



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

FACULTAD DE QUÍMICA-FARMACIA

Departamento de Farmacia

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

**“Estudio fitofarmacológico de la *Capraria
biflora L.*”**

Autor: Anisley González Rodríguez

Tutor: MSc. Liliana Vicet Muro

Lic. Dany Siverio Mota.

2004-2005

Santa Clara



Resumen.

En el presente trabajo fue desarrollada la evaluación del efecto antiinflamatorio de un extracto metanólico obtenido a partir de las hojas secas de *Capraria biflora L.* El estudio fue desarrollado empleando dos modelos farmacológicos: como técnica general se empleó el edema plantar inducido por Dextrano y la peritonitis inducida por carragenina como técnica más específica. El resultado de ambos modelos corroboró la acción antiinflamatoria del extracto. A través de un fraccionamiento biodirigido fue posible la separación y caracterización cromatográfica de las fracciones activas de dicho extracto. Obteniéndose en un primer fraccionamiento que la fracción C obtenida es la más activa, por lo que se decidió iniciar una segunda separación a partir de la misma, lográndose la obtención de la fracción C2 donde se encuentran los productos mayormente activos.

Introducción.

La *Capraria biflora L.* o esclaviosa, como también se le conoce en Cuba, es una hierba silvestre muy común en toda la isla. Es una planta exótica nativa de Texas con gran popularidad en países del continente americano.

En nuestro país es muy conocida, principalmente, por sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y diuréticas, lo cual ha despertado un gran interés en las investigaciones con plantas medicinales. Es por ello que el departamento de Química – Farmacia de la Universidad Central, Marta Abreu, de las Villas ha dedicado los últimos años a la investigación de esta planta. Teniendo en cuenta las pesquisas realizadas y los resultados obtenidos en investigaciones anteriores, se ha decidido llevar a cabo una nueva investigación proponiendo los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL:

- Continuar con el estudio fitofarmacológico de la *Capraria biflora L.*

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Establecer las condiciones de obtención y caracterización del extracto metanólico.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico a partir de la *Capraria biflora L.*
- Obtener a través de un biofraccionamiento las principales fracciones activas.

Revisión bibliográfica.

1.1 GENERALIDADES DE LA *CAPRARIA BIFLORA L.*

Según Juan Tomás Roig. ^[1]

- **Nombre científico:** *Capraria biflora L.*
- **Nombre común:** Savadilla.
- **Otros nombres:** Esclaviosa, Escabiosa, Magüiro, Majuito, Viuda (Cuba), Fregosa (Venezuela). ^[2]

1.1.1 Ubicación taxonómica.

Cronquist ^[3] plantea que esta planta debe ser ubicada de la siguiente forma:

- **División:** Spermatophyta.
- **Subdivisión:** Magnoliophytina.
- **Clase:** Magnoliatae.
- **Familia:** Scrophulariaceae.
- **Género:** *Capraria*.
- **Especie:** *C. Biflora L.*

1.1.2 Usos reportados y algunas formas de preparación.

A la *Capraria biflora L.* (Scrophulariaceae) se le han reportado varios usos desde su primer análisis hasta la fecha, así por ejemplo: su empleo como antiespasmódico, tónico digestivo, carminativo, antidiarreico, hipotensor y vermífugo, es muy conocido en Venezuela; se recomienda además en caso de diarrea, flatulencia, hipertensión, parasitosis, malestar estomacal, así como en problemas del tracto urinario (diurético), fiebre provocada por la malaria y como tranquilizante. ^[2,4]

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

Unas de sus aplicaciones más interesantes y quizás las más 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. ^[5]

Se le han reportado otros usos, tales como para el dolor de oídos, hemorroides, tos, reumatismos ^[4,6], problemas hepáticos y con acción tónico fortificante general. Además se aplica en la neumatosis y como astringente en las heridas. ^[1]

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 para combatir la diabetes y en baños o loción en afecciones ováricas y uterinas, y en la leuco y gonorrea. En Perú se emplea para el tratamiento del asma bronquial como planta sintomática por su acción descongestionante local y disminución del estado de ansiedad, permitiendo así un mayor efecto terapéutico. En Brasil, a partir de la raíz, se preparan tinturas antisépticas que se aplican en forma de compresas y lavados para el tratamiento local y preventivo ^[7], así como para el tratamiento de heridas infectadas, pero en forma de pomada. ^[8,9]

El té preparado a partir de las hojas, es empleado para el lavado de los ojos ^[4,10], para aliviar la comezón en 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 migrañas, cólicos, etc. ^[11]

1.1.3 Precauciones.

A dosis elevadas, la *Capraria biflora* L. puede producir debilidad general, sueño, rigidez y hasta llegar a provocar una parálisis muscular. Se presenta una especie de embriaguez con vértigo, lo cual se le atribuye a su acción depresora sobre el sistema nervioso central (SNC). ^[5,12]

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. ^[13]

1.1.4 Composición química y sus propiedades.

En 1998, Tejeda ^[14] realizó un tamizaje fitoquímico a las hojas de *Capraria biflora* L., desecadas a la sombra, y obtuvo una composición variada de metabolitos, de donde pudo inferir la presencia de lípidos, esteroides, saponinas, aminoácidos, alcaloides, quinonas, flavonoides, antocianidinas, taninos, compuestos fenólicos y azúcares reductores. De todos ellos refirió como posibles metabolitos, responsables de la actividad farmacológica de la planta, a los flavonoides, lípidos, taninos y alcaloides, teniendo en cuenta las propiedades antiinflamatorias y analgésicas que presentan los mismos. ^[15,16] 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. [17,18]

- **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 anti-séptico, antidiarreico, antiinflamatorio, antihemorrágico, etc. No poseen toxicidad a altas dosis, pero pueden causar daños en el tubo digestivo pudiendo provocar cólicos abdominales. [17,18]
- **Flavonoides:** son una clase de pigmentos vegetales hidrosolubles. Se clasifican en isoflavonas, flavanos, flavonoles, □sferoid y flavanonas; los □sferoid son uno de los pigmentos amarillos presentes en las partes verdes de las plantas junto a la clorofila y los carotenoides. Medicinalmente, poseen propiedades de fortalecimiento de los capilares sanguíneos, así como mejorador de las funciones de oxigenación de los tejidos; son cardiotónicas, hemostáticas y también antiinflamatorias. [17,18]
- **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, saponinas □sferoidales y saponinas triterpénicas. En la planta actúan en la germinación e inducen la floración. Presentan efectos diuréticos, expectorante, mucolítico, antiséptico y antiinflamatorio, relajan el intestino e incrementan las secreciones de las mucosas bronquiales, fluidifican éstas y facilitan la expectoración. Por vía parenteral pueden provocar, en altas dosis, hemólisis y necrosis; por vía oral son bien absorbidas. [17,18]
- **Fenoles:** se les engloba 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. Algunas plantas con alto contenido de fenoles son: los derivados salicílicos de la corteza del sauce, de las yemas del álamo, del arándano, del brezo, o la importante *metilarburina* contenida en las hojas de la guayaba. [17,18]

- **Antraquinonas:** compuestos policíclicos con más de veinte carbonos, inodoros, de color amarillo oscuro. Se absorben poco por el tracto gastrointestinal. Presentan efecto como antiinflamatorio local y antiséptico. [17,18]
- **Ácidos grasos:** Los ácidos grasos polinsaturados tipo omega 3, juegan un papel importante como agentes antiinflamatorios y protectores a nivel cardiovascular. Su actividad antiinflamatoria, anticoagulante, vasolidadora y antiagregante le confiere importancia en la prevención de la hipercolesterolemia. [19]
- **Mucílagos:** Los mucílagos son unos derivados de glúcidos gelatinosos con una gran capacidad para retener los líquidos, por ello al hidratarse aumentan de volumen. Se trata de mezclas amorfas de polisacáridos, que se tornan muy viscosos en agua. Las plantas retienen el agua gracias a estas sustancias. Medicinalmente tienen una gran importancia, ya que protegen los conductos digestivos y las mucosas ante cualquier agente irritante, sea químico o mecánico. La acción terapéutica de los mucílagos es emoliente, laxante suave, antiinflamatoria y antitúscica; es por tanto útil en las afecciones inflamatorias del aparato digestivo, de la piel (útil contra el dolor en contusiones) y del aparato respiratorio. Además, es muy útil en tratamientos contra la obesidad, ya que la capacidad de los mucílagos para aumentar de volumen produce una sensación de saciedad. [17,18]

Investigaciones realizadas a la planta han demostrado la existencia, en las hojas y raíces de esta especie, de un compuesto llamado biflorina, al cual se le atribuyen propiedades antibióticas [10], antibacterianas por su actividad frente a bacterias gram-positivas, así como una considerable acción fungicida por su resistencia a algunas especies de levaduras [20,21,22]. Esta sustancia se clasifica como una

naftoquinona muy soluble en acetona y un poco menos en alcohol, especialmente cuando es diluida en agua. Sin embargo, la aplicación de *Capraria biflora L.* en la medicina popular no se corresponde necesariamente con las propiedades antimicrobianas de la biflorina. [23,24]

Morais y colaboradores [5], cuantificaron a través del Método de Folin – Denis, por espectrofotometría uv. – vis, los taninos presentes en el te obtenido a partir de la planta completa, reportando un valor de 335.17 mg/100g de droga [8]. Estos metabolitos son compuestos polifenólicos aromáticos muy astringentes y muy amargos. Se dividen en hidrolizables y condensados [25] con acción astringente y antiinflamatoria, reforzada esta última, por sus propiedades antirradicálicas y capacidad antiproteasas. Los medicamentos 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. [26,27]

Es conocido que en la composición de la droga de origen vegetal, además de los metabolitos secundarios, están presentes los minerales e iones metálicos formando parte de esta, los cuales pueden ser constituyentes específicos del vegetal o aparecer producto de la contaminación de los suelos, agua, etc. Existen referencias de que esta planta es rica en potasio (K), sodio (Na), magnesio (Mg) y calcio (Ca), llegándose a determinar en muestras de te y en solución ácida de las cenizas por espectrofotometría de absorción atómica (Ca y Mg) y fotometría de llamas (Na y K). Además se aplicó la espectrofotometría de absorción molecular para cuantificar la presencia de aluminio (Al) y hierro (Fe). También en la planta se destacan valores, relativamente elevados, de iones cloruros y en un grado menos significativo se muestran los iones fosfatos.

Algunos de estos elementos pudieran ser responsables de una parte de la actividad farmacológica de *Capraria biflora L.* como es su efecto diurético, el cual, en muchas plantas, se le atribuye a las sales de potasio presentes en las mismas.

En la caracterización inorgánica realizada por Tejeda en 1998 ^[14], a las hojas de la planta, se reportan valores elevados de los iones Na, K, Ca y Mg, así como de Fe y Zn. Todo ello resulta muy ventajoso si se tiene en cuenta que estos cationes se requieren para muchas de las reacciones enzimáticas que continuamente están ocurriendo en nuestro organismo. ^[28,29]

1.1.5 Antecedentes de los estudios farmacológicos.

En 1999, Nii y Reinoso, demostraron que un extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora* L. posee, a una dosis de 200 mg/kg de peso, un efecto antiinflamatorio comparable con 10 mg/kg de peso de Indometacina. Dicho extracto mostró también tener efecto analgésico (100 mg/kg de peso), aunque en menor medida, con respecto al ácido acetilsalicílico. ^[30]

Un año después, Medinilla y Ramos, aislaron y evaluaron farmacológicamente un crudo de flavonoides obtenido a partir de un extracto hidroalcohólico de las hojas secas de dicha planta. La extracción del material vegetal fue realizado por maceración a través de mezclas hidroalcohólicas (etanol/agua) en las proporciones (9:1) y (1:1) sucesivamente a temperatura ambiente, lavando con cloroformo y acetato de etilo. Mediante este método se logró el fraccionamiento de los componentes, obteniéndose los flavonoides concentrados en una fracción de acetato de etilo. El crudo, así obtenido, mostró tener actividad antiinflamatoria a dosis de 150 y 200 mg/kg de peso. ^[31]

1.2 INFLAMACIÓN.

1.2.1 Fisiología de la inflamación. Mediadores celulares.

El proceso inflamatorio involucra fenómenos que pueden ser desencadenados por varios estímulos: agentes infecciosos, isquemias, interacciones antígeno-anticuerpos (Ag - Ac), lesiones térmicas o provocadas por otros agentes físicos.

Cada estímulo manifiesta un patrón característico de la respuesta que está acompañada, generalmente, de signos clínicos como eritemas, edema, hiperalgesia y dolor. ^[32]

La respuesta inflamatoria se caracteriza por:

- Dilatación de los vasos sanguíneos locales, con el consiguiente exceso de flujo sanguíneo local.
- Incremento de la permeabilidad de los capilares.
- Tumefacción de las células tisulares.

Varias de estas sustancias activan energicamente 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. ^[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. La actividad directa de las fosfolipasas C y/o A₂ sobre los fosfolípidos de membrana provocan la liberación de ácido araquidónico posibilitando la formación de productos oxigenados por varios sistemas enzimáticos, incluyendo las ciclooxigenasas, una de las varias lipooxigenasas o citocromo P₄₅₀. En la vía de las ciclooxigenasas, la primera enzima es la sintetasa de las endoperóxidos de las PGs conocidas como ciclooxigenasa de los ácidos grasos (COX). Esta enzima posee tres isoformas: COX-1, COX-2 y COX-3. La COX-1 se expresa constitutivamente por la mayoría de las células, mientras que la

COX-2 no es encontrada en condiciones normales, pero puede ser inducida por algunos factores séricos, citocinas o factores del crecimiento y la COX-3 que se encuentra en altas concentraciones a nivel hematoencefálico. Las ciclooxigenasas forman compuestos intermediarios inestables que son transformados 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 de incrementar la actividad analgésica de la bradicinina y de otros autacoides. ^[35]

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 prostaglandina natural por la que muestran mayor afinidad. ^[36]

Por otra parte, la vía de las lipooxigenasas (LOXs) compuestas por enzimas citosólicas que catalizan la oxigenación de los ácidos grasos poliénicos en los correspondientes hidroperóxidos lipídicos, difieren en su especificidad. En el caso del ácido araquidónico los metabolitos son denominados ácidos hidroxiperoxieicosatetraenólicos (HPETE), siendo intermediarios inestables, los cuales 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 hiperalgesia. 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 Ca^{2+} y la génesis de metabolitos del metabolismo del ácido araquidónico con funciones de segundos mensajeros intracelulares. [37]

1.3 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. [38]

1.3.1 Técnicas generales.

1.3.1.1 Modelos de inflamación aguda.

A Edema plantar por carragenia: 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 plantar derecha del ratón. El grupo control recibe solamente el vehículo y otro grupo recibe Indometacina como agente antiinflamatorio. El volumen de la pata inyectada es medido antes y después de la inyección de carragenina, en un pletismómetro 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. Existen reportes donde se emplean otros agentes irritantes, tal es el caso del Dextrano. [39,40]

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 de 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. ^[38]

1.3.1.2 Modelo de inflamación subcrónica o crónica.

A Granuloma inducido por Discos de Algodón: el producto en estudio se administra 7 días consecutivos. Los animales se sacrifican al día siguiente a la última administración. Se extraen los granulomas formados, el timo y las glándulas suprarrenales. Se desecan los granulomas y se determina la diferencia de peso con respecto al disco de algodón implantado al comienzo del experimento. ^[38]

1.3.2 Técnicas específicas.

1.3.2.1 Bolsa de aire en ratas.

A Técnica de Edwards: consiste en la formación de una bolsa de aire en el dorso del animal, al cabo de 6 días de la inyección de un agente irritante; recogiendo posteriormente el exudado y realizando con él las pruebas de interés. ^[38]

B Técnica de Sedwick: los animales son anestesiados y rasurados en la zona dorsal y la nuca, procediendo a la inyección de aire en la misma. Al tercer día se inyectan nuevamente con aire. Al cuarto día se les inyecta carragenina y 6 h después se sacrifican procediendo a la extracción del exudado inflamatorio. ^[38]

1.3.2.2 Peritonitis inducida por carragenina.

Se comienza con la administración del producto en estudio. Después de 1 h se les inyecta (i.p.) carragenina como agente irritante y 5 h mas tarde se sacrifican los

animales. Se les inyectan en la cavidad peritoneal PBS y después de un masaje se recogen los fluidos peritoneales y se procede a la determinación de los leucocitos presentes en una cámara de Neubauer. ^[38]

1.3.2.3 Actividad ciclo – oxigenasa.

A Actividad ciclo – oxigenasa y lipoxigenasa en leucocitos peritoneales de ratas: se basa en la estimulación de leucocitos peritoneales de ratas por ionóforo A23187, que determina la entrada de calcio a la célula, la activación de fosfolipasa A2 y la producción y liberación de metabolitos del ácido araquidónico producido por ambas vías. ^[38]

B Actividad ciclo - oxigenasa en vesículas seminales: se emplea como sustrato ácido araquidónico radioactivo para separar después de los metabolitos formados y el sustrato sin reaccionar, por cromatografía en capa fina, y cuantificar los diferentes compuestos por centelleo líquido. ^[38]

1.3.2.4 Permeabilidad capilar incrementada por histamina.

A Técnica de Ukada: consiste en la administración i.v. de azul de Evans, el cual se une a las proteínas plasmáticas, en particular a la albúmina, y por tanto colorear el área de la piel en la que tiene lugar la extravasación de proteínas debida a la histamina que previamente es inyectada intradérmicamente, lo que provoca un incremento de la permeabilidad capilar a las proteínas plasmáticas. ^[38]

B Técnica de Williams: permite cuantificar el edema producido por diversos mediadores de la inflamación por los compuestos en estudio, mediante la radioactividad presente en el plasma extravasado. ^[38]

2.1 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

2.1.1 Recolección y selección del material vegetal.

El material vegetal fue recolectado en dos lugares, fundamentalmente: en el municipio de Sancti Spíritus y en Meneses, Yaguajay, pertenecientes a la misma provincia de Sancti Spíritus, en el mes de enero del año en curso (2004 - 2005). Esta labor se realizó en varios lotes debido a la lejanía existente entre un lugar y otro y al escaso material cosechado en un principio. Comprendió ejemplares que se encontraban en estado de floración y fructificación, efectuándose la recolección en horas de la mañana. Posteriormente fueron trasladadas hacia el lugar donde más tarde serían seleccionadas las partes aéreas de la planta como material de interés, siendo lavadas con agua para eliminar las materias extrañas que pudieran estar presentes. Ejemplares de ambos lotes fueron considerados como muestras de herbario y evaluadas sus características macromorfológicas.

2.1.2 Secado y molinazo.

Una vez eliminadas las materias extrañas de las hojas de la planta, estas se fueron depositando en bandejas metálicas para facilitar su secado. Luego fueron trasladadas desde Sancti Spíritus, en bolsas de nylon, al Laboratorio de Química – Farmacéutica y Farmacognosia perteneciente a la Universidad Marta Abreu de las Villas, localizada en la provincia de Santa Clara; local donde se efectuaría más tarde la técnica experimental. Ya en el laboratorio se procedió al secado mediante calor artificial colocándose, las hojas recolectadas, en capas delgadas sobre bandejas de papel a una temperatura de 30°C en una estufa marca Thelco® modelo 70 durante una semana, aproximadamente.

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.

2.1.3 Tamizaje fitoquímico.

Muestras de ambos lotes fueron evaluadas por técnicas de tamizaje fitoquímico, descritas por el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana, para evaluar la composición química de cada una de ellas y compararlas con muestras precedentes de las áreas cercanas a la Universidad Central de las Villas para comprobar posible influencia del sitio de recolección.

2.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO.

Se tomó una muestra de 100 g de droga y se dividió en cuatro fracciones de 25g cada una; las mismas fueron exhaustivamente extraídas con 200 ml de metanol en un aparato soxhlet hasta lograr su agotamiento. El extracto, ya filtrado, fue concentrado en un rotoevaporador [©] Heidolph y pesado, posteriormente, para determinar su rendimiento.

2.3 CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO.

2.3.1 Determinación de los índices farmacognósticos.

Una vez obtenido el extracto metanólico se procedió a la evaluación de los índices farmacognósticos siguiendo la metodología descrita en la NRSP # 310/1992. ^[41]

a) Características organolépticas.

- Color.
- Olor.
- Sabor.

b) Densidad relativa.

Materiales:

- Pignómetro.

Cálculo:

$$dr = \frac{m}{V_r} \quad dr = \frac{P_p - P_{pe}}{V_r}$$

Donde: dr densidad relativa.

V_r volumen real del pignómetro.

P_p peso del pignómetro vacío.

P_{pe} peso del pignómetro más el extracto.

c) Índice de refracción.

Materiales:

- 1 beaker con agua.
- 1 beaker con alcohol.
- 1 gotero.
- Refractómetro.
- Papel de filtro.

Cálculo: $n_D^{25} = n_D^t + 0.00044 (t - 25 \text{ } ^\circ\text{C})$

Donde: 0.00044 factor de corrección por grado centígrado.

n_D^{25} índice de refracción a 25 °C.

n_D^t valor leído en la escala del refractómetro a la temperatura t.

t valor de la temperatura a la que se realiza la medición.

d) Sólidos totales.

Materiales:

- Cápsula de porcelana.
- Pipeta de 5 ml.
- Desecadora.

Cálculo:
$$St = \frac{Pr - P}{V} * 100$$

Donde: 100 factor matemático.

Pr masa de la cápsula + residuo (g).

P masa de la cápsula vacía (g).

V volumen de la porción de ensayo (ml).

e) Análisis capilar.

Materiales:

- 1 caja.
- 1 tirilla de papel de filtro 4*15.
- Pipeta de 22 ml.
- Varilla metálica.
- 1 beaker.

2.3.2 Evaluación cromatográfica.

El extracto metanólico obtenido fue sometido a un análisis cromatográfico por cromatografía en capa delgada, empleando las siguientes condiciones:

Materiales y equipos:

- Placas de sílica gel 60°.
- Cámara cromatográfica. (CAMAG)
- Micropipetas.

Solventes:

- Cloroformo:metanol (9:1).

Revelador:

- Ácido fosfomolibdico (10 % EtOH absoluto).
- Lámpara uv. ($\lambda = 256$)

2.3.3 Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico.

Con el fin de identificar los metabolitos presentes en el extracto metanólico, se llevó a cabo el tamizaje fitoquímico siguiendo la técnica descrita en el acápite 2.1.3. Para ello se tomó una muestra del extracto rediseñado en metanol en una relación 1:10 y se le realizó los ensayos correspondientes. El procedimiento a seguir para la ejecución de cada uno de estos ensayos se encuentra descrito en el Anexo 2.

2.4 EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO METANÓLICO.

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico obtenido de la *Capraria biflora* L. se emplean las técnicas descritas por el manual de técnicas de investigación.^[38]

2.4.1 Test del edema plantar por Dextrano.

- **Animales de experimentación:** ratones de 14 - 19 g de peso, heterogéneos, raza Swiss, los cuales fueron agrupados, por un peso promedio, en cinco lotes de seis animales cada. Dos días antes del experimento fueron mantenidos en condiciones apropiadas, con libre acceso de comida y agua. Doce horas antes de iniciar el experimento fue retirada la alimentación para evitar que este factor interviniera en los resultados, manteniendo el consumo de agua.

El extracto metanólico de *Capraria biflora L.*, compuesto en estudio, fue suspendido en solución acuosa de Tween 80 al 2 %, evaluándose a dosis de 50, 100 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 y preparadas momentos antes de comenzar la administración (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Diseño del estudio del edema plantar.

Grupos	Nivel de Dosis (mg/kg)	Nivel de Dosis (ml/kg)	Números de animales
I Ctrol (-) Tween 80	-	10	6
II Ctrol (+) Indometacina	7	10	6
III Ext. Metan. 50 mg/kg	50	10	6
IV Ext. Metan. 100 mg/kg	100	10	6
V Ext. Metan. 200mg/kg	200	10	6

-
- **Descripción de la técnica:** Se midieron los volúmenes normales de la pata derecha inferior de los ratones con un pie de rey, llegándose a realizar tres réplicas que cumplieron con un coeficiente de variación menor o igual al 4 %. Posteriormente se trataron los grupos experimentales: un control negativo que recibió solución acuosa de Tween 80 al 2 % y uno positivo al que se administró Indometacina 10 mg/kg de peso como agente antiinflamatorio; tres grupos problema que recibieron el extracto metanólico de *Capraria biflora L.* a dosis de 50, 100 y 200 mg/kg de peso, manteniéndose un volumen de administración constante de 10 ml/kg. Transcurrida una hora de la administración, mediante jeringuillas de 1 ml con aguja especial (cánulas), por vía oral, se administró, a cada uno de los lotes, 0.1 ml (inyectable) de solución acuosa al 1 % de Dextrano en la aponeurosis plantar derecha de todos los animales. Los volúmenes de la pata inflamada fueron medidos a las 2, 3, 4 y 5 horas después de comenzada la experiencia. El porcentaje de inflamación, a cada tiempo, se calculó 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.

Para el desarrollo del proceder experimental fue seguido el protocolo descrito en el acápite 1.3.1.1 A de la revisión bibliográfica.

2.4.2 Peritonitis inducida por carragenina.

Considerando los resultados de la evaluación anterior se decide utilizar un test más específico pero con un sólo rango de dosis. ^[38]

- **Animales de experimentación:** Se tomaron ratones de raza Swiss de 20 a 30 g de peso, siendo agrupados en tres lotes de 3 ratones cada uno. Los mismos

fueron mantenidos 2 días antes del experimento en condiciones de climatización apropiadas con libre acceso de comida y agua. Doce horas antes de iniciar el experimento fue retirada la alimentación, manteniendo el consumo de agua, para evitar que este factor interviniera en los resultados.

El extracto metanólico de *Capraria biflora L.* fue evaluado a una dosis de 200 mg/kg de peso, siendo suspendido en solución acuosa de Tween 80 al 2 %. Como grupo control positivo se empleó Indometacina 10 mg/kg de peso (agente antiinflamatorio) y como grupo control negativo se empleó una solución acuosa de Tween 80 al 2 %. La solución de carragenina, agente irritante, fue preparada al 0.75 % en solución buffer fosfato (PBS). Cada una de estas sustancias fueron preparadas justo antes de comenzar el experimento.

- **Descripción de la técnica:** Se comenzó aplicando el tratamiento a los grupos experimentales; se le administró Indometacina como agente antiinflamatorio al grupo control positivo, un grupo problema recibió el extracto metanólico a 200 mg/kg de peso y un último grupo recibió el vehículo. Cada una de las administraciones se realizaron por vía oral mediante jeringuillas de 1 ml con agujas especiales. Transcurrida una hora se les inyectó por vía intraperitoneal 0.25 ml de la solución de carragenina 0.75 % a todos los animales de experimentación.

Para el desarrollo del proceder experimental fue seguido el protocolo descrito en el acápite 1.3.2.2 de la revisión bibliográfica.

Cinco horas más tarde los ratones fueron sacrificados, lavándose la cavidad peritoneal con 2 ml de PBS (dos veces). Los fluidos peritoneales fueron recuperados con una jeringuilla, determinándose, más tarde, el número de leucocitos presentes en cámara de Neubauer mediante un microscopio.

Se determinó para cada grupo el % de inhibición de la migración leucocitaria con respecto al grupo control, según la siguiente expresión:

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

Donde: X es el valor medio del número de leucocitos.

2.5 FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO METANÓLICO.

2.5.1 Fraccionamiento I (CC₁).

0.05 g del extracto metanólico, pesados en balanza analítica, fue separado en columna cromatográfica empleando sílica gel 60 como fase estacionaria y cloroformo:metanol (9:1) y metanol como fases móviles. Se procedió a un flujo de, aproximadamente, 5 ml/min, tomando muestras de 5 ml para un total de 120 muestras. Las fracciones fueron combinadas en siete grupos A - G. en base al perfil cromatográfico en TLC, siguiendo las siguientes condiciones:

Materiales y equipos:

- a. Placas de sílica gel 60°.
- b. Cámara cromatográfica. (CAMAG)
- c. Micropipetas.

Solventes:

- Cloroformo:metanol (9:1).

Revelador:

- Ácido fosfomolibdico (10 % EtOH absoluto).

Todas las fracciones obtenidas fueron pesadas y calculado el rendimiento (el procesamiento fue repetido tres veces para obtener cantidades suficientes), así como evaluadas preliminarmente siguiendo un estudio piloto de la actividad antiinflamatoria a 125 mg/kg de peso como dosis y tres animales por grupo. El

resto de las condiciones (grupo control positivo y grupo control negativo) fue similar a lo descrito en el acápite 2.4.2.

2.5.2 Fraccionamiento II (CC_{II}).

Considerando los resultados obtenidos en el acápite anterior, la fracción C fue separada nuevamente en tres subfracciones: C1, C2, y C3. Cromatográficamente fue empleada una columna abierta de diámetro 2.5 cm con sílica gel 60° como fase estacionaria, de una altura aproximada de 50 cm, eludida con diclorometano:metanol en proporciones 98:2 y 90:10. El flujo de fase móvil fue aproximadamente de 5 ml/min., tomando alícuotas de 5 ml para un total de 250 muestras. Las fracciones fueron evaluadas por TLC bajo las siguientes condiciones:

Materiales y equipos:

- a. Placas de sílica gel 60°.
- b. Cámara cromatográfica. (CAMAG)
- c. Micropipetas.

Solventes:

- Diclorometano:metanol (99:1).

Revelador:

- Ácido fosfomolibdico (10 % EtOH absoluto).

Las fracciones fueron reunidas según su perfil cromatográfico, pesadas y calculado su rendimiento, así como evaluadas farmacológicamente según se indica en el acápite 2.4.2 a dosis de 40 mg/kg de peso.

Resultados y Discusión.

3.1 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

La evaluación de las características macromorfológicas de los ejemplares correspondientes a ambos lotes coinciden con los establecidos por Tejeda en 1998 ^[14] y con las reportadas por la literatura para esta especie vegetal ^[1,12]. Coinciden también con las características organolépticas de los polvos obtenidos a partir de ambos lotes, así como el resultado de la evaluación fitoquímica cualitativa (Tabla 3.1, Anexo 3), por lo que fueron empleados ambos lotes en la investigación, previamente homogenizados. Dichos resultados corroboran que el sitio de recolección no influye, al menos, cualitativamente en la composición de esta droga vegetal.

3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO.

El extracto metanólico se obtuvo a partir de 100 g de material vegetal. Para ello se tomaron los 100 g de la droga seca y molinada y se le adicionaron 800 ml de metanol, obteniéndose, finalmente, un rendimiento de un 31 %. Del extracto obtenido se tomó una porción para la determinación de los índices farmacognósticos, otra para el biofraccionamiento y una última para su evaluación farmacológica por el test del edema plantar y por el test de la peritonitis inducida por carragenina.

3.3 CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO.

3.3.1 Índices farmacognósticos.

El extracto metanólico obtenido a partir de las hojas secas de *Capraria biflora L.*, se caracteriza por ser un líquido oscuro de color verde casi negro, de olor característico y sabor amargo, con un precipitado espeso que presenta dichas características.

Los resultados de la determinación de los índices farmacognósticos aparecen resumidos en la Tabla 3.2. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado reportando el valor promedio.

Tabla 3.2 Resultados de los índices farmacognósticos.

ÍNDICES FARMACOGNÓSTICOS.	RESULTADOS.
Características organolépticas.	Color: Verde oscuro – negro.
	Olor: Característico.
	Sabor: Amargo.
Densidad relativa	0.825 g/ml.
Índice de refracción.	1.341nD
Sólidos totales.	5.60 g/5ml

Para el análisis e interpretación de la imagen del análisis capilar (Fig. 3.1) se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- a. Color.
- b. Sabor.
- c. Descripción de las diferentes partes.

A continuación se realiza un análisis detallado de la imagen obtenida.

	<p><u>Franja</u>: imagen alta de alrededor de 10 cm, de color carmelita claro, fácilmente detectable, en forma de concha.</p>
	<p><u>Subfranja</u>: zona pigmentada por la presencia de sustancias coloreadas, presenta más de un color que van desde verde intenso a un verde más claro, pero fácilmente detectable. Tiene una altura normal de 7 cm de alto.</p>
	<p><u>Banda</u>: zona de tamaño normal de 6 cm de altura, presenta diferentes colores que van desde un verde fuerte a un verde menos intenso.</p>
	<p><u>Subbanda</u>: zona situada debajo de la banda hasta el límite de inmersión. Es de color verde con pigmentos carmelitas y se caracteriza por tener una altura baja de 4 cm. aproximadamente.</p>

Fig. 3.1 Análisis capilar

3.3.2 Análisis cromatográfico del extracto metanólico.

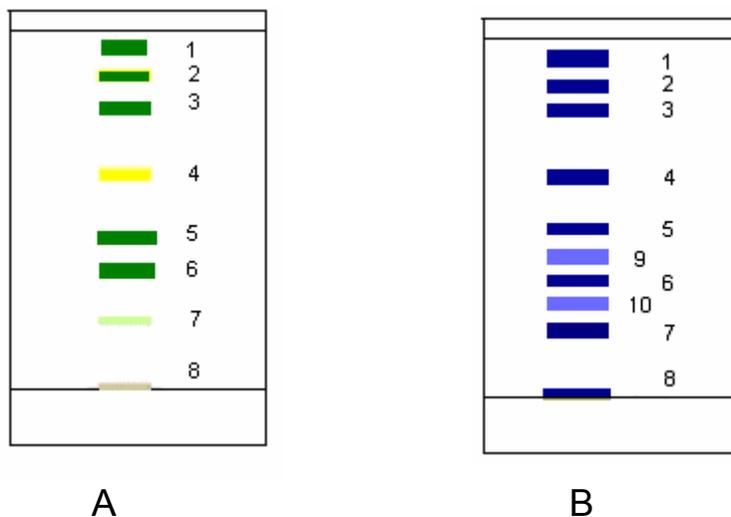


Fig.3.2 Análisis cromatográfico del extracto metanólico de hojas de *Capraria biflora* L...

El análisis de los resultados cromatográficos de la evaluación en TLC del extracto metanólico bajo las condiciones descritas en: 2.3.2 se muestra en los cromatogramas A y B, Fig. 3.2.

El cromatograma A representa los resultados al visible de la corrida cromatográfica. Se observan 8 bandas a Rfs: 0.71, 0.65, 0.62, 0.53, 0.48, 0.45, 0.42, 0.4 correspondientes a las bandas 1 – 7 en orden descendente y la correspondiente a la banda # 8 que queda retenida en el sitio de aplicación. Las bandas 1, 2, 3, 5 y 6 de color verde al visible se corresponde con variantes clorofílicas, lo cual fue corroborado por la fluorescencia roja a 256.

La banda número 4 con $R_f = 0.53$ resultó muy interesante al presentar un intenso color amarillo que se intensifica frente a los vapores de amoníaco, lo cual puede ser un indicativo de su naturaleza flavonoide, sustancia ya reportada para esta planta por González y Fernández ^[42]. Considerando la naturaleza medianamente polar de la fase móvil empleada, esta sustancia, de confirmarse su naturaleza flavonoide, debe ser poco hidroxilada o sus grupos hidroxilos están bloqueados de alguna manera, ya sea por formación de ésteres o éteres, sustituciones de relativa frecuencia en este tipo de sustancia.

El revelado de la placa con ácido fosfomolibdico (Fig. 3.2 B) permitió observar dos nuevas bandas, la # 9 con $R_f = 0.47$ y la # 10 con $R_f = 0.44$ los cuales revelan un color azul violáceo, un poco menos intenso que el resto de las bandas que se observan de un color casi negro. Dado las referencias para este tipo de revelado, estas sustancias son presumiblemente de naturaleza terpenoide, también reportadas por análisis cualitativo (tamizaje fotoquímico) para la planta y extracto alcohólico. ^[14]

3.3.3 Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico.

Tabla 3.3 Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico.

ENSAYOS	METABOLITOS	EXT. MET.
1	Resinas.	+
2	Triterpenos y esteroides.	+
3	Saponinas.	+
4	Aminoácidos Libres.	+++
5	Alcaloides.	+++
6	Coumarinas.	++
7	Glucósidos cardiotónicos	-
8	Carbohidratos reductores.	-
9	Taninos.	+
10	Quinonas.	+++
11	Flavonoides.	+
12	Antocianidinas.	-
13	Ácidos grasos.	+

En la Tabla 3.3 se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico. Para el cual el extracto metanólico inicial se redisolvió en metanol llegando a obtener una composición variada de metabolitos. Como se puede apreciar, se observan evidencias positivas de la presencia de resinas, triterpenos y/o esteroides, saponinas, aminoácidos libres, alcaloides, coumarinas, fenoles y/o taninos, quinonas, flavonoides y ácidos grasos, no siendo así en el caso de los glucósidos cardiotónicos, carbohidratos reductores y antocianidinas.

Estos resultados y los reportados por Tejeda en 1998 ^[14] al realizarle el tamizaje fitoquímico a un extracto alcohólico, a partir de las hojas secas de *Capraria biflora* L., son muy similares.

Cada metabolito presente en la planta le da a esta una propiedad diferente. En el acápite 1.1.4 de la revisión bibliográfica, se muestra un pequeño resumen de los posibles metabolitos responsables de la actividad antiinflamatoria. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico y el resumen realizado en el Capítulo I podemos inferir que tanto los triterpenos y/o esteroides, las saponinas, los alcaloides, fenoles y/o taninos, quinonas, flavonoides, como los ácidos grasos, pudiesen ser los posibles metabolitos responsables de esta actividad.

3.4 EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA.

Los resultados de la evaluación farmacológica del extracto metanólico de la *Capraria biflora* L. se muestran en la Tabla 3.4 y en los Gráficos 3.1 y 3.2. Dicha evaluación fue realizada empleando el test del edema plantar inducido por Dextrano y el test de la peritonitis inducida por carragenina.

3.4.1 Test del edema plantar inducido por Dextrano.

Como se puede observar en el Gráfico 3.1 para el grupo control negativo, el nivel de inflamación va aumentando progresivamente hasta alcanzar un 100 % de inflamación a las 4 horas de haber iniciado el experimento. Dicho porcentaje es mantenido, hasta una hora después que disminuye hasta un 79.04 % debido a los diferentes mecanismos antiinflamatorios que presenta el organismo.

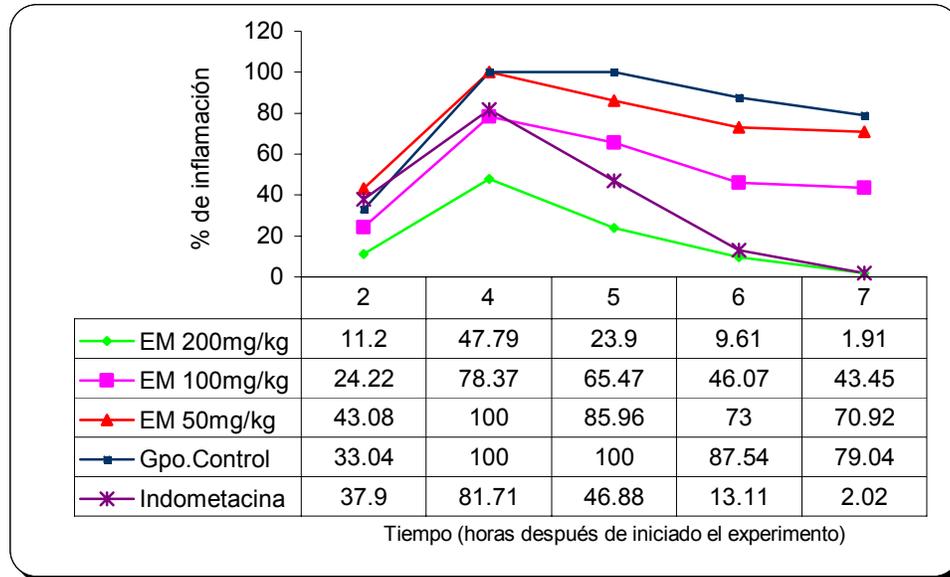


Gráfico 3.1 Resultados de la evaluación farmacológica: edema plantar (% de inflamación vs tiempo).

En el grupo tratado con el extracto metanólico a dosis de 50 mg/kg de peso comienza a desarrollarse la inflamación una hora después de haber administrado el agente irritante y logra su punto máximo a las 3 horas de haber administrado el mismo, con un 100 % de inflamación. Luego disminuye hasta un 70.92 % al cabo de las 7 horas de haber iniciado la experiencia.

A dosis de 100 mg/kg de peso comienza el proceso de inflamación al cabo de las 2 horas de haber comenzado el experimento hasta alcanzar un 78.37 %, como punto máximo de inflamación, a las 4 horas. Al cabo de las 5 horas se observa cómo este parámetro disminuye en el tiempo hasta un 43.45 % de inflamación.

En el grupo tratado con el extracto metanólico a dosis de 200 mg/kg de peso comienza a verse el efecto inflamatorio al cabo de las 2 horas de haber iniciado la experiencia hasta alcanzar su punto máximo a las 4 horas, alcanzando un 47.79% de inflamación. Una hora después de haber comenzado el mismo, se inicia el proceso antiinflamatorio disminuyendo hasta un 23.9 % al cabo de las 5 horas y así sucesivamente hasta obtener sólo un 1.91 % de inflamación.

En el grupo control positivo o Indometacina comienza a observarse el efecto inflamatorio a la hora de haber administrado el agente irritante (Dextrano), llegando a un 81.71 % de inflamación en su punto máximo a las 4 h de haber administrado el mismo. Posteriormente, se inicia el efecto antiinflamatorio, disminuyendo considerablemente hasta llegar a un 2.02 % de inflamación.

Al analizar cada grupo por separado podemos observar cómo el nivel de inflamación va aumentando considerablemente una vez administrado el Dextrano, alcanzado su nivel máximo, para cada uno de los grupos, al cabo de las 4 horas después de haber iniciado el experimento. Llegado a este punto se observa cómo la inflamación en la pata del ratón, va disminuyendo para cada una de las sustancias analizadas, no siendo así para el grupo control negativo.

El valor máximo del extracto metanólico a dosis de 50 mg/kg de peso y el de dicho grupo es el mismo, pero se observa cómo al grupo tratado con el extracto metanólico a esta dosis le va disminuyendo la inflamación en el tiempo. El punto máximo del extracto a dosis de 100 mg/kg de peso es muy inferior al del control negativo y muy cercano al de la Indometacina. Sin embargo, se observa cómo éste va disminuyendo hasta lograr un 43.45 % de inflamación, valor mucho menor que el del grupo tratado con Tween 80, pero a la vez mayor que el del grupo control negativo. Incluso se ve cómo los valores del grupo tratado con Indometacina disminuye considerablemente al cabo de las 5 horas después de iniciado el experimento, lo que no sucede a tal magnitud con el grupo tratado con el extracto metanólico a esta dosis (100 mg/kg de peso).

Debemos señalar la diferencia existente entre el extracto metanólico a 200 mg/kg de peso y el grupo control positivo, pues cómo se observa en el Gráfico 3.1; el porcentaje de inflamación a esta dosis es mucho menor con respecto a éste último, a la hora de haber administrado el agente irritante. El valor alcanzado en el punto máximo de inflamación por el extracto metanólico, a esta dosis, es muy inferior al alcanzado por el grupo control positivo, sin embargo, para ambos grupos ocurre

una disminución del porcentaje de inflamación hasta llegar a un 1.91 % y 2.02 %, respectivamente, al cabo de las 7 horas.

Como se puede apreciar, el extracto metanólico a cada una de las dosis analizadas, presenta actividad antiinflamatoria, resaltando la dosis de 200 mg/kg de peso.

A pesar que para este test del edema plantar no se realizó el procesamiento estadístico para determinar las diferencias significativas existentes entre un grupo y otro, se puede observar con claridad, cómo el extracto metanólico a 200 mg/kg de peso presenta un menor porcentaje de inflamación en comparación con las dosis restantes aplicadas.

3.4.2 Test de la peritonitis inducida por carragenina.

Al evaluar la actividad antiinflamatoria para el extracto metanólico a 200 mg/kg de peso por el test de la peritonitis inducida por carragenina (Tabla 3.4 y Gráfico 3.2), se corroboran los resultados obtenidos en el test anterior, pues se observa cómo el extracto metanólico a esta dosis presenta actividad antiinflamatoria con un porcentaje de migración leucocitaria de $0.62 \text{ células/ml} \cdot 10^6$, valor muy similar al obtenido para la Indometacina ($0.59 \text{ células/ml} \cdot 10^6$) y por tanto muy inferior al del grupo control negativo.

Tabla 3.4 Peritonitis inducida por carragenina.

GRUPOS	% de migración leucocitaria (Células /ml*10⁶)
Control (-)	1.062
ME	0.62
Indometacina	0.59

Estos resultados demuestran que el extracto metanólico, a dosis de 200 mg/kg de peso, tiene la propiedad de inhibir a los mediadores de la inflamación que están presentes en el organismo: prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI₂), leucotrienos (LTs), tromboxanos (TXs) y factor activador plaquetario. [34]

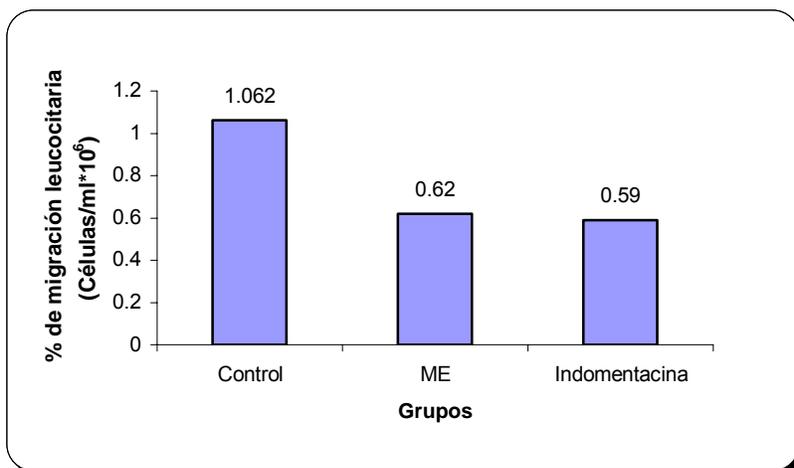


Gráfico 3.2 Resultados de la evaluación farmacológica: test de la peritonitis inducida por carragenina (porcentaje de migración leucocitaria vs grupos)

Teniendo en cuenta estos resultados queda demostrada la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico obtenido a partir de las hojas secas de *Capraria biflora* L., así como la posible propiedad de protección que presenta el extracto a dosis de 200 mg/kg de peso, contra la acción del agente irritante, lo que justifica la búsqueda de agentes antiinflamatorios entre los componentes del extracto metanólico.

3.5 BIOFRACCIONAMIENTO.

3.5.1 Fraccionamiento I (CC₁).

El desarrollo cromatográfico de la columna en las condiciones correspondientes al primer fraccionamiento se muestra en la Fig. 3.3 A y B. Como puede observarse, se logra una excelente separación obteniéndose bandas definidas de color

variable, las cuales coinciden con las fracciones finalmente obtenidas Fig. 3.3 A. La evaluación cromatográfica permitió agrupar las 120 alíquotas obtenidas en 7 fracciones según su perfil cromatográfico, el cual se muestra en la Fig. 3.3 B.

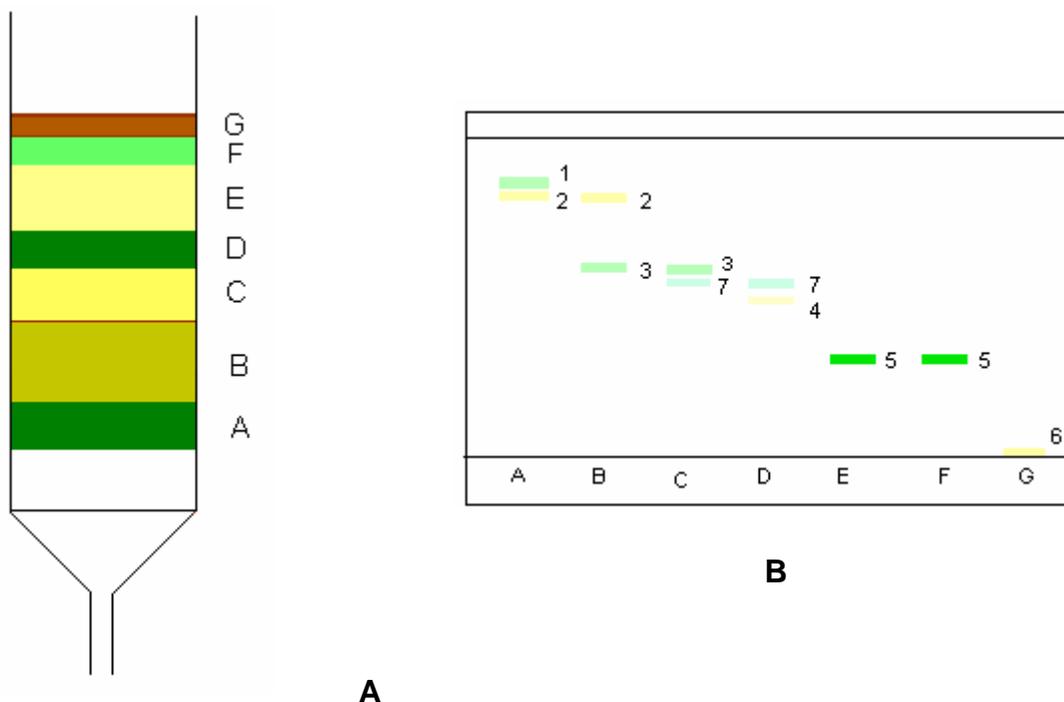


Fig. 3.3 Análisis cromatográfico de las fracciones obtenidas en el primer fraccionamiento (CC_I).

Una vez reunidas las fracciones, estas fueron concentradas a vacío en rotoevaporador y pesadas para calcular rendimiento, el resultado de las cuales aparecen resumidas en la Tabla 3.5. Como puede inferirse, del análisis de los resultados, se alcanzó un 80.65 % de rendimiento total, lo cual significa que quedó retenido en la columna un 19.35 % de la masa total empleada en la separación.

Tabla 3.5 Cálculo del rendimiento de la separación cromatográfica.

FRACCIONES	A	B	C	D	E	F	G	Total
Rendimiento (%/100 g de extracto)	21.5	11.8	0.29	6.35	3.5	14.6	22.9	80.65

- **Resultado de la evaluación farmacológica de las fracciones.**

Seguidamente, cada una de estas fracciones, fue evaluada farmacológicamente para establecer las fracciones activas. Los resultados de dicha evaluación aparecen en la Tabla 3.6 y el Gráfico 3.3.

Tabla 3.6 Resultados de la evaluación farmacológica fraccionamiento CC_I.

Grupos	% de Inhib. Leucocitaria (Células/ml*10 ⁶)
Fracc A	1.2850
Fracc B	0.9300
Fracc C	0.2550
Fracc D	0.9250
Fracc E	1.9225
Fracc F	1.3700
Fracc G	1.2705
Control (-)	1.7000
Indometacina	0.6740

Como puede observarse, del análisis de estos resultados, todas las fracciones a excepción de la fracción E, manifestaron menos migración leucocitaria que el grupo control, siendo significativa la disminución alcanzada por la fracción C, mucho menos que el grupo control positivo o grupo Indometacina, siendo mucho mayores los % de inhibición que en este grupo.

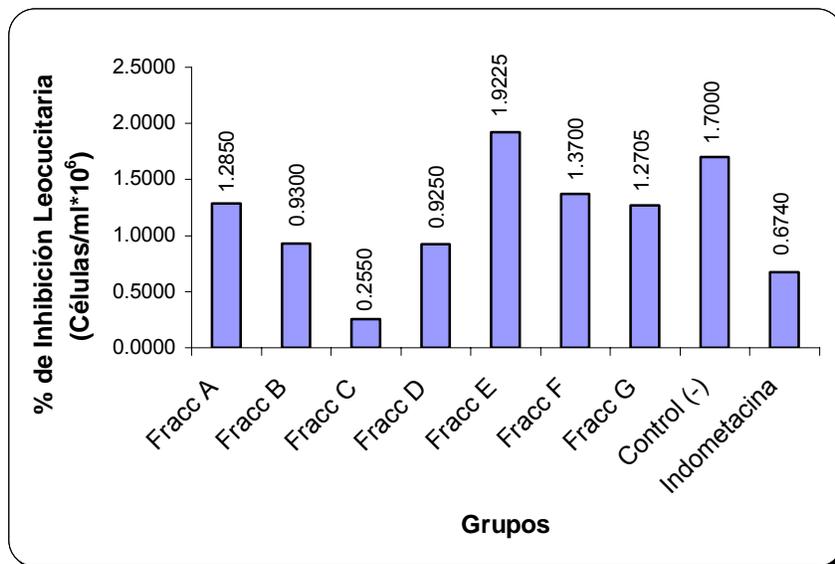


Gráfico 3.3 Evaluación farmacológica: test de la peritonitis inducida por carragenina (migración leucocitaria vs grupos).

Otra fracción, también con cierto efecto inhibitorio, resultó ser el grupo tratado con la fracción D, lo cual pudiera inferir que las sustancias relacionadas con la banda #8 del cromatograma del extracto metanólico, Fig. 3.2 (B), pudieran estar involucrados con el efecto antiinflamatorio manifestado por dicho extracto.

3.5.2 Fraccionamiento II (CC_{II}).

Una vez determinada que la fracción C resultaba la de mayores potencialidades como inhibidor de la migración leucocitaria, esta fue fraccionada en una segunda columna cromatográfica de sílica gel 60° como fase estacionaria y diclorometano:metanol (98:2 y 90:10) obteniéndose 250 alíquotas (5 ml cada una). Las alíquotas fueron cromatografiadas sobre sílica gel 60° y eluidas con diclorometano:metanol (99:1) para rendir 3 fracciones: C1, C2 y C3 según su perfil cromatográfico. Las dos primeras eluidas en la columna con los primeros 1000 ml de la fase móvil y C3 con la segunda. Los resultados de ambas cromatografías se observan en las figuras 3.4 A y B

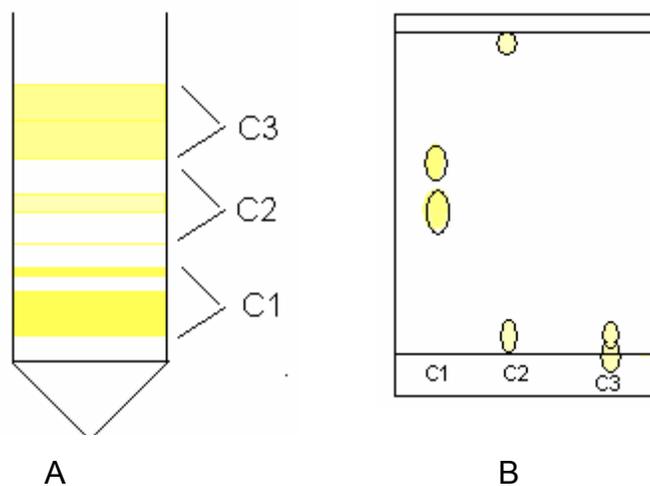


Fig. 3.4 Resultados cromatográficos de las fracciones obtenidas en el segundo fraccionamiento (CC_{II})

Como puede observarse en estas figuras, la muestra se separó al comenzar a operar la columna en 4 bandas, todas de color amarillo más o menos intenso, las dos primeras eluyen en un tiempo relativamente rápido, no siendo así con las dos restantes. Una vez reunidas las alícuotas en las tres fracciones, estas fueron concentradas y calculado el rendimiento para obtener 21.38 %, 48.01 %, 23.03 % de C1, C2 y C3 respectivamente.

- **Resultados de la evaluación farmacológica.**

Los resultados de la evaluación farmacológica para la fracción C se muestran en la Tabla 3.7 y en el Gráfico 3.4.

Tabla 3.7 resultados de la evaluación farmacológica fraccionamiento CC_{II}.

Grupo	% de migración leucocitaria (Células /mL *10⁶)
Fracción C1	11,425
Fracción C2	0.6775
Fracción C3	12,825
Control	19,300
Indometacina	0.674

Seguidamente, cada una de estas fracciones, fue evaluada farmacológicamente para establecer cuál de ellas contenía los compuestos mayormente activos. Para esta experiencia se hizo necesario disolver las fracciones en solución Tween 80 al 10 % para mejorar su solubilidad. Como puede observarse, tanto en la tabla como en el gráfico, en la fracción C2 se encuentran los productos mayormente activos, pues todos los grupos tratados mostraron una disminución en la migración leucocitaria. Con respecto al grupo control, fue esta fracción la de menor número de células con un 0.6775 células/ml*10⁶, muy similar al grupo tratado por la Indometacina y el grupo tratado con la fracción C, de lo cual se concluye que esta fracción puede considerarse como la fracción más activa, aunque no deben descartarse el resto de los componentes de esta fracción (C).

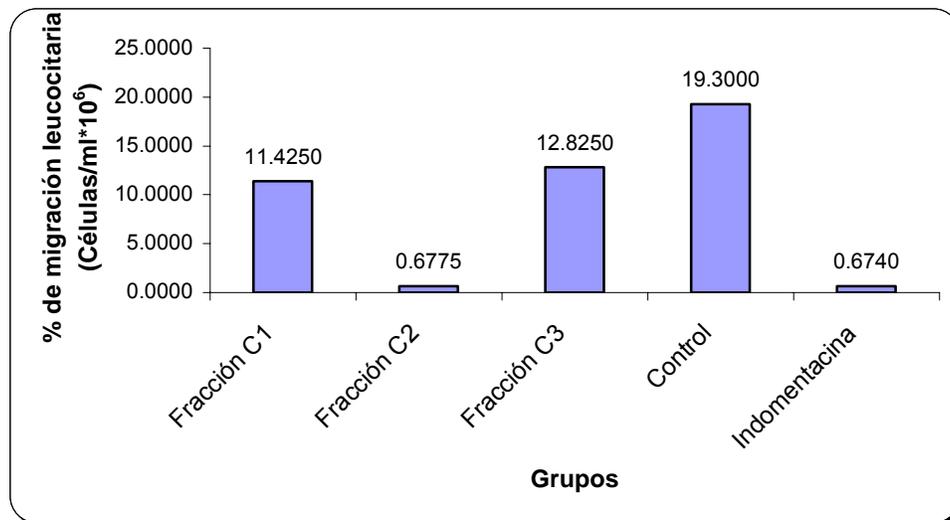


Gráfico 3.4 Evaluación farmacológica de la fracción C.

Por otra parte, considerando los resultados al revelar las muestras cromatografiadas en TLC con la solución alcohólica del ácido fosfomolibdico, podemos señalar que los metabolitos presentes, tanto en C como en C2, pueden ser compuestos de naturaleza terpenoide, lo cual fue corroborado con el ensayo de Lieberman Burchard, específico para este tipo de compuesto.

Conclusiones.

1. Se establecen el método soxhlet en un tiempo de extracción de 5 horas aproximadamente, como condiciones adecuadas para la obtención del extracto metanólico, lográndose un rendimiento satisfactorio.
2. Se determinaron los índices farmacognósticos del extracto metanólico original.
3. Se comprueba científicamente el efecto antiinflamatorio del extracto metanólico.
4. La fracción C obtenida, a partir del extracto metanólico, resultó ser la más activa de las obtenidas en el fraccionamiento CC_I.
5. Se realizó un segundo fraccionamiento a partir de la fracción C, lográndose la obtención de una subfracción a la que se le denominó fracción C2.

Recomendaciones.

1. Realizar el proceso de fraccionamiento a una escala mayor para obtener cantidades superiores de las fracciones activas que permitan la separación y elucidación estructural de los componentes.
2. Evaluar la posible toxicidad del extracto metanólico.
3. Evaluar, mediante otros test farmacológicos, el efecto antiinflamatorio de las fracciones activas.
4. Realizar el tamizaje fitoquímico a cada una de las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico, así como las obtenidas a partir del fraccionamiento CC_{II} .