



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

Facultad de Química-Farmacía.

Trabajo de Diploma

*Título: "Avances en el estudio fitoquímico del extracto acuoso de *Capraria biflora* L".*

*Autor: Annalay García Castellón.
Daimy Salas Aguilar.*

Tutores: MSc. Liliana Vicet Muro.

MSc. Dulce M. González Mosquera.

Lic. Dany Siverio Mota.

VC
SANTA CLARA

2005-2006

"AÑO DE LA REVOLUCION ENERGETICA EN CUBA"



Resumen

La actividad antiinflamatoria de una fracción n-butanólica obtenida a partir del extracto acuoso de la *Capraria Biflora* .L fue evaluada empleando la técnica del edema plantar inducido por Dextrano en ratones. La fracción fue administrada a dosis única de 200, 150, y 100 mg/Kg. de peso. Empleando indometacina como control positivo. La fracción evaluada disminuyó el efecto inflamatorio particularmente a dosis de 200mg/Kg. de peso. De esta manera la fracción n-butanólica puede ser considerada la fracción bioactiva del extracto, aunque no puede descartarse la presencia de otros compuestos antiinflamatorios en la otra fracción del extracto. En la investigación se inicio el estudio cromatográfico de la fracción bioactiva y fraccionamiento logrando reconocer la presencia de compuestos tipo flavonoides aunque no pudo asignarse ninguna estructura en específico.

En los últimos años el estudio de las plantas medicinales ha ganado una importancia creciente, la investigación se ha dirigido fundamentalmente hacia el conocimiento de las plantas usadas popularmente con fines medicinales, con el propósito de hacer evaluaciones analíticas, tecnológicas, toxicológicas, aislamiento de principios activos y otros estudios.⁽¹⁾

El resurgimiento de los medicamentos a partir de fuentes naturales ha mostrado los grandes valores terapéuticos de muchas plantas. El amplio uso que actualmente tienen las plantas medicinales, no solo se debe a problemas económicos, sino que además, de tener un efecto terapéutico, son menos nocivas que los fármacos sintéticos.⁽¹⁾

La *Capraria biflora* L. o esclaviosa, como también se le conoce en Cuba, es una hierba silvestre muy común en toda la isla. En nuestro país es muy conocida, principalmente, por sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y diuréticas, lo cual ha despertado gran interés en las investigaciones con esta planta medicinal. Es por ello que el departamento de Química- Farmacia de la Universidad Central, "Marta Abreu", de las Villa ha dedicado los últimos años a la investigación de esta planta. Teniendo en cuenta las pesquisas realizadas y los resultados obtenidos anteriormente, se ha decidido continuar dicha investigación proponiendo los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

- Contribuir al estudio químico- farmacéutico del extracto acuoso obtenido a partir de las hojas de la *Capraria biflora* L.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Determinar a partir del extracto acuoso la fracción bioactiva con efecto antiinflamatorio, evaluando experimentalmente su actividad farmacológica.
- Caracterizar cromatográficamente los componentes mayoritarios presentes en la fracción bioactiva.

1.1. SCROPHULARIACEA INFORMACIONES GENERALES.

Scrophulariaceae. es un familia de aproximadamente 220 géneros y unas 3000 especies, suelen ser herbáceas anuales o perennes o bien subfructuosas y en pocas ocasiones árboles, algunas semiparásitarias. Las flores suelen ser zigomorfas y los estambres reducidos a cuatro. Son caracteres anatómicos, los pelos glandulosos en los que las glándulas están divididas solamente por membranas verticales y los estomas rodeados por tres o mas células epidérmicas. Entre los géneros más conocidos de la familia están *Verbascum* con 306 especies, *Calceolaria* de unas 300 a 400 especies, *Linaria* con unas 150 especies, *Digitalis* de 20 a 30 especies entre otros. ⁽²⁾ En los jardines son muy populares muchas plantas de esta familia, como por ejemplo *Antirrhinum*, *Digitalis*, y *Verbascum*. Como malas hierbas se encuentran *Verónica*, *Euphrasia*, así como *Linaria*. Otras plantas de los géneros como *Mimulus*, *Penstemon*, *Hebe*, y *Calceolaria* se cultivan como ornamentales, mientras que las del grupo *Digitalis* son cultivadas para la producción de drogas. ⁽³⁾

1.1.1 Antecedentes químicos de la familia Scrophulariaceae.

Las especies *Digitalis purpurea* y *D. Lanata* son los más importantes y conocidas de la familia; debido a la presencia en sus hojas de heterósidos cardiacos, así como la existencia de cardenolidos, en las tres especies de *Isoplexis* incluidas también en el género *Digitalis*. Existen otros compuestos presentes en esta familia, tal es el caso de las saponinas, esteroides triterpenoides, y heterósidos cianogénicos en la especie *Linaria*. También se encuentran en la familia heterósidos de aucubina, naftaquinonas y antraquinonas, auronas e iridoides. Los alcaloides no son muy comunes pero se encuentran algunas especies de tipo monoterpenoide, quinazolina y quinazolidina. Evans refiere también investigaciones con otros géneros, así relaciona trabajos realizados con *Digitalis Ciliata* (glicósidos cardiacos), *Penstemon eriantherus*, *Odontites verna*, *Verbascum saccatum* (glucósidos iridoides), *Verbascum Thapsiforme*. *V. Phlomoide* (flavonoides), *Digitalis spp* (agliconas flavonoides), *Digitalis lanata* (antraquinonas). ⁽²⁾

1.2 GÉNERO CAPRARIA.

El género de *Capraria* comprende cinco especies, *Capraria peruviana*, *Capraria lanceolata*, *Capraria semiserrata*, *Capraria . mexicana* y *Capraria biflora* L. de la cual estaremos haciendo referencia.⁽⁴⁾

Capraria biflora es conocida con variados nombres en diferentes partes del mundo: esclaviosa, escabiosa, magüiro, majuito, viuda (Cuba)⁽⁵⁾, té del país en Puerto Rico, escobo en Colombia, en México es conocida como claudiosa; coat-weed en EUA⁽⁶⁾ fregosa en Venezuela; en Martinica se conoce como the d'Amérique; the du pays en Guadalupe y chá-de-Calcada en Brasil.⁽⁷⁾

Esta planta es un pequeño arbusto común en terrenos calcáreos y cercanías de las costas.⁽⁵⁾ No es endémica de Cuba pero puede encontrarse en casi toda la isla. También puede localizarse desde Bahamas y el Sur de la Florida, pasando por la Indias Occidentales, hasta Suramérica; y desde el Norte de América Central hasta el noroeste de México.^(5, 6) es una planta silvestre, común que se mantiene en floración y fructificación durante todo el año, automultiplicándose continuamente ya que las semillas que caen provocan el surgimiento de nuevas plantas que sustituyen a las viejas.^(5, 8, 9)

1. 2. 1. Composición química de *Capraria biflora* L.

Poco se conoce de la composición química de esta planta en especial del extracto acuoso. En 1998, Tejeda⁽¹⁰⁾ realizó un tamizaje fitoquímico para las hojas desecadas a la sombra y obtuvo una composición variada de metabolitos, donde pudo inferir la presencia de: lípidos, esteroides, saponinas, aminoácidos, alcaloides, quinonas, flavonoides, antocianidinas, taninos, compuestos fenólicos y azúcares reductores.

Investigaciones realizadas a la planta por Burkill⁽¹¹⁾ han demostrado la existencia, en las hojas y las raíces de esta especie, de un compuesto color rosa llamado biflorina, al cual se le atribuyen propiedades antibióticas y antibacterianas por su acción frente bacterias Gram.-positivas, así como una considerable acción fungicida por su resistencia a algunas especies de levaduras.^(12, 13, 14) Esta sustancia se clasifica como una naftoquinona muy soluble en acetona y un poco menos en alcohol especialmente cuando es diluido con agua. Sin embargo, la aplicación de *Capraria biflora* L. en la medicina popular

particularmente como antiinflamatorio, no se corresponde necesariamente con las propiedades antimicrobianas de la biflorina. ^(8, 15)

Morais y colaboradores, cuantificaron a través del Método de Folin-Denis, por espectrofotometría UV-visible, los taninos presentes en un té obtenido por infusión de toda la planta. Se reportó un valor de 335.17 mg por cada 100 gramos de droga ⁽⁶⁾.

Un estudio realizado por el Departamento de Química de la Universidad de las Indias Occidentales, Jamaica, plantea el aislamiento de cuatro nuevas estructuras isoméricas de sesquiterpenoides de las partes aéreas de la *Capraria biflora* L. En el mismo se determinaron cuatro caproriolides A (1), B (2), C (3), D (4) por espectroscopía RMN. Se realizaron estudios insecticidas para estos compuestos para determinar su potencia contra el gorgojo del boniato (*Cylos formicarius elegantulus*). Dos de estos compuestos 1 y 2 presentan efectos de mortalidad dosis dependiente en los gorgojos adultos. ⁽¹⁶⁾

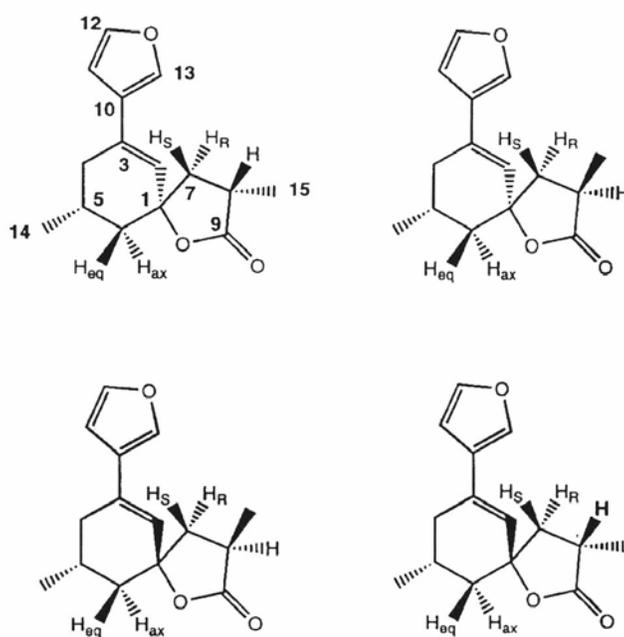


Figura 2. Estructuras sesquiterpenoides.

1.2.2. Composición inorgánica de *Capraria biflora* L.

Es conocido que en la composición de las drogas de origen vegetal, además de los metabolitos secundarios una parte importante son los minerales e iones metálicos, lo cuales pueden ser constituyentes específicos del vegetal o aparecer producto de la contaminación de los suelos, aguas, fertilizantes, etc. Según los reportes de la literatura, la planta es rica en potasio (K) (225 mg por cada 100g) sodio (Na) (52.50 mg por cada 100g), magnesio (Mg)(198.92 mg por cada 100g) y calcio (Ca) (112.07 mg por cada 100g), lo cual fue determinado en muestras del té y en solución ácida de las cenizas por espectrofotometría de absorción atómica (Ca y Mg) y fotometría de llama (Na y K). Además se aplicó la espectrofotometría de absorción molecular, para cuantificar la presencia de aluminio (Al) (12.77 mg por cada 100g) y hierro (Fe) (0.25 mg por cada 100g). También en la planta se destacan valores relativamente elevados de iones cloruro (218.33 mg por cada 100g) y en número menos significativo se muestran los iones fosfato (88.35 mg por cada 100g). Al té obtenido de la planta se le realizó también el análisis de los metales potasio, sodio, calcio y magnesio dando como resultado 8, 0.97, 15 y 76.44 mg por cada 100g respectivamente. ⁽⁶⁾

En la caracterización inorgánica realizada por Tejeda 1998 ⁽¹⁰⁾, a las hojas de la planta, se obtienen valores elevados de los iones: potasio, magnesio, calcio y sodio, lo cual coincide con el estudio efectuado por los investigadores brasileños reportado anteriormente. También se encontraron altos valores de hierro y zinc. Todo ello resulta ventajoso si tenemos en cuenta que estos son cationes muy comunes y se requieren para muchas reacciones enzimáticas en el organismo. ^(17, 18)

1.3.1 Principales usos atribuidos a *Capraria biflora* L.

Se le han reportado varios usos a esta especie por su empleo como antiespasmódico, tónico digestivo, antidiarreico, hipotensor y vermífugo; se recomienda además en caso de flatulencia, parasitosis, malestar estomacal, así como en problemas del tracto urinario por

su efecto diurético ⁽¹⁹⁾, Delens lo reporta también para el tratamiento de la fiebre provocada por la malaria y como tranquilizante. ^(20, 21)

Se le han reportado otras aplicaciones como en el dolor de oído, hemorroides, tos, reumatismo, en problemas hepáticos y por acción tónico fortificante general. ^(21, 22) Además se aplica en la neumatosis y como astringente en las heridas. ⁽⁵⁾

Es usada con mucha frecuencia en varios países del área centro y sur americana. Como por ejemplo, en Panamá y Colombia la toman como té nacional; en Yucatán la utilizan en baños o loción en las afecciones ováricas y uterinas, en la leuco y gonorrea, y en la diabetes. ⁽⁷⁾ En Perú se emplea para el tratamiento del asma bronquial como planta sintomática por su acción como descongestionante local y disminución del estado de ansiedad, permitiendo un mejor efecto terapéutico de otras plantas curativas o de sostén. En Brasil a partir de la raíz, se preparan tinturas antisépticas que se aplican en forma de compresas y lavados como tratamiento local y preventivo ⁽⁸⁾ además se utiliza en forma de pomada en el tratamiento de heridas infectadas. ^(23, 24)

El té preparado a partir de las hojas es empleado para el lavado de los ojos, para aliviar la comezón e la piel y como tónico general. Puede tener resultados en el tratamiento del estupor y la parálisis. Una infusión de esta parte de la planta puede ser empleada, además, en el tratamiento de la migraña, cólicos, etc. ^(24, 21, 11)

Unas de sus aplicaciones más interesantes y quizás las mas usadas en nuestro país, resulta ser su utilización para aliviar los dolores menstruales, para la recuperación post-parto, duchas y lavados vaginales y para la eliminación de las inflamaciones pélvicas. ⁽⁷⁾

1.3.2 Partes útiles de la planta.

Se reporta como parte útil de la planta la raíz, las hojas, el tallo y toda ella en su conjunto. ⁽⁵⁾

1.3.3 Precauciones

A dosis elevadas *Capraria biflora* L. puede producir debilidad general, sueño, rigidez hasta llegar a la parálisis muscular. Se presenta una especie de embriaguez con vértigo lo cual se atribuye a su acción depresora sobre el Sistema Nervioso Central. ^(6, 7)

Cuando se administra a altas dosis la decocción de las hojas de la planta actúa sobre el sistema nervioso central, provocando efectos estupefacientes y depresivos. ⁽²⁵⁾

Como vermífugo no se debe utilizar muy concentrado porque puede producir parálisis. Al respecto, se prepara usando 2 o 3 cogollos, los cuales se cocinan y el extracto se sirve para curar la diarrea y los resfriados. Otra manera de prepararlo es cocinando treinta gramos de hojas y flores en un litro de agua, dejando hervir por diez minutos. Según indicaciones del autor Delens ⁽²⁰⁾ es recomendable enfriar un poco y tomarlo tibio tres tazas al día.

Aunque debemos señalar que en estudios realizados anteriormente los resultados entran en contradicción con lo planteado por la literatura; donde quedo claramente demostrado que el nivel de excitación alcanzado por los animales distaban mucho de semejarse siquiera a un estado depresivo. Además se realizó un ensayo de toxicidad límite del extracto acuoso obteniéndose evidencia que dicho extracto no posee efectos tóxicos graves a dosis menores a 2000mg/Kg. de peso. ⁽²⁷⁾

1.3.4 Antecedentes del estudio farmacológico.

Investigaciones realizadas por Loy y colab (2003) ⁽²⁸⁾, demostraron que un extracto acuoso obtenido a partir de la *Capraria biflora* L. posee efectos antiinflamatorios a dosis de 200 mg/Kg. de peso comparable a la indometacina 10 mg/Kg. de peso. El estudio fue realizado utilizando el Test del edema plantar inducido por Carragenina se observa en el grafico 1, donde se ve un aumento progresivo de la inflamación hasta la 4 horas; en los grupos tratados previamente con 50, 100 y 200 mg/Kg. de peso del extracto acuoso la disminución del edema fue de 38.75, 35.96 y 27.94 % respectivamente a partir de las 5 horas. Mostrándose actividad antiinflamatoria a dosis de 100 y 200 mg/Kg. de peso,

pudiendo ser responsable este tipo de metabolito del efecto antiinflamatorio mostrado por la planta.⁽²⁹⁾

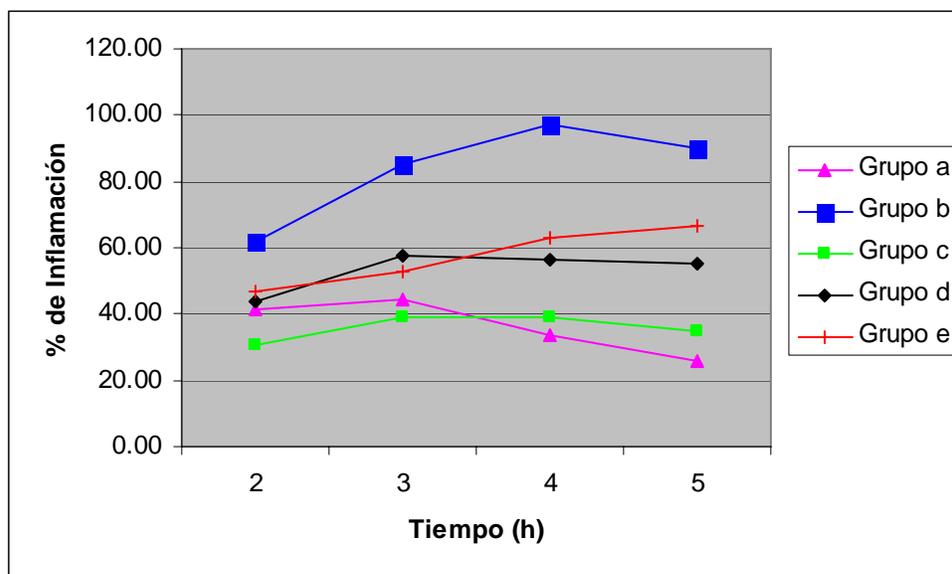


Gráfico 1. Efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de *Capraria biflora L.*

También mostró efectos analgésicos aunque en una menor medida, a una dosis de 100mg/Kg. de peso, comparándolo con el ácido acetil salicílico.⁽³⁰⁾

El aislamiento y la evaluación farmacológica de un crudo de flavonoides obtenido del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Capraria biflora L.*, son reportados por Medinilla y Ramos en el año 2000.⁽³¹⁾ La extracción del material vegetal fue realizado por maceración a través de mezclas hidroalcohólicas (etanol/agua), en proporciones (9:1) y (1:1), a temperatura ambiente, lavando posteriormente con cloroformo y acetato de etilo. Mediante este método se logró el fraccionamiento de los componentes, obteniéndose los flavonoides concentrados en la fracción de acetato de etilo.

1.4 INFLAMACIÓN

1.4.1 Fisiología de la inflamación. Mediadores celulares.

El proceso inflamatorio es complejo el cual envuelve una serie de fenómenos que pueden ser desencadenados por varios estímulos: agentes infecciosos, isquemias, interacciones

antígeno-anticuerpo, lesión térmica o provocada por otros agentes físicos. Cada estímulo manifiesta un patrón característico de la respuesta que está acompañada, generalmente, de signos clínicos como eritema, edema, hiperalgesia y dolor.⁽³²⁾

Varias de estas sustancias activan enérgicamente al sistema macrofágico y en pocas horas los macrófagos comienzan a fagocitar los tejidos destruidos.⁽³³⁾ Otras sustancias endógenas como los autacoides (incluyen a los eicosanoides) también están implicados en la respuesta inflamatoria. Se forman a partir de algunos ácidos grasos polinsaturados de veinte átomos de carbono, principalmente ácido araquidónico, y agrupa: prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI₂), leucotrienos (LTs), tromboxanos (TXs) y los fosfolípidos modificados, representados por el factor activador plaquetario (FAP).⁽³⁴⁾ (Fig. 1, Anexo 1)

Los eicosanoides son prevalentes y han sido detectados en casi todos los tejidos del cuerpo, su producción aumenta en respuesta a varios estímulos provocando diversos efectos biológicos y sus precursores están ampliamente distribuidos. El ácido araquidónico está esterificado a los fosfolípidos de las membranas celulares y a otros lípidos complejos. Las hormonas y otras sustancias aumentan la biosíntesis de los eicosanoides interactuando, probablemente, con receptores ligados a la membrana plasmática, que están acoplados a proteínas reguladoras ligadas al GTP (proteína P). Esto resulta de una activación directa de las fosfolipasas (C y/O A₂) o elevando las concentraciones citosólicas de Ca²⁺ que también puede activar esas enzimas. Algunos estímulos físicos parecen causar un flujo de calcio alterando la membrana celular y de esta forma, activando la fosfolipasa A₂, con posterior liberación de ácido araquidónico donde una parte es metabolizada rápidamente a productos oxigenados por varios sistemas enzimáticos, incluyendo las ciclooxigenasas, una de las varias lipooxigenasas o citocromo P-450. En la vía de la ciclooxigenasas, la primera enzima es la sintetasa de los endoperóxidos de las PGs conocidas como ciclooxigenasa de los ácidos grasos (COX). Este enzima posee dos isoformas: COX-1 y COX-2. La COX-1 se expresa constitutivamente por la mayoría de las células, mientras que la COX-2 no es encontrada en condiciones normales, puede ser inducida por algunos factores séricos, citocinas y

factores del crecimiento. Las ciclooxigenasas tienen actividades diferentes: una actividad de sintetasa de los endoperóxidos y una peroxidasa que convierte a la PGG en PGA, las cuales son inestables y pueden ser transformadas por reacciones enzimáticas en varios productos: PGI, TXA, PGE, PGF o PGD.

La PGE₂ y PGI₂ aumentan la formación del edema y la infiltración leucocitaria, facilitando el flujo sanguíneo para la región inflamada, además potencia la actividad analgésica de la bradicinina y de otros autacoides. ⁽³⁴⁾

La acción de las PGs es consecuencia de su interacción con diversos receptores específicos localizados en las membranas celulares y asociados a proteínas G, denominándose de acuerdo con la PG natural por la que muestran mayor afinidad. ⁽³⁵⁾

Por otra parte, la vía de la lipooxigenasas (LOXs) compuesta por enzimas citosólicas que catalizan la oxigenación de los ácidos grasos poliénicos en los correspondientes hidroperóxidos lipídicos que difieren en su especificidad. En el caso del ácido araquidónico los metabolitos son denominados ácidos hidroxiperoxieicosatetraenólicos (HPETE), siendo intermediarios inestables y son metabolizados por varias enzimas. La 5-lipooxigenasa sintetiza el 5-HPETE, que posibilita la síntesis de los leucotrienos.

Los productos obtenidos por la ruta metabólica que involucra la actividad de la 5-lipooxigenasa formados y liberados por neutrófilos, eosinófilos y macrófagos convenientemente estimulados, son los más involucrados en la respuesta inflamatoria. El LTB₄ ejerce una poderosa acción quimiotáctica que favorece la concentración de neutrófilos, su desgranulación, agregación y adherencia a las paredes postcapilares, produciendo además hiperalgia. Los LTB₄, LTC₄ y LTE₄ aumentan la permeabilidad vascular y la exudación plasmática. Los receptores de los leucotrienos admiten un receptor común LTD₄ / LTE₄, su activación estimula la fosfolipasa C modulando la producción de inositolfosfato como la movilización de Ca²⁺ y la génesis de metabolitos del metabolismo del ácido araquidónico con funciones de segundos mensajeros intracelulares. ⁽³⁶⁾

1.4.2 Posibles Metabolitos responsables de la acción antiinflamatoria del Extracto acuoso de *Capraria biflora L.*

En la literatura se han referido como posibles metabolitos responsables de la actividad farmacológica de la planta, a los flavonoides, lípidos, alcaloides y taninos, teniendo en cuenta las propiedades antiinflamatorias y analgésicas que pueden presentar los mismos. ^(16, 37) A continuación se muestra un resumen con los posibles metabolitos responsables de la actividad antiinflamatoria.

Alcaloides: son bases nitrogenadas con gran variación en su estructura molecular. Posee sabor amargo y un pH alcalino en solución acuosa. Tienen la función de regular el crecimiento de la planta y de su protección. Por vía oral son bien absorbidos y se metabolizan por el hígado. Las dosis tóxicas y terapéuticas se encuentran bien próximas. Los efectos que presentan son diversos: antiinflamatorio, citotóxico, hipotensor, antiespasmódico, broncodilatador, y otros. ^(38, 39)

Taninos: son compuestos fenólicos (polifenólicos) de estructura variable. No son bien absorbidos por el tubo digestivo debido a su alto peso molecular. Presentan actividad astringente, causando una sensación desagradable en la boca y la lengua cuando son administrados por vía oral. Son protectores de la planta. Poseen algunos efectos como antiséptico, antidiarreico, antiinflamatorio, antihemorrágico, etc. No poseen toxicidad a altas dosis, pero pueden causar daños en el tubo digestivo pudiendo provocar cólicos abdominales. ^(38, 39) El efecto de una fracción de taninos a partir de *Myracrodruon urundeuva* fue demostrado realizándose en test del edema plantar por Dextrano donde se vio una inhibición de la inflamación de 29.7%, 42.7% y 54.5% a las 2, 3 y 4 horas respectivamente demostrando así que la fracción de taninos (10 mg/kg de peso) inhibe significativamente los eventos inflamatorios. ⁽⁴⁰⁾

Flavonoides: Medicinalmente, poseen propiedades de fortalecimiento de los capilares sanguíneos, así como mejorador de las funciones de oxigenación de los tejidos; estos compuestos son cardiotónicos, hemostáticos y también antiinflamatorios. ^(38, 39) Este efecto antiinflamatorio demostrado por los flavonoides puede atribuirse a su capacidad

antioxidante así como a la inhibición de las enzimas lipoxigenasa y cicloxigenasa responsable de la síntesis de eicosanoides, metabolitos altamente implicado en los procesos inflamatorios. Recientemente fue demostrada la actividad de un tipo de flavonoide las proantocianidinas a la cual se le realizó un test antiinflamatorio donde se pudo apreciar que el compuesto causó una inhibición significativa en el edema plantar inducido por Carragenina al 1%, destacando que esta actividad solo se observó a 200 mg/kg de peso ⁽⁴¹⁾

Saponinas: son derivados terpénicos que agitados en el agua producen espuma semejante al jabón, reduciendo así la tensión superficial de esta. Son unos excelentes emulsivos. Se encuentran frecuentemente en las plantas medicinales. Existen dos tipos de saponinas: esteroidales y triterpénicas. En las plantas actúan en la germinación e inducen la floración. Presentan efectos como diuréticos, expectorantes, mucolítico, antiséptico y antiinflamatorio, relajan el intestino e incrementan las secreciones de las mucosas bronquiales, fluidifican estas y facilitan la expectoración. Por vía parenteral pueden provocar, en altas dosis, hemólisis y necrosis; por vía oral son bien absorbidas. ^(38, 39)

Fenoles: se les engloban muchas veces entre las sustancias aromáticas, pues pertenecen a un grupo de sustancias de efectos, y a menudo también de aroma, muy característicos. Medicinalmente, los fenoles liberan *hidroquinona*, una sustancia altamente eficaz como antiséptico y antiinflamatorio del aparato urinario ^(38, 39)

Ácidos grasos: entre los numerosos ácidos grasos conocidos en las plantas se encuentran los polinsaturados tipo omega 3, que juegan un papel importante como agentes antiinflamatorios y protectores a nivel cardiovascular. Su actividad antiinflamatoria, anticoagulante, vasodilatadora y astringente le confiere importancia en la prevención de la hipercolesterolemia. ⁽⁴²⁾

Los taninos son compuestos polifenólicos aromáticos de sabor amargo. Se plantea que tanto los hidrosolubles como los condensados ⁽¹⁹⁾ poseen una potente acción astringente y antiinflamatoria, reforzada esta última, por sus propiedades antirradicálicas y capacidad antiproteasa. Los medicamentos elaborados a partir de taninos a bajas concentraciones

actúan superficialmente y protegen los tejidos vivos en caso de inflamación de membranas y mucosas, y a los pulmones de la ocurrencia de catarros y bronquitis. ^(43, 44)

1.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Para la determinación de la actividad antiinflamatoria se llevan a cabo dos tipos de técnicas: las técnicas generales, dentro de las cuales se encuentran los modelos de inflamación aguda y los modelos de inflamación subcrónica o crónica, y las técnicas específicas donde se incluye la determinación de la actividad antiinflamatoria mediante la bolsa de aire en ratas, la peritonitis inducida por carragenina, la actividad ciclo-oxigenasa y la permeabilidad capilar incrementada por histamina. ⁽⁴⁵⁾

1.5.1 Técnicas generales.

1.5.1.1 Modelos de inflamación aguda.

A Edema plantar por carragenina: una hora después de la administración del extracto o principio puro, del grupo control negativo y del grupo control positivo se administra una solución de carragenina en solución salina fisiológica en la aponeurosis planta del ratón. El grupo control negativo solo recibe el vehículo y el grupo control positivo recibe Indometacina como agente antiinflamatorio. El volumen de la pata inyectada es medido antes y después de la inyección de carragenina, en un pletismometro de agua o por un pie de rey. El porcentaje de inhibición de la reacción inflamatoria de la carragenina, se calcula en la fase aguda, a las 1, 2, 3,5 y 7 horas de la inyección de la misma. Pueden emplearse otros agentes irritantes, tal es el caso del Dextrano. ^(45, 46)

B Edema auricular: se basa en la aplicación de 12-Tetradecanoil Forbol-13 Acetato (TPA) en unión con el producto en estudio, en caso de que la solubilidad lo permita, en la oreja del ratón. Transcurrida 4 h, los animales son sacrificados por dislocación cervical y se le corta una porción en la oreja inflamada e idénticamente otra de la oreja no

inflamada. La media aritmética de las diferencias entre el peso de ambas porciones da la magnitud del edema de cada lote. El fármaco de referencia es la Indometacina. ⁽⁴⁵⁾

2.1 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

2.1.1. Recolección y selección.

El material vegetal se recolectó en zonas rurales cercanas a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas y en el municipio de Santo Domingo, en el mes de Enero de este curso. Comprendió ejemplares que se encontraban en estado de floración y fructificación, se realizó en horas tempranas de la mañana tomando partes aéreas de la planta. Se procuró dejar ramas suficientes para no afectar el desarrollo normal de las plantas, teniendo en cuenta que esta es una especie perenne. Posteriormente se trasladaron en bolsas de nylon hasta el laboratorio de Química – Farmacéutica y Farmacognosia, donde se procedió a la selección de las hojas como material de interés, eliminando las materias extrañas y otras especies de plantas o impurezas mecánicas que pudieran presentarse.

2.1.2. Secado y molinado.

El secado fue realizado mediante calor artificial, utilizando estufa marca Thelco modelo 70 durante una semana, aproximadamente y extendiendo las hojas en capas delgadas sobre bandejas metálicas a una temperatura de 30 °C, tal y como se especifica por Fernández y González en el 2001.⁽⁴⁷⁾

Transcurrido este tiempo, la droga fue triturada en un molino de cuchillas de 5 pulgadas, marca Chisty & Norris, en el Laboratorio de Biomédicas del Centro de Investigación Agropecuario, obteniéndose con el mismo un tamaño de partícula de 1 mm.

2.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO

El material vegetal seco y molinado (70g) se extrajo con 437,5ml de agua dejando reflejar durante 2h a 70°C en un baño de agua marca (Heidolph). Este procedimiento fue repetido 4 veces hasta lograr el completo agotamiento de la droga. Los extractos acuosos así obtenidos fueron reunidos y evaporados hasta sequedad en un rotoevaporador marca (Heidolph).

El extracto seco fue pesado en una balanza analítica marca Boeco Germany (de 0.1mg, máx. 210g) y calculado el % de extracción.

2.2.1. Evaluación fitoquímica del extracto acuoso.

La composición fitoquímica del extracto acuoso se realizó a través de técnicas de tamizaje fitoquímico según la metodología establecida por el Manual de prácticas de laboratorio de Farmacognosia y siguiendo las especificaciones de la literatura especializada ^(2, 48). Se evaluó la presencia de saponinas, carbohidratos reductores, flavonoides, taninos, alcaloides, ácidos grasos y aminoácidos.⁽⁴⁹⁾

2.3 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ACUOSO.

2.3.1 Obtención de la fracción n-butanólico.

El extracto acuoso obtenido según la metodología descrita en el acápite 2.1 se redisuelve en 50ml de agua, con el fin de fraccionarlo mediante una extracción líquido- líquido con 50ml de n-butanol, el proceso fue repetido 7 veces hasta extracción exhaustiva; luego de finalizar el procedimiento descrito las fracciones n-butanólicas fueron reunidas y filtradas sobre sulfato de sodio anhidro y posteriormente concentrado a sequedad en un rotoevaporador [©] Heidolph; la fracción acuosa fue desechada. La fracción n-butanólica obtenida como extracto seco fue pesada en una balanza analítica marca Boeco Germany.(de 0.1mg, Máx. 210g) y calculado el porcentaje de extracción.

El diagrama de flujo del fraccionamiento se muestra en la figura 2.1

2.4 CARACTERIZACION DE LA FRACCION N-BUTANÓLICA.

2.4.1 Evaluación fitoquímica de la fracción n-butanólica.

Se evaluó la presencia de saponinas, carbohidratos reductores, flavonoides, taninos, alcaloides, ácidos grasos y aminoácidos. ⁽⁴⁹⁾ Siguiendo la metodología empleada en el acápite 2.2.1.

2.4.2 Evaluación cromatográfica.

Con el fin de evaluar la complejidad de la fracción n-butanólica, obtenida según la metodología descrita en el acápite 2.3.1, esta fue sometida a un análisis cromatográfico por cromatografía de capa delgada, (CCD) empleando placas de sílica gel 60° (TLC 20 x 20 cm) marca MERCK, cámara cromatográfica (CAMAG), y revelado a la luz UV en una lámpara marca (CAMAG) a una landa de 254 nm y con ácido sulfúrico concentrado; como revelador universal y vapores de amoníaco como revelador específico para flavonoides.

Se emplearon en el estudio dos fases móviles:

- FM_I: Diclorometano: Metanol (85:15).
- FM_{II}: Acetato de etilo: Metanol (85:15) ;(80:20).

2.5 EVALUACION DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LA FRACCIÓN N-BUTANÓLICA.

Par la evaluación de la actividad antiinflamatoria de la fracción n-butanólica obtenida de *Capraria biflora L.* se empleo el Test del edema plantar inducido por Dextrano. ⁽⁵⁰⁾

- **Animales de experimentación:** se utilizaron ratones Balb/C, heterogéneos de 16 – 26 g de peso, adaptados durante 48h a las condiciones del laboratorio. Los animales se mantuvieron bajo un ciclo alterno de luz y oscuridad cada 12h. Después del periodo de adaptación los animales se distribuyeron en los diferentes grupos de acuerdo a sus pesos corporales, el alimento les fue retirado 18h antes de los tratamientos y se les suministro agua ad libitum.

Todos los procedimientos fueron realizados según lo aprobado por los comités internacionales para el cuidado de los animales de laboratorio y de acuerdo con las regulaciones nacionales establecidas para la experimentación animal.

- **Tratamientos:** La fracción n-butanólica de *Capraria biflora L.* compuesto en estudio, fue suspendido en solución acuosa de Tween 80 al 2%, evaluándose a dosis de 100, 150 y 200 mg/Kg. de peso. Como grupo control positivo se utilizó Indometacina 10 mg/Kg. de peso disuelta en bicarbonato de sodio al 5% y como grupo control negativo se empleó una solución acuosa de Tween 80 al 2%. Como agente irritante se aplicó Dextrano en solución acuosa al 1%. Las sustancias fueron pesadas en una balanza analítica marca (Boeco Germany.) y preparadas momentos antes de la administración (Tabla 1).

Tabla 1 Diseño del estudio del edema plantar inducido por Dextrano.

Grupos	Nivel de Dosis (mg/Kg)	Nivel de Dosis (ml/Kg)	Números de animales
A Ctrol (+) Indometacina	10	10	6
B Ctrol (-) Tween 80	10	10	6
C Ext n-butanolico 200 mg/Kg	200	10	6
D Ext n-butanolico 150 mg/Kg	150	10	6
E Ext n-butanolico 100 mg/Kg	100	10	6

- **Descripción de la técnica:** Se midieron los volúmenes normales de la pata derecha posterior de los ratones con pie de rey (Mitutoyo), se realizaron cinco réplicas (con un coeficiente de variación menor del 4%). Posteriormente se realizaron las administraciones (vía oral) de las sustancias, control positivo, control negativo y la fracción n-butanólica a las dosis descritas en la Tabla 2.1, utilizando para ello cánulas especiales y un volumen de 10 ml/kg de peso.

El edema plantar fue inducido por una inyección subcutánea en la aponeurosis plantar derecha del animal con Dextrano (0,1ml de una suspensión al 1% en agua). Los volúmenes de la pata inflamada se midieron a las 2, 3, 4, 5, 6 y 7 horas después de comenzada la experiencia. El porcentaje de inflamación a cada tiempo fue calculado mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{Inflamación} = \frac{X_{\text{problema}} - X_{\text{control}}}{X_{\text{control}}} * 100$$

Donde:

- X_{problema} : volumen de la pata inflamada en el tiempo.
- X_{control} : volumen normal de la pata.

2.5.2. Análisis estadístico.

La evaluación estadística fue realizada usando Kruskal-Wallis y Mann-Whitney, utilizando el paquete estadístico SPSS.

2.6 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LA FRACCIÓN N-BUTANÓLICA.

2.6.1 Separación por cromatografía de columna.

Se tomó 1ml de la fracción n-butanólica y fue separada en columna cromatográfica abierta empleando sílica gel 60 como fase estacionaria y diclorometano: metanol (85: 15) como fase móvil. Se procedió a un flujo de, aproximadamente, 1 ml/min, tomando muestras de 3 ml para un total de 50 muestras. Las fracciones fueron combinadas en

nueve grupos 1-9, en base al perfil cromatográfico en CCD, en las siguientes condiciones: placas de sílica gel 60° (TLC 10 x 10 cm) marca MERCK, cámara cromatográfica (CAMAG); como solvente se empleó acetato de etilo: metanol (85:15) y el revelador fue ácido sulfúrico concentrado y luz UV en una lámpara marca (CAMAG) a una londa de 254 nm.

2.6.2 Separación por cromatografía de Capa Delgada Preparativa (CCDp).

Con el objetivo de separar y purificar los compuestos mayoritarios de la fracción bioactiva (n-buatnólica) y considerando los resultados obtenidos en la separación por columna se realizó una cromatografía CCDp, utilizando como fase móvil acetato de etilo : metanol (80:20) y como fase estacionaria sílica gel. Se punteó la fracción bioactiva en forma de franjas, ya una vez corrida la CCDp en la fase móvil antes mencionada .La muestra testigo se reveló a la luz UV en una lámpara marca CAMAG a una londa de 366 nm y con ácido sulfúrico (cuidando que la otra parte no se contamine con este último revelador) una vez definidas las franjas, se procedió a su raspado con mucho cuidado. Posteriormente cada una de estas fueron lavadas 10 veces con metanol y filtradas.

Este procedimiento fue repetido 4 veces con el objetivo de obtener una mayor cantidad de muestra.

Una vez obtenidas las 6 fracciones correspondientes a cada franja (F 1-6), estas fueron evaluadas cromatográficamente por CCD y unidas según su perfil cromatográfico reagrupadas en tres fracciones A (1-3), B (4), C (5-6) a las cuales se les realizó una cromatografía CCD donde se comparó con cuatro patrones de flavonoides: Hesperidina (PH), Naringenina (PN₁), Naringina (PN₂) y Quercetina (Q).

2.6.2.1 Análisis Espectrofotométrico UV visible de las fracciones obtenidas en la CCDp.

Los flavonoides presentan una banda más o menos intensa a 200-270nm y otra de mayor intensidad a mayor longitud de onda de 300-400. ⁽⁵²⁾ Dados los resultados en la CCD para las fracciones B y C fueron analizadas espectrofotometricamente con el fin de compararlas con tres patrones de flavonoides: Hesperidina (PH), Naringenina (PN₁) y la

Naringina (PN₂); empleando un Espectrofotómetro marca Genesys 10 uv con cubetas QS 10.00mm.

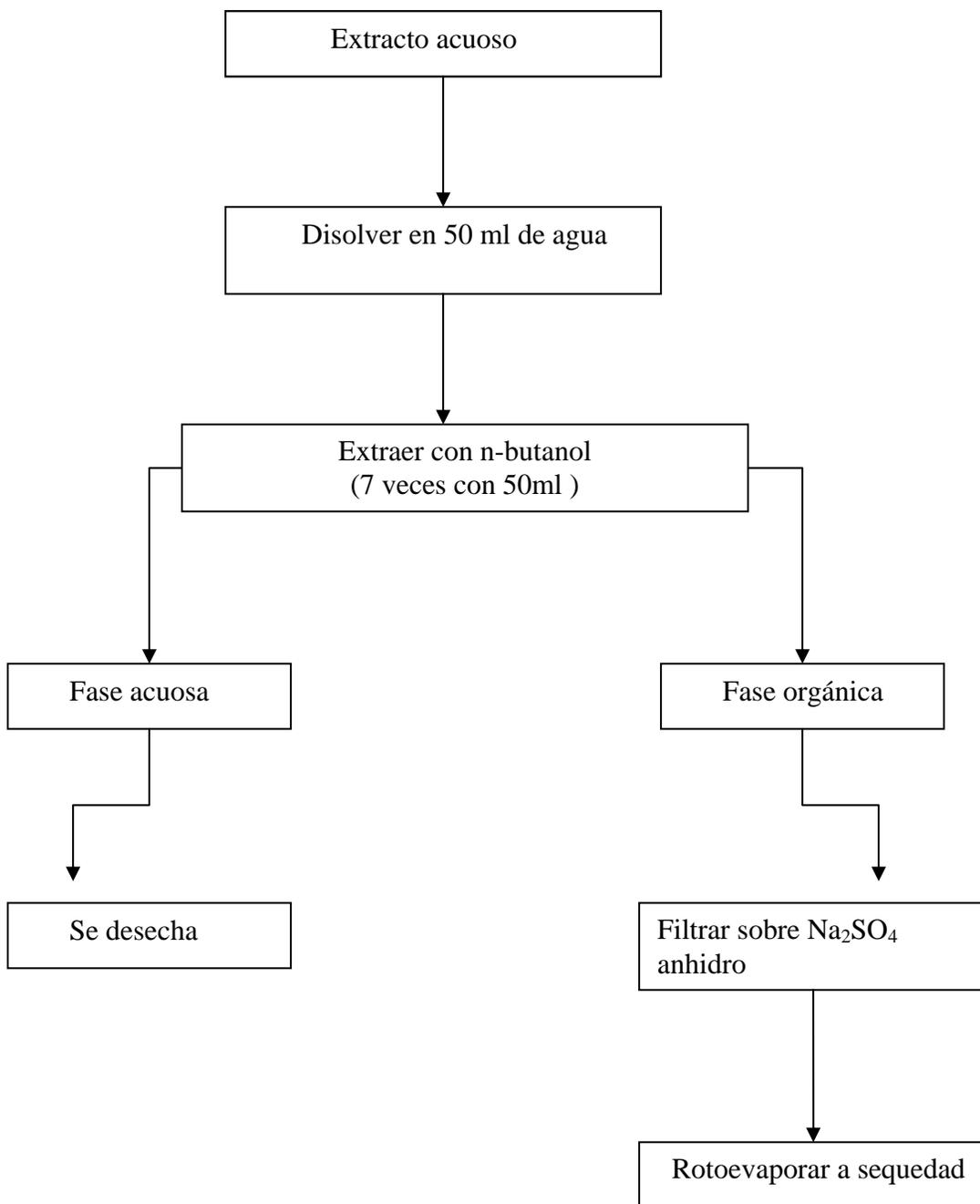


Fig. 2 Metodología de obtención de la fracción n-butanólica

3.1 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

La evaluación de las características macromorfológicas y organolépticas del material vegetal secado y molido coinciden con las establecidos por Tejeda en 1998 ⁽¹⁰⁾ y con las reportadas por la literatura para esta especie vegetal ⁽³⁰⁾. El material seco y molido fue almacenado en bolsas de polietileno, temperatura menor de 30°C y en desecadora; condiciones descritas por Hernández Martínez (1999). ⁽⁴⁹⁾

3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO

Como resultado del proceso extractivo se obtiene un extracto de color carmelita rojizo intenso, característica que coincide con los obtenidos por otros métodos reportados en estudios anteriores ^[48]. El extracto rindió un residuo de 28 g para un rendimiento de 40% en la extracción, cuantitativamente similar al alcanzado por soxhlet (41%), y superior al logrado por maceración (34%), infusión (10%) y decocción (15%). ⁽¹⁰⁾

3.2.1 Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso.

En el estudio fitoquímico realizado al extracto acuoso comprendió la evaluación cualitativa de la presencia de azúcares reductores, saponinas, flavonoides, taninos y/o fenoles, alcaloides, esteroides y ácidos grasos coincidiendo con las referencias de la presencia de estos metabolitos en estudios anteriores. ^(52,53)

3.3 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN N-BUTANÓLICA.

La fracción n-butanólica obtenida por la extracción líquido-líquido del extracto acuoso con n-butanol rindió un extracto de color carmelita intenso de consistencia viscosa similar al sirope. De la fracción obtenida con un 35% de extracción se tomó una porción para su evaluación farmacológica por el test del edema plantar, otra para el fraccionamiento de este por cromatografía de columna y por CCDp.

3.4 CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN N-BUTANÓLICA.

3.4.1 Tamizaje fitoquímico de la fracción n-butanólica

En la Tabla 2 se muestran los resultados del tamizaje fitoquímica. Para el cual la fracción n-butanólica se redisolvió en etanol, apreciándose evidencias positivas de los siguientes metabolitos: saponinas, carbohidratos reductores, alcaloides, esteroides, flavonoides y fenoles, no siendo así en el caso de los ácidos grasos.

Aunque los resultados indican composiciones similares en cuanto tipo de metabolito, a excepción de los taninos y saponinas en ambas fracciones la evidencia para saponinas y flavonoides fueron más significativas en el extracto n-butanólico que en el acuoso, lo cual pudiera indicar que estos metabolitos están en mayor proporción en esta fracción del extracto lo que está en correspondencia con lo reportado en la literatura para este tipo de solvente ⁽⁵²⁾; teniendo en cuenta que estos dos tipos de metabolitos (flavonoides y saponinas), constituyen los posibles responsables del efecto antiinflamatorio mostrado por el extracto acuoso ⁽²⁸⁾, consideramos oportuno evaluar farmacológicamente dicha fracción así como analizarla cromatográficamente para profundizar en su composición.

Tabla 3 Resultados de tamizaje fitoquímico realizado al extracto acuoso y las fracciones obtenidas del proceso extractivo.

<i>Ensayos</i>	<i>Metabolitos</i>	<i>Ext. Acuoso</i>	<i>Fracción n-butanólico</i>	<i>Fracción acuosa remanente</i>
Espumas	Saponinas	+	+	-
Liebermann-Burchard	Esteroides y/o triterpenos	+	+	+
Cloruro ferrico	Fenoles y/o taninos	+	Fenoles (+)	Taninos (+)
Draendorff	Alcaloides	+		+
Sudan	Ácidos grasos	+	-	+
Fehling	Azúcares	+	+	++
Shinoda	Flavonoides	+	+	+

3.4.2 Análisis cromatográfico.

En la figura 3 se pueden observar los tres resultados cromatográficos de las CCD que se le realizó a la fracción n-butanólica, A utilizando como fase móvil: diclorometano: metanol (85:15) [FM_I], en B la fase móvil fue acetato de etilo: metanol (80:20) [FM_{II}] y C la fase móvil fue acetato de etilo: metanol (85:15) [FM_{III}]. En un primer análisis de los cromatogramas Fig. 3 vemos que la fracción es bastante compleja y que ambas fases (diclorometano: metanol y acetato de etilo: metanol) logran una separación bastante aceptable de los componentes. Como se puede apreciar la fase móvil acetato de etilo: metanol logro una mejor resolución que la fase diclorometano: metanol, pues en (B y C) hay un total de 7 manchas y en A, solo se observaron 6 manchas.

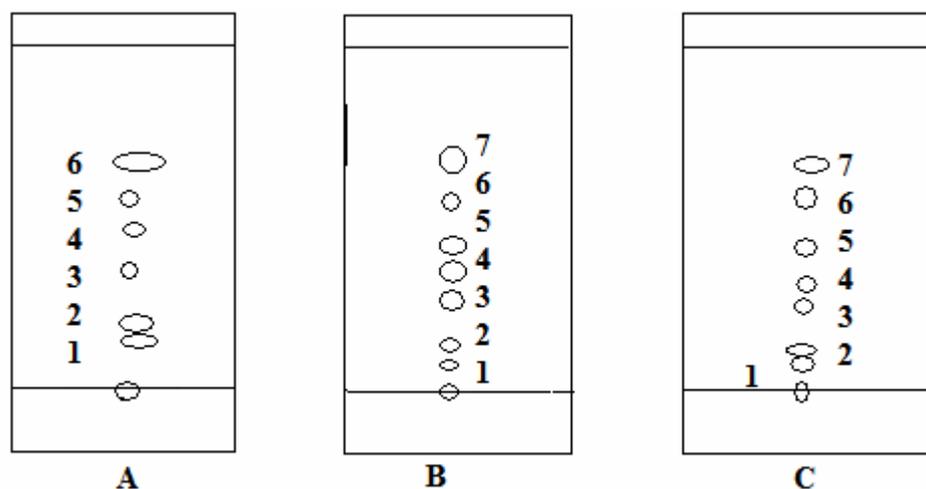


Fig. 3 Análisis cromatográfico de la fracción n-butanólica del extracto acuoso a partir de las hojas de *Capraria biflora* L.

Los Rf de las manchas en cada condición cromatográfica aparecen resumidos en la Tabla 3.

Tabla 3 Valores de Rf calculado para la fracción *n*-butanólica en dos fases móviles : diclorometano: metanol (85:15)A y acetato de etilo:metanol(80:20)B, proporción (85:15) C.

FM II (80: 20)	Rf	FM II (85: 15)	Rf	FM I (85:15)	Rf
mancha 1	0,03	mancha 1	0,04	mancha 1	0,06
mancha 2	0,10	mancha 2	0,08	mancha 2	0,11
mancha 3	0,14	mancha 3	0,17	mancha 3	0,23
mancha 4	0,20	mancha 4	0,31	mancha 4	0,31
mancha 5	0,31	mancha 5	0,43	mancha 5	0,60
mancha 6	0,43	mancha 6	0,53	mancha 6	0,77
mancha 7	0,63	mancha 7	0,63		

Del análisis de estos resultados podemos concluir que con la fase móvil acetato de etilo: metanol en ambas proporciones logran una buena separación pero que en B, proporción (80:20), se logra una mejor resolución.

3.5 EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA FRACCIÓN N-BUTANÓLICA.

La actividad antiinflamatoria fue evaluada a través del edema plantar inducido por

Dextrano, los resultados de dicha evaluación farmacológica se muestran en el Gráfico 2.

En el gráfico se muestra el % de inflamación en cada grupo tratado vs tiempo, donde se observa que en cada caso el punto máximo se logra a las 4 horas de comenzado el ensayo y luego disminuye en el tiempo. Durante todo el experimento se observaron síntomas de dolor en los animales. Este resultado es similar al obtenido para el extracto acuoso utilizando como agente irritante la Carragenina. ⁽²⁸⁾

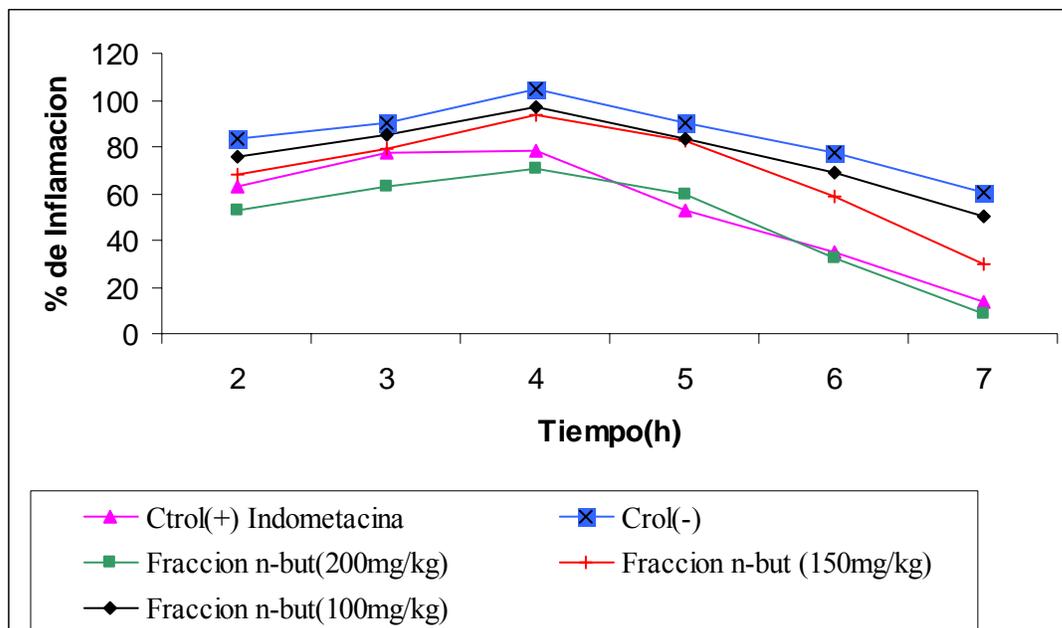


Gráfico 2 Efecto antiinflamatorio de la fracción n-butanólica.

En el grupo tratado con el control positivo se observa una disminución importante del porcentaje máximo de inflamación a partir de las 4 horas de haber administrado el agente irritante, disminuyendo considerablemente hasta llegar a un 13,22 % de inflamación a las 7 h. Se debe destacar que existen diferencias significativas con respecto al grupo control (-) en todos los tiempos (Tabla 4.).

Tabla 4 Resultados del análisis estadístico de la evaluación del efecto antiinflamatorio de la fracción n-butanólica con relación al control negativo.

Tratamiento Grupos	Volumen del edema durante el tiempo de estudio					
	2 horas	3 horas	4 horas	5 horas	6 horas	7 horas
Grupo A Ctrol (+)	63.2±5,29*	77.5±8,18*	78.0±9.25*	52.6±7.19*	35.2±9.53*	13.2±4.8*
Grupo B Ctrol (-)	83.0±3.98	90.2±1.3	104.5±11.5	90.4±8.26	77.7±9.75	60.8±15,1
Grupo C 200 mg/Kg	52.4±8.13*	62.7±10.9*	70.3±11.5*	59.1±9.49*	32.5±5.11*	8.7±3.09*
Grupo D 150 mg/Kg	67.8±11.8	79.5±11.9	93.6±9.4	82.5±5,73*	58.5±5.57*	29.9±5.89*
Grupo E 100 mg/Kg	75.7±14,4	84.7±17,8	96.9±18,8	83.6±17	68.6±16.6	50.2±8.72

Los datos representan la media[±] desviación estándar de los % de inflamación.

*P < 0,05 comparado con el grupo control (-).

Los grupos tratados con la fracción n-butanólica mostraron un comportamiento similar al grupo tratado con Indometacina. En todos los casos el máximo de inflamación se observa a las 4 horas de iniciado el experimento, con valores de 96.9, 93.6 y 70.3% a dosis de 100, 150 y 200 mg/kg de peso respectivamente. Se obtuvieron diferencias significativas en la dosis de 200 mg/kg de peso (Tabla3) con respecto al grupo control (-) para todos los tiempos evaluados.

Los porcentos de inflamación disminuyen en el tiempo hasta alcanzar a las 7 horas valores de 50.2, 29.9 y 8.7 para las dosis de 100, 150 y 200 mg/kg de peso respectivamente existiendo diferencias significativas entre los grupos tratados con dosis 150 y 200 mg/kg de fracción n-butanólica y control negativo a este tiempo.

De este análisis podemos inferir que la fracción a dosis de 100 mg/kg de peso no disminuye significativamente la inflamación producida por el Dextrano, con ninguno de los tiempos medidos mostró diferencias significativas; para el caso de la dosis intermedia solo se ven diferencias significativas con respecto al grupo control (-) después de transcurridas 5 horas del experimento lo cual podría estar dado por un efecto antiinflamatorio ligeramente tardío y se observó un mayor efecto para la dosis de 200 mg/kg de peso ya que hubo diferencias en todos los tiempo con el grupo control (-).

Al comparar los valores obtenidos para el grupo tratado con la fracción n-butanólica a la dosis de 200 mg/kg de peso respecto al control positivo (Indometacina) se muestra que no existe diferencias significativas entre estos grupos (Tabla 4).

Como resultado de este estudio podemos concluir que la fracción n-butanólica a dosis de 200 mg/Kg de peso mostró un efecto antiinflamatorio importante, por lo que se puede inferir, que esta es una fracción bioactiva del extracto acuoso original. Dada la composición fitoquímica de esta fracción referida en el acápite 3.4.1 y considerando que para los flavonoides se ha demostrado que el efecto antiinflamatorio puede atribuirse a su capacidad antioxidante así como a la inhibición de las enzimas lipoxigenasa y cicloxigenasa responsable de la síntesis de eicosanoides, metabolitos altamente implicado en los procesos inflamatorios; por tanto se puede inferir que estos metabolitos sean los responsables de la inhibición de la inflamación.

3.6. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LA FRACCIÓN N-BUTANÓLICA.

Con el objetivo de separar los componentes presentes en la fracción bioactiva por una mejor identificación de los mismos se procedió a evaluar dos métodos de separación, columna cromatográfica y CCD p.

3.6.1. Separación por cromatografía de columna.

En el desarrollo cromatográfico de la columna en las condiciones antes descritas en el acápite 2.6.1 se pudo observar, una separación obteniéndose 3 bandas definidas (A, B y C) de color amarillo pálido, intenso y carmelita respectivamente. La evaluación cromatográfica permitió agrupar según su perfil cromatográfico las 50 alicotas obtenidas en 9 fracciones, cuyo desarrollo cromatográfico se muestra en la Figura 4.

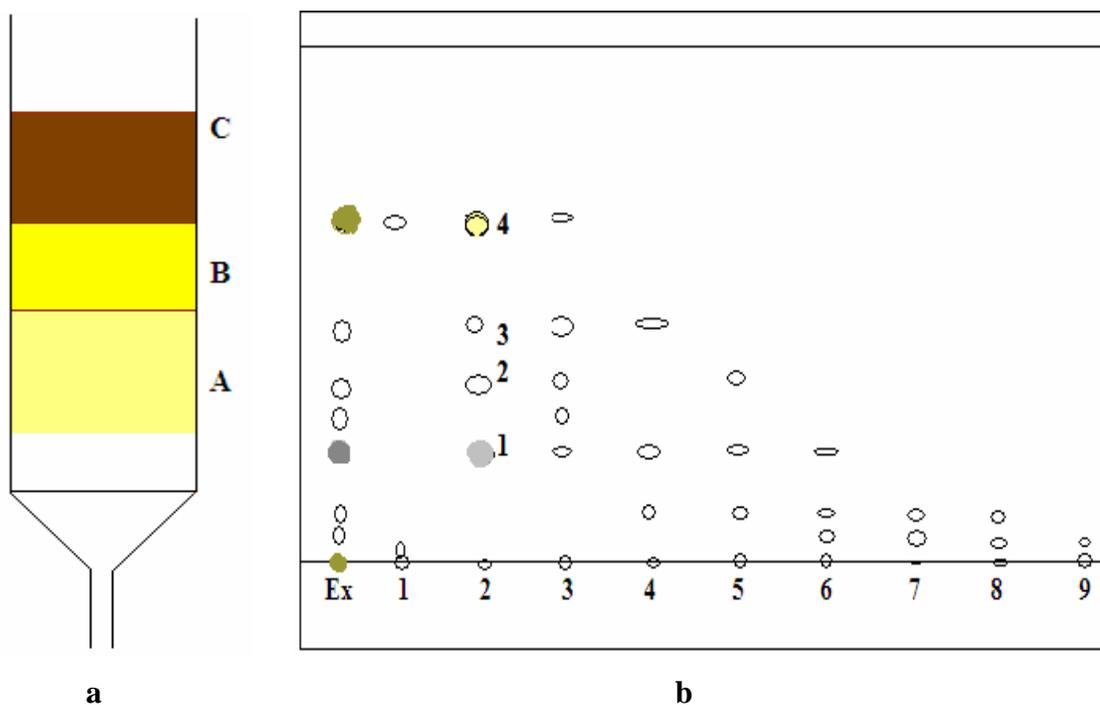


Fig. 4 Desarrollo cromatográfico de la fracción n-butanólica: a Bandas definidas en la cromatografía de la columna; b Desarrollo cromatográfico de las fracciones F (1-9) obtenidas de la fracción n-butanólica.

En la fracción 2 se observan de manera intensa dos manchas A y B referidas en el cromatograma de la figura 5 observándose en ambas un revelado típico de flavonoides por lo que se decidió realizarle una CCD a dicha fracción para compararla con cuatro patrones de flavonoides: Hesperidina (PH), Naringenina (PN₁), la Naringina (PN₂) y Quercetina (Q) (Figura 5). En dicho análisis se observa gran similitud cromatográfica entre las manchas A con los patrones Naringenina (PN₁) y la Naringina (PN₂) y la mancha B con el patrón Hesperidina (PH). Los valores de R_f aparecen resumidos en la Tabla (5)

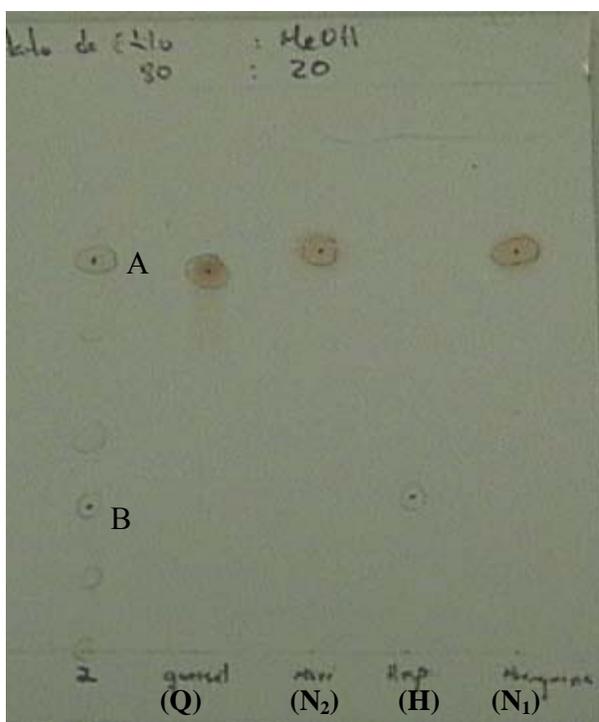


Fig. 5 Desarrollo cromatográfico de la fracción 2 con los cuatro patrones de flavonoides, Quercetina, Naringina (N₂), Hesperidina (H) y Naringenina (N₁).

El valor del R_f de la mancha A (0.70) se encuentra cercano a los valores de R_f de la Naringina (N₂) (0.71) y de la Naringenina (N₁) (0.73) pero al no existir una exacta coincidencia a alguno de ellos se descarta que se pueda asignar a dicho compuesto la estructura de ninguno de estos patrones, aunque puede estar relacionado estructuralmente dado al comportamiento cromatográfico similar que presentan.

Tabla 5 Valores de Rf calculados para la fracción 2.

<i>Manchas</i>	<i>Rf</i>
Fracción 2 (A)	0.70
Fracción 2 (B)	0.26
Quercetina	0.68
Naringina (N ₂)	0.71
Naringenina (N ₁)	0.73
Hesperidina (H)	0.28

En cuanto a la mancha B con un Rf igual a 0.26, tienen gran similitud con el Rf del patrón Hesperidina (H) (Tabla 5), pero no se puede asegurar de que sean el mismo compuesto, aunque no se descarta la posibilidad de que puedan tener alguna semejanza estructural. Debiéndose realizar otras pruebas de confirmación.

En la técnica empleada para la separación por columna cromatográfica, no se logró el aislamiento de ningún metabolito. Aunque si se observaron en la figura (la placa donde están dibujadas las 9 fracciones de la columna), algunas fracciones interesantes tales como la (f1, f3, f9, etc), donde se logra mayor purificación; pero al no constituir los componentes mayoritarios de la fracción bioactiva, fueron conservados para futuras investigaciones fitoquímicas. Por este motivo se propone en estudios futuros modificar las condiciones cromatográficas.

3.6.2. Separación por CCD preparativa.

Considerando los resultados obtenidos en la cromatografía de columna y con vistas a evaluar otra técnica de fraccionamiento se realizó una cromatografía de capa delgada preparativa (CCD), para separar y purificar los componentes mayoritarios de la fracción bioactiva (n-butanólica), empleando las condiciones descritas en el acápite 2.6.2 de materiales y métodos.

Los resultados de esta cromatografía aparecen en la Figura 6, donde se observan las franjas a la luz de 366 nm (diferenciándose por la intensidad de la fluorescencia azul que se observó). Las franjas F1, F2, F4 y F6 se observan al visible, F1, F2 de color Carmelita a

rojizo, F4 amarillo-verdoso y F6 amarillo, el resto se observan mas definidas a luz de 366 nm.

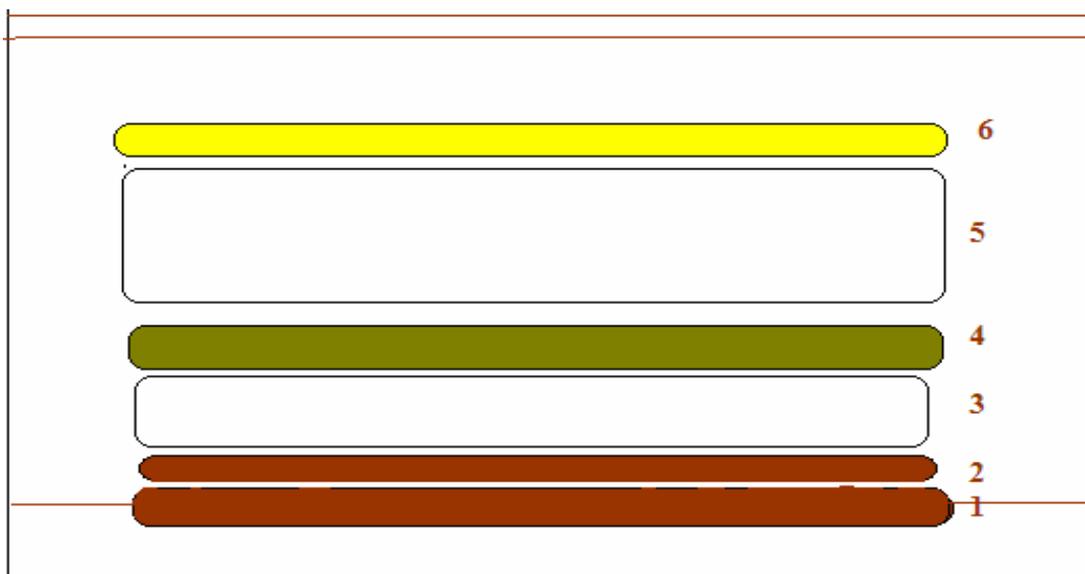


Fig. 6 Cromatografía de capa delgada preparativa de la fracción n-butanólica.

Una vez definidas, raspadas, lavadas y filtradas las franjas, se procedió a la evaluación cromatográfica de las 6 fracciones (Fig.7), las cuales atendiendo a su perfil cromatográfico se reagruparon en tres nuevas fracciones FA, FB y FC.

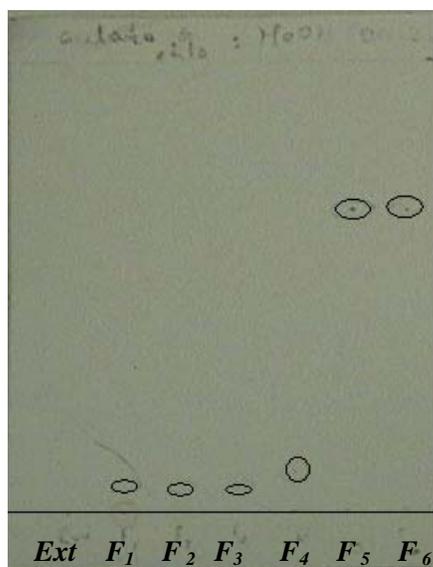


Fig. 7 Evaluación cromatográfica de las 6 franjas.

3.6.2.1 Análisis cromatográfico de las fracciones FA, FB, FC, contra los patrones (Naringina (2), Naringenina (1), Hesperidina)

Los resultados de dicho análisis cromatográfico aparecen en la Figura 8 y en la Tabla 6. El cromatograma muestra que en la fracción A no se evidenció ningún desarrollo cromatográfico, pues la sustancia queda retenida en el sitio de aplicación. En B se observaron tres manchas (B1, B2, B3), la mancha B1 con un valor de R_f igual a 0,19 tiene similitud con la Hesperidina (0,16), en el caso de B2 existe una aproximación al R_f tanto de la Naringina (0,7) como de la Naringenina (0,71), con igual comportamiento frente a los reveladores y en B3 no se observó coincidencia con ninguno de los tres patrones. En cuanto a la fracción C se pudo apreciar la presencia de una sola mancha, con R_f (0,69) muy similar al de los patrones Naringina y Naringenina; por el desarrollo cromatográfico interesante de la fracción C, se debe tener en cuenta para investigaciones futuras, ya que podríamos estar en presencia de un compuesto puro.



Fig. 8 Desarrollo cromatográfico de las fracciones obtenidas en la CCDp (A, B, C) con los patrones de flavonoides.

Tabla 6 Valores de Rf calculados para las manchas de las fracciones B y C obtenidas en CCDp con los patrones de flavonoides.

Manchas	Rf
B (1)	0.19
B (2)	0.69
C	0.69
Naringina (2)	0.7
Naringenina (1)	0.71
Hesperidina (H)	0.16
Quercetina (Q)	0.64

Con los resultados obtenidos no podemos asignarle una estructura a ninguno de nuestros componentes mayoritarios; aunque no podemos descartar la presencia de flavonoides debido al revelado típico de flavonoides y flavonas (amarillo y naranja frente al ácido sulfúrico concentrado)⁽⁴⁹⁾ que presentaran las manchas y a la proximidad en los Rf.

2.6.2 Análisis Espectrofotométrico UV visible de las fracciones obtenidas en la CCDp.

Como los flavonoides presentan una banda más o menos intensa a 200-270nm y otra de mayor intensidad a mayor longitud de onda de 300-400⁽⁵¹⁾ y dados los resultados en la CCD para las fracciones B y C, estas fueron analizadas espectrofotométricamente con el fin de compararlas con tres patrones de flavonoides: Hesperidina, Naringenina y la Naringina.

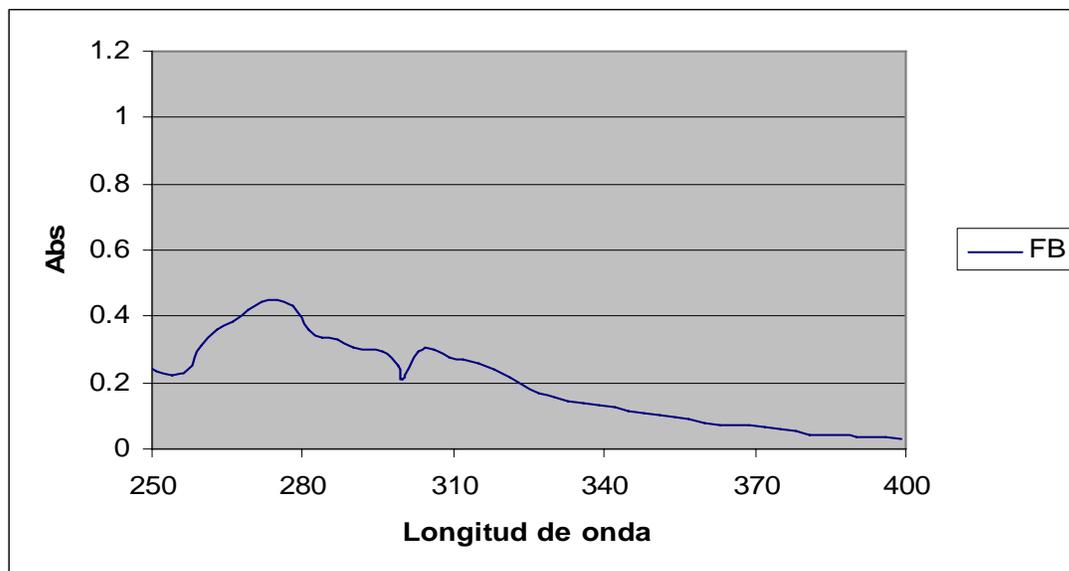


Fig. 9 Espectro correspondiente a la fracción B en la región UV visible.

En el espectro correspondiente a la fracción B (Figura 9) se observan dos bandas en la región UV visible, en intervalos de 250-285 con un máximo de absorción de 0,5 a una lamda (λ) igual a 275 la primera y la segunda banda en intervalos de 300-340 con absorción máxima de 0,3 a una lamda de 306.

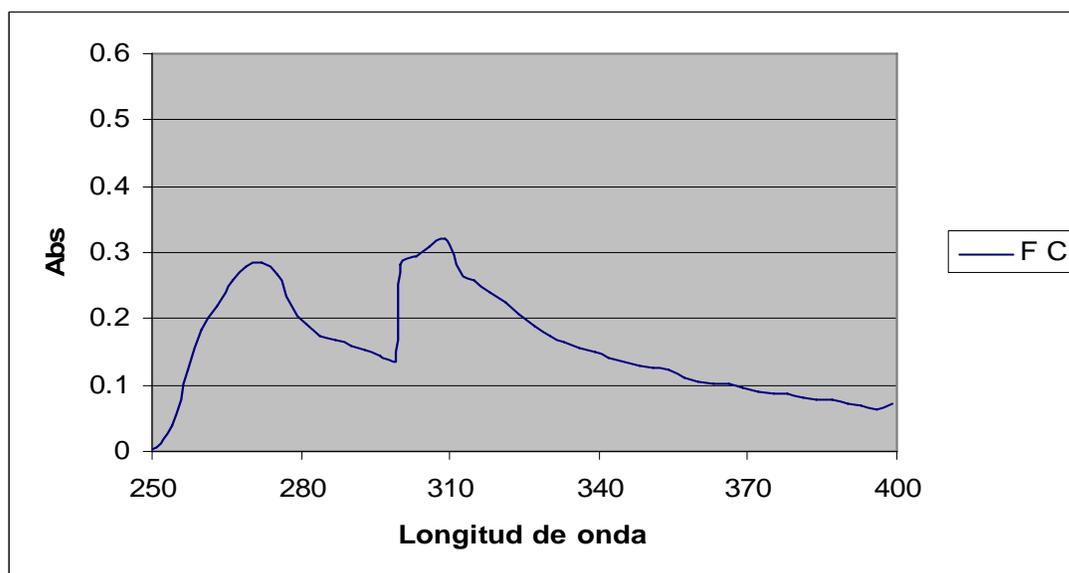


Fig. 10 Espectro correspondiente a la fracción C en la región UV visible.

Como se puede apreciar en la Figura 10 el máximo de absorción de la primera banda es de 0,29 a una lamda (λ) de 272 con un intervalo de 250-300, mientras que la segunda banda presentó a lamda igual a 309 un máximo de 0,32 en intervalo de 300-400.

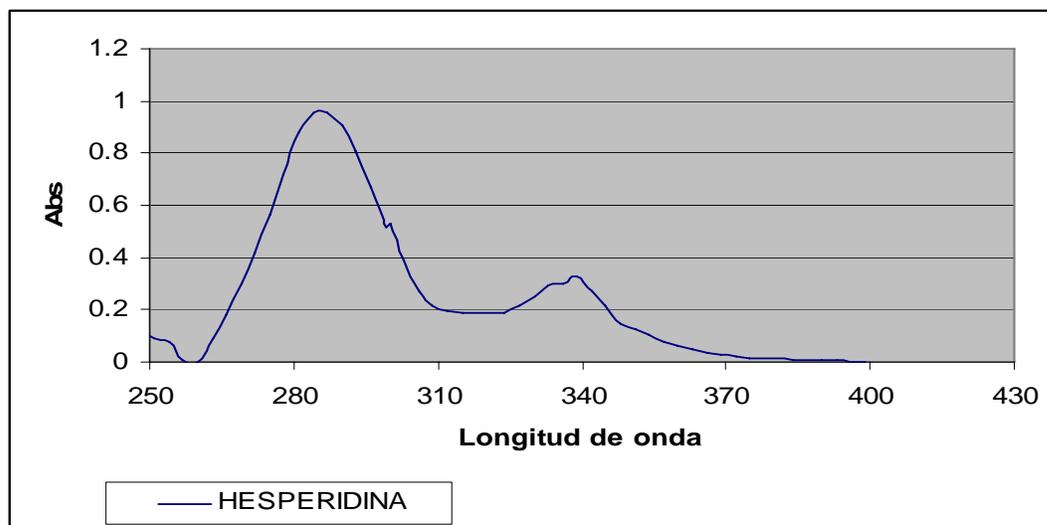


Fig. 11 Espectro correspondiente a la Hesperidina en la región UV visible.

El espectro realizado a la Hesperidina (Figura 11) mostró en la región UV visible dos bandas de absorción la primera comprendida en un intervalo 310-370 con un máximo de 0,9 a lamda de 285 y la segunda se observa de 310-370 teniendo un máximo igual a 0,33 a lamda de 339.

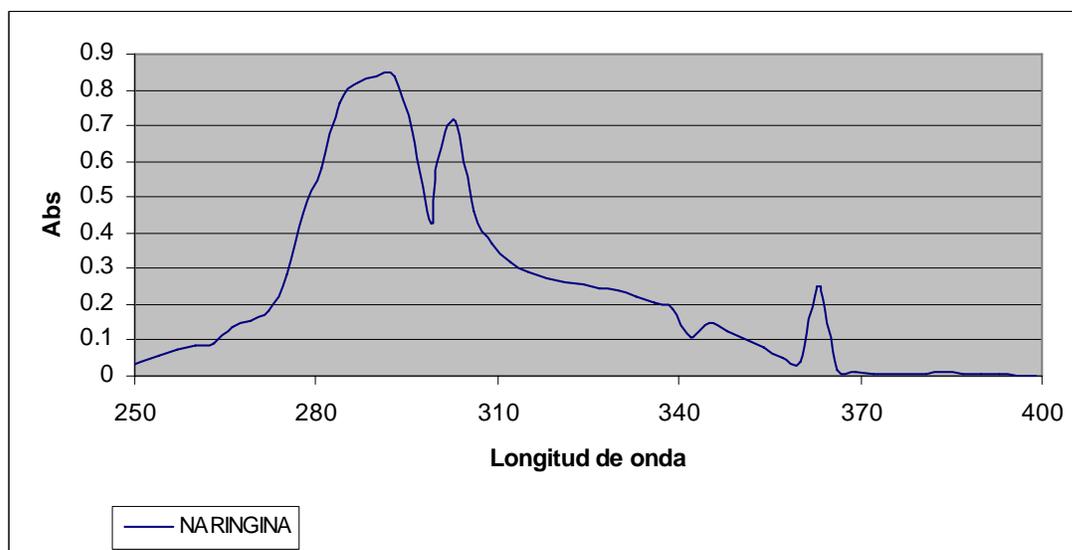


Fig. 12 Espectro correspondiente a la Naringina en la región UV visible.

En la Figura 12 se observan las dos bandas características de la Naringina, una con intervalo de 250-300 donde a λ de 296 tiene su absorción máxima de 0,85 y la segunda banda con absorción máxima de 0,7 con un valor de λ 305 en un intervalo 300-320.

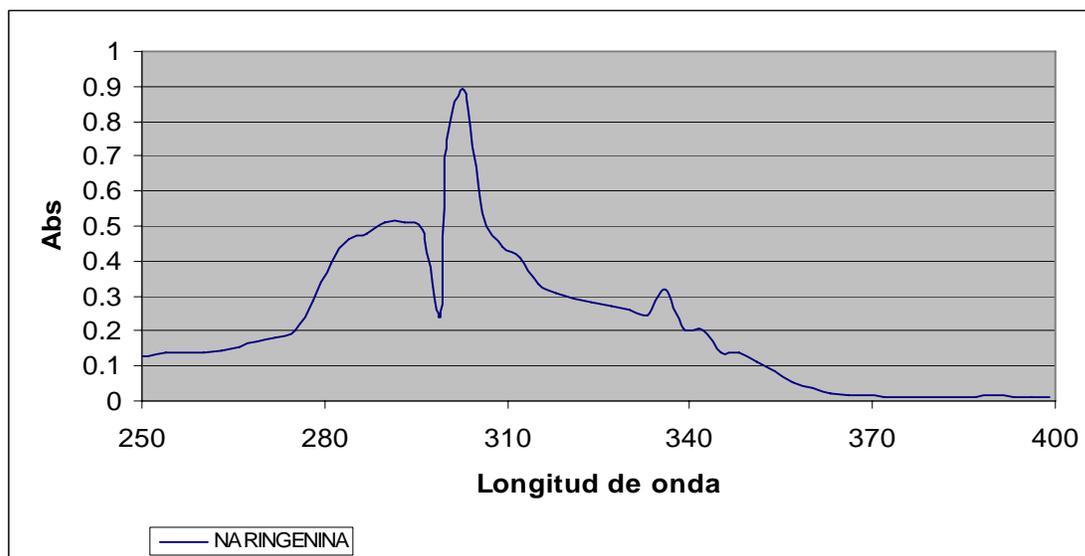


Fig. 13 Espectro correspondiente a la Naringenina en la región UV visible.

La Naringenina mostró dos bandas de absorción en el UV visible, una primera con intervalo de 250-285 con máximo de absorción de 0,5 a una λ de 275 y mientras que la segunda banda a intervalos de 285-340 presentó el máximo de absorción de 0,3 a una λ de 305.

Al comparar los espectros de las fracciones B y C con los patrones de flavonoides: Hesperidina, Naringina y Naringenina no se observó una correspondencia entre ellos, por lo que no podemos inferir que estas fracciones presentan ninguna de estas tres estructuras, aunque las bandas presentadas por estas fracciones (B y C) si se corresponden con las bandas características de los flavonoides, correspondientes a los anillos A y B del núcleo básico de este compuesto; específicamente con las bandas típicas para flavonas y flavonoles.⁽⁵²⁾

Considerando los resultados obtenidos en la espectrofotometría en el UV visible podemos señalar que en la fracción n-butanólica hay presencia de compuestos tipo flavonoide, al parecer flavonas y flavonoles. Por otra parte podemos concluir que la estructura de los

flavonoides presentes en esta fracción no coinciden con la Hesperidina, Naringina y Naringenina.

1. Se mostró el efecto antiinflamatorio de la fracción n-butanólica a dosis de 200 mg/kg de peso.
2. Se demostró que la fracción n-butanólica puede considerarse una fracción bioactiva del extracto acuoso de *Capraria biflora L.*
3. Se comprueba en la fracción n-butanólica la presencia de compuestos tipo flavonoides, al parecer flavonas y flavononas.
4. Se determinó que la estructura de los flavonoides presentes en la fracción n-butanólica no coinciden con la Hesperidina, Naringina y Naringenina.

1. Evaluar farmacológicamente la fracción acuosa resultante del proceso extractivo.
2. Continuar el estudio farmacológico del extracto acuoso de *Capraria biflora L.* en la búsqueda de otras fracciones bioactivas.
3. Realizar el proceso de separación a una escala mayor para obtener cantidades superiores de las fracciones de interés, que permitan la caracterización estructural de los componentes presentes en ellas.

1. Artiche Garcia; A.; Vanaclolxa.:Vademécum de fitoterapia. CITA Publicaciones y documentación, 1991. 13p.
2. Evans, W. C.: Farmacognosia. Trase-Evans/W.C. Evans. 3ra edición. Editorial Interamericana, S.A.. Pág. 139-142. 1991 16. Farmacopea Internacional. 3ra edición. Pág. 135.
3. Scrophulariaceae. The figwort family.
<http://the.seedsite.co.uk/scrophulariaceae.htm>
4. Edwin, G.: Flora of Perú. Field museum of natural history botanic.. Vol XIII: Pág 654. 1971.
5. Roig. Mesa, J. T; Diccionario Botánico de Nombres Vulgares Cubanos/ J.T. Roig Mesa. III Edición. La Habana; Edición Científico_Técnica; T. 2. 1984.
6. Morais, N.M.T; Nogueira, C.M.D; López, M.F.G; Vasconcelos, N. M.S. y SA, M.I: Inorganic analytical study of medicinal plants. An Assoc. Bras Quim.. 44(4): 14-19, 1999.
7. Roig Mesa J.T: Plantas Medicinales Aromáticas o Venenosas de Cuba/ J.T.Roig Mesa. III Edición. La Habana: Edición Científico_ Técnica; T.2. 1984.
8. Matos, F. L.: Farmacias vivas. Editorial EUFC, Pág. 210 Fortaleza. 1994.
9. Brito, A. E. M; Costa, M. S. Y.; Hondro, W.: Morfogénesis y regeneración de plantas a partir de explantes de hojas y tejidos de callos de la *Capraria Biflora L*; cultivados in Vitro: Revista brasileira de Fisiología Vegetal.1995.7(2):171-174.
10. Yegeada, Y.: Evaluación farmacognóstica y botánica preliminar de *Capraria biflora L*. Departamento de Farmacia. Facultad deQuímica. UCLV. 1998.
11. Burkll, H.M.. The useful plants of West Tropial Africa. Vol. 5. Royal Botanical Garden, Kew, UK: Pág 686.2000

12. Planta combate 17 tipos de hongos .JC Online-Editoria Ciencia e Meio Ambiente.Jornal do commercio Recife-04.12.2001.
www2.uol.com.br/JC/2001/0412-1.htm.
13. Duke ,J.Hand of biologically active phytochemicals and their activities.Boca Raton C. R.S Press,1992
14. Goncalves de lima, O. D´albuquerque , i.l.; Magalhaes Neto, b. Albuquerque,M.M. Breve nota sobre a actividade antimicrobiana da biflorina purificada por particao Craig. Revista do Instituto de Antibioticos, 1(2):95-98,1958a.
15. Beschia, M; Leonie, A.; Oaencea, J.:Chem. Abst. 101 Pág 167005, 1984.
16. Méndez, G.; Martínez, J. y Pérez , M.L.: Actividad antiinflamatoria en sustancias de origen natural. (24) 67-68.1991.
17. Flores, J.: Farmacología humana. Ediciones Científico y Técnica, S.A Masson Salvat Medicina. Pág. 296. España 1994.
18. Goodman and Gilman ,A.; Goodman, L.S yGilman, A.: Los metales pesados y sus antagonistas. En Gilman ,A.: las bases farmacológicas de la terapéutica. Edición revolucionaria. Pág.1574, 1588. 1994.
19. Vincent Martínez C. Glosario Botánico.2004
20. Delens M. y col. Encuestas Etnofarmacologica en los Estados Lara y Sucre de Venezuela.CESAP. 1992.
21. Medicinal Plants of the Guianas(Guyana, Surinam, French, Guianas)
www.mnh.si.edu/biodiversity/bdg/medicinal/SpeciesIndex.
22. Scofield, D. Medicinal usage: Capraria biflora L. (Scrophulariaceae), 2002.
23. Villar, M.; Villavicencio, O.: Plantas medicinales peruanas en el asma bronquial. Naturas Medicatrix. 1994 No. 37-38: 61-67.
24. Guzman, D. J. Especies útiles de la flora Salvadoreña. Ministerio de Educación, Dirección de Publicaciones, San Salvador, El Salvador. Pag.703, 1975.

25. Morton, J. Atlas of Medicinal plants of middle America. Springfield III. Charles C. Thomas Publisher 1981.
26. Middleton, E.; Theoharides, T.C.:The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52:673-751.
27. Machado, M.O.;Betancourt D.: Acción del extracto acuoso de *Capraria biflora L.* sobre el S.N.C. 2001.
28. Loy, S.; Vicet, L. y col : Anti-inflammatory Effects of an Aqueous of *Capraria biflora L.* *Acta farm. Bonaerance* 22(1) 53-55. 2003.
29. Burch, R.M.:Naunyn-Sch-miedebergis. *Arch. Pharmacol.* 342: 189-193. 1990.
30. Nii y Reinoso, Evaluación del efecto antiinflamatorio y analgésico del extracto acuoso de la *Capraria biflora L* 1998.
31. Medinilla, M y Ramos, Asnaldo: Aislamiento y evaluación farmacológica de un crudo de flavonoides de *Capraria Biflora L.*, como posible responsable del efecto antiinflamatorio. Trabajo de Diploma. UCLV. 2000.
32. Gallin JI, Goldstein IM and Snyderman R. (eds). *Inflamation: Basic principles and clinical correlates.* 2 nd ed. Raven Press. New York. 1992.
33. Guyton A, Hall J. Resistencia del organismo a la infección: I. Leucocitos, granulocitos, el sistema macrófago-monocítico e inflamación. En: Guyton A, Hall J. *Tratado de fisiología médica.* McGraw-Hill interamericana. Madrid. 1996; 477-86.
34. Campbell WB e Halushka PV. Autacóides derivados dos lípidos. Eicosanóides e factor ativador plaquetário. En: Goodman A. *As Bases Farmacológicas da terapêutica.* Editorial McGraw-Hill Interamericana. Rio de Janeiro. 1996; 438-49.
35. Coleman RA, Smith WL, and Narumiya S. Internatinal Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* 1994, 46; 205-29
36. Esplugues J. Mediadores celulares II. Eicosanoides. En: Flórez J. *Farmacología humana.* Ediciones Masson, SA. Barcelona. 1992; 289-99

37. Díaz, L .M.: Diseño y evaluación de comprimidos convencionales y de sesión controlada de extractos secos (Plantagolanceolata). Universidad de Santiago de Compostela. España. 1995.
38. Sustancias. Los glucósidos .Plantas medicinales.www.iespana.es/natureduca/med-sustanc-gluocosidos.htm.
39. Paula Carolina de Simoni Cordeiro.Nosoes de fitoquímica.
www.plantaservas.hpg.ig.com.br/dicasmedicinais/fitoquimica.htm.
40. G.S.B. Viviana; M.A.M. Bandeira; R.A. Ribeiro: Analgesic and anti-inflammatory effects of the tannin fraction from Myracrodium urundeuva. Phytotherapy Research. Vol II(2).Pag .118-122. 1997.
41. Sabarnas, A.; Wagner,H.: Analgesic and anti-inflammatory activity of the proanthocyanidin. Phytomedicine pag 401-405. 2000.
42. Nta. Zenia Toribio. Alimentos funcionales.
Nutriguía.www.nutriguía.com.uy/contenido/alimentos-funcionales.htm.
43. Pérez L.; Rodríguez, M.: Estandarización de la droga de Rizophora mangle L. Y del fitofarmáco del Aseptan. Trabajo de Diploma. UCLV. 1994.
44. Pathak, D, et... al: Flavonoides as medicinal agent recent. advances Fitoterapia.. Vol LXII, No.5: Pág 371 – 378, 1991.
45. Sánchez, C.; Pinzon, R.: Manual de técnicas de investigación. Actividad antiinflamatoria. Marzo. Pág. 81-82. 1995.
46. Silva, J.; Abebe, W.: Analgesic and anti-inflammatory effects of esencial oils of Eucalyptus. Januaral of Ethonopharmacologic. Pág. 277-283. 2003.
47. González, N y Fernández. M ‘Trabajo de Diploma: Estudio fitoquímico de las hojas de la *Capraria biflora L* ‘. como droga antinflamatoria. 2001.
48. Luck, O.: Investigación fitoquímica . Métodos en el estudio de productos naturales .Capitulo 2. Pág. 91-100.

49. Hernández, L.: Caracterización tecnológica de los sólidos pulverulentos de *Capraria biflora* L. Obtención de su extracto acuoso. 1999
50. Klinax, S.; Chang, A.: Actividad analgésica y antihistamínica de *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. Uña de Gato. Fitoica.
Unlugar.com/HTML/Articulos/Uncaria.htm.
51. Cuellar, A.; Miranda, M.: Farmacognosia y productos naturales. Pag .278-280. 2001.
52. Morgado, O. L.: Estudio fitoquímico del extracto acuoso de *Capraria biflora* L. Obtención y caracterización de un crudo de saponinas. 2003.
53. Lorenzo, Y.: Evaluación del efecto diurético de *Capraria biflora* L. 2002.