamnus*, se efectúa en la región de "Bosque muy húmedo, Montano Bajo", que abarca gran área de las montañas colombianas, cuya extensión aproximada es de 45.218 kms. cuadrados. Esta región presenta como condiciones climáticas generales, una temperatura aproximada entre 18-20 grados centígrados y un promedio anual de lluvias de 2.000 - 4.000 mm. Normalmente se extiende en una capa altimétrica de 2.000 - 4.000 mts. sobre el nivel del mar.

La especie se ha coleccionado hasta ahora en el Departamento de Cundinamarca, en la Sabana y zonas aledañas, principalmente en los cerros de Monserrate y Guadalupe, a una altura sobre el nivel del mar comprendida entre 2.750 - 3.300 mts.

En el Departamento del Huila, se coleccionó, en la Cordillera Oriental, sitio "Divide", al final del extremo norte (Campo La Tabanera), a una altura de 3.000 mts. sobre el nivel del mar.

RECOLECCION, DESECACION Y DESCRIPCION GENERAL DE LA CORTEZA

El material para este estudio del *Rhamnus goudotiana* se recolectó en el Departamento de Cundinamarca, Macizo de Bogotá, vertiente sobre la calle 63 de Bogotá. Por ser el arbusto poco ramificado, puede descortezarse fácilmente (lo cual se hizo con la mano), obteniéndose así la corteza tanto de las ramas como del tallo, en pequeños trozos que se secaron en una estufa a 40 grados centígrados durante cuatro horas. La corteza se presenta tanto seca como fresca de color gris, más bien lisa y cinérea, transversalmente fisurada, cubierta de líquenes y musgos; los trozos de corteza procedentes de ramas jóvenes, son por fuera lisos. La cara interna es casi del todo lisa, o finamente estriada a lo largo y de color amarillo pálido. Con los álcalis toma color rojizo. La fractura transversal es fibrosa y de color amarillo o amarillento. La corteza de este *Rhamnus goudotiana* es de sabor amargo.

Caracteres anatómicos de la corteza:

La corteza está cubierta de una gruesa capa de súber, de color rojizo (que también se nota raspando ligeramente la superficie de la corteza entera). El tejido restante, está formado por parénquima que contiene abundantes drusas de oxalato de calcio; se encuentran también esparcidas entre las células del parénquima, grupos de fibras lignificadas; estas

fibras presentan en su contorno, hileras de células cristalíferas, cada una de las cuales contiene un cristal aislado.

En el parénquima de la corteza se encuentran pocos granos de fécula, estos son muy pequeños y redondeados.

Caracteres del polvo:

El polvo se presenta de color pardo amarillento, de olor característico y sabor amargo.

Examen microscópico del polvo:

Para observar los elementos existentes en el polvo, se hicieron las preparaciones en hidrato de cloral al 10% ; los elementos que caracterizan la corteza del *Rhamnus goudotiana* son los siguientes:

Restos de súber de ordinario pardo rojizo, restos de parénquima cortical; fibras esclerenquimáticas. Fibras lignificadas cristalíferas, a cual se pone de manifiesto, con la adición de floroglucina y ácido clorhídrico; asimismo se encuentran cristales ortorómbicos y monoclinos de oxalato de calcio, aislados. Solo se encuentran pequeñísimas cantidades de fécula, en forma de granitos muy pequeños y redondeados, que ordinariamente se reconocen después de la adición de lugol. Como característica del polvo aparecen en gran cantidad y aisladas, células con contenido oscuro.

Reacciones micro-químicas del polvo:

Para la identificación del polvo, además de los estudios microscópicos, pueden emplearse reacciones micro-químicas de sus componentes principales. Los derivados antraquinónicos se obtienen por micro-sublimación y se presentan como diminutos cristalitos amarillos que se colorean de rojo cuando se tratan con una gota de lejía potásica al 5%.

ANÁLISIS QUÍMICO

Para el estudio de los componentes químicos del *Rhamnus goudotiana*, se utilizó el material seco, recolectado con anterioridad, el cual tenía ya ocho meses de almacenamiento. Los análisis químicos efectuados fueron los siguientes:

Análisis cualitativo:

Los análisis se encaminaron a la determinación de los derivados antraquinónicos presentes en la corteza, para esto se utilizó la reacción de Borntraeger (7).

Glicósidos antraquinónicos:

La presencia de estos se investigó en el hidrolizado igualmente mediante la reacción de Borntraeger (7).

Investigación de antranoles:

Se efectuó siguiendo la técnica de Fairbairns (8). Comparando los análisis hechos de antraquinonas libres, heterósidos antraquinónicos y antranoles, se encontraron coloraciones en el mismo orden: rosado, rojo cereza y rojo oscuro, lo que indica que se encuentran en el material estudiado, antraquinonas libres, heterósidos antraquinónicos y antranoles.

Como solventes orgánicos para la extracción de los principios activos se utilizaron éter y cloroformo, presentando el éter un mayor poder extractor, que el del cloroformo, ya que no los retiene, cuando se agitan posteriormente los extractos con la S. R. amoniacaal.

Análisis cuantitativo:

Para la ejecución de este análisis, se aprovechó la propiedad que tienen los derivados antraquinónicos de formar fenatos con los álcalis, los cuales son coloreados, y así, se pueden determinar colorimétricamente en un electro-fotómetro. Para este análisis se procedió de acuerdo con el método de Tschirch, de Daels, modificado por Maurin (9).

Para el análisis de la corteza del *Rhamnus goudotiana*, como no se poseía sustancia patrón, ni se consiguió en el comercio, se procedió a aislarla, a partir del ruibarbo comercial, por el procedimiento de auto-hidrólisis de Charaux Brydell (7).

Una vez obtenido el ácido crisofánico se procedió a realizar con él, en solución de potasa al 5%, una curva colorimétrica patrón.

Primeramente se elaboró una curva de estabilidad del color desarrollado, por derivados antraquinónicos, en la potasa al 5%. Así se preparó una solución que contenía 50 gamas/cc. de ácido crisofánico, en solución potásica, haciendo lecturas cada cinco minutos, durante una hora; estas lecturas se hicieron en el espectrofotómetro Coleman Junior, a una longitud de onda de 500 mu. siendo esta, a la cual, la solución coloreada del derivado antraquinónico, presentó su mayor poder de absorbancia.

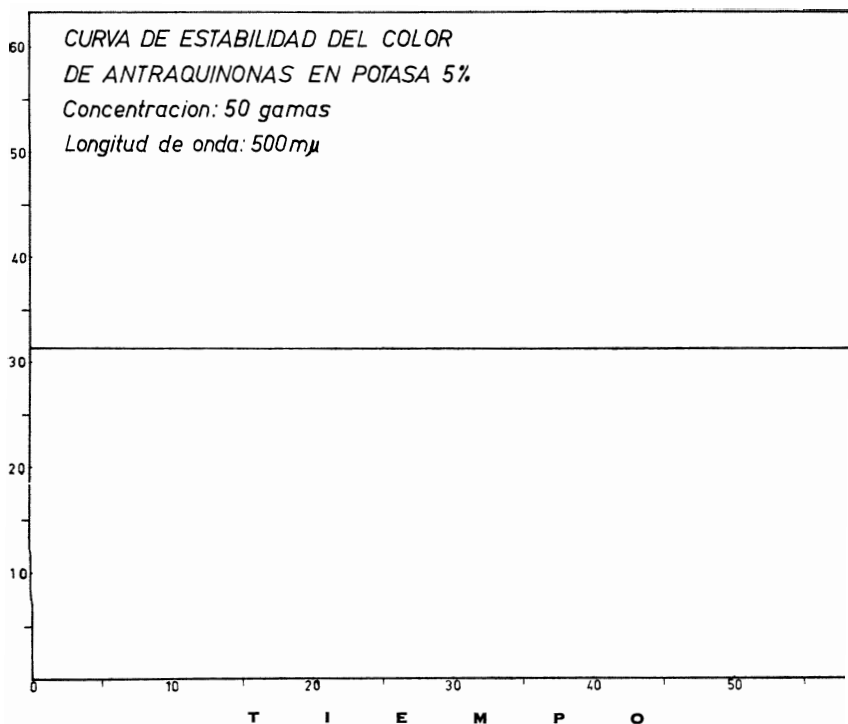


Gráfico número 1

Graficando, sobre papel milimetrado, se obtuvo una recta, paralela al eje de las abscisas, lo cual nos demuestra que este color es estable. (Figura N^o 1).

Habiendo establecido de esta manera, que el color desarrollado por los derivados antraquinónicos, en potasa al 5%, es estable, se procedió a la elaboración de una curva de calibración para antraquinonas. Para tal efecto, se prepararon soluciones del ácido crisofánico en potasa al 5%, que contenían 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 gamas/cc y se hicieron las lecturas en el espectrofotómetro Coleman Junior, a longitud de onda de 500 m μ . y graficando en papel milimetrado, se obtuvo una recta de 45 grados de pendiente, la cual constituye la curva patrón para el ácido crisofánico. (Figura N^o 2).

Teniendo la curva patrón, se aplicó al polvo de la corteza de *Rhamnus goudotiana*, el mismo método de análisis colorimétrico de Tschirch, de Daels, modificado por Maurin (9), para analizar su contenido, de una manera cuantitativa en derivados antraquinónicos, y por extrapolación en la curva colorimétrica patrón, expresar estos como ácido crisofánico.

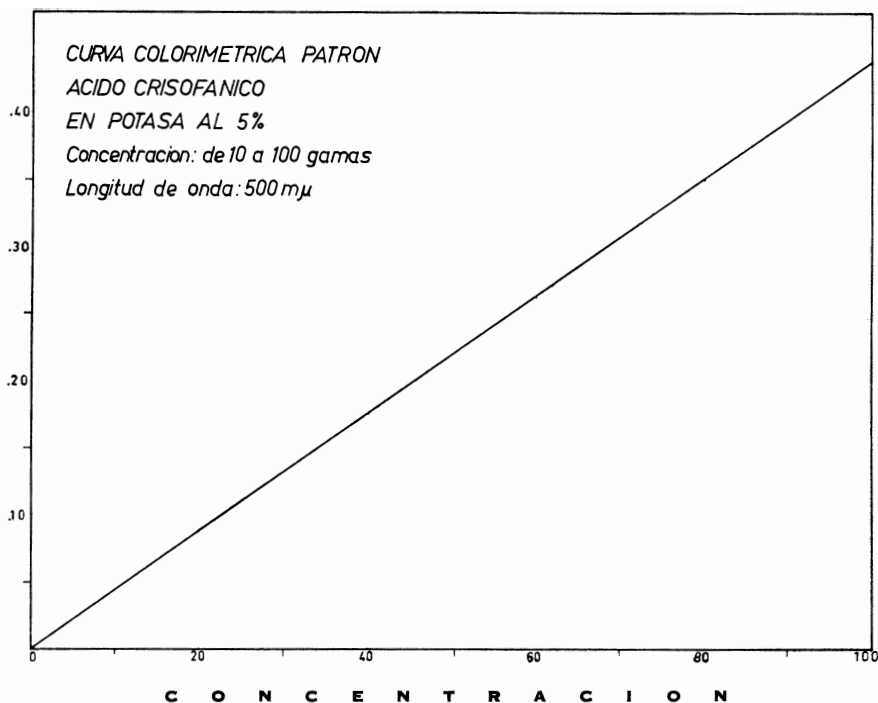


Gráfico número 2

La aplicación de este método se hizo, a una muestra exactamente pesada de 0.5 gramos de polvo de corteza de *Rhamnus goudotiana*, la lectura se hizo en el espectrofotómetro Coleman Junior, a una longitud de onda de 500 μ . Por extrapolación en la curva patrón, se calculó un contenido de antraquinonas totales de 2.04%, expresadas como ácido crisofánico.

Para determinar el contenido de antraquinonas libres, en la corteza, antes de hidrólisis se pesaron exactamente 0.5 gramos de polvo de corteza, y se efectuó una extracción completa de ellas con cloroformo; obtenida la solución clorofórmica, se continuó el procedimiento indicado en la segunda parte del método de análisis de Tschirch, de Daels, modificado por Maurin (9). Efectuada la lectura en el espectrofotómetro Coleman Junior y extrapolando en la curva de calibración, se calculó un contenido de antraquinonas libres, antes de hidrólisis, de 1.13%, expresadas como ácido crisofánico.

Los análisis efectuados se hicieron, sobre varias muestras y los resultados que se indican a continuación son los promedios:

Antraquinonas totales	2.04%
Antraquinonas libres	1.13%
Heterósidos antraquinónicos (calculados por diferencia).	0.91%

ANALISIS CROMATOGRAFICO

El método usado para el análisis cromatográfico del extracto de la droga, fue básicamente el de William A. Meer, Rolf S. Westby y Walter Sirgo (11), para la identificación y evaluación de extractos botánicos por cromatografía sobre papel. Se prepararon varias tiras de papel para cromatografía, Whatman N° 1, de 30 cm. de largo y 4 cm. de ancho. A 3 cm. del borde de cada tira se colocaron 0.5 cm. de la solución clorofórmica que contenían los derivados antraquinónicos libres y combinados del *Rhamnus goudotiana* y ácido crisofánico patrón, las tiras de papel fueron expuestas al aire para secarlas.

Se introdujo solvente en la cámara hasta una altura de 2.5 cm.; se cerró herméticamente dejándola saturar durante la noche.

Las tiras fueron transferidas, a la cámara saturada con el solvente, el tiempo de recorrido fue de dos horas. Después de secarlas, se reveló el cromatograma con S. R. amoniacal, apareciendo una coloración rosada. Se hicieron doce determinaciones, diferentes, con igual tiempo de desarrollo, obteniéndose un Rf. promedio de 0.95. Los valores del Rf. encontrados fueron los mismos para el patrón y el problema coincidieron con los obtenidos en el trabajo cromatográfico del *Aloe-Aloina* y de la *Cáscara Sagrada*, realizado por Nouri y Mary Bernard V. Christensen y Jack L. Beal (12).

Se efectuaron otras cromatografías en condiciones similares pero utilizando papel Whatman N° 3. El Rf. encontrado es idéntico al valor obtenido por T. J. Betts, J. W. Fairbairns y V. K. Mital (13), en sus trabajos cromatográficos en Antraquinonas y sus Heterósidos, utilizando papel Whatman N° 3.

CONCLUSIONES

1. Queda establecido que el *Rhamnus goudotiana* colombiano estudiado, es una especie que encierra la morfología general del género *Rhamnus*. Esta especie se diferencia de las otras conocidas en los bosques andinos, por tener los pedicelos de sus frutos, de 3-5 veces más largos que los peciolo de las hojas.

2. Quedan definidos los elementos histológicos presentes en la corteza del *Rhamnus goudotiana*, por medio de los cuales se puede identificar microscópicamente.
3. El análisis cualitativo, en base de la reacción de Borntraeger, confirma la presencia en la corteza del *Rhamnus goudotiana* colombiano, de los derivados oxi-metilantraquinónicos, tanto en la forma libre como en la forma de heterósidos antraquinónicos.
4. Se encuentran antranoles, según la reacción de Fairbairns.
5. El análisis cuantitativo, expresa un contenido en la planta, de un 2.04% de antraquinonas totales, 1.13% de antraquinonas en estado libre y 0.91% de heterósidos antraquinónicos.
6. Los análisis cromatográficos especifican que el derivado estable oxi-metilantraquinónico existente en la planta, es el ácido crisofánico.
7. De acuerdo con su contenido en antraquinonas, previo un estudio farmacológico, puede pensarse en adoptar la corteza del *Rhamnus goudotiana*, como droga, en reemplazo de la Cáscara Sagrada y del Frángula.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como fin desarrollar los siguientes puntos:

- 1º Estudio botánico del *Rhamnus goudotiana*, observando su relación morfológica con la del género *Rhamnus*, determinando así específicamente su clasificación botánica y distribución geográfica en Colombia.
- 2º Reconocimiento de los elementos histológicos que constituyen la corteza del *Rhamnus goudotiana* e identificación de sus principales componentes, los derivados antraquinónicos.
- 3º Análisis de los derivados de oxi-metilantraquinónicos, en la corteza del *Rhamnus goudotiana*.

BIBLIOGRAFIA

1. WESTTSTIN, R. "Tratado de Botánica Sistemática", 4 ed., págs. 573 y 786, Madrid y Buenos Aires, Editorial Labor S. A., 1944.
2. DARWIN, R., HOOKER, J. D. "Index Kewensis", *Plantarum Phanerogamarum*, 1 ed., Vol. 11, pág. 702, Londres. Tipografía Académica, 1895.

3. DARWIN, R., HOOKER, J. D. "Index Kewensis", Plantarum Phanerogamarum, 1 ed., Vol. 11, pág. 701, Londres. Tipografía Académica, 1895.
4. LEMEE, A. "Dictionnaire Descriptif et Synonymique des Plantes Phanérogames", Vol. V, págs. 782-783, Brest, Imprimerie Commerciale et Administrative, 1934.
5. TRIANA, J. et PLANCHON, J. E. "Prodromus Florae Novogranatensis", Vol. III, pág. 379. (Fotocopias tomadas de Ann. Sci. Nat. V. Bot. 14, 1872).
6. ESPINAL, L. S., MONTENEGRO, M. L. "Formaciones Vegetales de Colombia", Memoria explicativa sobre el mapa de Colombia, 1 ed., pág. 150, Bogotá, D. E. Imprenta Rotograbado, 1963.
7. Anales Fac. de Feia. Universidad de Chile (Tesis de Químicos Farmacéuticos), XII, 113 - 120 (1960).
8. SHELLARD, E. J. "Practical Chemistry for Pharmacy Students", 1 ed., pág. 50. Londres, Spottiswoode - Ballantyne and Co. Ltd., 1957.
9. GORIS, AL., LIOT, A. et JANOT, M. M., GORIS, AN. "Pharmacie Galénique", 3 ed., Vol. 1, págs. 221-222, Paris, Masson et Cie. Editeurs, 1949.
10. LEBEAU, P., JANOT, M. M. "Traité de Pharmacie Chimique", Vol. 11, pág. 1118, Paris, Masson et Cie., Editeurs, 1955-56.
11. J. Pharm. Sciences, 51, 756 (1962).
12. J. Ann. Ph. Ass., 45, 229 (1956).
13. J. Pharm. and Pharmacol., 16, 436-441, (1958).