

UNIVERSIDAD DE LA HABANA



Instituto de Farmacia y Alimentos

**EVALUACIÓN FITOQUÍMICA Y FARMACOLÓGICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE
LAS HOJAS DE LA ESPECIE *Boldoa purpurascens*, Cav.**

Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Ms.C. DULCE MARÍA GONZÁLEZ MOSQUERA

La Habana
2006

UNIVERSIDAD DE LA HABANA



Instituto de Farmacia y Alimentos

**EVALUACIÓN FITOQUÍMICA Y FARMACOLÓGICA DEL EXTRACTO ACUOSO
LAS HOJAS DE LA ESPECIE *Boldoa purpurascens*, Cav.**

Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Autora : MS.C. Dulce María González Mosquera

Tutores: Dr.C. Armando Cuéllar Cuéllar

Dr.C. Amuri Kilonda

Asesores: Dr.C. Luis R. Bravo Sánchez

Dr.C. Hermán Vélez Castro

**La Habana
2006**

ÍNDICE

	Págs.
INTRODUCCIÓN	1
1. Revisión bibliográfica	6
1.1. <i>Nyctaginaceae</i> . Generalidades botánicas	6
1.2. <i>Boldoa purpurascens</i> , Cav ex Lag (nitro). Generalidades botánicas de la especie	6
1.2.1. Descripción botánica	7
1.2.2. Hábitat, distribución, fenología y cultivo	7
1.3. Usos en la medicina tradicional	7
1.4. <i>Antecedentes en los estudios de Nyctaginaceae</i>	8
1.4.1. Antecedentes en el estudio químico de la especie del género <i>Boldoa</i>	10
1.5. Actividad biológica de los compuestos del género <i>Boldoa</i>	10
1.6. Antecedentes en el estudio biológico de <i>Boldoa purpurascens</i> , Cav	11
1.7. Aislamiento y purificación de flavonoides	13
1.8. Técnicas analíticas empleadas en la identificación de flavonoides	15
1.9. Consideraciones farmacológicas en la terapia de la diuresis	17
2. Materiales y Métodos	23
2.1. Evaluaciones preclínicas	23
2.1.1. Evaluación de la actividad diurética del extracto acuoso	24

2.1.2. Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto acuoso	25
2.1.3. Valoración toxicológica del extracto acuoso	27
2.1.3.1. Evaluación de la toxicidad aguda	27
2.1.3.2. Evaluación de la genotoxicidad	29
2.1.3.2.1. Ensayo de Micronúcleos	30
2.1.3.2.2. Test de Ames	30
2.2. Estudio farmacognóstico de <i>Boldoa purpurascens</i>	31
2.2.1. Recolección	31
2.2.2. Estandarización de la droga cruda	32
2.2.2.1. Secado	32
2.2.2.2. Determinación de los parámetros de calidad	33
2.3. Preparación de extractos y métodos de fraccionamiento	35
2.3.1. Extracción por un sistema de polaridad creciente	35
2.3.2. Preparación del extracto acuoso	36
2.3.2.1. Fraccionamiento por un sistema de contracorriente	37
2.3.2.2. Separación por placa preparativa de la fracción butanólica	37
2.3.2.3. Análisis espectroscópico de la fracción n-butanólica	37
2.3.2.4. Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) de la fracción n-butanólica	38
2.3.3. Obtención de una fracción rica en flavonoides	38
2.3.3.1. Aislamiento y purificación de los compuestos presentes en el	

3.3.2. Ensayo de micronúcleos en médula ósea	51
3.3.3. Test de Ames	53
4. ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO DE <i>Boldoa purpurascens</i>	58
4.1. Clasificación botánica	58
4.2. Estandarización de la droga cruda	58
Secado y humedad residual	59
Determinación de cenizas totales	60
Composición inorgánica de la planta	61
Tamizaje fitoquímico	62
5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS; AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS	65
5.1. Extracción con disolventes de polaridad creciente	65
5.1.1. Preparación del extracto acuoso y métodos de fraccionamiento	68
Fraccionamiento por contracorriente	63
5.1.1.1. Separación por placa preparativa de la fracción butanólica	68
Absorción por espectroscopía infrarroja (IR) de las fracciones	68
Análisis de las fracciones por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia	70
5.2.2. Análisis de la fracción n-butanólica obtenida por contracorriente	71
5.3. Obtención de una fracción n-butanólica rica en flavonoides	71

5.3.1. Aislamiento y purificación de los compuestos de la fracción butanólica	72
5.3.1.2. Separación y purificación de otros compuestos de la fracción butanólica. (5 y 7)	73
5.4. Análisis espectroscópicos de los compuestos obtenidos	74
5.4.1. Absorción por espectroscopía UV/Vis	74
5.4.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear. Propuesta estructural	74
5.5. Evaluación de la actividad diurética de compuestos aislados del extracto acuoso	81
5.5.1. Evaluación de la actividad diurética de 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-flavona-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosida	81
5.5.2. Evaluación de la actividad diurética de un compuesto aislado del extracto acuoso (4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-flavona-3-O- β -D-xilopiranosida)	82
6. DISCUSIÓN GENERAL	86
CONCLUSIONES	93
RECOMENDACIONES	96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

A principios de este siglo, el desarrollo de la química y el descubrimiento de complejos procesos de síntesis orgánica desembocaron en dos sucesos: una nueva producción de medicamentos por parte de la industria farmacéutica y un aumento del volumen de productos farmacológicos que facilitó la atención a un mayor número de pacientes (Arteche, 1998; 2003).

Sin embargo, las plantas medicinales no quedaron totalmente olvidadas y en los tiempos actuales se observa como en numerosos institutos y empresas farmacéuticas de todos los países se continúa intensamente su investigación.

Hoy, en todo el mundo, se realizan múltiples trabajos dirigidos al campo de la medicina natural, a pesar del alto consumo de quimioterapéuticos. En los momentos actuales una parte de los esfuerzos en la industria farmacéutica van encaminados hacia la obtención de fármacos de origen natural que puedan ser terapias alternativas respecto a los sintéticos (Harnischfeger, 2002).

En Cuba, como en el resto del mundo, la fitoterapia está recuperando terreno debido a la demostración científica de su beneficio terapéutico y a una de sus características más importantes: la seguridad, es decir, la poca o nula toxicidad y los escasos efectos secundarios e indeseables que presentan (Graf, 1999; Rodríguez, 2001).

Si bien es cierto que la extracción, aislamiento e identificación de los constituyentes de las drogas vegetales se ha efectuado en años relativamente recientes, el propósito para el cual estas sustancias medicinales se emplean hoy día es el mismo que le dieron nuestros antecesores.

Se han conocido muchas especies de diferentes familias de plantas con determinada acción biológica, un ejemplo lo constituye la familia Nictaginaceae. Se ha encontrado en la mayoría de los estudios realizados en los diferentes géneros y especies que los flavonoides, las sales de potasio, los taninos y las saponinas, entre otros, pueden ser responsables de una acción diurética (Arteche, 1998; 2003). Entre ellos se destacan los flavonoles y las flavonas, presentes en algunas especies de esta familia (Arteche, 1998; 2003; Harbone, 1982;).

Dentro de las enfermedades más frecuentemente tratadas con plantas medicinales están las del sistema renal. Una de las especies cuyo empleo en estas patologías se informa popularmente es *Boldoa purpurascens*, Cav (Roig, 1988), conocida en Cuba como Nitro. Esta especie sólo tiene informes preliminares acerca de estudios que validen su utilidad como medicamento vegetal con propiedades diuréticas y que la misma puede ser utilizada en diversas patologías relacionadas con el sistema renal, por lo que se requiere profundizar en el estudio químico y farmacológico del extracto acuoso de las hojas y para ello se plantea el problema científico siguiente:

Problema científico

La medicina tradicional refiere el uso del extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*, Cav en el tratamiento de afecciones del sistema renal. No hay estudios científicos que validen el mismo por lo que si se desea emplear como fitomedicamento, hay que realizar estudios químicos y biológicos que corroboren dicho uso tradicional.

Por tales razones en el presente trabajo se plantea la hipótesis siguiente:

Hipótesis:

El extracto acuoso de las hojas de la especie *Boldoa purpurascens*, Cav posee componentes químicos que son responsables del efecto diurético atribuido por la medicina tradicional.

Para comprobar dicha hipótesis se propusieron los objetivos siguientes:

Objetivo general:

Realizar evaluaciones fitoquímicas, farmacológicas y toxicológicas al extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*, Cav que permitan avalar su uso por la medicina tradicional.

Objetivos específicos:

1. Corroborar si el extracto acuoso de las hojas de la especie tiene efecto diurético, como se le atribuye por la medicina tradicional.

2. Realizar las evaluaciones antimicrobianas y toxicológicas al extracto acuoso de las hojas de la planta que permitan dar criterios sobre su uso como terapia alternativa del sistema primario de salud en Cuba.
3. Evaluar algunos índices farmacognósticos para las hojas de *Boldoa purpurascens*, Cav que permitan establecer los parámetros de calidad para su normalización como droga cruda.
4. Determinar los componentes inorgánicos mayoritarios del extracto acuoso de la planta.
5. Aislar y caracterizar químicamente componentes orgánicos presentes en el extracto acuoso de las hojas de *Boldoa purpurascens*, Cav.
6. Evaluar la posible contribución de los compuestos aislados al efecto diurético del extracto acuoso, referido por la medicina tradicional.

Novedad científica:

Por primera vez, se realiza un estudio científico que permite establecer que el extracto acuoso a partir de las hojas de la especie *Boldoa purpurascens*, Cav al 5 % presenta un efecto diurético comparable con la Furosemida y la Hidroclorotiazida, sin presentar toxicidad detectable en animales de experimentación, lo cual permite sugerir su uso seguro como fitomedicamento para trastornos renales.

En este extracto activo, se determina la presencia de alto contenido de potasio (0,9%), se aíslan y caracterizan cuatro glicósidos derivados de flavonoides, de ellos, tres estructuras se refieren por primera vez como nuevos productos naturales y se demuestra que estos componentes químicos contribuyen al efecto diurético de este extracto.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. *Nyctaginaceae*. Generalidades botánicas.

Nyctaginaceae: Plantas dicotiledóneas, orden Centrospermales, herbáceas o leñosas, por lo común con hojas opuestas, flores en cimas umbeliformes o corimbiformes, brácteas en la base de las flores, libres o soldadas, a veces petaloideas, con frecuencia en involucreo caliciforme, cinco sépalos corolinos, soldados, con base persistente en la madurez, formando, alrededor del agujero, un antocarpo envolvente. La mayoría son americanas. El nombre de la familia es derivado de *Nyctago*, que denominó al hoy llamado *Mirabilis*.

1.2. *Boldoa purpurascens*, Cav ex Lag (nitro). Generalidades botánicas de la especie.

Boldoa purpurascens, Cavanilles ex Lag, es conocida vulgarmente en Cuba como nitro o tostón (Roig, 1988). Fue descubierta por Cavanilles en América y depositada en el jardín botánico de Madrid en 1816 por Lagasca, un discípulo de Cavanilles, introducida en Cuba en 1842. Se puede observar los aspectos taxonómicos más importantes en la figura 1.

A esta planta se le conocen tres sinonimias: *Boldoa ovatifolia* Lag; *Cryptocarpus globosus* HBK y *Salpianthus purpurascens* Hook.& Arn. Es la única especie de su género.

1.2.1. Descripción botánica.

Boldoa purpurascens, Cav. ex Lag. Es una planta de 1-2 metros de altura, herbácea, muy ramificada; las ramas de la inflorescencia son pegajosas. Hojas rombo-aovadas a aovado-deltoideas, de 5 a 20 cm; agudas a atenuadas, abruptamente acuminadas en la base, decurrente en el peciolo. Flores aglomeradas en racimos cortos y densos al extremo de las ramas de la panoja; periantio de 2,5-3 mm. Fruto de 1,5 mm de diámetro; semilla negra, lustrosa, crece en terrenos yermos, (León, 1957) (Figura 2 y 3).

1.2.2. Hábitat , distribución, fenología y cultivo.

Es una planta silvestre en los terrenos de serpentina y calcáreos, bastante abundante en las cercanías de La Habana, por Guanabacoa y Marianao. (Roig, 1984; 1988). Habita en México, Nicaragua, Guatemala, Costa Rica y Venezuela (León, 1951). Es una planta poco conocida por la población y quizás a eso se deba los escasos estudios que posee.

En Cuba florece de diciembre a mayo, las hojas alcanzan su mayor tamaño en los meses de junio y julio.

1.3. Usos en la medicina tradicional.

En los estudios etnobotánicos se informa su uso como diurético y antiséptico de las vías urinarias. En algunos lugares de Cuba se ha usado para la eliminación de cálculos renales. Es posible que esta acción (no demostrada) sea cierta, atendiendo

al potente efecto diurético que se le atribuye, lo cual lleva consigo una eliminación considerable de líquido y puede ocasionar la fragmentación de los cálculos, pudiendo ser arrastrados del órgano (riñón). Se refiere el empleo de sus hojas y renuevos. (Roig, 1988)

En 1957 el sacerdote Alain León refiere su venta en La Habana, como un poderoso diurético.

1.4. Antecedentes en los estudios de *Nyctaginaceae*.

La familia *Nyctaginaceae* está constituida por 30 géneros, con aproximadamente 300 especies distribuidas en América y el Caribe, siendo químicamente poco conocida. Los géneros más estudiados han sido *Bougainvillea*, *Guapira*, *Mirabilis* y *Pisonea*. Los compuestos que mayormente se informan en la literatura para estos géneros son alcaloides, flavonoides, proantocianidinas, saponinas y sapogeninas. Entre ellos, kamferol y quercetina han sido los compuestos químicos más corrientemente informados (Stintzing y col., 1998).

Atendiendo a los informes que aparecen en la literatura sobre estudios realizados a algunos géneros de esta familia, solamente se resaltan evaluaciones realizadas a *Boerhaavia* y *Bougainvillea*, siendo muy escasos en el resto de los géneros. La investigación para los flavonoides encontrados en las diferentes especies de estos géneros ha estado dirigida en su mayoría a evaluar sólo la actividad antioxidante; no se encontraron trabajos de comprobación de la actividad diurética de flavonoides

aislados en esta familia que avalaran dicho uso, indicando la presencia de éstos de manera general y asociándolos con la acción (Tabla I)

Dentro de la familia botánica se han estudiado algunas especies del género *Boerhaavia*, principalmente las especies *Boerhaavia diffusa* L(BD) y *Boerhaavia erecta* (Stintzing y col., 1998).

La decocción y el jugo de las hojas frescas de *B. diffusa* se emplean en la medicina tradicional de Martinica como analgésicas y anti-inflamatorias; las raíces para la cura de úlceras corneales y ceguera nocturna; también se emplean como hepatoprotectores. Las hojas han sido utilizadas contra la dispepsia, la ictericia, el ensanchamiento del bazo y para aliviar los dolores abdominales. (Chandan y col.,1991; Souza y col., 1999; Shrivastava, 1995).

Borrelli (1995), en el Departamento de Farmacología Experimental, Universidad Nápoles, aisló varios rotenoides que se evaluaron en su efecto sobre la motilidad intestinal "in vitro". Tres de ellos presentaron actividad espasmolítica.

Se estudió la actividad antifúngica de los extractos de cloroformo, acetato de etilo, etanol, éter y agua a partir de las raíces de *B.diffusa*. Se obtuvieron los mejores resultados para los extractos etanólicos y en acetato de etilo con 46 % y 57 % de inhibición al crecimiento del *Microsporium fulvum* respectivamente.

Lami (1999), en la Universidad Médica y Farmacéutica de Japón, aisló del extracto metanólico de las raíces de *Boerhaavia diffusa* dos lignanos conocidos, la

liriodendrina y el mono-beta-D-glucósido del syringaresinol. Este último mostró efecto significativo como antagonista de los canales de calcio en el corazón de la rana.

Chang (1999) de la Escuela de Farmacia, Universidad de Medicina, Taipei, R.O.C, informa que el tallo de *Bougainvillea spectabilis* salvaje se usa en la medicina tradicional para tratar la hepatitis. De las hojas de la planta se aislaron y caracterizaron el spinasterol y la quercetina. Estos metabolitos no se habían aislado previamente de *Bougainvillea spectabilis*. Se demostró que la quercetina es el principio activo de la misma al mostrar fuerte actividad en la inhibición de la xantina oxidasa en el estudio. Se evaluaron nueve flavonoides naturales para valorar el efecto inhibitorio de la xantina oxidasa, la baicaleína, baicalina, capillarina, d-catequina, d-epicatequina, hesperidina, liquiritina, puerarina y wogonina.

Narwal 2002, en el Instituto de la Agricultura de Nueva Delhi, evaluó el efecto antiviral de una proteína aislada de las hojas de *Bougainvillea xbutiana* que mostró efectividad en estos ensayos después de ser inoculada en el tabaco.

1.4.1. Antecedentes en el estudio químico de las especies del género Boldoa

El género *Boldoa* sólo tiene como especie a *Boldoa purpurascens*, Cav. En la amplia revisión bibliográfica efectuada no se han encontrado estudios químicos que justifiquen su uso popular como diurético, ni antibacteriano.

La única referencia a la especie se encuentra en la evaluación por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG – EM) de extractos de hojas de

Boldoa purpurascens, Cav, donde se detectó la presencia de los ácidos grasos palmítico, esteárico, oleico, mirístico y pentadecanoico (González y col., 2001). Con anterioridad a este trabajo, no se citan estudios relacionados con la determinación de los componentes químicos de *Boldoa purpurascens*, Cav..

1.5. Actividad biológica de los compuestos del género Boldoa.

Uno de los géneros de la familia *Nyctaginaceae* es el de *Boldoa* el cual ha sido poco estudiado desde el punto de vista químico, pero se conoce que dentro de los componentes más comunes en esta familia están los flavonoides, saponinas, sales de potasio, taninos y otros (Arteche, 2003). La capacidad para provocar diuresis y disminuir edemas se informa para los flavonoides y sales de potasio (Harbone, 1988; Brandi, 1992) en varias especies de *Nyctaginaceae*. Se han referido los informes de la familia por ser *Boldoa purpurascens*, Cav única especie dentro del género. Existen otros compuestos dentro de la familia que pueden ejercer diferentes acciones farmacológicas; a continuación se describen algunos: los triterpenos y esteroides como antiespasmódicos, antipiréticos, antitumorales, narcóticos y eméticos; los fenoles y taninos son astringentes, cicatrizantes y antisépticos; las saponinas se caracterizan por ser tensoactivas, laxantes, hemolíticas, anticancerígenas e inmunoestimulantes y los ácidos grasos, hipolipemiantes. (www.plantasmedicinales.org/abstract/2000).

1.6. Antecedentes en el estudio biológico de *Boldoa purpurascens*, Cav.

Las afecciones renales constituyen uno de los índices de más alta morbilidad en la clínica y existe una alta incidencia en la tasa de urocultivos positivos. Por otro lado, el uso de plantas medicinales por parte de la población en el tratamiento de afecciones renales también es elevado. Esto motivó que se evaluara el efecto de extractos en forma de decocciones de once especies de plantas empleadas popularmente para el tratamiento de afecciones renales. Se evaluó "in vitro", mediante el método de difusión radial, sobre el crecimiento de seis especies de bacterias de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella* y *Proteus*, obtenidas a partir de urocultivos humanos (Secades y col., 1987)

Se prepararon decocciones con concentraciones de 5, 8 y 10 %. Los extractos de *Boldoa purpurascens* y otras tres especies no mostraron efecto bacteriostático, por lo que se plantea que su uso en dichas afecciones no se debe a su acción antibacteriana. Se conoce que en el proceso de decocción algunos compuestos presentes en las plantas se degradan y quizás éstos sean los responsables de la acción biológica que se pretende comprobar. Además, el disolvente se satura en breve tiempo lo cual conlleva a que la droga no se agote en el proceso de extracción y quizás los metabolitos activos no se hayan extraído en las concentraciones adecuadas para ejercer determinada acción farmacológica. Por tanto, es recomendable que se realicen otros ensayos utilizando concentraciones más elevadas de los extractos que permitan asegurar lo planteado, pues se conoce que

generalmente los metabolitos secundarios están en bajas concentraciones en las plantas y, por otra parte, se pueden obtener los extractos por extracción continua con control de la temperatura, método que permite un agotamiento mayor de la droga, obteniendo una mayor concentración de los principios activos. Otro aspecto a señalar es que los ensayos microbiológicos se deben realizar en cepas tipificadas (ATCC), antes de hacerlo con cepas procedentes de cultivos de humanos. El método de difusión radial no es adecuado para productos naturales por lo que se considera que los resultados de este trabajo no son confiables.

En el departamento de Farmacología y Toxicología del Centro Nacional de Investigaciones Científicas de Cuba se evaluaron como diuréticas e hipotensoras cuatro especies de plantas, cuyas acciones farmacológicas son conocidas en la medicina tradicional: *Xanthium chinense* (Guisazo de caballo), *Boldoa purpurascens*, Cav (Nitro blanco), *Lepidium virginicum* (Mastuerzo) y *Cecopria peltata* (Yagruma).

(Tabla II)

Los resultados corroboraron las propiedades diuréticas de estas plantas. De ellas *Boldoa purpurascens*, Cav es la especie que manifestó un mayor efecto diurético con la decocción menos concentrada (González y col, 1986). Al analizar los resultados de esta investigación se puede plantear que la extracción durante cinco minutos no permite obtener concentraciones adecuadas de los metabolitos presentes en la planta, pues ellos se encuentran en cantidades pequeñas en las mismas. Además,

sólo se realizaron mediciones del volumen de orina excretada sin la comparación con controles positivos de diuréticos reconocidos y no se determinó la concentración de los iones excretados en la orina. Por otro lado, no quedan claros los criterios para considerar la acción demostrada por los extractos como importante o no. Es por ello que se considera necesario realizar un estudio más detallado en la comprobación de esta actividad farmacológica para *Boldoa purpurascens*, utilizando para ello diuréticos de comprobada eficacia como controles positivos e incluir en dicha evaluación extractos con concentraciones más bajas, considerando que se propone la mayor diuresis a la menor concentración del extracto evaluado.

1.7. Aislamiento y purificación de flavonoides

Los flavonoles y las flavonas glicosídicas son compuestos generalmente estables y pueden extraerse desde el material vegetal secado, con disolventes en frío o en caliente.

Los aglicones de los flavonoles y flavonas son raramente encontrados como constituyentes internos de los vegetales; ellos son frecuentemente localizados sobre las superficies externas de hojas (Harbone y col., 1982; 1988). Esos flavonoides tienden a ser menos polares cuando están a menudo metilados o acilados y requieren disolventes menos polares para su extracción, tales como éter, hexano y diclorometano.

Los disolventes de elección son combinaciones de agua con metanol, etanol o acetona (en relación 1 : 5 y 1 : 1; v/v), siendo baja la proporción de agua requerida para la extracción (1 : 5; v/v), en material fresco. (Cimanga, 1998; Cody, 1982)

Para el aislamiento de una gran cantidad de flavonoides se usa la cromatografía en columna con celulosa microcristalina y como fases móviles metanol : ter- butanol : ácido acético : agua, n-butanol : ácido acético : agua; sílica (tamaño de partícula 0,06-0,03 Merck gel de sílice 60). Se recomienda como sistema de elución una mezcla del cloroformo con acetato de etilo, benceno y metanol. Además, se pudieran utilizar como fases móviles en esta separación la mezcla de diclorometano/ metanol/ agua, acetato de etilo/metanol; esto está en dependencia de la polaridad que muestren los componentes a separar. También se usa la poliamida, utilizando en este caso como eluyentes metanol/ácido acético/agua, agua/n-butanol/acetona/dioxano y tolueno/hexano/etiletilcetona/metanol. Se usa con más frecuencia sephadex LH-20, amberlite XAD-7 y lichroprep RP-18.

Otro de los métodos usados con estos fines es la cromatografía líquida de elevada resolución o eficacia (CLAR /CLAE). Generalmente, para las flavonas y flavonoles se emplea la fase reversa RP-18. Para la separación de una gran cantidad de flavonoides se utiliza la cromatografía en fase reversa C₈ ó C₁₈ y como eluyentes las mezclas de metanol/ácido acético/agua, metanol/agua/ácido fórmico, acetona/ácido acético/agua en gradientes o en modo isocrático (Markham, 1989).

1.8. Técnicas analíticas empleadas en la identificación y caracterización estructural de flavonoides.

Numerosas técnicas analíticas se emplean en la identificación y caracterización estructural de las variadas estructuras flavonoides presentes en la naturaleza. La combinación de la cromatografía en capa delgada, la espectroscopía ultravioleta visible, la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masa aportan evidencias de incuestionable valor en este sentido.

En la determinación de los flavonoides mediante la cromatografía en capa delgada se emplean materiales adsorbentes como la poliamida, sílica C-8 ó C-18 en fase reversa. Las condiciones cromatográficas sugeridas en la identificación de flavonoides son las siguientes:

Los flavonoides en forma de glicósidos se determinan empleando como adsorbentes celulosa, poliamida, sílica y C-18 en fase reversa. Como fases móviles se utilizan mezclas de ter-butanol/butanol/agua, butanol/ácido acético/agua, metanol/ácido acético/ agua y agua/butanol/acetona/dioxano.

Para los flavonoides polihidroxilados se emplean de igual forma que la anterior como fase estacionaria, celulosa, poliamida, sílica y C-18 en fase reversa. Se proponen para este caso fases móviles de mezclas de ter-butanol/butanol/agua, butano/ ácido

acético/agua, benceno/ácido acético/agua, metanol/ácido acético/agua, benceno/piridina/ácido fórmico, cloroformo/tolueno/acetona, acetato de etilo/metiletilcetona, ácido fórmico y agua. Se sugieren las combinaciones de metanol/agua para la aplicación de la cromatografía en fase reversa.

Los flavonoides altamente metilados se separan cromatográficamente mediante el empleo de las mismas fases estacionarias anteriormente señaladas y como fases móviles cloroformo/metanol, tolueno/hexano, metiletilcetona/metanol, así como otros disolventes de baja polaridad.

La propuesta de las condiciones cromatográficas descritas para la identificación de estructuras flavonoides se considera adecuada, atendiendo a la utilización de variadas combinaciones de adsorbentes y eluyentes propuestos.

Como puede apreciarse en la identificación de los compuestos flavonoides que presentan una polaridad media se emplean mezclas medianamente polares que incluyen generalmente la utilización de disolventes como butanol, metanol, ácido acético y agua. El diclorometano no aparece informado en la preparación de estos sistemas de elución, siendo éste un disolvente a tener en consideración de acuerdo a su polaridad.

La espectroscopía de absorción ultravioleta/visible es usada ampliamente en la determinación de las estructuras tipo flavonoides, por lo que constituye una herramienta muy útil en la elucidación estructural de dichos metabolitos, pues se

registran bandas con máximos de absorción, características para cada tipo de flavonoide. Usualmente los espectros de flavonas y flavonoles se registran en metanol y menos satisfactoriamente en etanol. (Mabry, 1970). El rango de lectura se localiza a longitudes de onda entre 210 y 500 nm.

La resonancia magnética nuclear se señala como una técnica de caracterización estructural de valor indiscutible. Es importante tener en cuenta la selección cuidadosa de los disolventes empleados, los cuales deben originar señales fuera del área seleccionada del espectro donde los compuestos dan señales típicas. Los disolventes comúnmente empleados en la realización del espectro protónico son acetona-d₆ (2,05 ppm), cloroformo (CDCl₃) (7, 25 ppm), dimetilsulfóxido-d₆ (DMSO-d₆) (2,5 ppm), metanol-d₄ (CDOH-d₄) (3,35 ppm) y piridina-d₅ (7,0; 7,35 y 8,5 ppm).

Los flavonoides y sus glicósidos son mayormente solubles en disolventes polares, tales como el DMSO-d₆ y piridina-d₅. El DMSO-d₆ tiene la ventaja que puede disolver a ambos tipos de compuestos, además de la aglicona.

Complementariamente al espectro de resonancia magnética protónica (RMN ¹H), el de resonancia magnética de carbono 13 (RMN ¹³C) ofrece el número y el entorno de los átomos de carbonos presentes en la estructura, así como la identificación de las uniones entre los carbonos de la estructura y los azúcares que puedan estar como sustituyentes en sus formas glicosídicas.

1.9. Algunas consideraciones sobre la farmacología y terapia de la diuresis.

Para la comprensión de los mecanismos que proporcionan la acción diurética, resulta imprescindible estudiar la estructura de los riñones, el lugar y el modo de acción de los fármacos diuréticos.

Los riñones contienen aproximadamente dos millones de nefronas, que filtran agua y electrolitos como NH_4^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HPO_4^{2-} , HCO_3^- y H_3O^+ , así como no electrolitos, tales como urea, creatinina, ácido úrico y glucosa.

Este proceso tiene lugar desde las cápsulas de Bowman hacia los túbulos proximales. Las proteínas plasmáticas, debido a su gran volumen, no experimentan la filtración salvo en casos de lesión renal; entonces aparecen albúmina y globulina en la orina (Goodman, 1996; Guyton, 1986).

Los riñones mantienen constante el volumen y composición de los líquidos corporales elaborando orina, cuya constitución está finalmente determinada por la ingestión de soluto, agua y por el tipo de transformación metabólica de carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos endógenos y exógenos. Estos órganos también sirven como la principal vía de excreción de medicamentos que se reciben como terapéuticos.

Normalmente, el riñón regula el equilibrio de sodio (en consecuencia, el líquido extracelular) de una manera muy eficiente. La ingestión diaria de sodio varía mucho. En países occidentales la dieta promedio contiene unos 170 meq/24h. Casi el 98% de esta cantidad se excreta por la orina. Sin embargo, ella representa menos del 1%

de la cantidad del sodio filtrado. De ahí que la conservación de la homeostasia del sodio sea principalmente una función del túbulo renal y de la reabsorción del sodio filtrado.

Las alteraciones en el volumen arterial efectivo afectan el manejo del sodio por el riñón a través del sistema renina-angiotensina-aldosterona, el sistema nervioso simpático y otros factores. Es posible que la última categoría incluya cambios en las presiones intrarrenales hidrostáticas y oncótica (factores físicos) (Orizaga, 1994).

Estos factores físicos juegan un papel importante en la reabsorción de sodio, ya que una caída de volumen sanguíneo arterial efectivo (deshidratación, hemorragia) y la consecutiva disminución de la presión arterial disminuyen el riego renal. (Ramsay, 1994; Ritz y col, 1994)

En respuesta a la reducción de riego renal, se reduce el flujo de plasma glomerular, más que la presión hidrostática de los capilares, originando una caída del índice de filtración en el glomérulo, proporcionalmente menor que la disminución del flujo de plasma renal.

Esta disparidad se debe a una mayor vasoconstricción de las arteriolas eferentes comparadas con las aferentes, en respuesta a un aumento de los valores de catecolamina y angiotensinas II (Orizaga, 1994).

La cantidad de potasio que entra en el filtrado glomerular cada día es cercana a los 800 meq, en tanto que la ingestión diaria varía de 50 a 150 meq, aproximadamente;

por ello, para conservar el equilibrio normal de potasio del cuerpo, sólo se puede excretar la octava parte de la carga tubular diaria. En condiciones fisiológicas, casi 70% del potasio filtrado se reabsorbe en el túbulo proximal (Orizaga, 1994).

Tanto la Furosemida como los demás diuréticos que actúan en los segmentos diluyentes provocan un rápido e intenso incremento en la eliminación urinaria de cloruro y sodio. Aumenta también la eliminación de potasio porque, al aumentar la carga de sodio que llega al túbulo distal, se incrementa el intercambio con potasio a ese nivel. La estimulación de renina produce también aumento de la actividad de la aldosterona, lo cual facilita la eliminación de potasio (Orizaga, 1994).

Estos fármacos son capaces de provocar dilatación venosa a altas dosis con lo que reducen la precarga; en tratamientos crónicos producen una ligera reducción de la presión arterial, pueden aumentar los niveles de ácido úrico y glucosa en sangre aunque en menor grado que las tiazidas (Flórez, 2003).

Estos fármacos se emplean generalmente como tratamiento de primera línea en pacientes con fallo cardíaco, excepto para aquellos con diabetes o gota, lo que ha corroborado por estudios realizados por Anderson, 1997. En la insuficiencia cardiaca aguda, los diuréticos reducen la presión y el volumen diastólico ventricular (precarga).

Como terapias alternativas a los fármacos sintéticos hay varias plantas medicinales cuyos extractos se han utilizado con fines de producir diuresis y cuya composición química se ha relacionado con dicho efecto (Cáceres, 1987b; 1999).

El estudio bibliográfico sobre los aspectos botánicos, químicos y farmacológicos de la familia Nyctaginaceae, y en particular de la especie *Boldoa purpurascens*, Cav, permitió establecer las conclusiones parciales siguientes:

- Se han realizado escasos estudios químicos en la mayoría de los géneros de la familia Nyctaginaceae.
- Los géneros más estudiados desde el punto de vista químico y biológico en esta familia son *Guapira*, *Pisonia*, *Mirabilis* y *Bougainvillea*.
- No se han realizado estudios químicos sobre la especie *Boldoa purpurascens*, Cav que validen su uso tradicional como diurético.
- Los flavonoides son compuestos que pueden ser aislados de los productos naturales por medio de la cromatografía clásica de columna, usando como adsorbentes sustancias tales como celulosa, poliamida y sílica y como eluyentes, mezclas de disolventes de diferentes polaridades.
- Los métodos que más usualmente se usan para la purificación de este tipo de compuestos son la cromatografía de columna, empleando como fase estacionaria sephadex LH-20 y la cromatografía líquida de elevada eficacia en fase reversa (RP-18).

- La espectroscopía ultravioleta visible es un método que brinda información estructural de gran importancia sobre estos compuestos.
- En la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es importante seleccionar el disolvente más apropiado para cada caso. En particular para los flavonoides y sus glicósidos el DMSO-d₆ y la piridina son los disolventes más adecuados, por la elevada solubilidad que presentan estos compuestos en los mismos, aunque el DMSO-d₆ tiene como ventaja el poder disolver los azúcares y la aglicona.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos empleados en el trabajo experimental.

Los reactivos empleados en las diferentes fases experimentales se indican a continuación: Nitrato de mercurio, difenilcarbazona y cloruro de mercurio (calidad farmacéutica), ciclofosfamida (Asta Médica), acetylaminofluoreno y azida de sodio (ANALAR), éter dietílico, acetato de etilo, diclorometano, metanol, n-butanol y cloroformo (MERCK), etanol (calidad farmacéutica).

2.1. Evaluaciones preclínicas.

2.1.1. Evaluación de la actividad diurética del extracto acuoso.

Se utilizaron ratas hembras de la línea Sprague Dawley de cuatro semanas de edad, con un intervalo de peso inicial entre 160 - 220 gramos, procedentes del CENPALAB.

Fase experimental I

Para el desarrollo de esta fase experimental se analizaron diferentes concentraciones del extracto acuoso obtenido de las hojas de *Boldoa purpurascens*, Cav al 10% liofilizado.

Un total de 30 animales se dividieron en 5 grupos de 6 animales cada uno, los cuales permanecieron en ayuno (agua y comida) en cajas de T 4 (Techniplast) con fondo de rejilla, 18 horas antes de la administración. Las ratas fueron hidratadas oralmente con agua (5 mL/100g) para el grupo control, mientras que los 4 grupos restantes recibieron (2 mL/100g) de agua y (3 mL/100g) del extracto acuoso según las dosis

orales únicas de 10, 50, 100 y 150 (mg/mL), respectivamente, y de esta forma se completaron los (5 mL/100g) de hidratación.

Luego de cada administración se colocaron en cajas metabólicas individuales y se anotó el volumen de orina en 24 horas, colectados en tubos graduados que contenían 2 gotas de parafina líquida para prevenir la evaporación, seleccionando así la concentración a administrar en la fase II del experimento.

Se evaluaron extractos de concentración 1, 5, 10 y 15 % peso/volumen, obtenidos por soxhlet y posteriormente liofilizado bajo las condiciones siguiente: Equipo EDWARDS HIGH VACUMS MODEL EF6, temperatura de enfriamiento (-50 °C), tiempo de enfriamiento (4 horas), temperatura de calentamiento (+20 °C) y tiempo de liofilización 24 horas

Fase experimental II

Este ensayo se realizó con 4 grupos de 6 animales, con la dosis seleccionada en la fase experimental I.

Previo a cada administración, los animales se mantuvieron en ayuno de 18 horas. El grupo 1 sólo recibió agua (5 mL/100g) y sirvió como grupo control, el segundo grupo (2) recibió extracto acuoso (5 mL/100g), mientras que a los grupos 3 y 4 se les administró Furosemida (4 mg/Kg) e Hidroclorotiazida (10 mg/Kg), respectivamente, en un volumen de 5 mL. En esta fase se determinó, además del volumen de orina, las concentraciones de sodio, potasio y cloruro, por la información que estos parámetros ofrecen en el análisis de la diuresis.

La determinación de sodio y potasio se realizó mediante un fotómetro de llama Modelo FP-10 de fabricación alemana. Los valores registrados en el equipo, se compararon con las tablas

existentes para la determinación de la concentración de estos iones. El valor de concentración obtenido se convirtió en meq/L, teniendo en cuenta la dilución con la que el instrumento realizó la lectura.

Al finalizar, los resultados se expresaron en meq/24 horas. El cálculo se realizó a través de la ecuación:

$$meq/24hrs = \frac{meq/L * D}{1000} \quad D = \text{diuresis en 24 horas}$$

Para determinar las concentraciones de cloruro en orina, se aplicó el método de Shales:

- 1- Pipetear en tubos de ensayos graduados 0,2 mL de orina y 1,8 mL de agua destilada
- 2- Añadir cuatro gotas de difenilcarbazona y valorar con nitrato de mercurio; repetir los pasos 1 y 2, pero usando 2 mL de cloruro de mercurio.

Este procedimiento debe efectuarse diariamente y cuando cambie el analista.

El análisis de este resultado se expresó en meq/24 horas. Para esto se determinó antes los meq/L:

$$meq/L = \text{dec. cons.} \times 100$$

(dec. cons. = décimas de mL consumidas de agente valorante.)

El agente valorante es una disolución de nitrato de mercurio en presencia de difenilcarbazona y el punto final se aprecia por la aparición de una coloración azul violeta

estable. Todas las determinaciones se realizaron en cinco ocasiones con intervalos de una semana entre ellas. Para el análisis estadístico de estos datos se aplicaron técnicas no paramétricas empleando los test de Kruskal- Wallis y Man Whitney.

2.1.2 .Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto acuoso.

Se utilizó un extracto acuoso, obtenido en equipo soxhlet por extracción continua, usando 50 g de droga y 600 mL de agua destilada.

El extracto se liofilizó, según se describe en el epígrafe 2.1.1, se pesó y se disolvió en agua destilada estéril, hasta alcanzar una concentración del 20 % m/v. Para la realización de las pruebas de actividad antibacteriana se utilizaron cultivos bacterianos de la colección ATCC del cepario del Departamento de Microbiología, Facultad de Biología de la Universidad de La Habana. Para esta evaluación se empleó el método de corte en agar, sobre tubos de ensayos . Entre las cepas usadas en el estudio, se encuentran varias de las que causan infecciones renales con mayor frecuencia, como son la *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. rettgeri*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* y *Staphylococcus aureus*.

2.1.3 Valoración toxicológica del extracto acuoso.

2.1.3.1. Evaluación de la toxicidad aguda.

-Muestras de ensayo empleadas.

Se empleó el extracto acuoso liofilizado de *Boldoa purpurascens*, Cav, almacenado en condiciones de refrigeración durante el período de aplicación.

-Métodos y sistemas de ensayo empleados.

Se utilizaron 23 ratas (12 machos y 11 hembras) de la línea *Sprague Dawley* de nueve semanas y 200-280 g de peso. Los animales utilizados en el estudio procedían de CENPALAB. Los mismos se alojaron según el sexo en cajas T-4 de macrolón, de fondo de rejilla, en una densidad poblacional que garantizó el espacio vital recomendado para la especie (5 por caja) y se les administró una dieta comercial peletizada, estipulada para la especie, procedente del CENPALAB y agua corriente apta para el consumo humano.

Se mantuvieron en cuarentena durante cinco días, realizando las inspecciones diarias. Los animales certificados como saludables por el personal técnico que realizó el estudio, pasaron al ensayo definitivo.

- Sistema de identificación.

Los animales de estudio se identificaron individualmente por un número, mediante tatuajes en las orejas. Las cajas se identificaron por medio de tarjetas en las que se recogió la información siguiente: Grupo de tratamiento, sexo, especie, línea y número de cada animal de la caja.

- Ensayo preliminar.

Se llevó a cabo en tres animales (2 machos y 1 hembra), a los cuales se les administró el extracto en dosis de 2000 mg/Kg, considerando la cantidad de sólidos totales presentes en el extracto, por vía oral, mediante cánula intragástrica, tras un ayuno previo durante toda la

noche. La dosis se dividió en cuatro administraciones para cumplir con el volumen máximo permitido para la especie por esta vía que es (20 mL/Kg). El período entre una administración y otra fue de 3 horas y se permitió el acceso a los alimentos 3 horas después de la última. Se observaron 24 horas después de la última administración y al no presentarse mortalidad se procedió al ensayo principal (Chang, 1994).

- Aleatorización.

Los animales se ubicaron en diferentes grupos de forma aleatoria, asignándose por caja 5 animales.

- Procedimiento experimental.

Los animales se mantuvieron en ayuno durante toda la noche. Al grupo 1 se le administró el extracto en dosis de 2000 mg/Kg de peso (78 mL/Kg) por vía oral, mediante cánula intragástrica. La dosis se dividió en 4 administraciones cada tres horas para cumplir con el volumen máximo permitido para ratas de este peso por esta vía. El grupo 2 se tomó como control y no recibió tratamiento. Se permitió el acceso a los alimentos, 3 horas después de la última administración.

Los animales se observaron sistemáticamente durante las 24 horas posteriores, para recoger los signos clínicos; luego, el procedimiento se mantuvo diariamente por un período de 14 días. Se controló el peso corporal antes de la primera administración, a la semana y al final del experimento; posterior al sacrificio se practicó necropsia a todos los animales para ser analizados por el patólogo.

2.1.3.2. Evaluación de genotoxicidad.

2.1.3.2.1 Ensayo de micronúcleos.

Para la realización de este estudio se utilizó el extracto acuoso liofilizado de *B. purpurascens*, extraído por soxhlet. Como sustancia de referencia se utilizó el mutágeno ciclofosfamida, agente alquilante de la firma Asta Médica, España.

Se utilizó como control negativo el agua corriente, para comprobar la incidencia de micronúcleos espontáneos.

- Animales de experimentación.

En el desarrollo del experimento se utilizaron como modelo animal 25 ratones machos consanguíneos de la línea *Balb/c*, procedentes del CENPALAB.

Los animales se encontraron con una edad entre las 8-12 semanas y sus pesos corporales estaban entre 22 ± 3 g. Luego de concluida la etapa de cuarentena se procedió al pesaje de los animales y se distribuyeron en 5 grupos de tratamiento, con 5 animales por tratamiento.

Se alimentaron con la dieta ratonina comercial, fórmula EM 1001 y agua corriente "*ad libitum*".

La ciclofosfamida se administró en una dosis 60 mg/Kg de peso por vía intraperitoneal. Se utilizó la vía oral para el extracto a evaluar, por ser la que se emplea en la medicina tradicional.

- Procedimiento experimental.

La conducción de la parte experimental del ensayo se realizó en dos semanas. Los animales se trataron en el horario de la mañana y por las tardes se observaron durante todos los días, con vista a anotar la aparición de cualquier signo tóxico. Estos se trataron durante dos días consecutivos, espaciados los tratamientos 24 h y se sacrificaron los mismos luego de 24 h de la última administración.

El procedimiento empleado para obtener las preparaciones celulares de la médula ósea es el de Schmid (1976).

-Criterio de Genotoxicidad.

Se tomó como criterio de evaluación genotóxica los índices de genotoxicidad (IG) y el de citotoxicidad (IC), recomendados por la OECD (1993) y Hayashi y col., (1994).

El índice de genotoxicidad se determinó mediante la relación de eritrocitos policromáticos (EPC) micronucleados (MN) y el total de eritrocitos policromáticos (EPC) [$IG = \frac{EPC\ MN}{Total\ EPC}$] en agua destilada, en ratones machos de la línea Balb/c.

El índice de citotoxicidad (IC) (eritrocitos normocromáticos) se determinó registrando 400 células y como medida de la relación entre los eritrocitos policromáticos (EPC) y los eritrocitos normocromáticos [IC = (EPC/ENC)] (CSGMT, 1995).

2.1.3.2.2. Test de Ames.

Como sistema biológico se emplearon las cepas de la entero bacteria *Salmonella typhimurium*, cepa TA100, para detectar sustituciones de pares de bases, y cepa TA 98, para detectar corrimiento del marco de lectura. (Anderson, 1997). Se utilizaron cuatro medios de cultivo, medio mínimo E.Vogel Bonner, medio mínimo suplementado con histidina-biotina, agar de superficie y medio rico en el ensayo de confirmación de las características genéticas de las cepas, el medio mínimo E .Vogel- Bonner se utilizó para los estudios exploratorios y definitivos (Mc George, 1986).

Como controles positivos se utilizó 2-acetyl amino fluoreno (ANALAR) y Azida de sodio (ANALAR).

Como control negativo: Agua destilada estéril y como sustancia de ensayo extracto acuoso liofilizado de *Boldoa purpurascens*, Cav.

Procedimiento de tratamiento e intervalo de dosis.

Para el desarrollo del estudio de incorporación en placas, se seleccionaron las dosis 50, 100, 150, 300, 500 µg por placa de acuerdo al criterio de toxicidad (estudios de genotoxicidad realizados en médula ósea).

-Diseño experimental.

Antes de comenzar los ensayos se comprobaron las características fenotípicas de las cepas; cada cepa se cultivó en caldo nutriente durante 16 h, sin agitación. Al finalizar la incubación se sembraron las bacterias en medio de cultivo Vogel- Bonner E. **Ensayo de incorporación en placa.**

Se adicionó 0,1 mL de cada dosis a cada tubo de top agar que contenía 0,1 mL del cultivo de *Salmonella typhimurium* y 0,5 mL de la mezcla S9, muestra de ensayo con activación metabólica. Se mezclaron vigorosamente en vorter y se colocaron en placas, las cuales se incubaron durante 66 h a 37° C.

Todos los procedimientos experimentales se realizaron acordes al Código de Buenas Prácticas de Laboratorio en Toxicología Experimental.

- Análisis estadístico.

Se calcularon las medias y la relación existente entre el número de colonias revertantes para las tratadas y los controles (Razón de mutagenicidad RM). Se evaluó la posibilidad de que el producto produjera una respuesta positiva en alguna de las cepas empleadas con y sin activación metabólica.

La relación dosis respuesta se analizó mediante el empleo del programa estadístico Salmonel (Myers y col., 1987), el cual encuadra esa relación en al menos cuatro modelos matemáticos.

Constante $Y = b$

Lineal simple $Y = ax + b$

Lintox I (lineal atenuado por toxicidad exponencial simple) $Y = (ax + b)^{4x}$

Lintox II (lineal atenuado por toxicidad exponencial a segunda potencia) $Y = (ax + b)^{T \wedge 2x}$

2.2. Estudio farmacognóstico de *Boldoa purpurascens*.

2.2.1. Recolección.

El material vegetal empleado en el estudio se recolectó en los meses de diciembre a marzo (2003-2004), en el semillero del área de "Las Antillas" de la Universidad Central de Las Villas, en horas de la mañana, procedente de un suelo carbonatado. La planta se identificó por la Ingeniera Agrónoma Betty Campos Hernández, especialista de la estación experimental de la institución.

Para el desarrollo del trabajo sólo se utilizaron las hojas de la planta, por ser las que presentan informes sobre su uso en la medicina tradicional. Una muestra de la planta se conservó en el herbario del Jardín Botánico de la propia Universidad, con el No 3012.

2.2.2. Estandarización de la droga cruda.

El estudio farmacognóstico se realizó de acuerdo con la metodología establecida por la Norma Ramal 309 de Salud Pública para medicamentos de origen vegetal (N.R.S.P. 309/1992). En cada ensayo se realizaron tres réplicas y se informa el valor promedio.

2.2.2.1. Secado.

Se emplearon los tres métodos de secado descritos en la literatura: secado al sol, sombra y en estufa empleando un equipo MLW WSU 100 R.D.A a una temperatura de 40° C con aire recirculado.

Se realizaron tres réplicas en cada evaluación. El registro del secado se realizó con una frecuencia de 24 horas (sol), 48 horas (sombra) y 8 horas (estufa), hasta que la masa del material vegetal se mantuvo aproximadamente constante.

Secado a la sombra: Las hojas se colocaron sobre mallas de hilo que dejaban pasar perfectamente el aire a través de ellas; éstas se mantuvieron en un local ventilado en ausencia de radiación solar directa, moviéndose manualmente dos o tres veces al día para obtener una ventilación más completa y acelerar el secado.

Secado en la estufa: La droga se sometió a una temperatura de 40°C. Cada 8 horas se determinó la masa del material vegetal a la temperatura ambiente, hasta obtener tres lecturas consecutivas iguales.

Secado al sol: Las hojas se expusieron al sol esparcidas sobre mallas de hilo y se movieron manualmente dos o tres veces al día, durante todas las horas en que se disponía de sol. En horas de la noche se retiraban, para evitar que cualquier accidente atmosférico limitara el estudio y se continuó con igual procedimiento que para el secado a la sombra.

Posteriormente toda la droga secada se molinó, utilizando un molino de cuchillas (Redsch mühle. Gmbh 657 Haan, West-Germany) con un tamaño de partículas de 0,75 mm.

2.2.2.2. Determinación de los parámetros de calidad.

Se determinaron los índices numéricos siguientes: humedad residual, cenizas totales, cenizas insolubles en ácidos, cenizas solubles en agua (NRSP 309,1992) y el contenido mineral del extracto acuoso.

Humedad residual: Este análisis se realizó a la droga secada por los diferentes métodos seleccionados. Con el objetivo de compararlos, se realizó de acuerdo al método gravimétrico establecido en la norma referida con anterioridad. Se utilizó una estufa MLW WSU 100.

Cenizas totales: Estos ensayos se realizaron utilizando una balanza analítica marca Boeco-alemana, una plancha y una mufla marca TGL FM 222-11, de procedencia alemana.

Se procedió a realizar las determinaciones según la norma indicada anteriormente y se efectuaron cuatro réplicas, de las cuales dos fueron usadas posteriormente en la determinación de cenizas solubles en agua y dos en la determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico. La temperatura utilizada en la mufla fue de 650 °C. Se utilizó un papel cuantitativo, con una especificación del porcentaje de cenizas igual a 0,03. Para informar los valores se realizaron los cálculos correspondientes, se emplearon las fórmulas $C_1 = (M_2 - M_1 - M) \times 100 (\%)$ $C_t = C_1 \times 100 / 100 - H$; C_1 (porcentaje de cenizas totales en base hidratada); M (masa del crisol vacío (g)); M_1 (masa del crisol con muestra (g)); M_2 (masa del crisol con

cenizas totales(g)); 100 (factor matemático); H = por ciento de humedad del material; para las solubles en agua el cálculo se realizó por la fórmula:

$C_1 = (M_2 - M_4 / M_1 - M) \times 100$ (%) $C_A = (C_1 \times 100 / 100 - H)$, donde C_1 (por ciento de cenizas solubles en agua); M_4 (masa del crisol con cenizas insolubles en agua (g)), el resto de las denotaciones tienen el mismo significado.

Para el cálculo de las cenizas insolubles en ácido se empleó la fórmula siguiente:

$C_1 = (M_2 - M / M_1 - M) \times 100$ (%), $C_i = C_1 \times 100 / 100 - H$; M_2 (masa del crisol con cenizas insolubles en ácido (g)), M (masa del crisol vacío (g)); M_1 (masa del crisol con muestra de ensayo (g))

Determinación de la composición inorgánica por espectrofotometría de absorción atómica

Se procedió al análisis cuantitativo del contenido de plomo, cadmio, litio, hierro, cobre, cromo, manganeso, níquel, sodio, potasio, magnesio y calcio en el extracto acuoso de *B. purpurascens*. El análisis químico se llevó a cabo según la metodología descrita en la Norma Cubana (N.C. 76-01, 1981).

Inicialmente se realizaron tres réplicas de extracción, las cuales se obtuvieron por decocción de 10 g de droga seca en 100 mL de agua desionizada, calentando durante 30 minutos; se filtró y del filtrado se tomaron diferentes alícuotas para las diluciones correspondientes. Para la lectura de potasio se preparó una dilución de 0,5 mL en 100 mL; para sodio y para litio fue de 5 mL en 50 mL.

Posteriormente a estos análisis, se realizó la cuantificación a partir del extracto liofilizado; para ello se emplearon dos réplicas de un mismo lote.

La curva de calibración para cada una de las determinaciones se realizó con reactivos estándar y en diferentes intervalos de concentración.

Tamizaje fitoquímico.

El método de tamizaje se llevó a cabo utilizando las técnicas establecidas en el año 2000 por Miranda y col.

Se realizó el proceso de extracción del material vegetal por el método de maceración y por extracción continua en equipo soxhlet empleando como disolventes éter dietílico, etanol y agua.

Siguiendo el procedimiento establecido se realizó el tamizaje fitoquímico a los extractos, a través de los diferentes ensayos planificados para el mismo (Miranda y col., 2000).

2.3. Preparación de extractos y métodos de fraccionamiento.

2.3.1. Extracción por un sistema de polaridad creciente.

Uno de los métodos de extracción aplicados en el estudio de la planta fue la extracción con disolventes de polaridad creciente. La especie objeto de estudio no tiene informes acerca de su composición química, por lo que se comenzó realizando este proceso extractivo general.

Se fragmentan 50 g de droga secada en estufa a 40°C a un tamaño de partícula de 0,75 mm y se extrae con disolventes de polaridad creciente de la siguiente forma: Primero se extrae por maceración con de éter dietílico (1L, 72 horas) (Extracto A). Se filtra, se guarda el extracto y el proceso se repite una vez más. Se continúa la extracción con acetato de etilo

(600 mL, 8 horas) (Extracto B), etanol (600 mL durante 12 horas) (Extracto C) y finalmente con agua (600 mL, 6 horas) (Extracto D). Por ese orden, se determinó que disolvente extrae la mayor proporción de componentes de la planta.

Todos los extractos de forma independiente se concentraron con evaporador rotatorio BUCHI-100 hasta un volumen aproximado de 50 mL y se procede con ellos a calcular el porcentaje de sustancias extraíbles, calculando los sólidos totales extraídos para cada disolvente, expresándolos en porciento. Así, se tiene como promedio de tres réplicas, (todos referidos respecto al peso de sólidos contenidos en un mililitro de extracto)

Se realizó la determinación cualitativa de flavonoides en los extractos A, B, C, D aplicando los ensayos de tamizaje fitoquímico.

Análisis cromatográfico del extracto D (acuoso)

Se realizó una cromatografía en capa delgada al extracto D, utilizando como fases móviles cloroformo-etanol (1:1; v/v), benceno-cloroformo-acetona (9:3:1; v/v/v), benceno-acetona (3:1; v/v), n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1 y 2:1:1; v/v/v); se emplearon como reveladores generales cámara de yodo y asperjado con ácido sulfúrico 50 % en agua más calor, el amoníaco, UV y tricloruro de aluminio, como reveladores específicos para flavonoides.

2.3.2. Preparación del extracto acuoso.

Las hojas de *Boldoa purpurascens* (2 kg) secadas y molinada se extrajeron en un matraz camisetaado (reactor) a 120 °C con 20 L de agua, durante dos horas y el extracto se secó por atomización en spray dry para su conservación y posterior uso.

2.3.2.1 Fraccionamiento por un sistema de contracorriente.

Se utilizó un sistema de contracorriente con intercambiadores, empleando como fase fija 50 mL de etanol 20% en agua y como fase móvil primeramente 50 mL de tolueno, después 50 mL de cloroformo y finalmente 50 mL de n-butanol.

En la primera fase fija se disuelve 1g del extracto seco. Se realizaron cinco intercambios con tolueno, después cinco intercambios con cloroformo y finalmente los cinco intercambios con n-butanol. Estas 15 fracciones más las cinco fracciones de la fase fija, se concentraron en evaporador rotatorio con vacío hasta sequedad, calculando el rendimiento de extracción y se destinan para un análisis en capa delgada bajo las condiciones cromatográficas descritas en el epígrafe 2.3.1 y posterior aislamiento de los compuestos de interés.

2.3.2.2. Separación por placa preparativa de la fracción n–butanólica.

Se utilizó una placa preparativa con gel de sílice como fase estacionaria, en las mismas condiciones cromatográficas descritas para la CCD del epígrafe 2.3.1 y seleccionando como fase móvil la mezcla cloroformo etanol (1:1; v/v).

Las manchas obtenidas en forma de franjas para la fracción n–butanólica se rasparon y se extrajeron con 40 mL de metanol, calentando suavemente, se filtró y el disolvente se eliminó por rotoevaporación en atmósfera de nitrógeno.

2.3.2.3. Análisis espectroscópico de la fracción n-butanolica.

Se registra el espectro infrarrojo de los sólidos obtenidos en el acápite anterior en forma de tabletas sobre KBr empleando un instrumento VECTOR 22 R.D.A y con un intervalo de frecuencia entre 4000 y 399 HZ.

2.3.2.4. Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) de la fracción n-butanólica.

Las fracciones de las cuatro franjas obtenidas (I,II,III,IV) se analizaron por CLAE utilizando una columna BioRad-Aminex HPX 87H, (300x7.8mm), con un detector UV/Vis, volumen de inyección 20 µL, flujo 0,3 mL/min. y un buffer de ácido sulfúrico 0,005 M y fosfato. Antes de inyectar las muestras se pasaron por matriz C18 para extraer contaminantes hidrofóbicos en una precolumna.

Se emplearon patrones de la firma SIGMA: Quercetina, Hesperidina, Hesperetina, Naringenina, Naringina, Rutina, Sacarosa, Rafinosa, Glucosa y Fructosa.

2.3.3. Obtención de una fracción rica en flavonoides.

Se disolvieron en 600 mL de agua 200 g del extracto seco que se obtuvo en el epígrafe 2.3.2 y se extrajo con n-butanol diez veces. La fracción butanólica se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en 200 mL de metanol; se filtró, el filtrado se concentró y posteriormente se adicionó sobre éter diisopropílico (1L); se obtuvo un precipitado de color carmelita denominado crudo de flavonoides (27g).

2.3.3.1. Aislamiento y purificación de los compuestos presentes en el crudo de flavonoides .

Para el aislamiento de estos compuestos se tomaron 10 g de la mezcla de flavonoides obtenida a partir de la fracción n- butanólica, según la metodología descrita en el epígrafe 2.3.3 (crudo de flavonoides) y se colocaron sobre una columna cromatográfica de gel de sílice de (1m x 50 cm de diámetro) y se eluyó con 20 % de MeOH en CH₂Cl₂. Cuando el primer producto se colectó, de acuerdo al seguimiento por CCD, el eluyente se cambió por CH₂Cl₂/MeOH/H₂O en proporciones (80 :19 :1; v/v/v). Se colectaron 125 fracciones de 100 mL cada una.

Todas las fracciones se analizaron por cromatografía en capa delgada y se reagruparon en cuatro fracciones mayores, (10-16, 17-23, 41-48, 60-128) FA, FB, FC, FD. Las fracciones se sometieron de forma independiente a un proceso de cristalización en metanol.

La fracción FD (60-128) se sometió a un nuevo fraccionamiento en columna de gel de sílice (1m x 50 cm de diámetro) eluyente: MeOH/CH₂Cl₂ (20:80, v/v). Se obtuvo una mezcla de (600 mg). Para la separación de la mezcla obtenida se empleó CLAE RP-18, por medio de una columna X TERRA MS C-18, de dimensiones 30 x 100 mm. Se eluyó con MeOH/H₂O desde 50 % hasta 100 % de MeOH y utilizando un flujo de 10 mL/min. La lectura se realizó a 276 nm (Liu y col, 2002; Liv, 2004; Lock, 1998; Sakusihima, 1998; Sánchez-Rabaneda, 2003).

2.3.3.1.1. Análisis por espectroscopía ultravioleta (UV/VIS) de los compuestos aislados.

A cada compuesto aislado e identificado como 1, 2 y 7 se le registró el espectro UV/VIS, en un equipo Genesy de procedencia americana (E.U). Para ello se tomó por separado 1 mg de los compuestos 1 y 2 y se diluyó en 25 mL de metanol; en el caso del compuesto 7, la dilución se hizo en 10 mL, y la lectura se realizó desde 200 hasta 400 nm.(Mabry y col, 1970; Harbone, 1988).

2.3.3.1.2. Análisis por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de los compuestos aislados.

Todos los compuestos obtenidos a partir de los 10 g del precipitado descrito en el epígrafe 2.3.3 se analizaron por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN ^1H y ^{13}C), en dimetilsulfóxido (DMSO) y CHCl_3 a 37°C en un instrumento Bruker AMX 400 a 300 y 400 MHz para el ^1H y 75 y 100 MHz para el ^{13}C . Los corrimientos químicos se informaron en ppm tomando como referencia al tetrametilsilano.

2.3.3.1.3. Análisis por espectrometría de masas.

Para obtener los espectros de masa de los compuestos 1 y 2 se utilizó el método ionización por *electro spray* (ESI-MS) (modo negativo y positivo), en un equipo

Termo Finnigan LCQ-Advange de procedencia alemana.

2.3.3.1.4. Determinación de la rotación óptica.

La rotación óptica de los compuestos 1, 2 y 7 se determinó con un polarímetro Propol Perkin-Elmer 241, empleando como disolventes para las determinaciones agua c:0,054 M; dimetil sulfóxido (DMSO) c: 0,023 M y cloroformo c: 0,066 M, respectivamente.

2.3.3.4. Preparación de derivados acetilados

Se tomaron 5 g del crudo de flavonoides obtenido en 2.2.3 y se realizó el proceso de acetilación con una mezcla de 100 mL de piridina: anhídrido acético en proporción (1:1; v/v). Posteriormente se realizó una extracción con CH₂Cl₂, el disolvente se evaporó y el residuo sólido se disolvió en metanol. La disolución obtenida se separó por columna de gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo al 15 % en diclorometano (EtOAC/CH₂Cl₂) (15:85; v/v). Se obtuvieron los espectros RMN ¹H de todos los compuestos acetilados

2.3.3.2. Evaluación de la actividad diurética de la metilendioxi flavona aislada (4',5-dihidroxi-6,7- metilendioxi flavona-3-O-β-D-xilopiranosida) (compuesto 2).

Este ensayo se desarrolló siguiendo la metodología descrita en 1997 por Vogel.

Animales utilizados: Ratas Wistar hembras, con un peso entre 150-200g como promedio, procedentes del CENPALAB (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio) las cuales se mantuvieron en cuarentena. Las mismas se aclimataron 5 días antes de iniciar el ensayo, para adaptarlas a las condiciones del laboratorio. El suministro de agua y comida se hizo “*ad libitum*”.

A los animales se les retiró el agua y la comida 18 horas antes de comenzar el ensayo. Se confeccionaron seis grupos de 5 animales cada uno. Después de un ayuno de 18 horas, los

animales se hidrataron con 8 mL de cloruro de sodio de concentración al 0,9 % administrado por vía oral en dos administraciones, con una hora entre cada una de ellas por cada 200 g de peso corporal.

Una hora después de la última administración del hidratante, se le suministró a cada uno de los animales la solución de uno de los flavonoides aislados del extracto acuoso de *B. purpurascens*, Cav, así como la Furosemida, Hidroclorotiazida y el agua destilada; los animales se colocaron inmediatamente en jaulas metabólicas individuales para comenzar la recogida de orina a las 1, 2, 3, 4, 5 y 24 horas después de la administración de los productos a evaluar y realizar la medición del volumen excretado

- Descripción de las dosis y vías de administración.

Se administró un volumen de 4 mL (por rata de 200 g). La vía de administración fue la oral, empleando para ello una cánula intragástrica, Se utilizaron como controles positivos los diuréticos Furosemida e Hidroclorotiazida a dosis de 25 mg/Kg, el producto objeto de estudio una fracción de flavonoides obtenida a partir del extracto acuoso de *B. purpurascens* a las dosis de 25, 50 y 100 mg/Kg. La duración del ensayo fue de 6 días (5 de aclimatación de los animales y uno de prueba).

2.3.3.3. Evaluación de la actividad diurética de la metilendioxi flavona aislada (4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi flavona-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosida (Compuesto 1).

El ensayo se desarrolló siguiendo la metodología descrita en 1997 por Vogel.

Se emplearon ratas machos Sprague Dawley procedentes del CENPALAB con un intervalo de peso entre 180-220 g y de 8 a 12 semanas de edad, las cuales se mantuvieron en cuarentena durante 5 días, para detectar cualquier cambio anormal, sólo aquellos considerados sanos fueron seleccionados para el experimento. El suministro de agua y comida se hizo “*ad libitum*”.

A los animales se les retiró el agua y la comida 18 horas antes de comenzar el ensayo. Se empleó un volumen de agua de 40 mL/Kg de peso para administrar los productos, por vía oral por medio de cánula intragástrica. Se utilizó un control negativo (cloruro de sodio 0,9 %), un control positivo (Furosemida) y el flavonoide aislado del extracto acuoso de *B. purpurascens*, Cav.

Los animales se colocaron en jaulas metabólicas individuales para comenzar la recogida de orina a la hora después de la administración del producto a evaluar y los controles utilizados y realizar la medición del volumen excretado en tubos graduados, culminando la recogida a las 6 horas.

- Descripción de las dosis

Las dosis de ensayo para el grupo control positivo (10 mg/Kg), según establece la técnica empleada y para la sustancia en estudio las dosis de ensayo administradas (3, 6, 12, 25, 50 y 100 mg/Kg). El ensayo tuvo una duración de 17 días. (5 de aclimatación de los animales y 12 de prueba).

3. EVALUACIONES PRECLÍNICAS

3.1 Evaluación de la actividad diurética del extracto acuoso.

Resulta necesario primeramente comprobar algunos aspectos etnomédicos relativos al efecto biológico que se le atribuye al extracto acuoso de esta especie para proceder a determinar algunos parámetros farmacognósticos y fitoquímicos de la planta, finalizando con la evaluación farmacológica de los compuestos aislados que permitan correlacionarlos con la actividad biológica que se le atribuye.

La primera fase del experimento farmacológico persiguió como objetivo determinar la dosis y la concentración mínima con la que se obtuviera el mayor volumen de orina, para establecer la concentración del extracto a administrar en la fase dos del experimento y así corroborar que un extracto acuoso a partir de las hojas de *Boldoa purpurascens*, Cav, de la forma que se realiza por la medicina tradicional, es portador del efecto diurético que se le atribuye. Se administraron volúmenes de 3 mL/100 g de extracto acuoso más el volumen necesario de agua para completar los 5 mL/100 g necesarios para lograr la hidratación de los animales. (Tablas III , IV, V, VI, VII y VIII)

Al comparar los valores medios de volumen de orina obtenidos a las 24 horas luego de administrar las diferentes concentraciones de extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*, Cav, con los valores obtenidos para los grupos controles se evidenció

una diuresis resultante muy escasa, prácticamente nula, para el extracto a la concentración más baja de las administradas. Este resultado indicó que la dosis debía ser aumentada y se propuso como volumen de extracto a administrar 5 mL/ 100 g, lo cual no afectó el volumen de hidratación propuesto (5 mL/100 g). El hecho de no conocer el ó los principios activos de la planta y por tanto en las cantidades que se encontraban en este extracto (componentes que provocan la acción diurética) constituyó otro factor que hizo pensar en un aumento del volumen del extracto a utilizar, pues en las dosis de extracto administradas, existe una mezcla de todos los metabolitos presentes en el mismo, por lo que resultó una concentración muy pequeña e insuficiente para provocar el efecto diurético esperado.

Se seleccionó como concentración óptima del extracto acuoso para la segunda fase del experimento la concentración más baja a partir de las que se produjo el efecto diurético deseado (50 mg/mL; extracto al 5%), ya que a partir de esta no se obtuvieron diferencias notables en cuanto a los valores medios de volumen de orina para las diferentes concentraciones del extracto. Esto se corresponde con los resultados obtenidos por otros autores (González, 1986), en un estudio realizado a cuatro especies de plantas medicinales diuréticas, dentro de las cuales estaba la especie *Boldoa purpurascens*, Cav y donde se comprueba que el extracto de la misma produjo la mayor diuresis a la concentración más baja, también la concentración seleccionada constituyó un valor intermedio entre todas las concentraciones administradas, lo que evita una posible subdosificación o sobredosificación del extracto (Goodman, 1996).

En la fase II del experimento los resultados que se obtuvieron, tanto para el extracto como para la Furosemida, Hidroclorotiazida y el control en cuanto a volumen de orina ($p=0,0002$) y a meq de sodio ($p=0,0008$), potasio ($p=0,0002$) y cloruro ($p=0,0082$) excretados en 24 horas, se registraron. Se tomaron en consideración los valores medios de todos los parámetros medidos para cada uno de los animales, en las 5 ocasiones en que se realizó el experimento.

A través del análisis de estos datos mediante la utilización de técnicas no paramétricas (Test de Kruskal-Wallis) y obtenidos los resultados que se exponen en la tabla IX se pudo conocer que existían diferencias muy significativas ($p < 0,01$) de los valores de volumen de orina, excreción de sodio, potasio y cloruro entre todos los grupos analizados (control, Furosemida, Hidroclorotiazida y extracto). Este análisis permitió comprobar que el extracto y los controles positivos tomados para el estudio provocaron cambios en los parámetros evaluados, por lo que se hizo necesario determinar entre qué grupos estaban dadas las diferencias entre ellos (Tabla X) y así valorar el efecto diurético del extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*, Cav, por lo que se analizaron estos resultados por el test de Mann-Whitney para conocer los niveles de significación en la comparación entre los grupos de estudio. Se encontró entre el grupo control (1) y el grupo extracto (4) diferencias significativas en cuanto a todos los parámetros, ya que $p < 0,05$ para un nivel de confianza de 95%, donde los mayores valores correspondieron al grupo extracto, exceptuando la excreción de cloruro, la cual no se comportó de la misma forma. Esto corroboró una vez más la actividad diurética del extracto en estudio. Al comparar el grupo extracto (4) con el grupo Hidroclorotiazida (3) se pudo

apreciar las diferencias significativas entre ellos, al realizar un análisis de los parámetros volumen de orina y excreción de sodio y potasio. Sin embargo, se estableció una comparación de este mismo grupo (4) con el grupo Furosemida (2) y se observó que no existían diferencias significativas para el volumen de orina y excreción de sodio y cloruro. Estos grupos sólo diferían significativamente en la eliminación de potasio, perteneciendo los valores más elevados al grupo extracto (4). Esto evidenció que este grupo presenta un comportamiento similar al grupo Furosemida (2)

Al analizar la tabla XI, que muestra los valores de la media (\bar{x}) y desviación estándar (SD) de cada uno de los parámetros para los grupos sometidos al estudio, se pudo apreciar las diferencias que existen entre las mismas, donde el volumen de orina y la excreción de los diferentes iones es mayor para los grupos tratados con Furosemida, Hidroclorotiazida y extracto, si se comparan con el grupo control, lo que permitió demostrar la acción diurética que provoca este extracto en los animales de experimentación, pues uno de los efectos de los fármacos diuréticos es el aumento del volumen de orina excretada y la modificación de algunos iones, como ocurrió en este caso. Además, el aumento de estos parámetros para la Furosemida e Hidroclorotiazida (diuréticos reconocidos), también permitió garantizar un control de la calidad del estudio ya que el comportamiento de estos fármacos se correspondió con lo informado en la literatura (Flórez, 2003).

3.2. Evaluación de la actividad antibacteriana.

Para evaluar la actividad antimicrobiana se mantuvo el extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*, Cav en contacto con las 22 cepas bacterianas empleadas, según se describió

en el epígrafe 2.1.2. No se detectaron afectaciones al crecimiento, ya que en ningún cultivo se hallaron halos de inhibición, a pesar de que el extracto se aplicó en concentración elevada (20 % m/v), lo cual indicó que el extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*, Cav carece de propiedades antibacterianas. La concentración usada en esta investigación superó la empleada por la población, a pesar de ello no se detectó en el extracto evaluado actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano. (Tabla XII)

Aunque el extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*, Cav carece de actividad antibacteriana, el efecto mecánico de arrastre durante la micción y eliminación de volúmenes considerables de orina, contribuyen a la disminución de la infección microbiana (Bojase, 2002; Fukait, 2002; Khan, 2004), toda vez que se demostró que el extracto acuoso de las hojas de la especie a una concentración de 5 mg / mL tiene efecto diurético por vía oral en ratas, similar a la Furosemida.

3.3. Evaluación toxicológica del extracto acuoso.

3.3.1. Toxicidad aguda oral.

Se realizó el ensayo de dosis límite en ratas Sprague Dawley por tratarse de un extracto de una planta medicinal de la cual no existen informes de toxicidad en su uso tradicional, ni en estudios anteriormente realizados. Este ensayo es válido para compuestos de los cuales se espera muy baja toxicidad (Hoffman,1996; León, 1991, Loomis, 1992;), por lo que sería irrelevante conducir un estudio de toxicidad aguda a altos niveles de dosis. Así pues, debe existir un punto a partir del cual el investigador puede llegar a la conclusión de que el producto es prácticamente no tóxico o no letal tras una exposición aguda. (Tabla XIII)

Durante las observaciones diarias no se evidenció ningún signo de toxicidad en los grupos tratados. Se realizó la comparación entre el comportamiento de los pesos corporales por grupo y por sexo al inicio, a los 7 días y al final del experimento. El análisis de los resultados obtenidos a partir de los 7 días indica que el tratamiento no provocó ningún efecto en la variación de los pesos corporales. (Tablas XIV)

Al comparar sexos iguales en grupos diferentes, se obtuvo que tampoco se observó diferencias significativas ($p > 0,05$) en el comportamiento de los pesos corporales, lo que indicó que no existen diferencias por sexo. (Tabla XV y XVI)

El ensayo culminó con un 100 % de supervivencia, este resultado se correspondió con lo esperado en este tipo de ensayo, así como con la baja toxicidad que se esperaba obtener del extracto. Así se pudo determinar que la dosis letal media para el extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*, Cav es superior a 2000 mg/kg de peso.

3.3.2. Ensayo de micronúcleos en médula ósea.

Los micronúcleos se forman a partir de fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros que se circularizan y se encuentran en el citoplasma de la célula (Hartman, 1995; Krishna, 1995; Matter, 1997; Schmid, 1976) cuando una sustancia es capaz de inducir roturas de cadenas o daña el huso mitótico, provocando un retardo en la migración de los cromosomas durante la mitosis (Albert y col, 1989; Bolognesi y col., 1997; Heddle, 1990; Nakayama, 1994;)

La introducción y estandarización de esta prueba en diferentes laboratorios ha permitido demostrar la sensibilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos en este experimento (CSGMT, 1995; Hayashi, 1994, 1999; ICH, 2002), lo que ha generado que ésta se encuentre incluida en la ruta crítica de evaluación de cualquier sustancia a utilizar en humanos (Gutierrez, 1998; Gravue, 1994; Marzin, 1997; Scheider, 1995; 1998b; Sánchez, 1999;). La descripción y los resultados del experimento se muestran en las tablas XVII y XVIII.

Para el ensayo de micronúcleos se recomienda tanto la vía oral como la intraperitoneal, siempre que se realice el estudio de la máxima dosis tolerable (CSGMT; 1995; Speit y col, 1996), aunque para algunos compuestos se ha demostrado su efecto clastogénico sólo cuando se inocula intraperitonealmente. Un ejemplo de ello lo constituyen el dicromato de potasio (CSGMT, 1989) y el uretano (Bernardini, 1998; Holmstrom, 1990). Se utilizó la vía oral ya que es la utilizada terapéuticamente.

Para las dosis de 500, 1000 y 2000 mg x kg⁻¹ de peso se encontró una inducción de micronúcleos de 0,442; 0,415 y 0,362 %, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango espontáneo (0,10-0,39 %) de aparición de micronúcleos en la línea ensayada (Aron, 1989; Anderson, 1997; Khan, 1998; Socorro, 1999). Del análisis de estos resultados se puede concluir que, a las dosis ensayadas y bajo las condiciones del experimento, los componentes del extracto no mostraron actividad clastogénica o anuegénica (Hayatsu, 1998).

Los valores informados en la literatura consultada para el índice de genotoxicidad, oscilan entre 0,10 y 0,49 para esta especie de roedores (Lovell, 1989; Mac Gregor, 1987) y para la línea de ratones Balb/c hasta 0,39 en el control negativo (Ashby, 1997; Heddle, 1983, 1990;

Salamone, 1991;). En Cuba esta línea, procedente del CENPALAB puede presentar valores de hasta 0,50 (Cancino, 1993).

Es conocido que el índice de citotoxicidad brinda un estimado de la exposición del órgano diana al compuesto evaluado (CSGMT, 1995; Paton, 1996) y una disminución del mismo expresa cualquier perturbación en la hematopoyesis como resultado de la exposición al xenobiótico (Asita, 1992; Jourenkova y col, 1998; Mavourin, 1990; Shi y col, 1994; Te y col, 1997). Los valores encontrados para este índice (tabla XVIII), para los animales tratados con el extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*, Cav demostró que el mismo no induce efectos citotóxicos en los eritrocitos de médula ósea. Se probó la máxima dosis recomendada para estudios de toxicología in vivo, 2000 mg/kg de peso (OECD, 1996). Como se observó, no existen incrementos significativos del porcentaje de eritrocitos policromáticos nucleados a las dosis ensayadas del extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*, Cav, como tampoco se observó una relación dosis-respuesta. Estos resultados avalan la inocuidad del extracto, propuesta en los estudios toxicológicos generales analizados anteriormente;

aunque no se puede excluir la posibilidad de que estuviera influenciado por la vía de administración que pudo limitar la llegada del compuesto al órgano diana.

3.3.3. Test de Ames.

Estos sistemas de ensayos son capaces de detectar mutaciones puntuales (Mac George, 1986), eventos de recombinación y no disyunción, aneuploidías y aberraciones numéricas o estructurales, o sea, un amplio espectro de daños al ADN (CETESB, 1993) y su reparación. Con tales fines se emplean sistemas biológicos que difieren en su nivel de organización,

desde bacterias y levaduras hasta células somáticas y germinales “in vivo” e “in vitro” (Anderson, 1993; Marzin, 1997).

Estas series de pruebas a corto plazo han sido ideadas para predecir el riesgo que corren los humanos al estar expuestos a sustancias químicas sospechosas y pueden en algunos casos brindar información suficiente para establecer niveles de seguridad. Para recomendar un fármaco de origen vegetal sobre bases seguras es necesario conocer, a ciencia cierta, los posibles efectos adversos y los colaterales al efecto beneficioso (León y col, 1991). Esto se debe a que con frecuencia se ha informado actividad mutagénica y carcinogénica en muchos productos de origen vegetal (Graf, 1994; Stadler y col, 1994; Stoner, 1995; Sycheva y col, 1997).

Entre los ensayos a corto plazo para evaluar mutaciones génicas, el de mayor difusión es de reversión del locus histidina, conocido como ensayo de Ames. Este ensayo tiene como premisa la utilidad de sistemas bacterianos como un camino eficiente para detectar agentes que pudieran interactuar con el ADN y causar mutaciones. (Abril, 1984)

Los resultados que se muestran en las tablas XIX y XX permitieron determinar si el producto de prueba produjo mutaciones puntuales en el ADN de las cepas de ensayo, lo cual se detecta por la producción de mutaciones en el fenotipo de las mismas. Aquí se pudo observar la media del número de colonias revertantes inducidos por la sustancia de prueba en ausencia y en presencia de activación metabólica, la media del número de colonias revertantes del control del disolvente (agua destilada estéril), así como la razón de mutagenicidad (R M).

En el ensayo se pudo observar que la media del número de revertantes para cada una de las dosis empleadas no sobrepasa el doble del control, lo mismo con activación metabólica que en ausencia de esta, para la cepa TA 100. Por consiguiente la RM (razón de mutagenicidad) es menor que dos. En la cepa TA 98, se encontró que la media del número de revertantes para cada una de las dosis empleadas no alcanza el doble de la media del control, tanto con activación metabólica como en ausencia de ella, lo mismo que la razón de mutagenicidad, la cual es menor que dos, lo cual indica que no se produjo mutaciones puntuales en el ADN de las cepas evaluadas.

Estos resultados evidencian que no se produjo daño genotóxico en las bases del ADN de las cepas evaluadas.

Los resultados obtenidos mediante el programa estadístico SALMONEL demostraron que no existía relación dosis-respuesta al no existir diferencias significativas entre las cepas con y sin activación metabólica, es decir los resultados cumplen con el criterio de negatividad.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos farmacológicos y toxicológicos se proponen las consideraciones parciales siguientes:

- El extracto acuoso de las hojas de la especie mostró una potente acción diurética en ratas, comparable con diuréticos reconocidos de alta eficacia.
- El extracto acuoso de *Boldoa purpurascens* no mostró acción antimicrobiana a concentraciones del extracto al 20% por lo que el empleo popular de esta planta en infecciones urinarias no está justificado científicamente.

- No se presentaron consecuencias toxicológicas derivadas de la administración única del extracto acuoso preparado al 10 % de las hojas de *Boldoa purpurascens, Cav.*
- El consumo de una dosis única elevada del extracto probado por vía oral no representa un riesgo para la salud, atendiendo a los resultados experimentales.
- El valor de la LD₅₀ del extracto acuoso de *Boldoa purpurascens, Cav* es mayor que 2000 mg/Kg de peso.
- El extracto acuoso de *Boldoa purpurascens, Cav* no resultó genotóxico en ninguna de las dosis (500, 1000, 2000 mg/Kg de peso) evaluadas, ya que no produce efectos clastogénicos ni aneugénico.
- El extracto acuoso de *Boldoa purpurascens, Cav* no presenta efecto mutagénico, probado por el ensayo de incorporación en placa en las cepas TA 98 y TA 100 en presencia y ausencia de activación metabólica.

4. ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO DE LAS HOJAS DE *Boldoa purpurascens*.

4.1. Clasificación botánica.

Se comprobó que la planta objeto de estudio es *Boldoa purpurascens* Cav, por medio de su comparación con un ejemplar herborizado en el Jardín Botánico de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, identificado el con número de herbario 3012, coincidiendo con los datos botánico informados para esta especie en la literatura (León, 1957).

4.2. Estandarización de la droga cruda.

Secado y humedad residual.

Este estudio suele ser de gran importancia, pues el proceso de secado reduce sustancialmente el volumen y la masa de la droga vegetal, lo que permite el almacenamiento durante el tiempo que se establece para cada especie y poder disponer de ella en diferentes épocas del año. También mejora su estabilidad química, física y microbiológica. (Miranda, 2000; OMS, 2003)

Por primera vez se realizó el estudio de secado, así como la determinación de los índices numéricos para esta especie, lo que permitió establecer los límites de especificación para el secado de las hojas de *Boldoa purpurascens*.

Los resultados obtenidos aparecen en la tabla XXI. Las hojas de la planta sometidas al proceso de secado artificial en estufa, demoraron tres días para alcanzar el peso estable en las condiciones descritas en el experimento.

con una pérdida en peso de $82,02 \pm 1,00$ %. La humedad residual del material seco presentó un valor adecuado para la conservación del material vegetal que resultó de $5,600 \pm 0,06$ %.

Para el secado a la sombra y al sol se alcanzó el peso constante a los 15 y 4 días, respectivamente. Atendiendo al tiempo de secado, se puede plantear que el método artificial es el más adecuado.

Con respecto a los valores de pérdida de peso para la droga sometida a los tres métodos de secado, en todos los casos son superiores al 60%, (dentro de los límites normales establecidos), según las normas ramales de Salud Pública de Cuba (NRSP 309 y 310, 1992), a pesar de ser el secado en la estufa el que logró un mayor porcentaje de pérdida en peso de agua y por lo tanto, de acuerdo a este parámetro, es el mejor método de secado.

En la tabla XXI se muestran los valores promedios de las réplicas evaluadas para la humedad residual para cada método de secado. Tal como se informa en la Farmacopea Británica del 2004, los valores de este parámetro para cada método de secado se encuentran dentro de los límites establecidos para las especies vegetales, que se establece que sea por debajo de un 10 % (Sharapin, 2000).

El método de secado en la estufa proporciona los menores valores de humedad residual en el material vegetal, por tanto puede permitir alargar el tiempo de almacenamiento de la droga en base a este índice (Claus, 1985; Miranda, 2000). Este resultado favorece la propuesta de que el secado artificial (estufa) para las hojas de *Boldoa purpurascens*, Cav, es el más apropiado.

Determinación de cenizas totales.

Las cenizas que se obtienen por incineración son indicativas de la calidad de la muestra con que se trabaja y constituyen una base para juzgar la identidad y la pureza de una droga, brindando además una información de la posible adulteración con materias inorgánicas o cuerpos extraños que contenga la misma y del contenido de sales inorgánicas.

Es razonable el hecho de detenerse a analizar los valores de cenizas obtenidas, ya que según Evans, 2002, dichos valores dan criterio, en el caso de muchas plantas, del tipo de manipulación realizada. Sin embargo, existen gran cantidad de plantas que ofrecen valores elevados de cenizas, debido probablemente a un alto contenido de componentes inorgánicos.

Se apreció que los valores de cenizas totales en la especie *Boldoa purpurascens*, Cav resultaron relevantes ($41,19 \pm 0,55$ %) (tabla XXII), lo cual correspondió con el elevado porcentaje de componentes inorgánicos encontrados en los extractos del material vegetal, resultando llamativos los valores para el potasio, magnesio, sodio y calcio, determinados por absorción atómica. El elevado contenido de algunos de estos minerales está relacionado con la composición del suelo donde crece esta especie.

Los porcentajes de cenizas solubles en agua exceden del valor que aparece referido para varias especies vegetales ($34,096 \pm 0,66$ %) (NRSP 309,1992; Farmacopea Británica, 2004), lo que estuvo dado por la presencia de metales alcalinos y alcalinos térreos, así se comprobó

la presencia de los mismos en las hojas de esta planta en cantidades considerables. Para el caso de las cenizas insolubles en ácido clorhídrico ($2,32 \pm 0,04$ %), exceden del valor que se refiere en la literatura consultada para muchas plantas. (Evans, 2002; WHO, 1998). El valor de las cenizas insolubles en ácido clorhídrico puede alertar sobre la presencia de metales pesados que pueden conferir toxicidad, por ello se realizó la determinación de la composición inorgánica de los extractos acuosos, lo cual se analiza más adelante.

En plantas como la que se estudia, en la que el valor de las cenizas totales es elevado, es necesario añadir ácido nítrico o sulfúrico para obtener cenizas blancas al igual que otras plantas que se han estudiado (Farmacopea Británica, 2004). No obstante, una alta proporción de ellos justifican el valor de las cenizas solubles en agua, vinculadas a la presencia de los metales alcalinos y alcalinos térreos.

Composición inorgánica de la planta.

Si se toman en consideración los valores de las cenizas totales, se advierte que se está ante una planta con elevado contenido de componentes inorgánicos en las hojas. Entre los metales presentes en la planta se encuentran potasio, plomo, cadmio, hierro, cobre, cromo, magnesio, níquel, sodio, manganeso y calcio, estando en mayor proporción el potasio, aunque el sodio, magnesio y calcio se hallan también en cantidades importantes. La presencia de cadmio y plomo en las plantas se atribuye generalmente a la contaminación de los suelos donde se cultiva; la cantidad máxima permisible está en el orden de 10 mg/kg para

el cadmio y 0,3 mg/kg para el plomo (Miranda M, 2000; USP.XXIV, 2000), por lo cual esta planta tiene valores permitidos para esos metales. (Tabla XXIII)

Existen un gran número de plantas cuya acción diurética se debe a la presencia de algunos componentes inorgánicos en forma de sales. Así, la especie objeto de estudio contiene un elevado porcentaje de sales de potasio y en menor cuantía otras como sodio y calcio, principalmente. La determinación de los metales presentes en el extracto acuoso de *Boldoa purpurascens* demostró que el potasio se encuentra en una alta proporción en las hojas de la planta, lo que puede contribuir al efecto diurético que presenta la misma (Arteche, 1998, 2003; Flórez, 2003).

Tamizaje fitoquímico.

El estudio fitoquímico a través del método de tamizaje se llevó a cabo utilizando las técnicas establecidas por Miranda y col, 2000. Este procedimiento permitió conocer tentativamente los metabolitos secundarios presentes en el material vegetal estudiado.

Una vez conocida la posible presencia de determinados metabolitos, es posible encaminarse a la preparación de los extractos con los disolventes más recomendables para el tipo de componentes que se desee estudiar.

Los resultados del tamizaje fitoquímico de la planta fresca y secada diferentes métodos sugieren que no existen diferencias en los resultados al aplicarlo a los extractos de la planta secada, por lo que al menos la composición por familia química no se altera. (Tabla XXIV)

Según los resultados para el tamizaje fitoquímico, se puede señalar que la composición por familia química general que presenta *Boldoa purpurascens*, Cav es:

- Triterpenoides y/o esteroides
- fenoles y/o taninos
- saponinas
- ácidos grasos
- flavonoides
- compuestos con grupos aminos
- compuestos reductores (pueden estar en forma libre o formando glicósidos) .

Los resultados de los ensayos realizados permitieron arribar a las siguientes conclusiones parciales respecto al análisis de calidad de la droga cruda:

- Los estudios realizados a las hojas de *Boldoa purpurascens*, Cav permitieron establecer algunos valores de los parámetros de calidad para la normalización de la especie como droga cruda, por encontrarse los mismos dentro de los límites establecidos según las normas cubanas para especies vegetales (NRSP 309 y 310,1992) y las establecidas por la OMS, 1998 .
- El estudio de secado permitió establecer al método artificial como el más adecuado para esta especie, por proporcionar el menor tiempo de secado (tres días), el menor contenido de humedad residual del material secado ($5,600 \pm 0,06$ %) y el mayor valor de pérdida en peso de agua ($82,02 \pm 1,00$ %).

- La caracterización inorgánica del extracto acuoso de las hojas de la especie corroboró la elevada composición de componentes inorgánicos, lo cual se corresponde con el elevado valor de cenizas calculado ($41,19 \pm 0,55$ %), en particular se resalta el potasio entre 0,8 y 0,9 % en peso.
- Se determinó por primera vez, por medio de las técnicas de tamizaje fitoquímico, la posible composición química de las hojas de esta planta, que no ha sido informada con anterioridad a este trabajo.

5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS; AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.

5.1. Extracción con disolventes de polaridad creciente.

La especie *Boldoa purpurascens*, Cav. sólo tenía escasos informes que confirmaran la existencia de determinados metabolitos, se conoce lo descrito en el (tamizaje fitoquímico) del epígrafe 4.2 y la presencia de ácidos grasos encontrados por González y col, 2001, por lo que se comenzó realizando este proceso extractivo.

El procedimiento empleado permitió determinar cuál de los disolventes extraía la mayor cantidad de componentes solubles presentes en las hojas de la planta, así se obtuvo el porcentaje de los mismos que produjo cada disolvente (todos referidos al peso de sólidos contenidos en 1 mL de extracto).

Extracto A (etéreo)	2,5 %
Extracto B (acetato de etilo)	2,2 %
Extracto C (etanol)	8,4 %
Extracto D (agua)	21,0 %

Se pudo observar que aún después de extraer con tres disolventes de polaridad diferente, el extracto acuoso final es el que mayor cantidad en peso extrajo de los componentes solubles de las hojas de la planta y sólo en el extracto D los resultados del tamizaje fitoquímico mostraron evidencias positivas para metabolitos

posiblemente responsables del efecto farmacológico propuesto para la planta. (Markhan, 1988; Roig, 1988; Toebes, 2005; Van Hoff, 1989)

El extracto acuoso (D) se refrigeró para tratar de obtener algún sólido por cristalización. Al no observar cristalización pasadas las 24 horas se procedió a realizar el análisis de este extracto, empleando cromatografía en capa delgada (CCD), para evaluar la abundancia de metabolitos y valorar la posibilidad de aislar algún componente por algún método clásico.

Se pudo apreciar que por la poca complejidad en cuanto a número de manchas que se observaron en el cromatograma y la buena resolución de las mismas, se podría aislar algún componente farmacológicamente activo.

En el cromatograma (Figura 4), se observaron sólo 4 manchas de color púrpura al ser reveladas con vapores de amoníaco y luz UV (reveladores específicos para flavonoides), con Rf 0,2; 0,4; 0,5 y 0,7; que sugirió la presencia de estos metabolitos pues coincidieron los valores de Rf y el revelado con lo referido en la literatura (Markham, 1982; Miranda, 2000; Vande, 1998).

Una vez conocido que el extracto acuoso contenía el mayor porcentaje de metabolitos presentes en las hojas de *Boldoa purpurascens*, Cav (21,0 %) y que existían en el mismo compuestos que podrían estar relacionados con la acción farmacológica comprobada, teniendo en cuenta el resultado del tamizaje fitoquímico y el desarrollo de la cromatografía para este extracto, observada anteriormente, se decidió emplear el extracto acuoso, para

aplicar diferentes fraccionamientos al mismo y aislar los componentes de tipo flavonoide que pudieran contribuir a la acción farmacológica demostrada para este extracto.

5.1.1. Preparación del extracto acuoso y métodos de fraccionamiento

Las hojas secas y pulverizadas de *Boldoa purpurascens*, Cav se sometieron a extracción con calor utilizando un reactor para obtener el extracto acuoso, ya que esto permitió procesar masas de droga superiores a 1 kg en poco tiempo y por tanto obtener mayor volumen del extracto de una sola vez y realizar el proceso extractivo con un control exacto de la temperatura, para evitar posible degradación de los componentes activos. El extracto se secó por el método de atomización por Spray Dry, para su conservación y posterior uso, pues, como es conocido, los extractos acuosos están expuestos a la proliferación de microorganismos en muy poco tiempo. (Figura 5)

Fraccionamiento por contracorriente.

Teniendo en cuenta los resultados del tamizaje fitoquímico, este procedimiento estuvo dirigido a obtener los compuestos fenólicos presentes en el extracto acuoso (Figura 6), dentro de los cuales están los flavonoides, por su posible relación con la acción farmacológica demostrada para *Boldoa purpurascens*.

Teniendo en cuenta el desarrollo cromatográfico en CCD al UV y el uso de tricloruro de aluminio como reveladores específicos para flavonoides. Las 10 fracciones de lavado con los disolventes orgánicos, tolueno y cloroformo, no mostraron manchas definidas además de tener un aspecto resinoso, mientras que las fracciones acuosa y de n-butanol dieron lugar a

manchas mejor definidas; siendo estas las seleccionadas para continuar trabajando, lo cual conduce a tratar de aislar este tipo de metabolito, presentes en el extracto acuoso de las hojas de *B. purpurascens*, Cav (Markhan, 1988).

La fracción butanólica mostró seis manchas mejor resueltas (Figura 7) que las de la fracción acuosa que presentó cuatro manchas, además, se obtuvo mayor cantidad de masa seca para esta fracción, lo que indicó mayor proporción de los componentes eluidos en ella, por lo que se seleccionó a la primera fracción para la separación por cromatografía en placa preparativa con vistas a aislar los componentes que aparecieron en esta fracción (Figura 8).

5.1.1.1. Separación por placa preparativa de la fracción butanólica.

Los componentes de la fracción n–butanólica, se separaron mediante el uso de cromatografía en placa preparativa atendiendo a los resultados del análisis cromatográfico por (CCD). Las cuatro manchas mejor resueltas en forma de franjas, con Rf: 0,3; 0,5; 0,6 y 0,7 se disolvieron en metanol y evaluaron cualitativamente por CCD para tener criterios de la pureza de las fracciones correspondientes a cada franja (I, II, III y IV), lo cual permitió conocer que los productos obtenidos estaban aún impuros. A cada fracción se le registró el espectro infrarrojo, para obtener más información sobre los grupos funcionales presentes en cada fracción obtenida y relacionar estos con los grupos que poseen los metabolitos de interés del extracto acuoso(Shulten, 1985).

Absorción por espectroscopía infrarroja (IR) de las fracciones I, II, III y IV.

Los resultados obtenidos en el espectro infrarrojo (IR) (Tabla XXV y Anexo 1) de las fracciones descritas en el epígrafe 4.2, indicaron la posible presencia de grupos hidroxilos alcohólicos y fenólicos asociados, preferentemente secundarios y primarios de acuerdo al ancho de la banda que aparece entre 3000 y 3500 cm^{-1} , la cual sugiere una posible asociación por puentes de hidrógeno; además, el hecho de que exista una banda OH indica la presencia de un enlace C-O el cual puede ser asignado a la señal que se registra en 1109,3 cm^{-1}

En los espectros de las fracciones I, II, III y IV aparece también una banda entre 2923 y 2931 cm^{-1} la cual puede ser asignada a vibraciones de valencia de $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ y que indica la presencia de una porción saturada en la molécula. Esto se complementa con las bandas que aparecen entre 1385 y 1389 cm^{-1} en las fracciones II, III y IV, que es característica de CH_3 .

Además, en los cuatro espectros aparece una banda ancha con centro entre 1647-1652 cm^{-1} que puede tener incluidas las bandas del C=C no conjugado y, además, la banda carbonílica donde la constante de fuerza del enlace está debilitada por asociaciones por puentes de hidrógeno que puede corresponder con compuestos de tipo flavonoides.

En el espectro obtenido para la fracción IV aparece una banda en 1653 cm^{-1} que se asemeja más a la del C=O de un aldehído o cetona, que participa en enlace por puente de hidrógeno, lo que provoca que esta banda aparezca más ancha y a valores por debajo de 1700 cm^{-1} (Anexo 1)

Para corroborar que en la fracción n–butanólica aparecieron los compuestos de interés, se evaluaron las fracciones I, II, III y IV por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) (Hober; 2001; Svedstrom, 2006).

Análisis de las fracciones I, II, III, IV por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia. (CLAE).

Las cuatro fracciones obtenidas mediante cromatografía en placa preparativa fueron analizadas usando patrones de carbohidratos y flavonoides como compuestos de interés, y se obtuvieron los resultados siguientes:

Fracción I: Presentó tres picos detectables (Figura 9), siendo el de mayor tiempo de retención (40,29 min) el componente principal (50,1%) de la cantidad de sustancia eluida a partir de la franja obtenida de la cromatografía en placa preparativa.

Fracción II: Presentó seis picos detectables (Figura 10) y sólo dos de apreciable intensidad, siendo el de menor tiempo de retención (13,77 min) el componente principal (65,9%) de la cantidad de sustancia eluida a partir de la franja obtenida de la cromatografía en placa preparativa.

Fracción III: Presentó seis picos detectables (Figura 11), similar al cromatograma anterior; el de menor tiempo de retención (13,80 min) resultó ser el componente mayoritario (50,1 %), de

igual comportamiento, pero con la diferencia de que el componente principal, pudiera estar más impuro.

Fracción IV: Presentó cuatro picos detectables (Figura 12), siendo también el de menor tiempo de retención (13,93 min.) el componente principal (53 %)

La comparación de los tiempos de retención y el enriquecimiento de los picos de las muestras y los patrones disponibles, sugirió que estas fracciones eran ricas en carbohidratos y de igual forma, de acuerdo al tiempo de retención de algunos flavonoides y sus glicósidos (Lock, 1998; Kuma y col, 2001; Liu y col, 2002; Liv, 2004), estos tipos de productos naturales pueden estar presentes en el extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*, Cav, por lo cual el trabajo posterior se encaminó a realizar el aislamiento de estos compuestos (Figura 13 y 14, Tabla XXVI).

5.2.2. Análisis de la fracción n-butanólica obtenida por contracorriente.

De acuerdo a los resultados observados en CCD, de la fracción obtenida en n-butanol en el intercambio por contracorriente, epígrafe 5.1.1, donde aparecieron manchas de comportamiento cromatográfico similar al de los flavonoides, y conocido que con este disolvente se pueden eluir los diferentes flavonoides, según las mezclas empleadas (Markhan, 1988), a partir de este análisis se decidió cambiar la fase móvil empleada por diclorometano/ metanol/ agua (80:19:1; v/v/v).

Del análisis de estos resultados se seleccionó el n-butanol como un buen disolvente para la extracción de los flavonoides y que podría ser usado para la obtención de una fracción

enriquecida en estos metabolitos a partir del extracto acuoso seco obtenido de las hojas de *Boldoa purpurascens*, Cav.

5.3. Obtención de una fracción n-butanólica rica en flavonoides.

El sólido obtenido a partir de la fracción butanólica (Figura 15), descrito en el epígrafe 2.3.3 evaluado por cromatografía en capa delgada utilizando placas fluorescentes (PF-254), originó varias manchas bien resueltas en la fase móvil diclorometano/metanol/agua (80:19:1; v/v/v), revelado al UV y con ácido sulfúrico más calor, lo cual sugirió la presencia de flavonoides en la mezcla evaluada (Voirin, 1983).

5.3.1. Aislamiento y purificación de los compuestos de la fracción butanólica (compuestos 1, 2, 3, 4).

Las fracciones descritas en el epígrafe 2.3.3.1 se reunieron en cuatro nuevas fracciones denominadas como FA, FB, FC y FD. Se decidió realizar una cristalización en metanol para la fracción FA (10-16), ya que en la cromatografía en capa delgada no se observaron diferencias y a las 24 horas se observó que precipitó un sólido de color amarillo claro con una masa correspondiente a 56 mg denominado compuesto 2, (análisis realizado por CCD).

La segunda fracción FB (17-23) también se sometió a cristalización en metanol y se obtuvieron 19 mg de un sólido de color amarillo que por el resultado de la cromatografía en capa delgada resultó una mezcla de dos compuestos, uno denominado 3, que estaba ligeramente contaminado con el compuesto 2. La tercera fracción FC (41-48), después de someterla a cristalización en iguales condiciones a las anteriores y evaporar el disolvente, rindió 600 mg de un producto de color amarillo intenso, que al seguimiento por CCD, indicó un compuesto aparentemente puro, denominado 1. La fracción FD (60-120) se evaporó y rindió 600 mg de una mezcla de compuestos, que por su poca complejidad se decidió separar por CLAE preparativa en fase reversa (Parejo, 2004; Pereira y col, 2004; Petsalo, 2005) utilizando un gradiente desde MeOH 50% en agua hasta 100% de MeOH. Se obtuvieron 20 mg del compuesto 4, ligeramente contaminado con otro compuesto, según la CCD.

5.3.1.2. Separación y purificación de otros compuestos de la fracción butanólica (Compuestos 5 y 7).

La fracción butanólica descrita en el epígrafe 2.3.3 se acetiló y se eluyó de la columna cromatográfica con acetato de etilo al 10% en diclorometano. Las fracciones colectadas se llevaron a sequedad y se obtuvieron 2,8 g de un sólido que al analizarlo por CCD aparentaba estar puro y se denominó 5. Además, se obtuvo otra fracción de 157 mg de un compuesto

contaminado que se denominó 7, el cual se purificó más tarde por placa preparativa y rindió 25 mg de dicho compuesto aparentemente puro.

El proceso de acetilación tuvo como objetivo obtener el compuesto 7 puro y permitió a la vez corroborar las uniones de los azúcares en las estructuras propuestas, como se verá más adelante.

Los tres compuestos aislados y purificados que resultaron nuevas estructuras tenían las características siguientes:

Compuesto 1: sólido amarillo intenso (recristalizado en MeOH), temperatura de fusión 189-191 °C, $[\alpha]_D^{25} - 100,5$ (H₂O, c: 0,054 M).

Compuesto 2: sólido amarillo claro (recristalizado en MeOH), temperatura de fusión 262-264 °C, $[\alpha]_D^{25} - 136,6$ (dimetil sulfóxido (DMSO), c: 0,023 M).

Compuesto 7: sólido amarillo claro, temperatura de fusión 101-103 °C, $[\alpha]_D^{25} - 64,96$ (cloroformo (CHCl₃), c: 0,066 M).

Denominaciones:

$[\alpha]_D^{25}$ Ángulo de rotación específica

(c) concentración del analito.

En los informes revisados sobre aislamiento de compuestos de tipo flavonoides (Markham, 1989; Mandalari y col, 2006) aparece descrito que el extracto de partida es el metanólico y

en otros casos es el etanólico. Los disolventes que se refieren para la elución de este tipo de metabolito por cromatografía de columna preferentemente son mezclas de agua con metanol o acetona, siempre usando proporciones bajas de agua, generalmente en relación (1 : 5; v/v). Sin embargo, para el caso de *Boldoa purpurascens*, Cav no se empleó el método para el aislamiento de estos compuestos como se refiere en la literatura (Markhan, 1987). Para el desarrollo de este trabajo experimental, se partió del extracto acuoso, por ser el que tiene informes de su uso en la medicina tradicional (Roig, 1988); además, se comprobó experimentalmente para dicho extracto la actividad farmacológica propuesta. Se utilizaron como fases móviles para la elución de estos compuestos diclorometano/metanol (80: 20; v/v) y diclorometano/metanol/agua (80 :19 :1; v/v/v) y se obtuvo aproximadamente un 15 % de compuestos que responden a estructuras con núcleo flavonoide, por lo cual se consideró una metodología adecuada para aislar este tipo de metabolito a partir de extractos acuosos.

5.4. Análisis espectroscópicos de los compuestos obtenidos.

5.4.1. Absorción por espectroscopía UV/Vis.

El espectro ultravioleta visible (UV) registrado en metanol del compuesto 1 (Anexo 2), mostró dos máximos de absorción a 278 y 336 nm, en el cual se observaron dos bandas una entre 250 y 285 nm y la otra entre 320 y 385 nm, esta banda se corresponde con una sustitución de hidroxilo en el carbono 4' (Mabry y col., 1970). El espectro del compuesto 2 (Anexo 2), apareció con dos máximos de absorción, uno a 278 y el otro a 339 nm, lo que correspondió con dos bandas similares a las del compuesto 1; esto estuvo dado por la similitud estructural de estos dos compuestos. Para el caso del compuesto 7 (Anexo 2), los máximos de

absorción se observaron a 209 y 309 nm, originando un espectro con dos bandas una entre 210 y 250 nm y la otra entre 299 y 350 nm, lo cual se corresponde con flavonas sin grupos hidroxilos (Mabry, 1970; Voirin, 1983). Los espectros de flavonas y flavonoles son registrados usualmente en metanol y es poco frecuente en etanol (Markham, 1970), por lo cual los espectros de estos compuestos se registraron bajo esas condiciones.

Muchas flavonas y flavonoles presentan dos bandas de absorción en la región del UV/Vis, una en el intervalo entre 320 y 385 nm y otra entre 250 y 285 nm, correspondiendo a los anillos A y B del núcleo base de estos compuestos (Voirin, 1983).

5.4.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear. Propuesta estructural.

Los espectros RMN ^1H y de ^{13}C del compuesto 1 (anexos 3, 4 y 5) mostraron señales para los protones aromáticos que son características de compuestos fenólicos. Así, el singuleto ancho centrado a δ 12,55 ppm evidencia la presencia del grupo OH en posición 5 del anillo A, con un corrimiento químico a campo bajo de δ 177,8 ppm en el anillo C (Niassy y col, 2004) (Tabla XXVII y XXVIII), lo cual se refleja en las señales del espectro HMBC. Este valor responde al establecimiento de una interacción por puente de hidrógeno entre el protón del grupo OH del C-5 y el oxígeno del grupo carbonilo situado en la posición cuatro del anillo C (C-4). En el patrón de sustitución del anillo A se observan un singuleto de protón aromático a δ 6,90 ppm y otro fuera de esta zona a 6,17 ppm, indicativo de un sistema trisustituido, lo que acertadamente responde a lo correlacionado para las señales del carbono a δ 102,8 ppm en el espectro HMQC. Igualmente, esta señal a δ 6,17 ppm correlaciona con los corrimientos a campo bajo de los carbonos 6 y 7 del anillo A del flavonoide a 129,4 y 153,9 ppm,

respectivamente, confirmando así la trisustitución para este anillo. La localización del grupo metilendioxi en las posiciones 6 y 7 de este anillo se estableció comparando los resultados del espectro RMN ^{13}C de este compuesto 1 (Tabla XXVIII) con el conocido compuesto 4 (Hiroshi, 1988) (Figura 16). Como resultado de esta comparación pudo establecerse la identidad estructural del aglicón de los compuestos 1 y 4. Es decir, se evidencia una total correspondencia en las señales para este sistema común entre ambos compuestos.

Se encontró en el espectro HMBC (Anexo 7) la correlación que existía entre el protón del carbono ocho (C- 8) con un corrimiento a δ 6,90 ppm y los carbonos 6 y 7 del anillo A del flavonoide, con corrimientos a 129,4 y 153,9 ppm, respectivamente. Se encontró, además, que el protón del carbono ocho (C-8) tenía correlación cruzada con el carbono 9 a δ 151,7 ppm y con el 10 a δ 106,9 ppm.

La aparición de un sistema AB comprendiendo dos dobletes (2 H) y las señales a δ 8,05 ppm y δ 6,91 ppm mostraron que el anillo B del flavonoide es parasustituido.

Se observó una señal con un corrimiento a δ 8,05 ppm en el espectro HMBC que correlacionó con un corrimiento en el espectro de ^{13}C a 160,3 ppm, lo que permitió asignar el carbono 4' del anillo B. Así, se comprobó que este protón correlacionaba con el carbono 2 del anillo C con un corrimiento a 156,6 ppm. Además, había correlación en el espectro de RMN ^{13}C con corrimientos que aparecieron a 130,7 ppm. Esto brindó la información para asignar los carbonos 2' y 6'.

Se comprobó en el espectro H-H COSY (Anexo 6) el acoplamiento en el anillo B entre los protones de los carbonos 2', 6' y 3', 5', así como del protón 6' con el carbono 4' del propio anillo.

Para el anillo B, en el espectro HMBC, se estableció la correlación entre el carbono uno (C-1') de este anillo y los protones que aparecieron a 6,91 ppm pertenecientes a 3' y 5'. Por otra parte apareció un singuleto ancho a δ 10,3 ppm en el espectro RMN ^1H HMQC. La resonancia a estos bajos valores de campo debe ser atribuida al grupo hidroxilo de la posición cuatro de este anillo, manifestándose así la naturaleza fenólica de este compuesto.

Las correlaciones observadas en el espectro HMBC del compuesto 1 (Anexo 7) permitieron la asignación de todos los átomos de carbono del aglicón, excepto para el carbono 5, el cual se asignó por comparación con el resto, teniendo en cuenta el entorno químico del mismo y se asignó el corrimiento a 140 ppm. El resto de las señales del espectro RMN ^1H indicaron la presencia de una cadena de disacárido, que consistió en una unión de una pentapiranososa al aglicón del flavonoide y un terminal 6-deoxihexopiranososa.

Todos los glicósidos aislados y caracterizados poseen el mismo aglicón, por lo cual se discute la asignación de los carbonos de este esqueleto una única vez. (Figura 16)

Estos datos son concordantes con la presencia en el espectro de masas (ESI- MS modo negativo) (Anexo A), al de un pico correspondiente al ion molecular a m/z 591 $[\text{M-H}]^-$, un pico a m/z 445 que correspondió a la pérdida del fragmento de una hexosa

(ramnopiranosas), así como un fragmento correspondiente al aglicón de dicho compuesto que apareció a m/z 313.

Las señales correspondientes al aglicón en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C concuerdan con una estructura de flavonoide con grupo dioxalano (Tabla XXVII y XXVIII).

Propuesta estructural de los azúcares

Compuesto 1

Las señales en el espectro RMN ^1H (Anexo 3, Tabla XXVII) indicaron la presencia de la cadena de un disacárido, consistiendo en una pentapiranosas unida al aglicón y un terminal 6-deoxyhexopiranosas. Estos azúcares se identificaron como α -L-arabinosa y α -L-ramnopiranosas por análisis combinado del compuesto 1 y su producto acetilado 5 (Tabla XXIX). El análisis del espectro H-H COSY para el compuesto 5 reveló que la ramnosa estaba unido por el C-2 de la arabinosa, la posición de unión del disacárido al aglicón se determinó por la correlación observada en el espectro HMBC entre el protón anomérico de la arabinosa (δ 5,55 ppm) y el C-3 (δ 132,7 ppm). Una correlación se observó entre el protón anomérico de la α -L-arabinosa (δ 5,90 ppm) y el protón H-2 absorbiendo por debajo de los valores del corrimiento de (δ 3,85 ppm).

En el espectro protónico de este compuesto aparece que el H-2 es un triplete con una constante de acoplamiento de (8,40 Hz), este triplete puede estar interpretado como un doble doblete con una constante de acoplamiento con el hidrógeno 1 (H-1) de (5,90 Hz), lo

que se puede corresponder con una interacción axial- ecuatorial y mayor que 8 Hz con una interacción axial - axial con el H-3.

Aquí aparece que los protones de H-5 tienen como constante de acoplamiento con el H-4 (4,3 y 6,45 Hz), esto supone una orientación ecuatorial del H-4.

Así se pudo establecer sobre la base del RMN ^{13}C y el espectro de masa en modo negativo (ESI-MS) (Cuyckens, 2004), el cual mostró un ion molecular a m/z 591 $[\text{M-H}]^-$. También se encontró un pico a m/z 445 que corresponde a la pérdida de un resto de ramnopiranososa, y un fragmento correspondiente al aglicón que apareció a m/z 313. Todo esto permitió proponer como fórmula molecular para este compuesto de $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_{15}$. Consecuentemente, se propuso como estructura del compuesto 1:

4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi flavona-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosida.

Compuesto 2

Las señales en el espectro RMN ^1H (Anexo 9) indicaron la presencia de la cadena de un monosacárido, consistiendo en una pentapiranososa unida al aglicón. Este azúcar se identificó como β -D-xilosa por análisis de las constantes de acoplamientos de todos los protones de la misma en el espectro protónico (RMN ^1H) de su producto acetilado 6 (Tabla XXIX). La posición de unión del monosacárido al aglicón se determinó por la correlación observada en el espectro HMBC (Anexo 13) entre el protón anomérico de la xilosa (δ 5,42 ppm) y el C-3 (δ 132,7 ppm).

En el experimento H-H COSY del compuesto 6 (Tabla XXIX), se observó la correlación que existía entre la señal del protón anomérico a 5,58 ppm y el protón H-2. Así apareció el H-2 como un doble doblete con una constante de acoplamiento de $J= 8,22$ Hz con el H-3 y de 6,4 Hz con el H-1, lo que puede corresponder con una interacción axial axial .

Aparece que los protones H-5 tienen como constantes de acoplamiento ($J=11,88$ y $4,57$ Hz), lo que se corresponde con una posición axial para el protón H-4.

Se estableció sobre la base de espectro RMN ^{13}C y el espectro de masa (ESI-MS) que el compuesto 2 respondió a la fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{O}_{11}$. El espectro de masa en modo negativo $[\text{M-H}]^-$ mostró un ion molecular a m/z 445. Apareció un fragmento a m/z 313, lo que correspondió con el aglicón, lo cual indica la pérdida de una unidad de pentosa (Anexo B). En consecuencia, se propuso como estructura para el compuesto 2: 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-3-O- β -D-xilopiranosida.

Compuesto 7

La correlación observada en el espectro H-H COSY (Anexo 19) entre el protón anomérico de β -D-glucosa a δ 5,65 ppm y el protón 2 (H-2) absorbiendo por encima de δ 3,76 ppm , sugirió que α -L- ramnosa estaba unida por la posición dos (C-2) de la glucosa. Las señales observadas para el resto del aglicón eran bastante similares a las de los compuestos 1 y 2, indicando una estructura común para el aglicón de la flavona. (Anexos 15-21)

Sin embargo, debido a la acetilación de 4' OH, los protones 3' y 5' del anillo B se observaron a menores valores de corrimiento, mientras que la señal del grupo metilendioxi se detectó

como un singuleto en el espectro protónico de los compuestos 1 y 2. Aquí apareció en el espectro como un doblete para el compuesto 7 realizado a 25° C; el cual a 55° C fue transformado a un sistema de Spin AB con $^2J = 1\text{Hz}$. Este valor de 2J coincide con lo informado para el metilendioxi-benceno (Prasch y col, 2000).

Así, el espectro de masa (ESI-MS) en modo positivo $[M+H]^+$ mostró el ion molecular a m/z 959. Este correspondió con la fórmula molecular $C_{44}H_{46}O_{24}$. Dada la baja energía de la técnica empleada es limitada la información estructural por la poca fragmentación, pero los valores obtenidos juntos a los resultados del espectro DEPT RMN ^{13}C permitieron proponer la estructura del compuesto 7 como 4',5-bis (acetiloxi)-6,7-metilendioxi-flavona-3-O-(2,3,4-Tri-O-acetil- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-(3,4,6-tri-O-acetil)- β -D-glucopiranosida. Esta estructura correspondió con el octaacetato del compuesto natural original 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-flavona-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosida.

5.5. Evaluación de la actividad diurética de compuestos aislados del extracto acuoso.

5.5.1. Evaluación de la actividad diurética de 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-flavona-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosida. (compuesto 1)

Cuando se comparó el grupo control negativo (7) con los diferentes grupos donde se probaron las dosis del producto en estudio (1, 2, 3, 4, 5 y 6), se obtuvo diferencias significativas en cuanto a todos los parámetros medidos: volumen de orina, excreción de sodio, cloruro y potasio, pues la probabilidad es menor que 0,05, excepto en el grupo 2, donde no hay diferencia en la excreción urinaria del potasio de este grupo comparado con el control negativo. Cuando se analizó los valores de rangos medios de cada uno de los

parámetros del propio test, se observó que los mayores valores correspondieron a los grupos donde se administró el flavonoide en cuanto a la diuresis en las 6 horas y las concentraciones de los electrolitos sodio y potasio, lo cual confirma la actividad diurética del producto que se ensayó (Tabla XXX). Se compararon las diferentes dosis de la flavona administrada con la Furosemida (8) y se observó que no existen diferencias en el volumen de orina excretado para la dosis de 100 mg/mL (1), significativa para dosis de 50 mg/mL (2) y 25 mg/mL (3) y muy significativas para las restantes dosis, siendo mayores los valores de volumen de orina en el producto evaluado, por tanto se pudo confirmar la eficacia del flavonoide como diurético (Figura 17). Cuando se analizó el comportamiento del sodio y el cloruro se encontraron diferencias muy significativas. Se pudo observar que la menor excreción de los mismos se encontraron para las dosis ensayadas de la flavona (Tabla XXXI y XXXII) de forma contradictoria al volumen de orina excretado. Esta diferencia permitió sugerir que el compuesto pudiera pertenecer a un nuevo grupo de sustancias diuréticas llamadas acuaréticas, que actúan a través de los canales de agua (acuoporin) (Agre, 2003).

5.5.2. Evaluación de la actividad diurética de 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-3-O-β-D-xilopiranosida. (compuesto 2)

Con los valores obtenidos de los volúmenes de orina para cada grupo de animales se obtuvieron los valores medios y la desviación estándar en todos los tiempos medidos y se determinaron las diferencias. (Tabla XXXIII)

Como se observó en este estudio, la Furosemida y el compuesto aislado de *Boldoa purpurascens* a 100 mg/Kg mostraron los mejores efectos diuréticos, muy semejantes a

todos los tiempos evaluados (siendo conocida la actividad de la Furosemida como diurético de alta eficacia). Por otra parte, el compuesto aislado de *Boldoa purpurascens* a 50 mg/Kg mostró efectos semejantes a la Hidroclorotiazida, al igual que a 25 mg/Kg a partir de las cuatro horas, observándose diferencias en todos los casos con el control sin tratamiento.

Como puede apreciarse, las curvas de la Furosemida y la del compuesto aislado a dosis de 100 mg/Kg de peso corporal prácticamente se superponen en todos los tiempos evaluados (Figura 18 y Tabla XXXIII), siendo muy similar su comportamiento; lo mismo ocurre con el compuesto aislado a 25 mg/Kg y la Hidroclorotiazida. Se comprobó, que aún a esta concentración, el compuesto estudiado presenta efecto diurético. Con los resultados obtenidos se pudo sugerir que este compuesto es uno de los que contribuye a la acción diurética propuesta para el extracto acuoso de las hojas de esta planta por la medicina tradicional.

Los procedimientos desarrollados para la obtención de la fracción farmacológicamente activa, los análisis cromatográficos y espectroscópicos permitieron establecer las consideraciones parciales siguientes:

- El agua es el disolvente, de los empleados, que mayor porcentaje en peso de sustancias extrae de las hojas de esta especie, con el 21,0% de sustancias solubles extraíbles.
- La metodología de extracción líquido-líquido con agua y n-butanol y el uso de la cromatografía clásica de columnas empleando las fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (80:19:1;

6. DISCUSIÓN GENERAL

Se comprueba, con rigor científico el poderoso efecto diurético del extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*, Cav, postulado por la medicina tradicional. Se pudo determinar la dosis efectiva en ratas del extracto acuoso para provocar dicho efecto (extracto al 5%), a través de los ensayos preclínicos realizados y establecer que el comportamiento de este extracto es similar a la Furosemida que es un diurético de elevada eficacia. Se comprueba, además, este efecto para el compuesto 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxiflavona-3-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosida (1), presentando diferencias significativas con la Furosemida en cuanto al volumen de orina excretado, siendo mayor para el compuesto en todas las dosis ensayadas. También se observó que a la dosis de 50 mg/kg de peso en ratas la excreción de potasio es menor para el producto evaluado.

Para 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxiflavona-3-O- β -D-xilopiranosida (2) a la dosis de 100 mg/kg de peso se observó un comportamiento similar a la Furosemida, mientras que a la dosis de 50 mg/kg se comportó como la Hidroclorotiazida a todos los tiempos evaluados, igual comportamiento que la dosis anterior tuvo a 25 mg/kg; pero a partir de las 4 horas. Se pudo realizar la determinación cuantitativa de los iones sodio, potasio y cloruro excretados en la orina al evaluar el extracto y para uno de los flavonoides aislado (4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxiflavona-3-O- α -L

-ramnopiranosil(1→2)- α -L-arabinopiranosida) (1), lo cual permitió establecer diferencias con la Furosemida, fármaco que se caracteriza por ser expoliador de potasio, mientras que este producto no tiene esta tendencia a la dosis de 50 mg/kg. Se comprobó que a pesar de ser más potente el compuesto 1 que la Furosemida, tiene similar eficacia. Además, el volumen de agua excretado no se corresponde con la excreción de sodio, por lo que pudiera pensarse que no actúan por el mismo mecanismo para provocar el efecto propuesto y que pudiera ser por el mecanismo de los diuréticos acuaréticos para el flavonoide (Agre, 2003). Se observó que, en ratas a la dosis de 3 mg/kg, el compuesto 1 mantenía una elevada diuresis al cabo de las seis horas, lo que permitió predecir que el mismo tiene un tiempo de vida media superior al de la Furosemida. Todos estos resultados permitieron concluir que en este extracto se encuentra la fracción bioactiva para la acción que se le atribuye. Se comprueba que el extracto acuoso no tiene acción antibacteriana, lo que sugiere que el efecto que se propone por la medicina tradicional para este extracto no se encuentra fundamentado.

Boldoa purpurascens, Cav es la única especie de su género y es una planta con amplia distribución en América y el Caribe, silvestre, que se multiplica con relativa facilidad, garantiza una fuente natural de flavonoides, con probada potencia y eficacia como diurético, fármacos de primera línea para el tratamiento de diversas patologías. En el estudio farmacognóstico de las hojas de la especie colectadas en los meses de marzo-diciembre, se determinaron algunos parámetros de calidad de la droga a través de los ensayos fundamentales que permitieron establecer los valores límites para cada parámetro, dentro de los cuales la droga tiene las cualidades que se valoraron en este estudio, lo que posibilita establecer dichos valores para la normalización de la droga para su comercialización. Así, se

estableció que para las hojas de la especie secadas a 40° C en estufa y durante tres días el material vegetal debe contener una humedad residual de $5,600\pm 0,06$ %, el contenido de cenizas totales estará en $41,19\pm 0,55$ % y el de las cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico tendrá valores de $34,096\pm 0,66$ % y $2,32\pm 0,04$ %, respectivamente. No existían estudios de esta índole en esta especie. Las determinaciones cuantitativas de la composición inorgánica del extracto acuoso de la planta sirvió de pauta para confirmar la presencia de un número elevado de componentes metálicos y que no proporcionaban efectos tóxicos al extracto, al no encontrarse concentraciones apreciables de metales pesados a la vez que confirma cuál es la causa del elevado contenido de cenizas totales. Se corrobora que las sales de potasio se encuentran en un elevado porcentaje en las hojas de *Boldoa purpurascens*, Cav (0,9 %), lo cual justifica su contribución al efecto diurético en el extracto acuoso.

El tamizaje fitoquímico reveló la compleja composición química de las hojas de esta especie, de la cual no se poseía información. Se propone la presencia de triterpenoides y/o esteroides, saponinas, fenoles y/o taninos, ácidos grasos, compuestos reductores y compuestos con grupos amino.

Los métodos de fraccionamiento empleados para el extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*, Cav con vista a obtener la fracción bioactiva conllevaron en ambos casos a proponer la presencia de flavonoides en dicho extracto y a escoger el método de extracción por intercambio líquido-líquido utilizando agua –n-butanol como el más adecuado para esta especie, el cual permite obtener un porcentaje considerable de la fracción de flavonoides (13,5 %) presentes en el extracto acuoso. Además, proporcionó la separación de los flavonoides del resto de los metabolitos.

La fracción parcialmente purificada, obtenida del extracto acuoso de las hojas de *Boldoa purpurascens*, Cav se encuentra enriquecida en flavonoides en forma glicosídica, como lo demostró su comportamiento en cromatografía en capa delgada, con el uso de reveladores específicos (UV, amoníaco y tricloruro de aluminio). Por un procedimiento

sencillo, se logró la obtención de una fracción rica en glicósidos flavonoides de la cual se pudieron aislar y purificar cuatro compuestos, mediante el uso de la cromatografía en columna y posterior cristalización y por medio de cromatografía líquida de elevada eficacia usando fase reversa. Tres de estos flavonoides resultaron ser nuevas estructuras de productos naturales nunca antes conocidas.

El análisis de los espectros ^1H NMR ^{13}C NMR y ESI-MS permitieron corroborar la presencia de los flavonoides 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-flavona-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosida (1), 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-flavona-3-O- β -D-xilopiranosida (2), 4',5-bis(acetiloxi)-6,7-metilendioxi-flavona-3-O-(2,3,4-tri-O-acetil- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-(3,4,6-tri-O-acetil)- β -D-glucopiranosida (7), este resultó ser el octoacetato del producto natural 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-flavona-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosida (compuesto 3) como los nuevos flavonoides identificados y caracterizados del extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*, Cav nunca antes informados, el compuesto mayoritario es el 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-flavona-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosido.

El amplio estudio antimicrobiano realizado para el extracto acuoso, a elevadas concentraciones, demostró que el mismo no actúa como antibacteriano en los desórdenes del tracto urinario, sino que la mejoría en esta patología puede estar dada por el fuerte arrastre mecánico que provoca el potente efecto diurético comprobado para el extracto.

Los estudios de toxicidad aguda en ratas realizados al extracto acuoso permiten sugerir la seguridad de su uso, sin riesgos, permitiendo establecer sus límites terapéuticos (dosis límite mayor a 2000 mg/kg de peso).

Los estudios de genotoxicidad ayudan a establecer la inocuidad del extracto aún en altas concentraciones, así como establecer que el extracto acuoso de las hojas de *Boldoa purpurascens*, Cav no resultó genotóxico en ninguna de las dosis evaluadas (50; 100; 150; 300 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por no provocar daños clastogénicos bajo las condiciones del experimento.

El trabajo realizado enmarca resultados orientados a lograr la introducción de drogas vegetales con eficacia, calidad y seguridad comprobada, que contribuyan a resolver los problemas de salud de la gran cantidad de países subdesarrollados. La carencia de medicamentos y los elevados costos de los mismos en los países del tercer mundo han logrado que la Organización Mundial de la Salud (OMS) incentive las investigaciones en plantas medicinales con vistas a resolver los problemas de salud que allí se presentan.

Desde el punto de vista científico este trabajo avala los métodos de separación de los compuestos fenólicos, esencialmente los flavonoides, del extracto acuoso de esta especie, que se informan por primera vez en este trabajo. Se aíslan y caracterizan tres compuestos de este tipo nunca antes conocidos y se realizan estudios farmacológicos a dos de los compuesto aislados del extracto acuoso lo que complementó la atribución de la acción diurética a este tipo de compuesto.

Todos estos resultados contribuyen a ampliar el conocimiento de la acción farmacológica y de la composición química para el extracto acuoso de las hojas *Boldoa purpurascens*, Cav, en particular de los flavonoides que contiene, además de abrir nuevas perspectivas para la industria farmacéutica, constituyendo resultados de absoluta novedad científica.

Por otra parte, desde el punto de vista social los estudios mostrados en el trabajo avalan con rigor científico el uso de la totalidad de los resultados en farmacopeas de plantas medicinales.

CONCLUSIONES

1. Se demuestra experimentalmente que un extracto acuoso al 5 % a partir de las hojas de *Boldoa purpurascens*, Cav tiene efecto diurético, no tiene efecto antimicrobiano y no presenta toxicidad.
2. Por medio del estudio farmacognóstico realizado a las hojas de *Boldoa purpurascens*, Cav se pudieron establecer las especificaciones de calidad que permiten la normalización de las hojas de esta especie vegetal como droga cruda, de acuerdo con los requisitos establecidos por la OMS y las normas cubanas para drogas vegetales.
3. El método de extracción líquido-líquido con el empleo de los disolventes agua- n-butanol es el idóneo para la separación de los flavonoides presentes en el extracto acuoso de esta especie. Se aislaron y caracterizaron los compuestos siguientes:
 - 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxiflavona-3-O- α -L- ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2) - α -L-arabinopiranosida.
 - 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxiflavona-3-O- β -D-xilopiranosida.
 - 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxiflavona-3-O- α -L- ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosida.

.- 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxiflavona-3-O- β -D- glucopiranosida.(Compuesto patentado en 1988).

4. El contenido de 0,9 % de iones potasio encontrados en el extracto acuoso y la presencia de los compuestos 1 y 2 contribuyen al efecto diurético encontrado para dicho extracto.

RECOMENDACIONES

1. Continuar los estudios de purificación y caracterización de otros compuestos presentes en el extracto acuoso de las hojas de *Boldoa purpurascens* que puedan contribuir al efecto diurético.
2. Completar los estudios toxicológicos y tecnológicos del extracto acuoso a partir de las hojas de *Boldoa purpurascens*, Cav con la finalidad de su posible uso como medicamento de origen natural.

1. Abril, J. Evaluación mutagénica en bacterias: el ara de mutaciones directas. Mut-Res 1984; (3):281-309
2. Agre P, Mackinnon R. Canales moleculares a través de las paredes de la célula. Premio Nobel de Química. Real Academia Sueca de las Ciencias. 2003. Información al público octubre 8, 2003.
3. Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M. Molecular Biology of the cell. Garland Publishing. New York: Academic Press; 1989.
4. Anderson D, Dobrzyńska MM, Jackson LI, Yu TW, Brinkworth MH. Somatic and germ cell effects in rats and mice after treatment with 1,3-butadieno and its metabolites 1,2-epoxybutene and 1,2,3,3-diepoxibutano. Mut-Res 1997; 391(3):101-109.
5. Arima H, Danno G. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L) and their structural elucidation. Biosci Biotechnol Biochem 2002; 66 (8): 1727-30.
6. Aron C, Sorg R, Zimmer D. The mouse bone marrow micronucleus test. Evaluation of 21 drug candidates. Mut Res 1989; 223, 129-140.
7. Ashby J, Tinwell H, Callender RD, Kimber I, Clay P, Galloway SM et.al. Thalidomide: lack of mutagenesis activity across phyla and genetic endpoints. Mut-Res 1997; 396(1-2):45-64.
8. Asita A, Hayashi M, Suzuki. Micronucleated reticulocyte induction by ethylating agents in mice. Mut-Res 1992; 271: 29-37.

9. Ateche A, Vanaclocha B, Guenechea J L. Editores. Fitoterapia, Vademécum de prescripción de plantas medicinales. 4ta . Barcelona: Masson; 2003.
10. Ateche A, Vanaclocha B, Guenechea J L. Editores. Fitoterapia, Vademécum de prescripción de plantas medicinales. 3ra . Barcelona: Masson; 1998.
11. Bathia V, Gupta SR, Sheshadri T R .Glycosides flavonoids of tamarind leaves. *Phytochemistry* 1966; 5(1): 177-81.
12. Bernardini S, Hirvonen A, Pelin K, Norppa H. Induction of sister chromatid exchange by 1, 2-epoxy-3-butene in cultured human lymphocytes: Influence of GCTT1 genotype. *Carcinogenesis* 1998; 19 (2): 377-80.
13. Bojase G, Majinda R, Wanjala C. Antimicrobial flavonoids from *Bolusanthus speciosus*. *Planta Médica* 2002; 68(7): 615-620.
14. Bolognesi C, Merlo F, Rabboni R, Valerio F, Abbondandolo A. Cytogenetic biomonitoring in traffic police workers micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 1997; 30(4): 396-402.
15. Borrelli F, Ascione V, Capasso R, Izzo AA, Capasso F, Petrucci F, Valente R, Fattorusso E, Tagliamonte Scafati O. Rotenoids from *Boerhaavia diffusa*. *Anticancer Res.* 1995; 14(2 A): 501-61.
16. Brandi M. Flavonoids: Biochemical effects and therapeutic applications. *Bone Mineral.* 1992; 19: 53-514.
17. British Pharmacopeia . 6th. London: Her Majesty's Stationery office; 2004.
18. Cáceres A. Diuretic activity of plants used for the treatments of urinary ailments of Guatemala. *J Ethnopharmacol.* 1987 b; 19(3): 233-245.

19. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Universitaria. Guatemala Universidad San Carlos de Guatemala; 1999.
20. Cancino L, Fonseca G, Remigio A, Salamone I, Alvarez X, Palacios M. Introducción de micronúcleos por ciclofosfamida en médula ósea de ratón en 5 líneas diferentes: Balb/c, DBA/2, OF1, NMR1 y C57 BL/s. C. Programa V Congreso. La Habana; 1993.
21. Carvajal A, Casaco R, González B. Actividad diurética e hipotensora de cuatro especies de plantas con reportes en medicina popular. Revista Cenic 1996; 17 (1-2): 34-36.
22. CETESB. Mutación genética reversa en Salmonella typhimurium. Ensayo de AMES;1993.
23. Chan P, Wallae Ho A F. Acute toxicity and eye irritancy. En: Raven press. Principles and methods of toxicology. Tercera. New York;1994.
24. Chandan BK, Col. Boerhaavia difusa: a study of its hepatoprotective activity. J. Ethnopharmacol 1991; 31(3): 229-307.
25. Chang WS, Chang YH, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. J. Ethnopharmacol 1999; 59(3): 307-9.
26. Cimanga K, Hisham G. Isolation of active compounds from the leaves of Morinda morindoides. Phytochemistry 1998; 38:1301
27. Claus E P. Farmacognosia. Segunda edición. Ciudad de la Habana: Edición Revolucionaria; Editorial Ciencia y Técnica 1985: 1, 2, 28, 110,118.

28. Cody V. Plant flavonoids: Pharmacological and Structure Activity Relationships
In: The Flavonoids-Advances in Research, Harbone, J B (Ed) Chapman and Hall. London: 1982.
29. CSGMT. Guidelines for testing of chemicals: Protocol recommended by the CSGMT JEMS. MMS. for the short term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis* 1995; 10(3): 153-59.
30. Cuéllar C A. Química de los fármacos naturales. Revolucionaria. La Habana: Pueblo y Educación; 1983.
31. Cuyckens F, Caléis M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom* 2004; 39: 1-15.
32. Discher AC. Química inorgánica farmacéutica. Masson. España: Alhambra, C. A; 1996.
33. Flórez J, Armijo J. Fármacos diuréticos. En: Flórez J. Farmacología Humana. Edición Científico Técnica S.A. España: Masson Salvat; 2003. p. 835-849
34. Fukait, Míshurova E, Kaiton K, Kanda T , Terada Normira T. Antimicrobial activity of licorice flavonoids again st methicilin-resistant Staphylococcus aureus. *Fitoterapia* 2002; 273 (6): 536-539.
35. Gómez F. Clasificación de los diuréticos: de lo anatómico a lo funcional. *JANO*1997; 62 (1416): 43 - 48
36. González B, Carvajal D. Actividad diurética e hipotensora de 4 especies de plantas con reporte en Medicina Tradicional. *Revista Cenic* 1986; 17: 34-36.

37. González DM, Cuéllar A, Martínez Y. Evaluación farmacognóstica y estudio fitoquímico preliminar de *Boldoa purpurascens*, Cav. Revista Cubana de Farmacia 2001;.Suplemento especial: 114-117.
38. Goodman G. Las bases farmacológicas de la terapéutica. S.A de C.V. México: Interamericana; 1996.
39. Graf V, Alonso A, Castro R, Díaz F. Genetic mutations. Food chem.-toxic 1999; 32: 320-30
40. Gravue J, Abramsson Z, Ericsson L. The relation between DNA content in micronucleated mouse bone marrow erythrocytes. Mut Res 1994; 9(1): 31- 38.
41. Griev. Plantas medicinales con acción diurética. Abstract [en línea]2000 jun 7 [17 febrero 2002]; 34.URL disponible en [http:// WWW.plantas_medicinales.org/abstract/ 2000](http://WWW.plantas_medicinales.org/abstract/2000)
42. Gutiérrez S, Carbonell E, Galofre P, Creus A, Marcos R. Application of the single cell gel electrophoresis (SCGE) assay to the detection of DNA damage by 131I treatment in hyperthyroidism patients. Mut Res 1998; 13 (1): 95-98.
43. Gutiérrez S, Carbonell E, Galofre P, Creus A, Marcos R. The alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) assay applied to the analysis of radiation-induced DNA damage in thyroid cancer patients treated with 131 I. Mut-Res 1998 b; 413: 111-19.
44. Guyton A. Tratado de Fisiología Médica. 7ma. La Habana: Científico Técnica; 1986.
45. Harbone JB, Williams C. The flavonoids-Advances in Research. Chapman and Hall. London: Academic Press; 1982.

46. Harbone JB. Plants flavonoids in biology and medicinal properties. Alan R. New York : Springer; 1988.
47. Harnischfeger G. Postharvesting technologies and procedures in the comercial production of medicinal and aromatic plants. En: Apuntes del Training Course on Quality Control and Standarization of Herbal Medicinal Products. Panamá, 2002.
48. Hartman A, Herkormmer K, Glück M, Speit G. DNA-damaging effects of cyclophosphamide on human blood cells in vivo and in vitro studied with the single-cell gel test (Comet Assay). *Enviroment Mol Mutagen* 1995; 25: 180-187.
49. Hayashi M, Genotoxicity: Guidance on specific aspect of regulatory genotoxicity test for pharmaceuticals on Internacional Conference on Harmonisation of Technical Requirement for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). 18 : Abril de 1995;Tokyo.
50. Hayashi M, Tice R, Mac Gregor J, Romagna F, Pacchierotti F. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mut Res* 1994; 312: 293-304.
51. Hayatsu, A S, Negishi T. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mut Res* 1998; 202(2): 429-46.
52. Heddle J, Bouch A, Khan M. Concurrent detection of gene mutation and chromosomal induced aberrations in vivo in somatic cells. *Mut Res* 1990; 5(2): 179-184.
53. Heddle J, Hite M, Salamone M. The induction of micronuclei, a measure of genotoxicity. *Mut Res* 1983; 123: 61-118.

54. Hiroshi K, Hiroshi I; OTA ISAN KK. Novel flavonoid and glicoside thereof. Tokkyo Koho, JP63203682 A2. 1988, august 23.
55. Hober G E, Meir, Sticher O. Quantitative High Performance. Liquid. Chromatographic Analysis of casticin in the fruits of vitex agnus-castus. Pharmaceutical Biology 2001; 39(1): 14-15.
56. Hoffmann G. Cap 9: toxicology: The Basis Science of Poisons. Cassaret and Doull's. Genetic Toxicology. 5th Edition. London: 1996. p. 269-300.
57. Holmstrom M. Indution of micronuclei in bone marrow of mice exposed to 1,2, or 3 daily doses of urethane. Mut. Res. 1990; 234: 147-154.
58. ICH.(International Conference of Harmonization) Document 3A Q22a; ICH Harmonized tripartite "Guideline of herbal remedies" 2002 (a).
59. J, Cimino M, Hayashi M, Vapiparys P, Mac Gregor J. Micronucleus test: index of cytogenetic damage. Past, present and future. Environ Mol. Mutagen 1991; 18: 277-291.
60. Jourenkova W. Cancer epidemiol Biomarkers. Prev. 1998; 7 (1): 19-23.
61. Khan M, Hill R, Van-Dyk J. Partial volume rat lung irradiation: an evaluation of early DNA damage. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys 1998; 40(2): 467-76.
62. Khan M, Omoloso A. Antibacterial activity of Galeola foliata. Fitoterapia 2004; 75 (5): 494-496.
63. Krishna J, Petrte J, Anderson J. and Thesis, J. Use of cyclophosphamide as a positive control in dominant lethal and micronucleus assay. Mut Res 1995; 335: 331-337.

64. Kuma Zawa T, Kimura T, Matsuba S, Sato S, Onodea J. Synthesis of 8C glucosylflavones. *Carbohydrate Research* 2001; 334: 183-193.
65. Lami N, Kadota S, Kikuchi T, Momose Y. Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* L. Identification of Ca²⁺ channel antagonist compound from the methanol extract. *Chem Pharma Bull* 1991; 39(6):1551-5.
66. León A. Flora de Cuba. Contribuciones ocasionales del Museo de Historia Natural del Colegio La Salle. 2da. España: Masson; 1957.
67. León O, Toxicidad y mortalidad a corto plazo por extractos acuosos de la inflorescencia del cordobán (*phreodiscos*). *Rev Cub de Plantas Medicinales* 1991; 3(23): 345-347
68. Liu K, Ku Y, Wen K, Ho L, Chang Y. Analysis of flavonoids and coumarins in *Ixeris laevigata* var. *Oldhami* by HPLC. *J. of Liquid Chromatography and Related Technologies* 2002; 23 (16): 2573-2584.
69. Liv Z, Wang L, Li W, Huang Y, Xu ZC. Determination of orientimin and vitexin in *Trollius chinensis* preparation by HPLC. *Zhongguo Zhong yao ZaZhi* 2004; 29 (11): 1049-1051
70. Lock de Ugas O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de Productos Naturales. Asociación de Publicaciones Educativas. Universidad Católica del Perú; 1998.
71. Loomis T. Fundamentos de toxicología. Tercera. España: Editorial Acrabia Zaragoza; 1992; 224-229.

72. Lovell D, Albanase R, Anderson D, Amphet G. Chapter 7. Statistical of in vivo cytogenetic assays statistical. Evaluation of mutagenicity test data. Estados Unidos: Ed. Kirkland Cambridge, University Press; 1989.p.184-232.
73. Mabry J, Markhan k, Thomas M. The systematic identification of flavonoids. Springer. New York : Harbone J B; 1970.
74. Mac Gregor J, Heddle J, Salamone M, Tice R. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. Mut Res 1987; 189: 103-112.
75. Mandalari G, Bennet RN, Saija A, Waldron KW. Characterization of flavonoids and pectins from bergamot (Citrus bergamia Risso) peel, a major byproduct of essential oil extraction. J Agric Food Chem 2006; 54 (1): 197-203.
76. Markham K. Flavones, Flavonols and their glycosides. Inc: Methods in plant Biochemistry. Academic Press ; London 1989; 1:197-235.
77. Markham K. Techniques of favonols identification. Academic Press ; London: Chapman and Hall; 1982.
78. Markhan K, Wilson R. Flavones, flavonols and their glycosides. Phytochemistry 1988; 20:197-231.
79. Marzin D. The position of the in Vitro micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guidelines. Mut Res 1997; 692 (1-2): 175-81.
80. Marzin M. Biological testing of materials and medical devices. Genotoxicity. Springer. London. Lucca; 1991.

- a. materials Geneva, Suiza, 1998.
81. Matter B, Grauwiler J. Micronuclei in bone marrow cells. A simple in vivo model for the evaluation of drug induced chromosomal aberrations. *Mut Res* 1997; 23: 239-249.
82. Mavourin K, Cimono N, Salamone M, Heddle J. The in vivo micronucleus assays in mammalian bone marrow and peripheral blood. *Mut Res* 1990; 239:29-80.
83. Mc George L. Ames . Salmonella mutagenicity assay protocol. coriel institute for Medical Research Office of Science and Research, departament of environment protection. New Jersey:Trenton; 1986.
84. Miranda M, Cuéllar A. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Cuba: Universidad de La Habana. Habana: Pueblo y Educación; 2000.
85. Nakayama T. Suppression of hidroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. *Cancer Research* 1994; 54(7):199 1s-3s.
86. Narwal S, Balasubrahmanyam A, Sadhna P, Kapoor H, Lodha ML. A systemic resistance inducing antiviral protein with N-glycosidase activity from *Bougainvillea xbuttiana* leaves; *Cancer Research* 2002 ; 62(15): 985-95
87. Naval MV, Gómez-Serranillo MP, Carretero M.E y Villar A.M. Ginseng. *Rev de Fitoterapia* 2002; 2(2): 123-138.

88. Niassy B, Um B, Lobstein A, Weniger B, Koné M, Antos R. Studies on chemical constituents from the root of *Mirabilis jalapa*. *Chimie* 2004; 7(12): 993-996.
89. NRSP 309. Norma Ramal. Medicamentos de origen vegetal: Droga Cruda. Métodos de ensayo. La Habana. Cuba: MINSAP; 1992.
90. NRSP 310. Norma Ramal. Medicamentos de origen vegetal: Droga cruda. Especificaciones Generales. La Habana. Cuba: Ministerio de Salud Pública (MINSAP); 1992.
91. NRSP. Norma Ramal. Medicamentos de origen vegetal. Tinturas y extractos fluidos. Procesos tecnológicos. La Habana: MINSAP; 1992.
92. OECD. Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo. Guidelines for testing of chemical; 1996.
93. OMS. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Ginebra. 2003: 23-25.
94. Organization Economic for Cooperation and Development. (OECD). Acute Oral Toxicity. Guidelines for testing of chemical 1996; No. 401.
95. Orizaga J, Blengio J R, Garst A. Tratado de Medicina Interna de Cecil. Décimo Quinta. La Habana: Pueblo y Educación; 1994.
96. Parejo J, Jáuregui O, Sánchez-Rabaneda F. Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography-negative. Electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J, Agric. Food Chem* 2004; 52: 3679-3687.

97. Paton JW, Hoffmann WP, Garriot M. Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system. *Mut Res* 1996; 370:65-73.
98. Pereira CA, Yariwake JA, Laucas FM, Wauters. JN, Tits M, Angenot. L. HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. *Phytochemistry* 2004; 15 (4) : 241-248.
99. Petsalo A, Jalonen J, Tolonen A. Identification of flavonoids of *Rhodiola rosea* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2005; 16 (5): 342-350.
100. Prasad D. A new aromatic glycoside from the roots of *Prunus armeniaca*. *Fitoterapia* 1999; 70: 266-268.
101. Prasch E, Bühlmann P, Affolter, C. Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data. 3^{ra} Completely Revised and Enlarged English. Springer-Verlag, Berlin; 2000.
102. Ramsay LE. Metabolic effects of diuretics. *Cardiology*; 1994; 84 (supl 2): 48-56.
103. Ritz E, Pathophysiology and treatment of hypertension and edema due to renal failure. *Cardiology* 1994; 84 (supl 2): 143-154.
104. Rodríguez H. Las plantas medicinales en Costa Rica. Primera. Costa Rica: Editorial Universidad Nacional; 2001.
105. Roig Mesa JT. Diccionario Botánico de Nombres Vulgares Cubanos. Tercera. La Habana: Científico Técnico; 1984.

106. Roig Mesa JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Cuarta. Científico Técnica. 1988.
107. Romani A, Vignolini P, Isolani L, Heimler D. HPLC-DAD/MS characterization of flavonoids and hydroxycinnamic derivatives in turnip tops (*Brassica rapa* L). *J Agric Food Chem* 2006; 54 (4): 1342-1346.
108. Sahu SC, Gray GC. Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin isolated rat liver nuclei. *J Ethnopharmacol* 1997; 39(6):1551-5
109. Sakusihima.A, Nishibi S. Saponins from *Pisonia umbellifera*. *Phytochemistry* 1998; 43(1): 189-194.
110. Salamone M, Mavournin K. Bone marrow micronucleus assay. A review of the mouse stock used. *Environ. Mol. Mutagen* 1994; 23 (4): 239-273.
111. Salamone M, Mavournin K. Mouse strains and the bone marrow micronucleus assay: a look at the literature. ABSTRACT 224.EMS Abstract. *Environ. Mol. Mutagen* 1991; 17(19): 63- 68.
112. Sánchez L A. Estudio citotóxico, genotóxico y anogenotóxico de extracto acuoso de la especie *Phyllanthus orbicularis* [Tesis de doctorado]; 1999, Universidad de la Habana
113. Sánchez-Rabaneda F, Jáuregui O, Casals I. Liquid Chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J. Mass Spectrom* 2003; 38: 34-48.

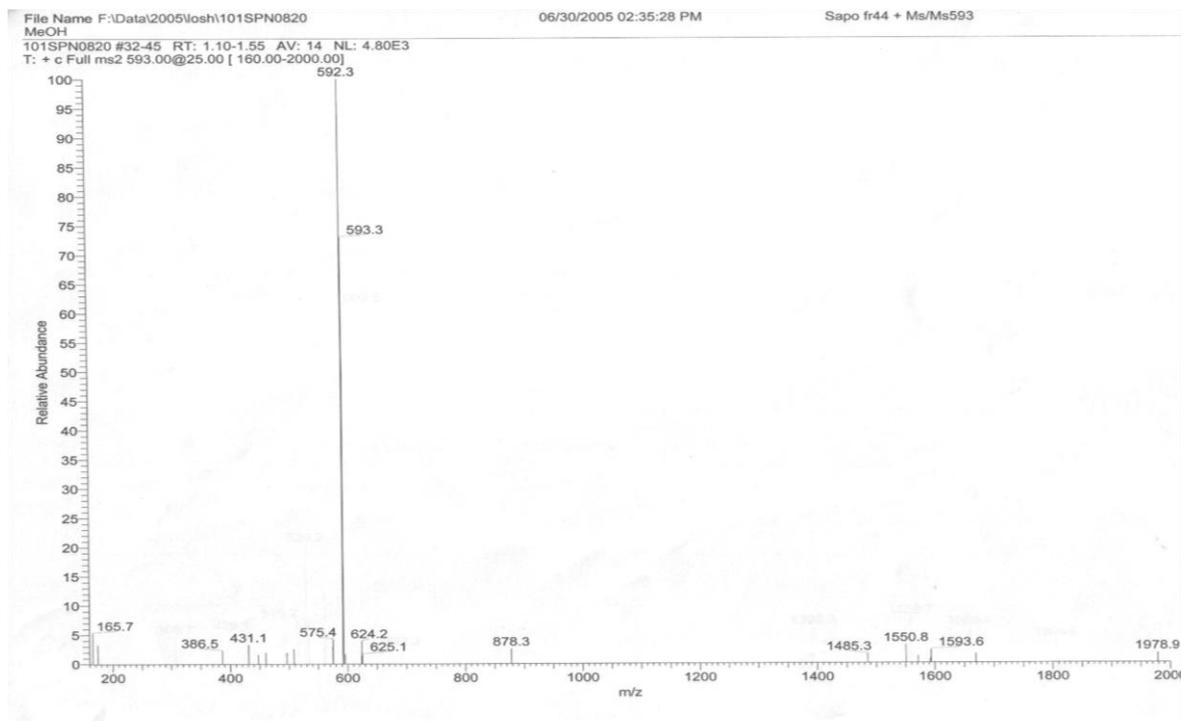
114. Schimid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. Principles and methods for their detection. Academic Press. New York; 1976.
115. Schneider B, Wurgler F, Romagna F. Distic area distribution difference of micronuclei induced by clastogenic and aneuploidogenic chemicals in the bone marrow of the CD1 mouse. *Mut Res* 1995; 334: 81-89.
116. Secades, M, De la Osa I, Gutierrez C, Fuentes V. Tamizje de extractos de plantas medicinales sobre bacterias aisladas en urocultivos humanos. *Rev Cub de Plantas Medicinales* 1987; 7: 106-110
117. Sharapin. Fundamentos de Tecnología de productos fitoterapéuticos. Santa Fé de Bogotá Colombia: Convenio Andrés Bello y Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos (RIPROFITO) del Subprograma X de CYTED; 2000.
118. Sheider G, Sien H. Die lipophilen Flavonen in Folic. Orthosiphones. *Deutschwes Apothehisil Zeitung. Curr Sci* 1973; 113, 201-202,
119. Shi ST, Wang ZY, Smith TJ, Hong JY, Chen WF, Yang CS. Effects of green tea and black tea on 4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone bioactivation, DNA methylation, and lung tumorigenesis in A/J mice. *Cancer. Res.* 1994; 54(17): 464-477
120. Shrivastava N, Padhya MA. Punarnavine profile in the regenerated roots of *Boerhaavia diffusa* L. from leaf segments. *Curr Sci* 1995; 68(6): 653-656.
121. Shulten H. In *Manual Proceeding of thePhytochemical Society of Europe.* Clanrendon Press. Orford;1985; 25: 75-97.

122. Skaltsa H, T Zakou O, Singh M. Polyphenols of *Ocimum sanctum* from Suriname. *Pharmaceutical Biology* 1999; 37 (1): 5-10.
123. Socorro T. Evaluación genotóxica de la vacuna VA-MENGOC-BC. [Tesis doctoral]. La Habana: Ciencia y Técnica; 1999.
124. Souza Brito ARM, Robineau LG, Bighetti BJE, Gracioso JS, Hiruma-Lima CA. Antinociceptive effect of *Boerhaavia difusa* L. (Nyctaginaceae) in mice. *J Ethnopharmacol.* 1999; 43 (15): 112-115
125. Speit G, Hanelt S, Helbi. R, Seidel A, Hartmann. A. Detection of DNA effects in human cells with the Comet assay and their relevance for mutagenesis. *Toxicology Letters* 1996; 88: 91-98.
126. Stadler R, Turesky R, Muller O, Markovic J, Leong-Morgenthaler P. The inhibitions effects of coffe on radical-mediated oxidation and mutagenicity. *Mut Res* 1994; 16(308): 177-190.
127. Stintzing FC, Kammerer D, Schieber A, Adama H, Nacoulma OG, Carle R. Betacyanins and phenolic compounds from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhavia erecta* L. *Phytochemistry* 1998; 14(2A): 501-6
128. Stoner GD, Mukhtar H. Poliphenols as cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis* 1995; 15(9): 2065-2068.
129. Sudjaroen Y, Haubner R, Bartsch II, Owen RW. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from *Tamarindus indica* L. Seeds and pericarp. *Food Chem Toxicol* 2005 ; 43(11): 1673-1682.

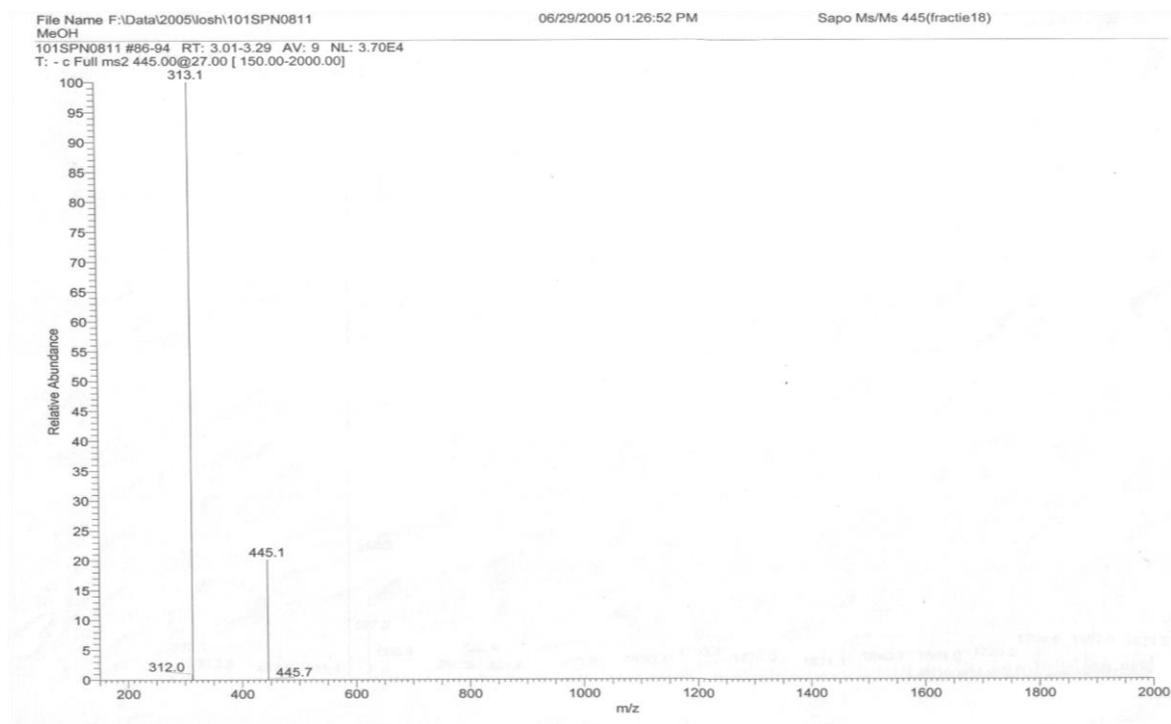
130. Svedstrom U, Vuorela H, Hiltunen R. Fractionation of polyphenols in hawtorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to HPLC analysis. *J Chromatograf.* 2006; 17: 65-73
131. Sycheva LP, Zhukov VS. Use of micronucleus test for screening mutagens and carcinogens. *Vestn-Ross-Akad-Med-Nauk* 1997; (7): 14-18.
132. Te C, Gentile JM, Baguley BC, Pearson AE, Gregory T, Ferguson LR. In vivo effects of chlorophyllin on the antitumour agent cyclophosphamide. *Int. J. Cancer.* 1997; 70 (1): 84-89.
133. Toebes AH, De Boer V, Verkieij JA, Lingeman H, Ernst WH. Extraction of isoflavone malonylglucosides from *Trifolium pratense* L. *J Agric Food Chem* 2005; 53(12): 4660-4666.
134. USP.XXIV The United States. Pharmacopeia. The National Formulary. United States: Pharmacopeial Convention; 2000: 546-567
135. Van Hoff, Huange E. Bioassay guide isolation of antivirally active phenolglucosides from the leaves of the poplar tree Cultivar beaupre. *J Natural Product* 1989; 52: 872- 878.
136. Vande Castele K; Geiger H and Van Sumere C. Characterization of flavonoids .*J Chromatograf* 1998; 240: 81-94
137. Vogel H.G. and Vogel W, *Drug Discovery and pharmacological evaluation.* Springer. London. Verlag; 1997.
138. Voirin B, Jay M, Gonnet J. Techniques of identification of flavonoids *Phytochemistry.*1970; 4: 1605-1624.

139. Vogel M. Introducción a la Genética Toxicológica. Goowdwin T. Suecia: W Estocolmo;1994.
140. William Evans. Trease and Evans. Pharmacognosy. Edición 15. London: Saunders. 2002.
141. World Health Organization. General Guidelines for methodologies and Research and Evaluation of Tradicional Medicine. WHO/EDM/TRM/2000.1. Geneva, Suiza, 2000a.
142. World Health Organization. Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. Geneva , Suiza, 2004:14.
143. World Health Organization. Quality Control Methods for Medicinal plant

Anexos

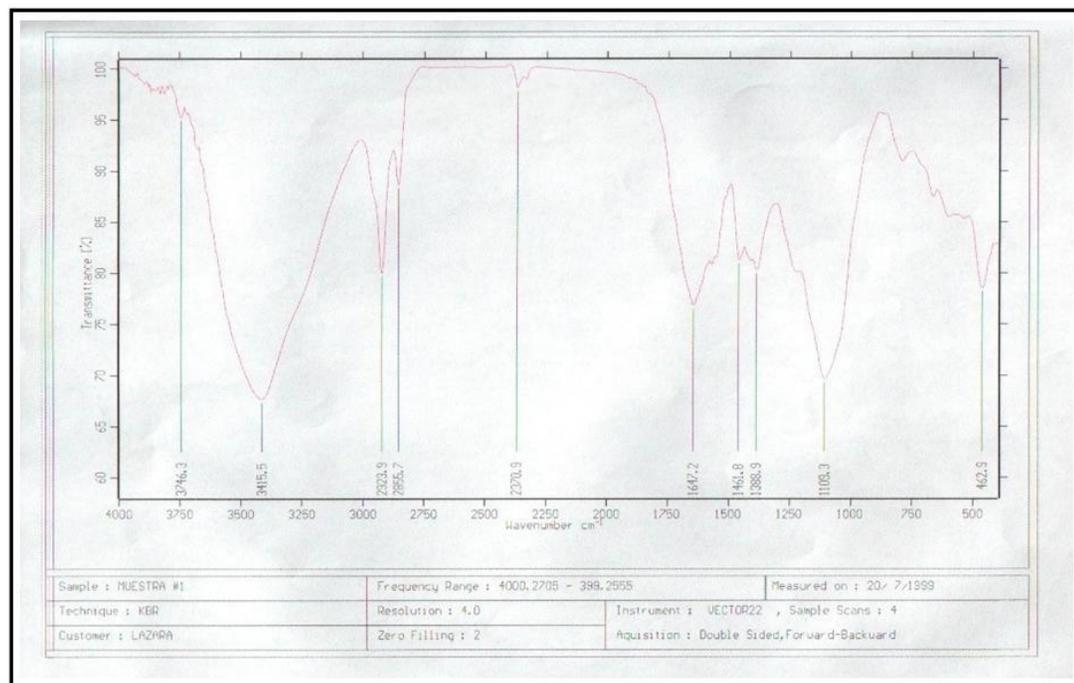


Anexo A. Espectro de masa del compuesto 1



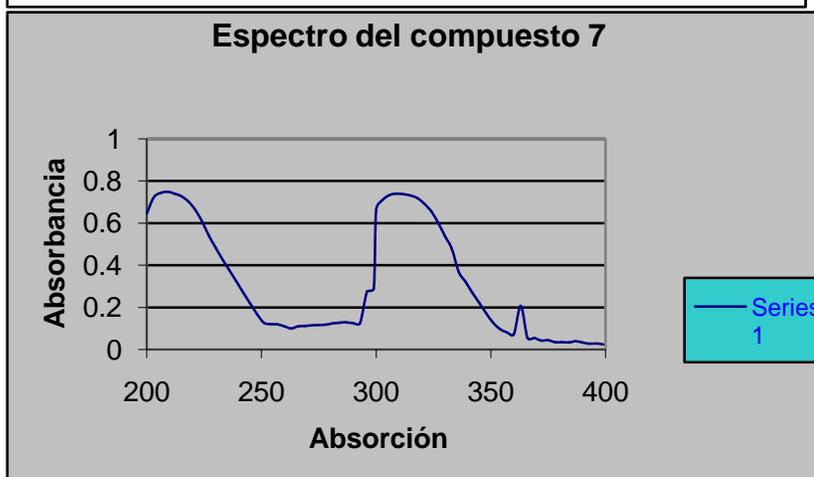
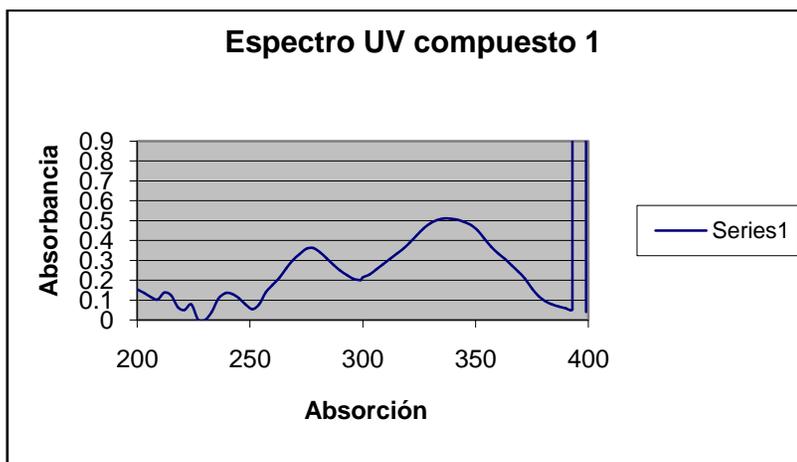
Anexo B. Espectro de masa compuesto 2

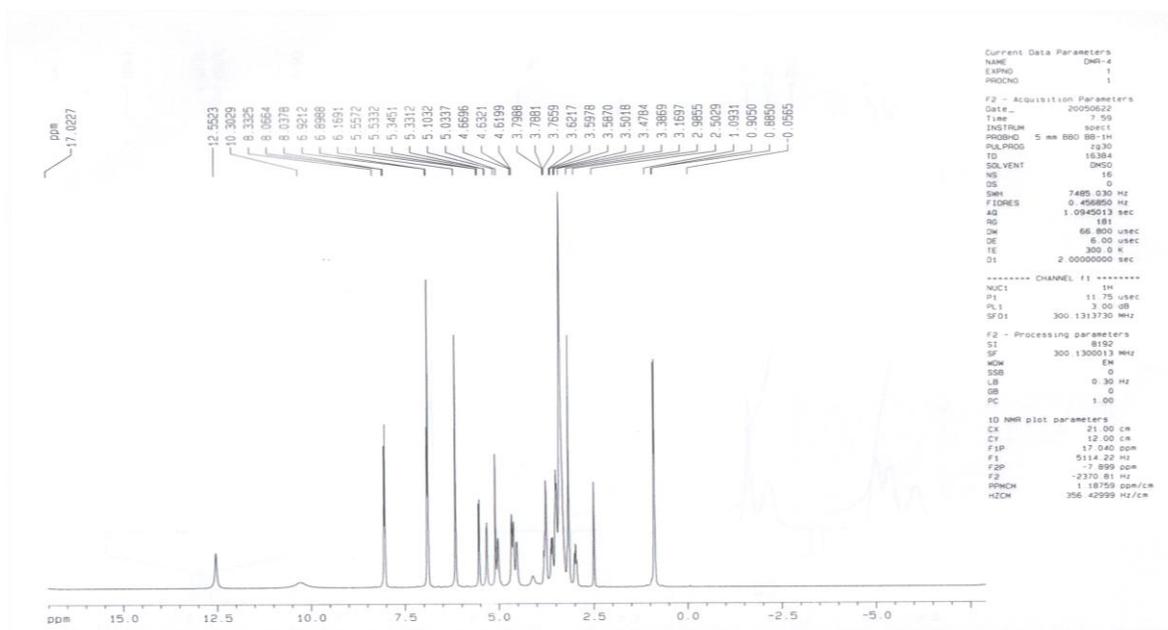
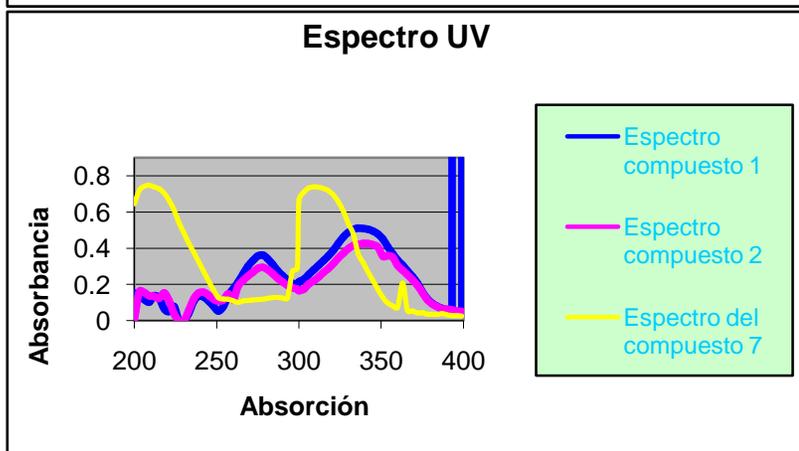
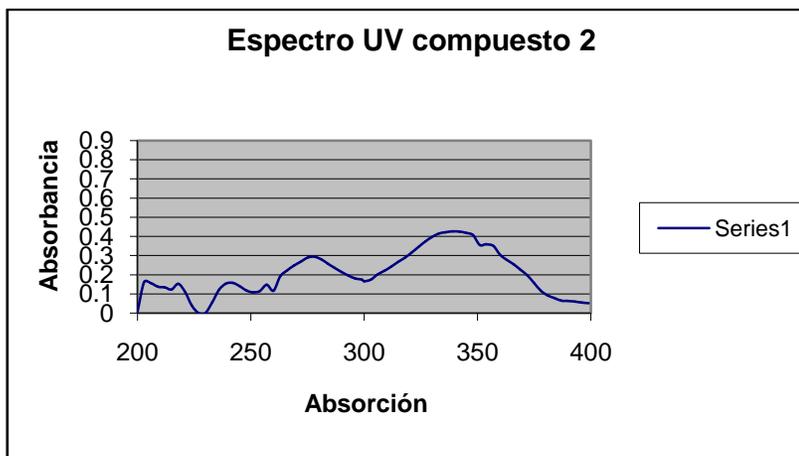
ANEXO 1. Espectro IR de la fracción I obtenida por CCD preparativa



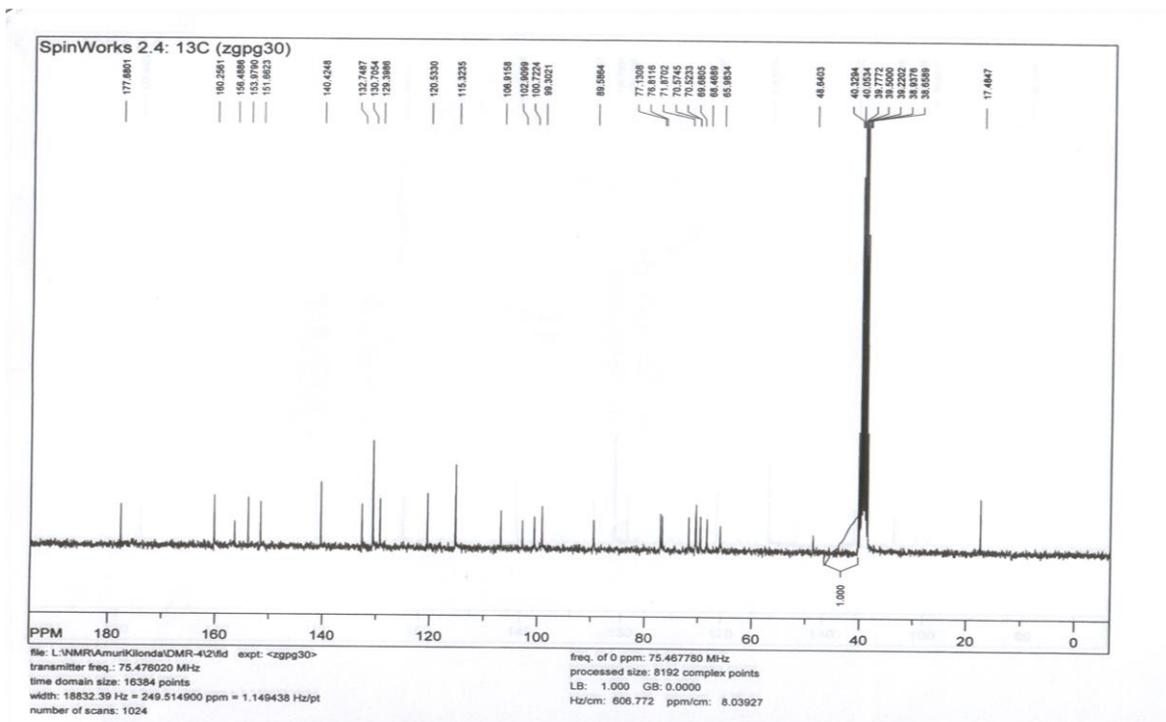
Espectro IR Fracción I

Anexo 2. Espectros UV/Visible de los flavonoides aislados del extracto acuoso de las hojas de *Boldoa purpurascens*

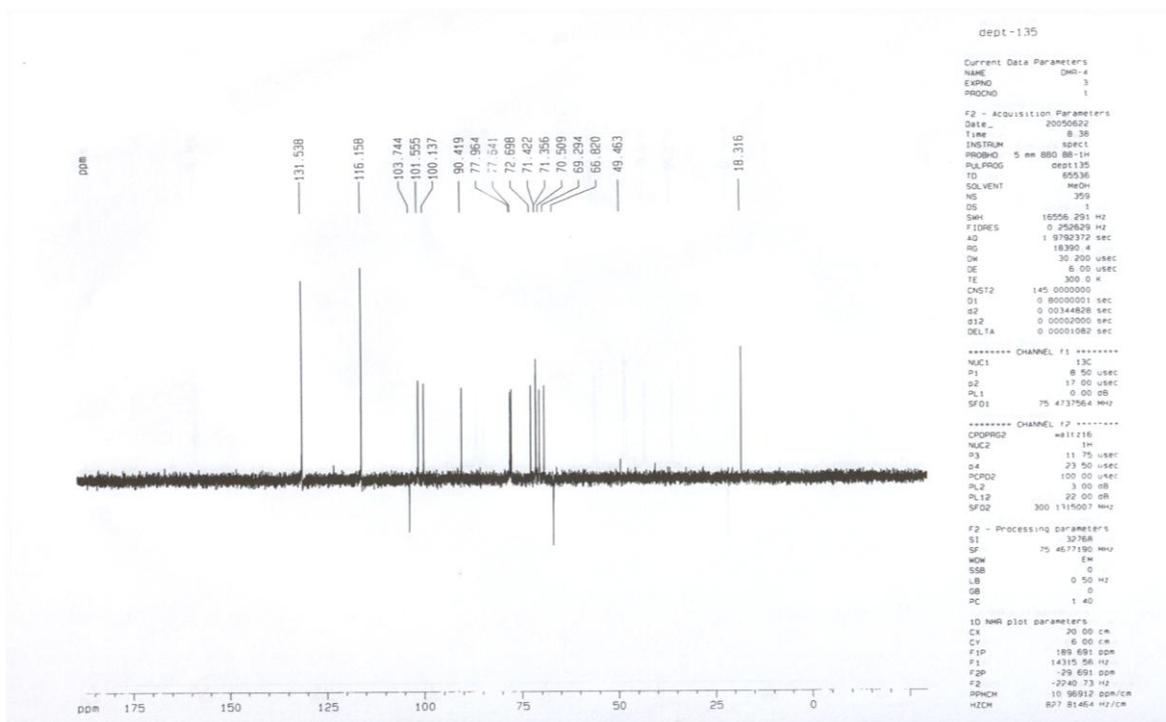




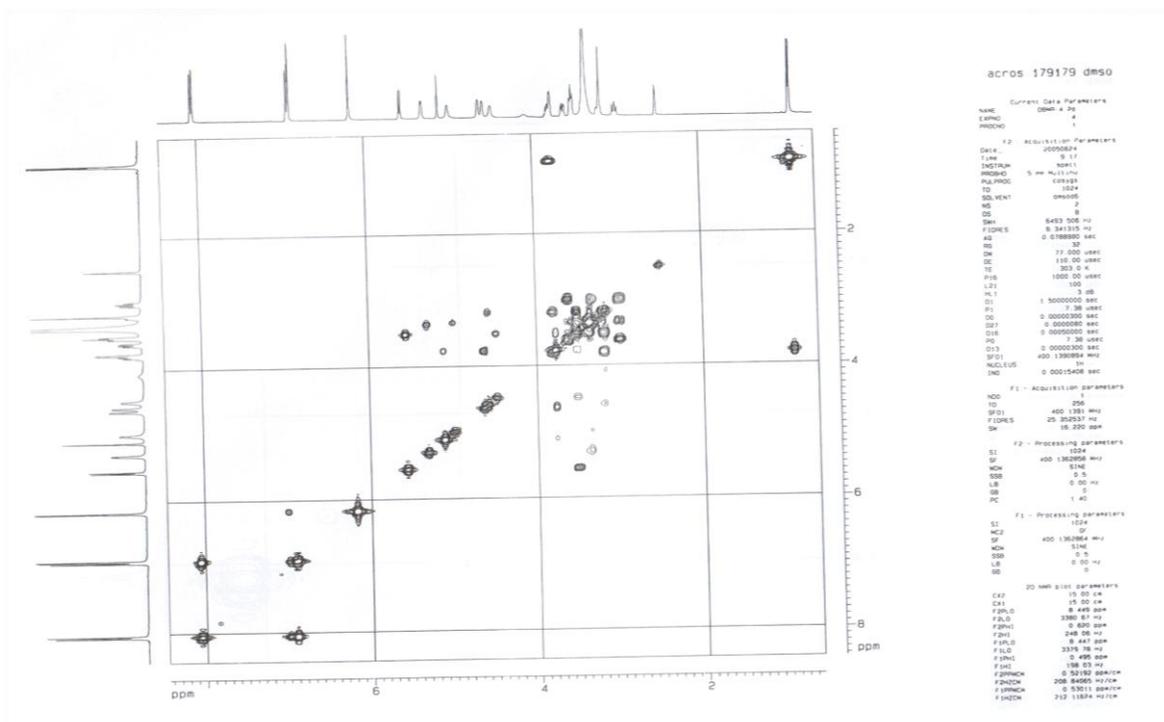
Anexo 3. Espectro protónico del compuesto 1.



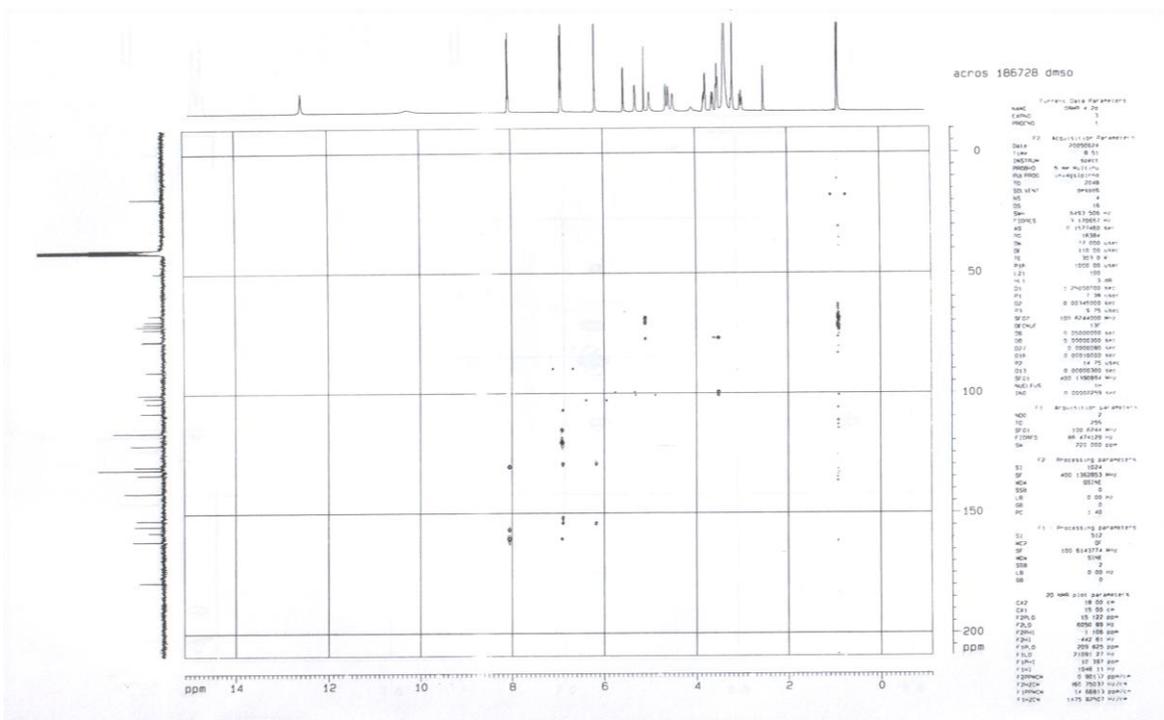
Anexo 4. Espectro de carbono 13 del compuesto 1.



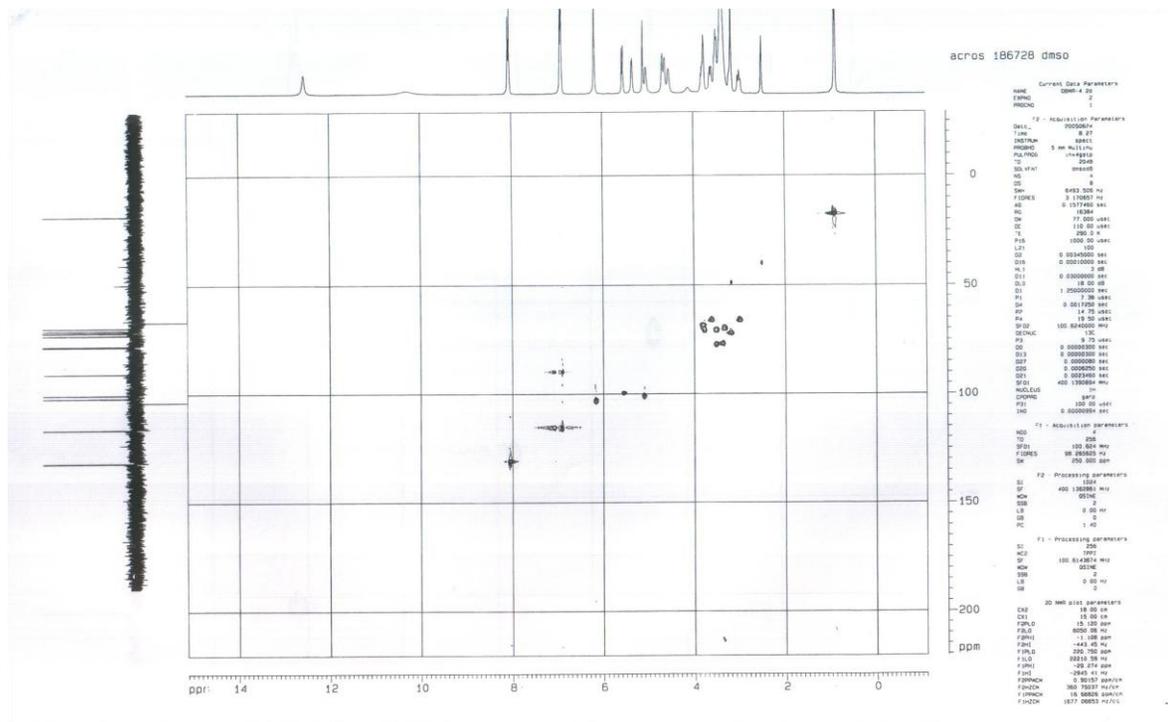
Anexo 5. Espectro de carbono 13 (DEPT) del compuesto 1



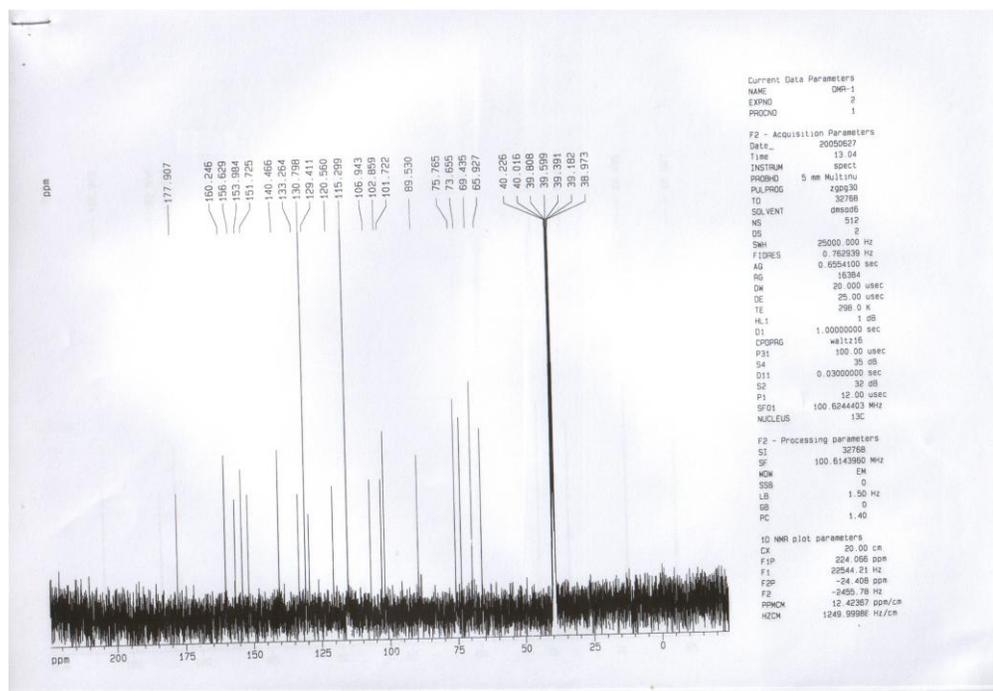
Anexo 6. Espectro H-H COSY del compuesto 1.



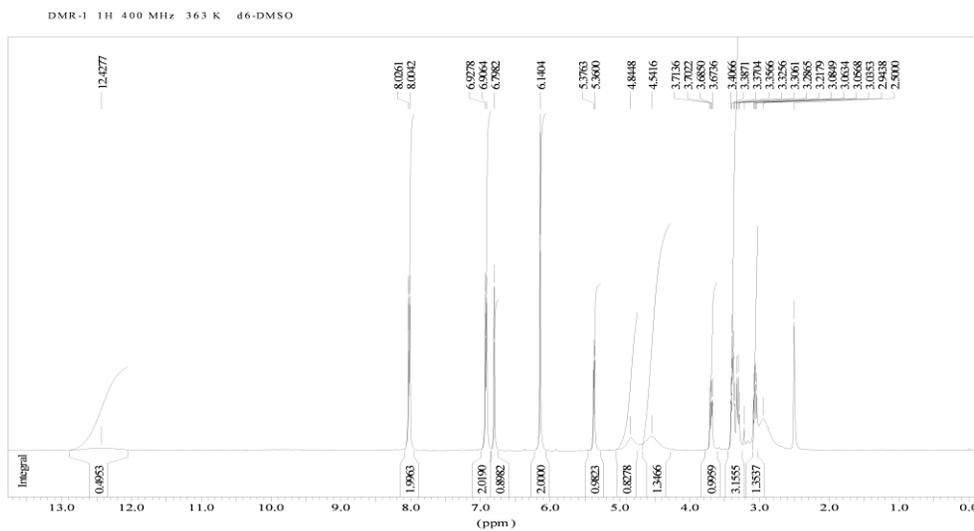
Anexo 7. Espectro H-C COSY (HMBC) del compuesto 1.



Anexo 8. Espectro H-C COSY (HMBC) del compuesto 1.

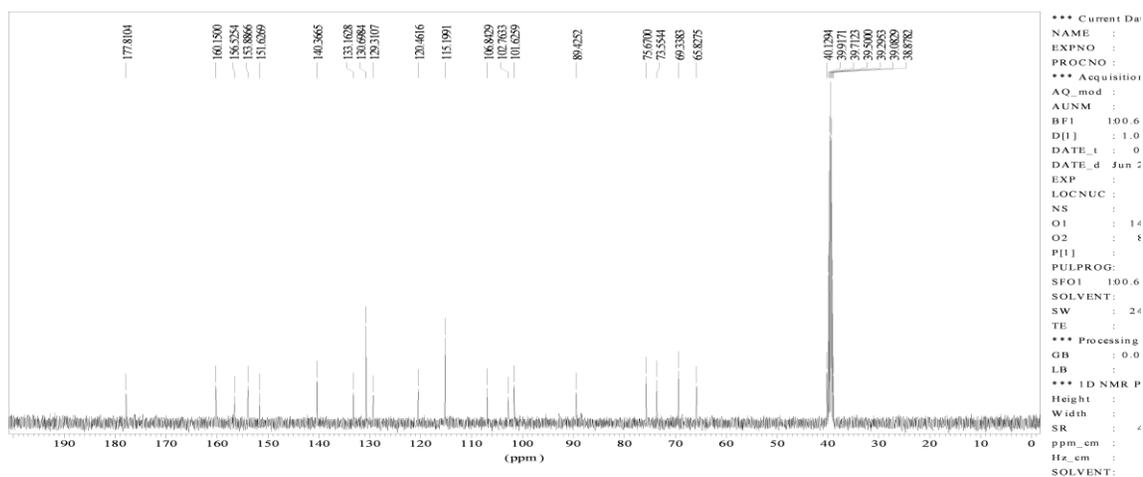


Anexo 8. Espectro de carbono 13 del compuesto 2



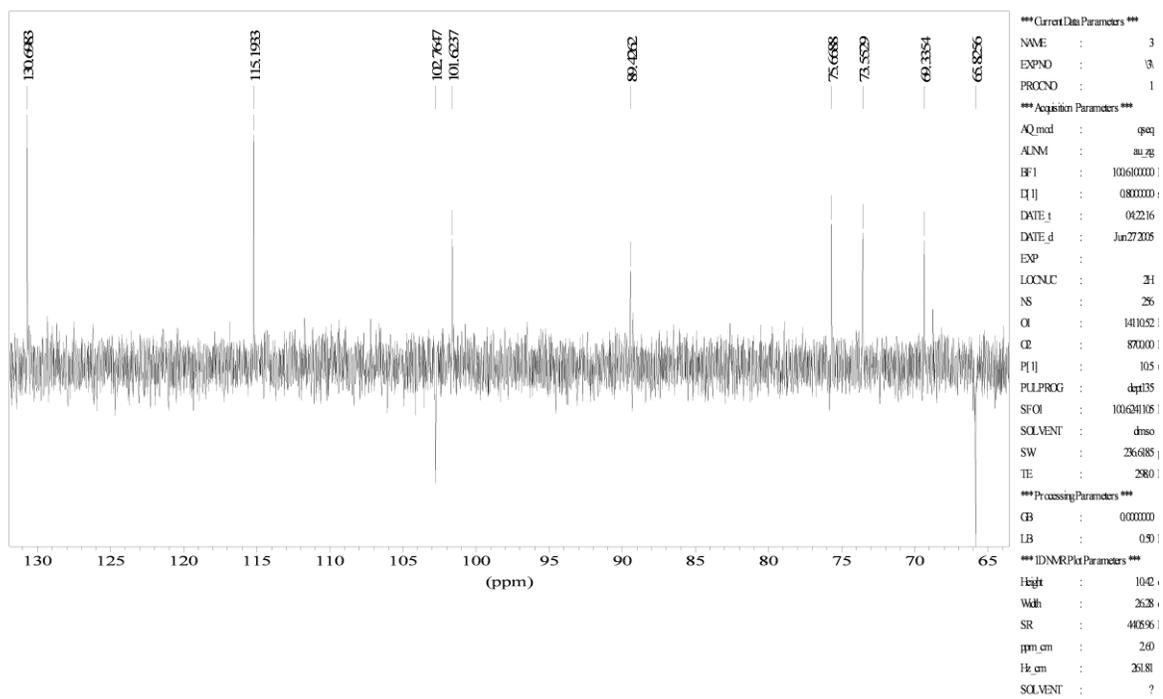
Anexo 9. Espectro protónico del compuesto 2

Espectro RMN Protónico Compuesto 2.



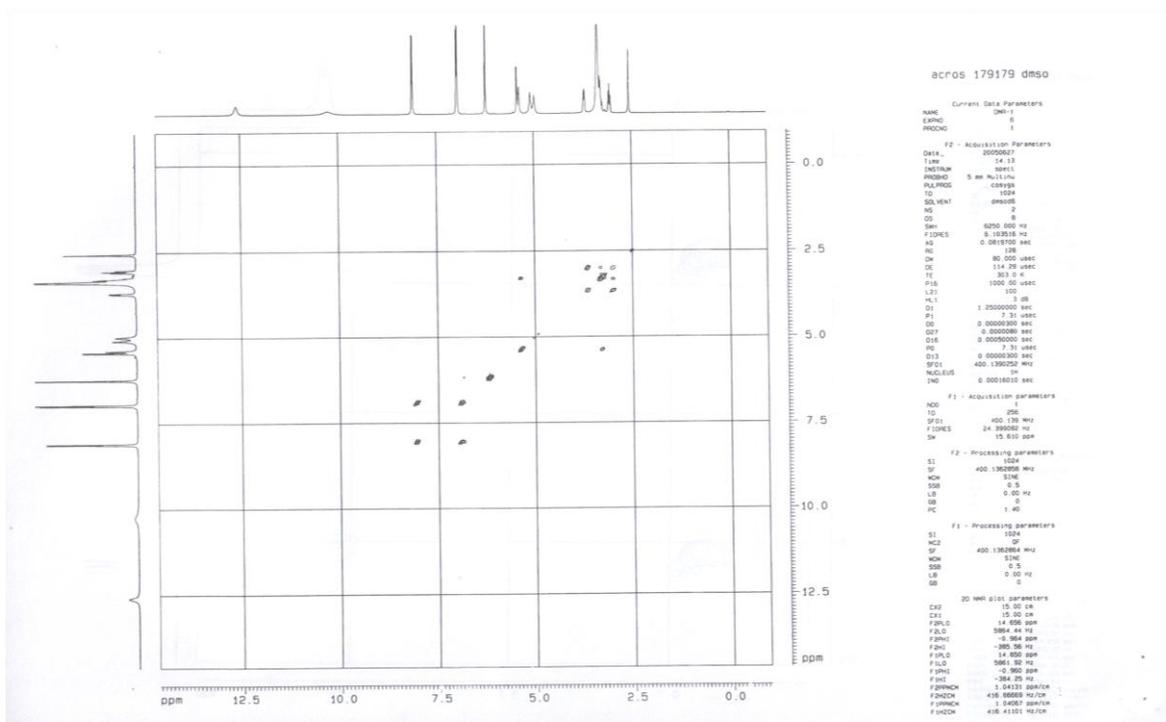
Anexo 10. Espectro de carbono 13 del compuesto 2.

Espectros RMN Carbono. Compuesto 2

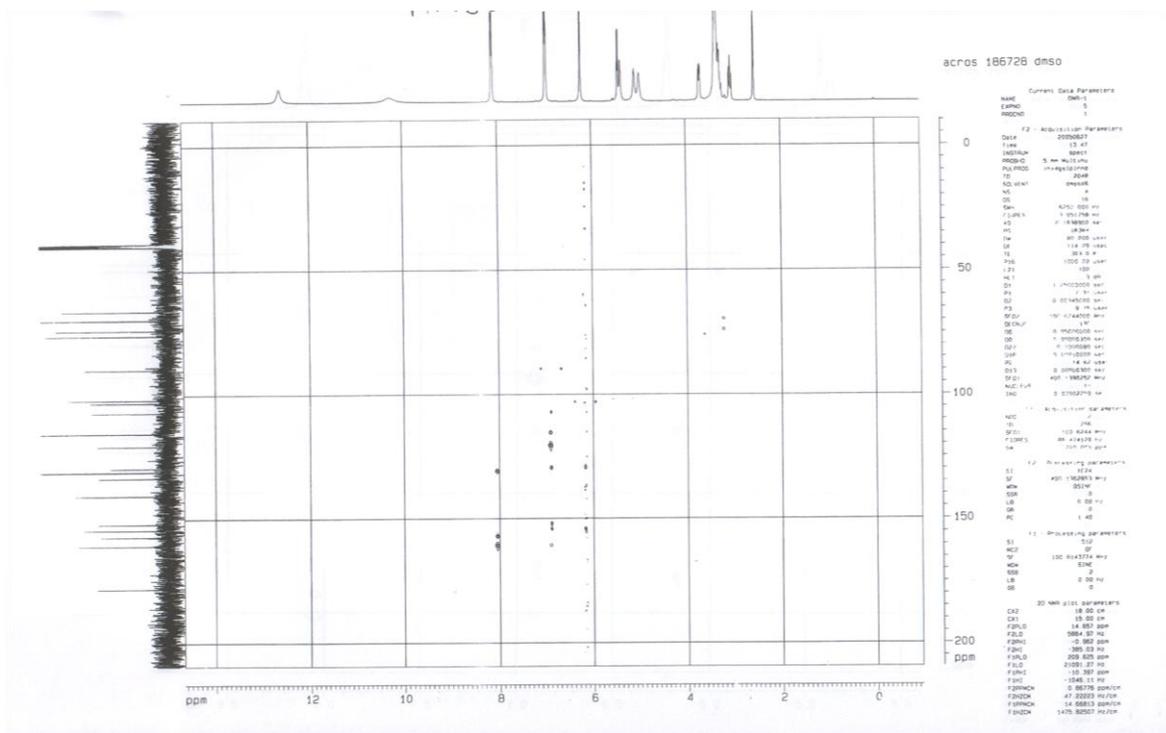


Anexo 11. Espectro de carbono 13 (DEPT) del compuesto 2

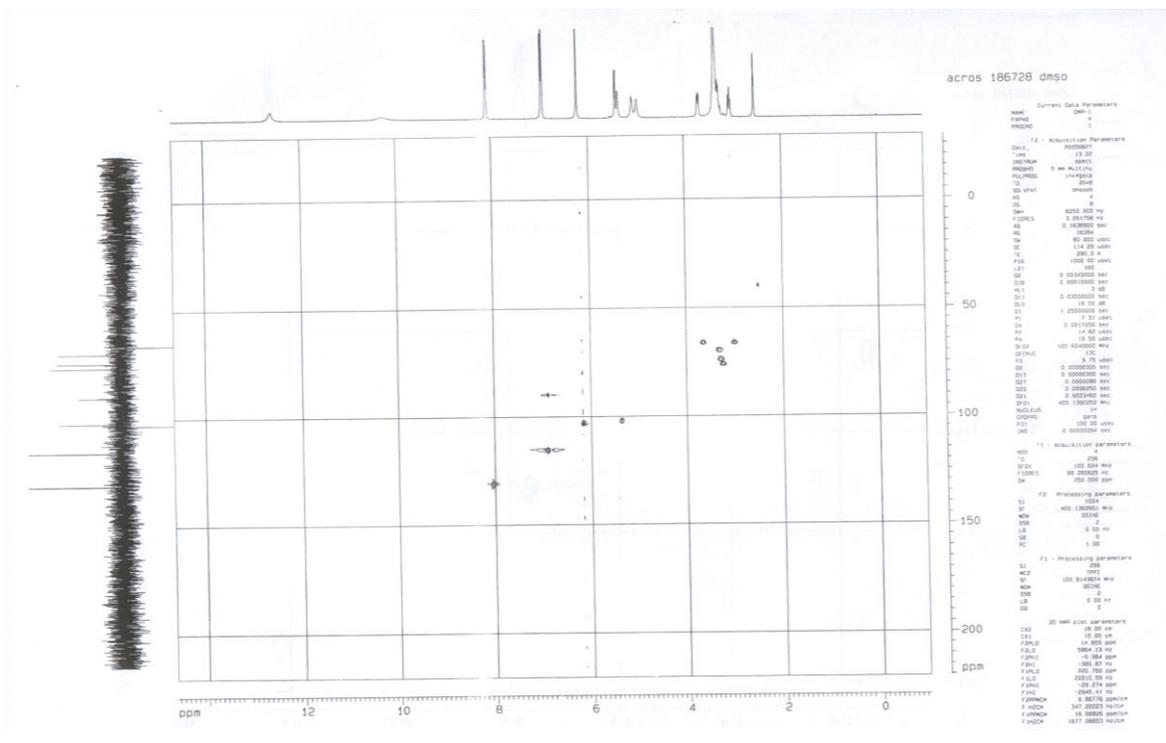
Espectros RMN Carbono. Compuesto 2



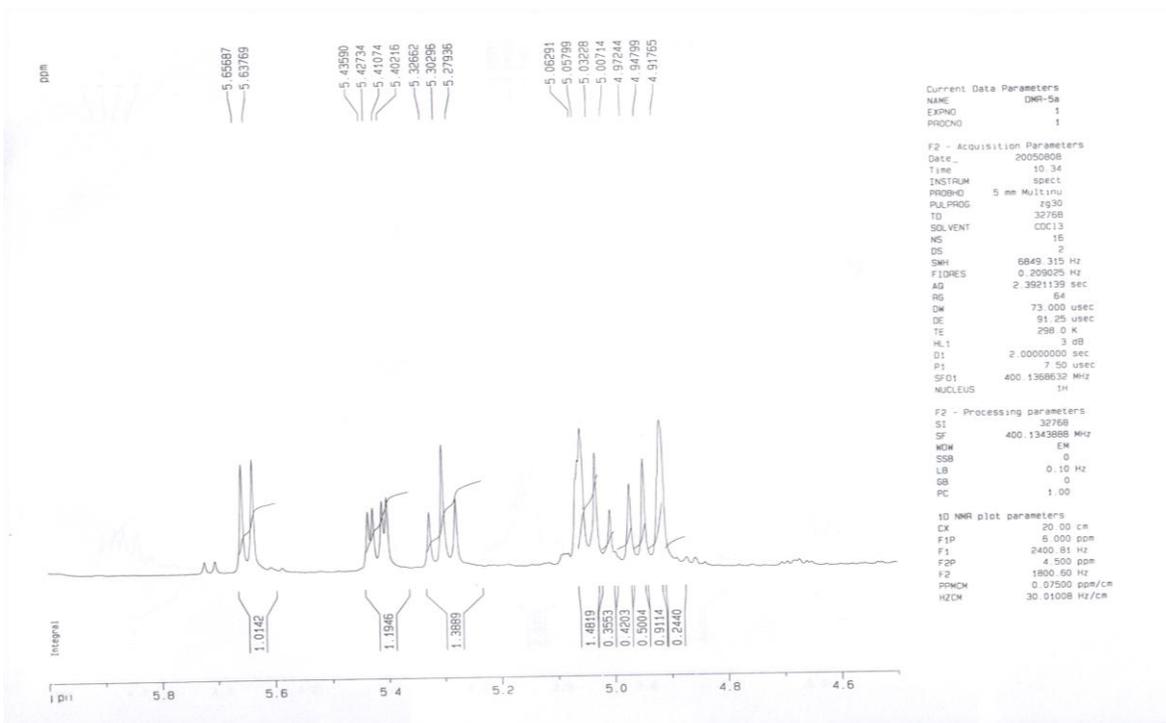
Anexo 12. Espectro H-H COSY compuesto 2



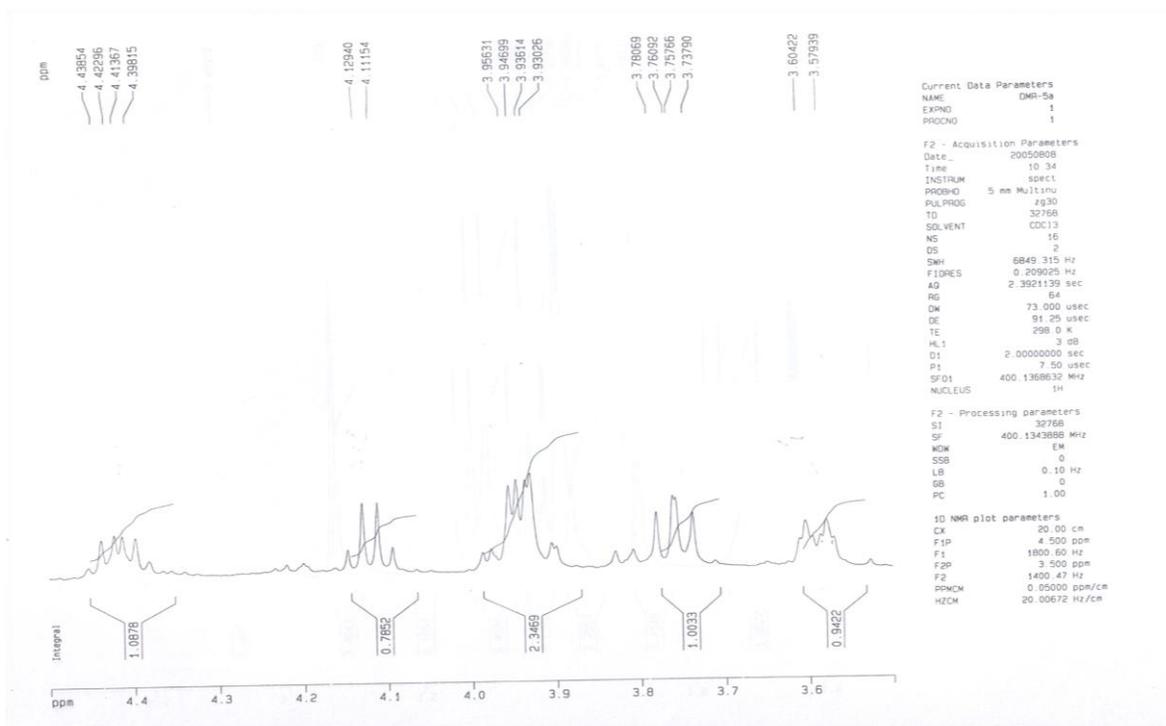
Anexo 13. Espectro H-C COSY (HMBC) compuesto 2



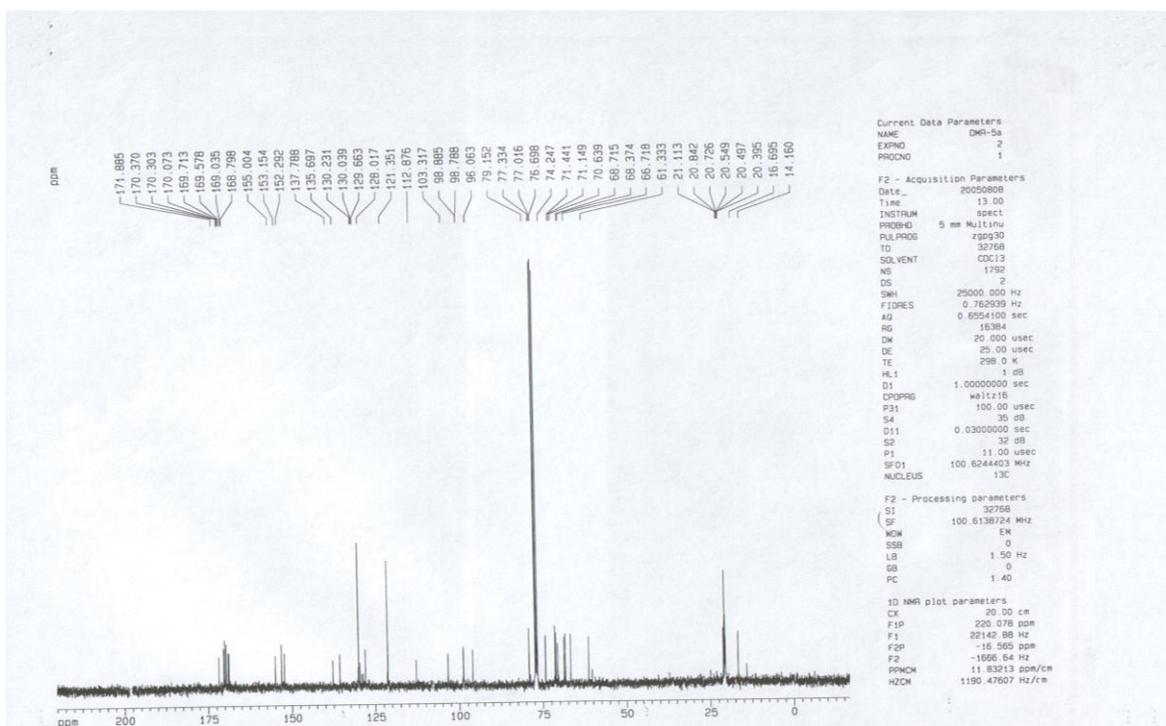
Anexo 14. Espectro H-C COSY (HMBC) Compuesto 2



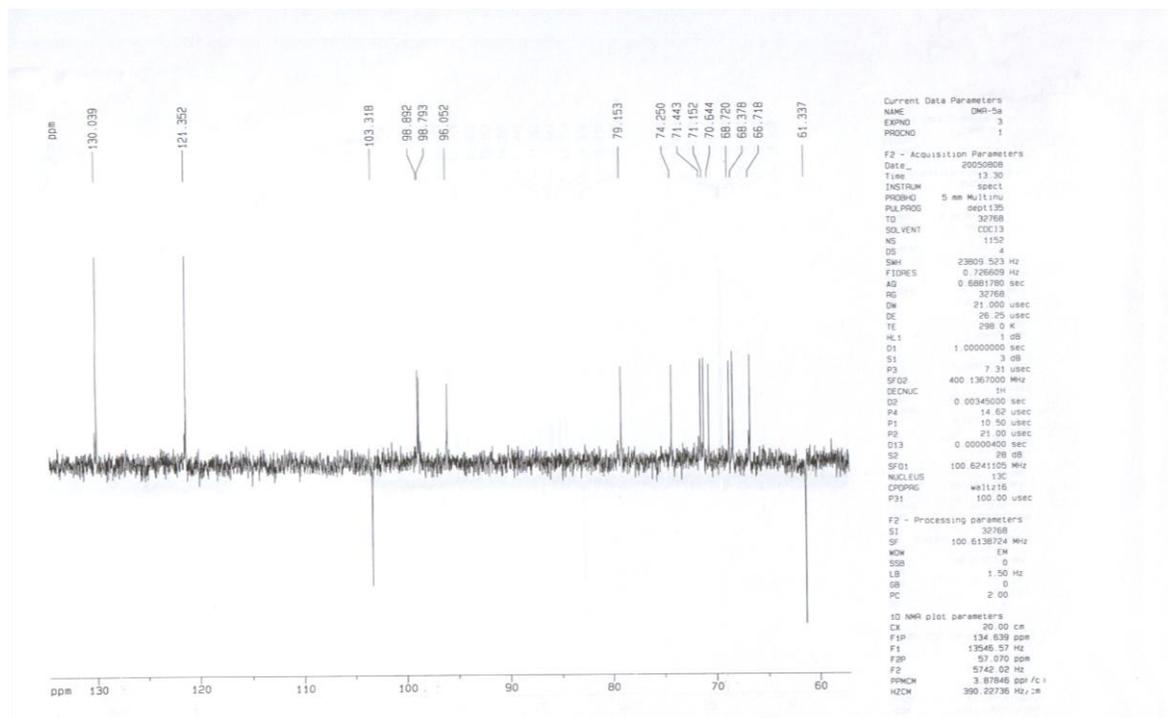
Anexo 15. Espectro protónico del Compuesto 7.



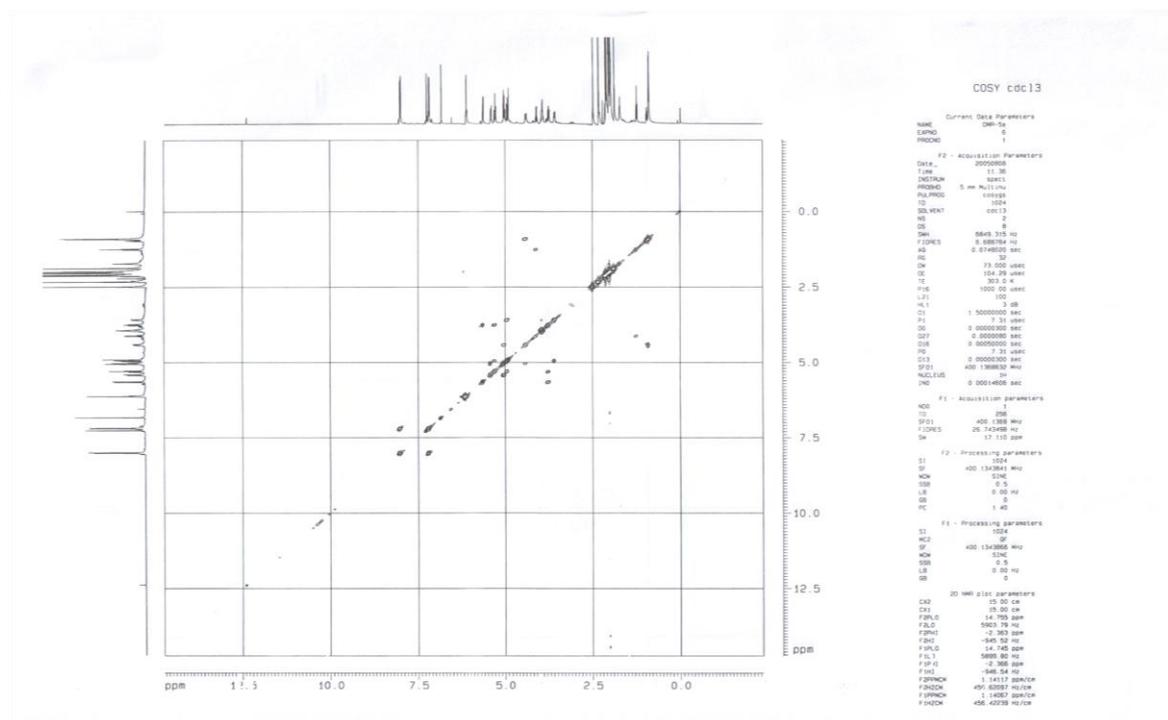
Anexo 16. Espectro protónico del Compuesto 7.



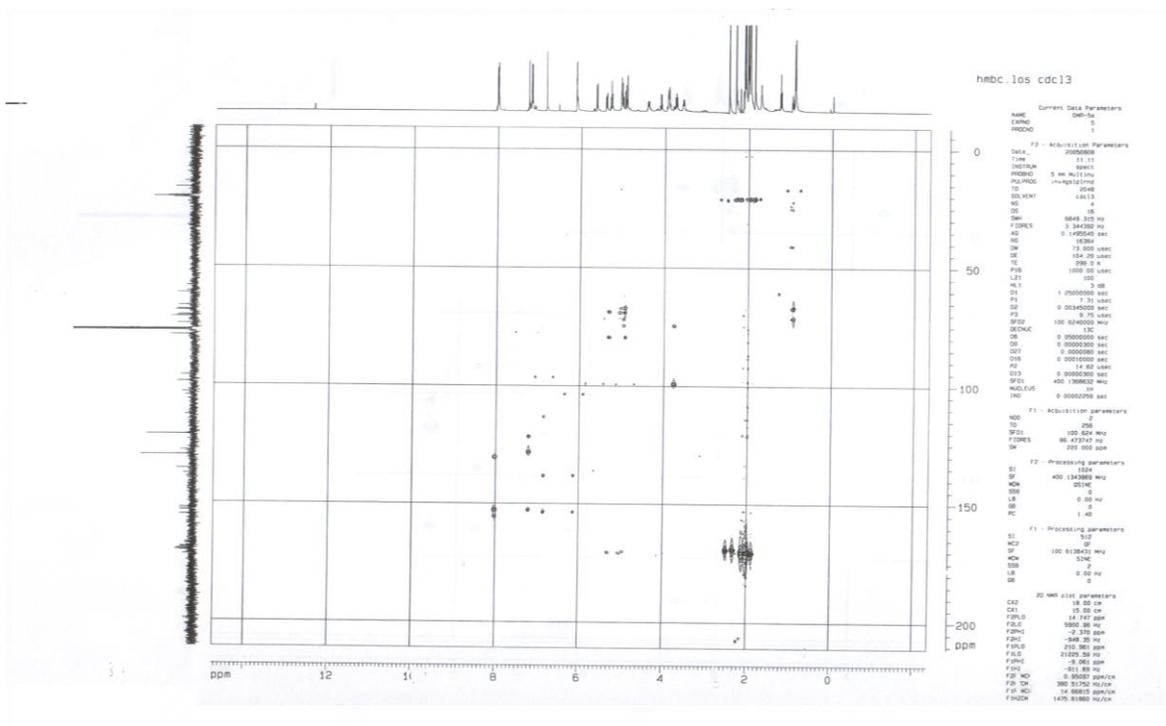
Anexo 17. Espectro de carbono 13 del Compuesto 7.



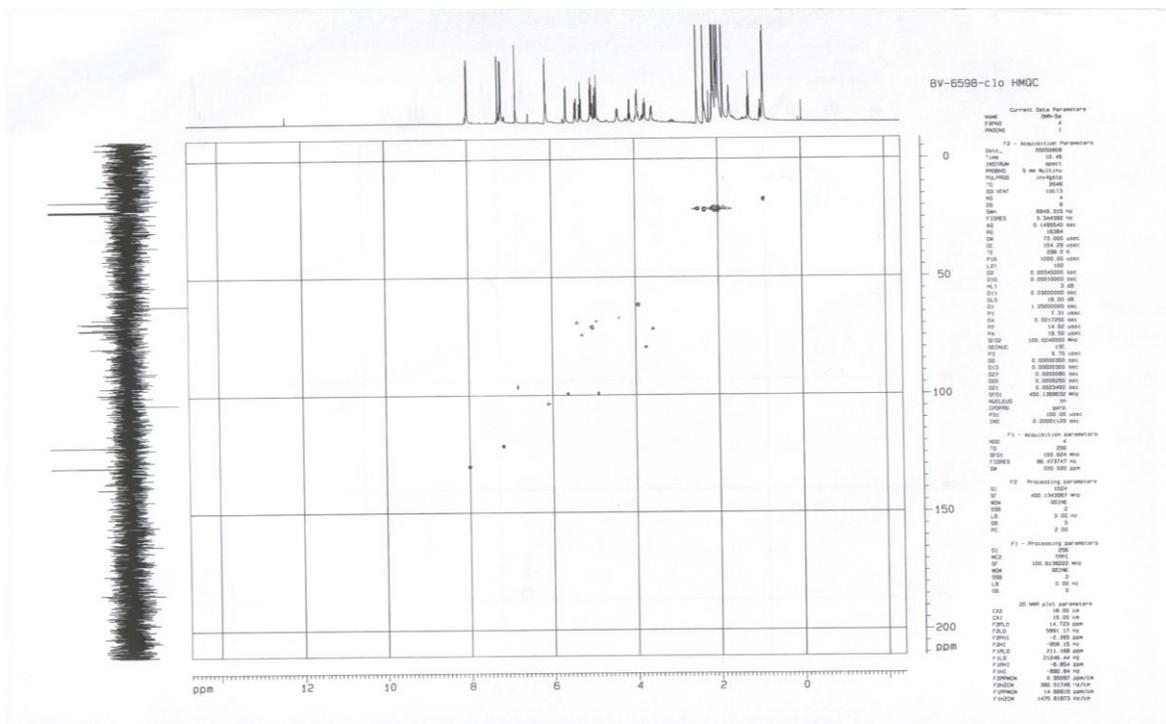
Anexo 18. Espectro DEPT del Compuesto 7.



Anexo 19. Espectro H-H COSY del Compuesto 7.



Anexo 20 Espectro H-C COSY (HMBC) del Compuesto 7.



Anexo 21. Espectro H-C COSY(HMQC) del Compuesto 7.

Clasificación taxonómica de *Boldoa purpurascens* Cav

Nombre Científico: *Boldoa purpurascens*, Cav

Familia: *Nyctaginaceae*

Sinonimia: *Cryptocarpus globosus* H.B.K

Género: *Boldoa* Endl

División: *Magnoliopsida* Especie: *Boldoa purpurascens*

Subclase: *Magnoliophyta*



Figura 1. Planta y hojas de *Boldoa purpurascens*, Cav. (foto)

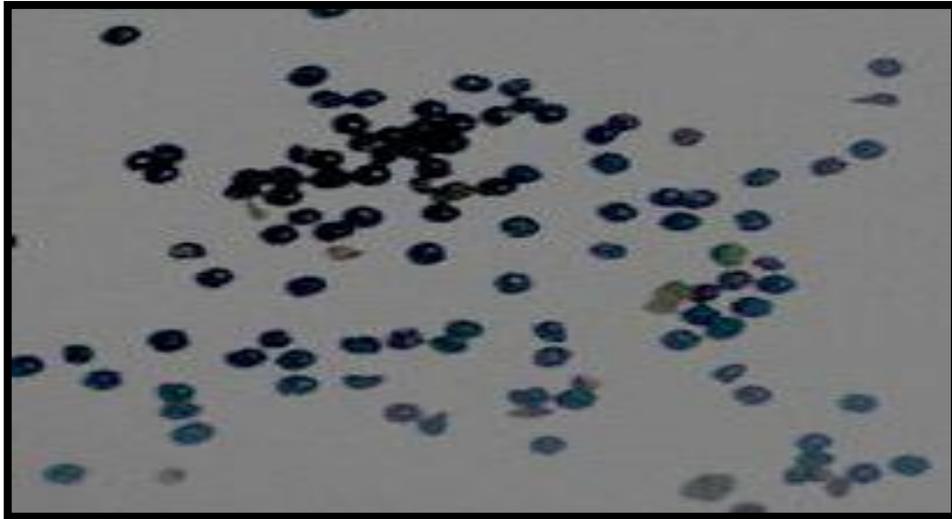


Figura 2. Semillas y renuevos de *Bolboa purpurascens*.



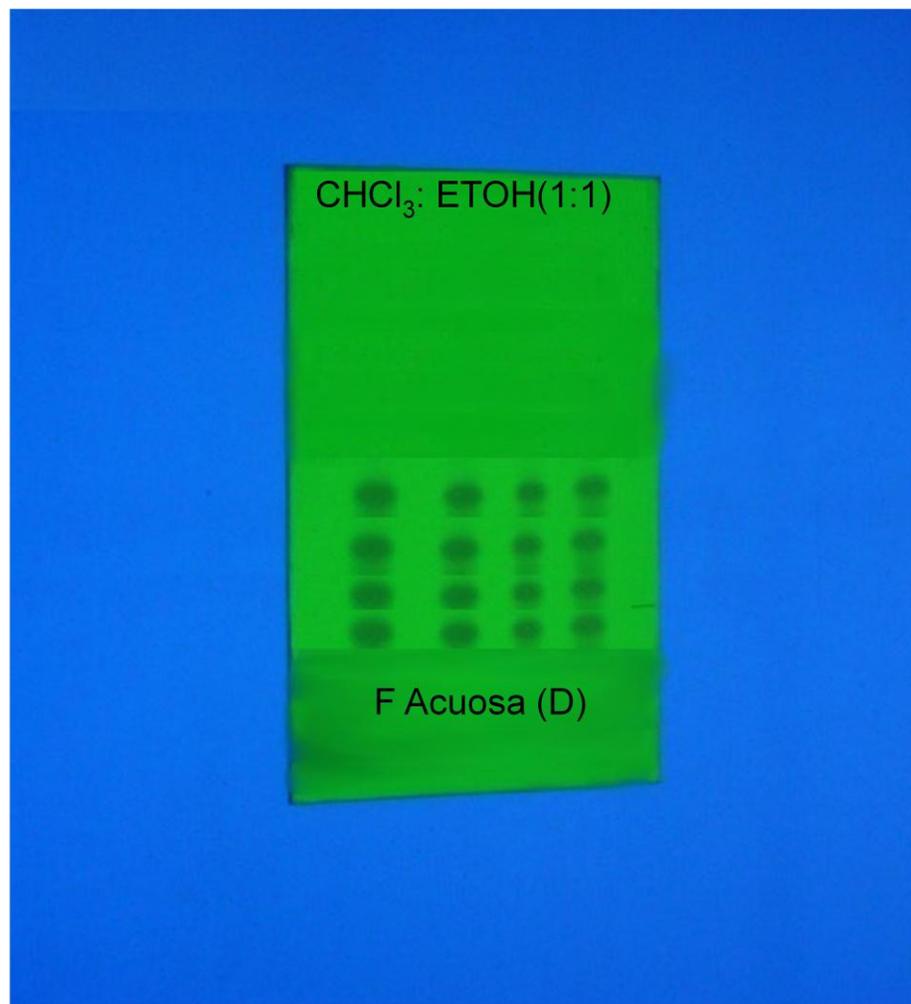


Figura 4. Cromatograma de la fracción acuosa

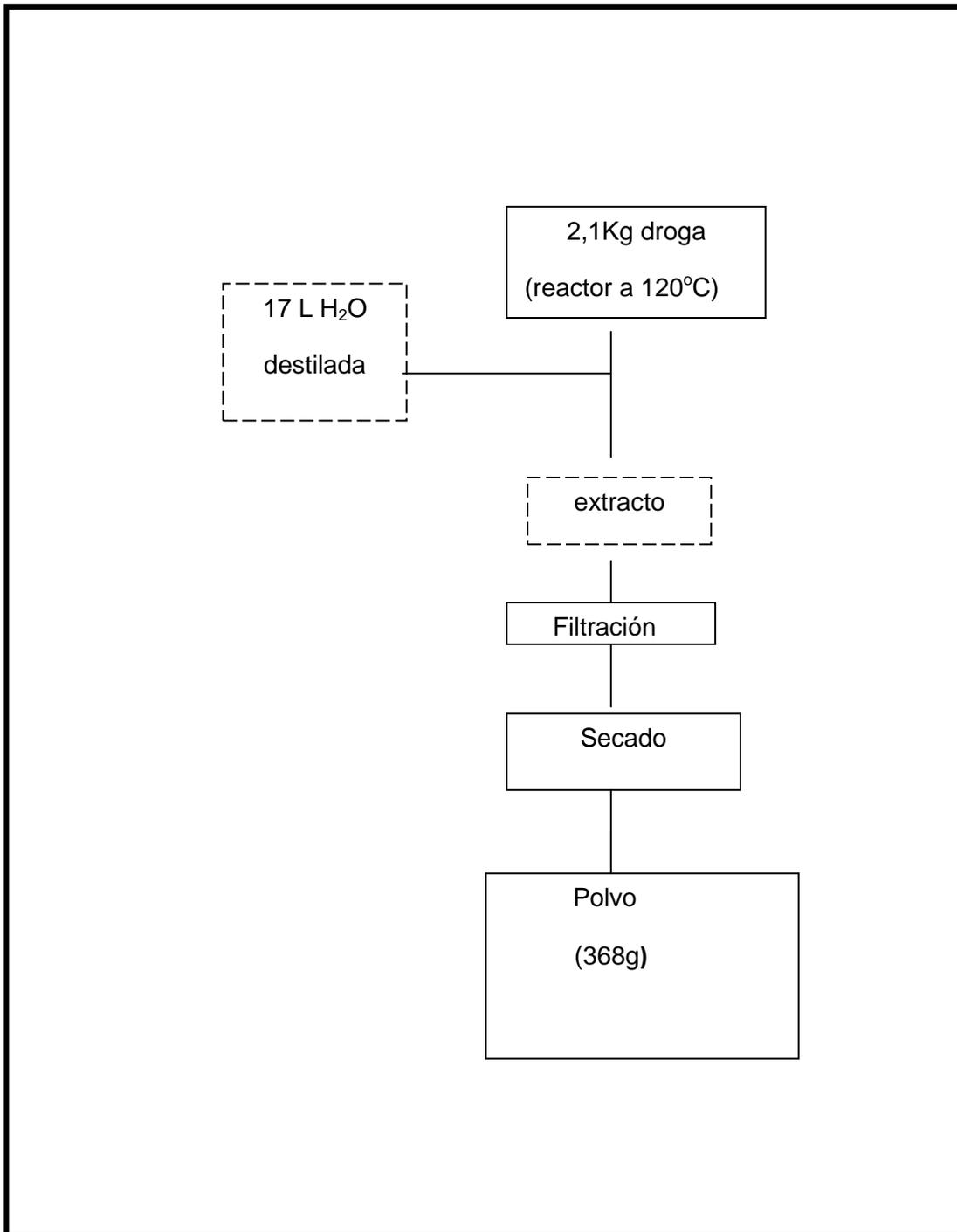


Figura 5. Diagrama de obtención del extracto acuoso seco.

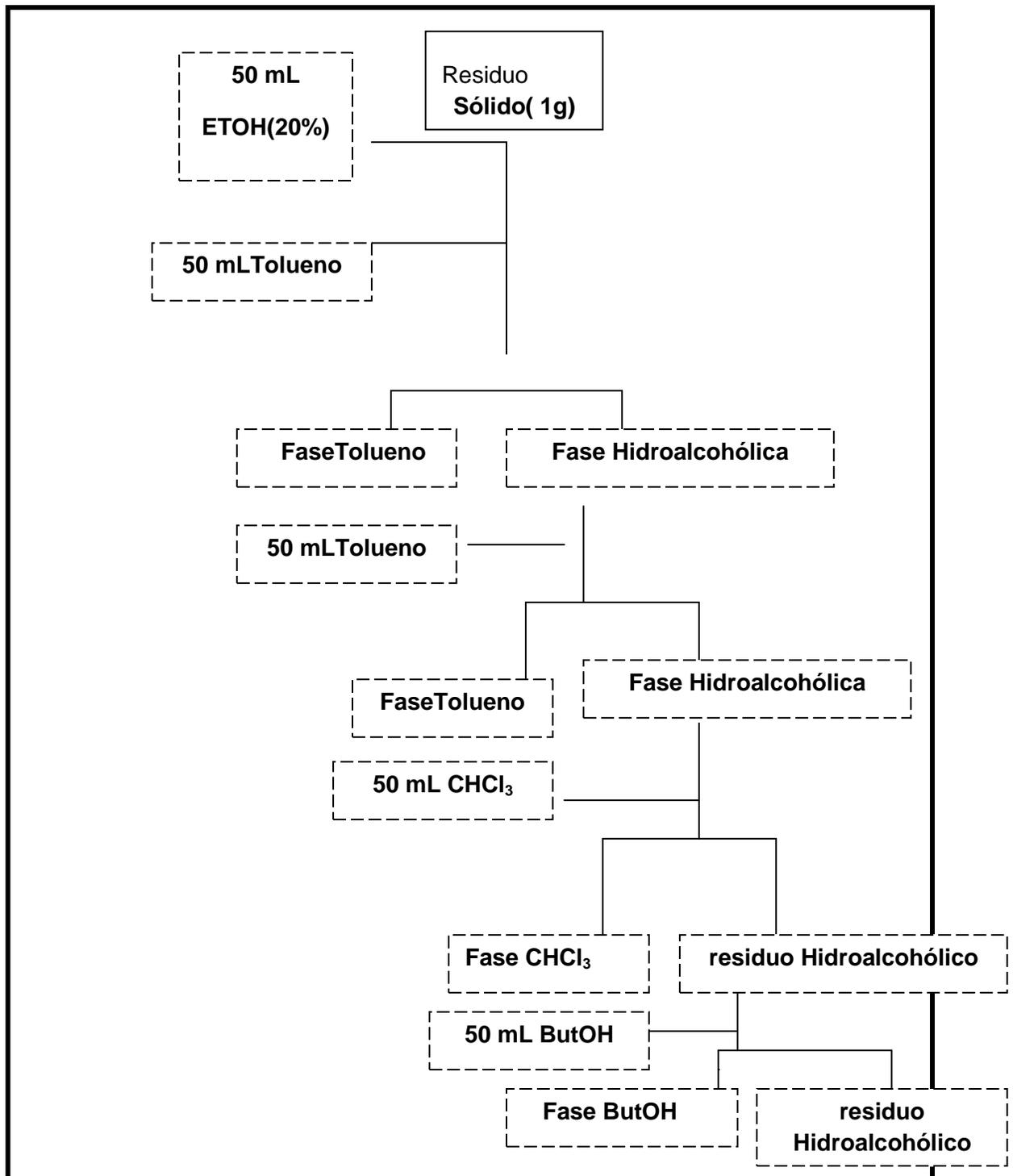


Figura 6. Proceso en contracorriente del extracto acuoso

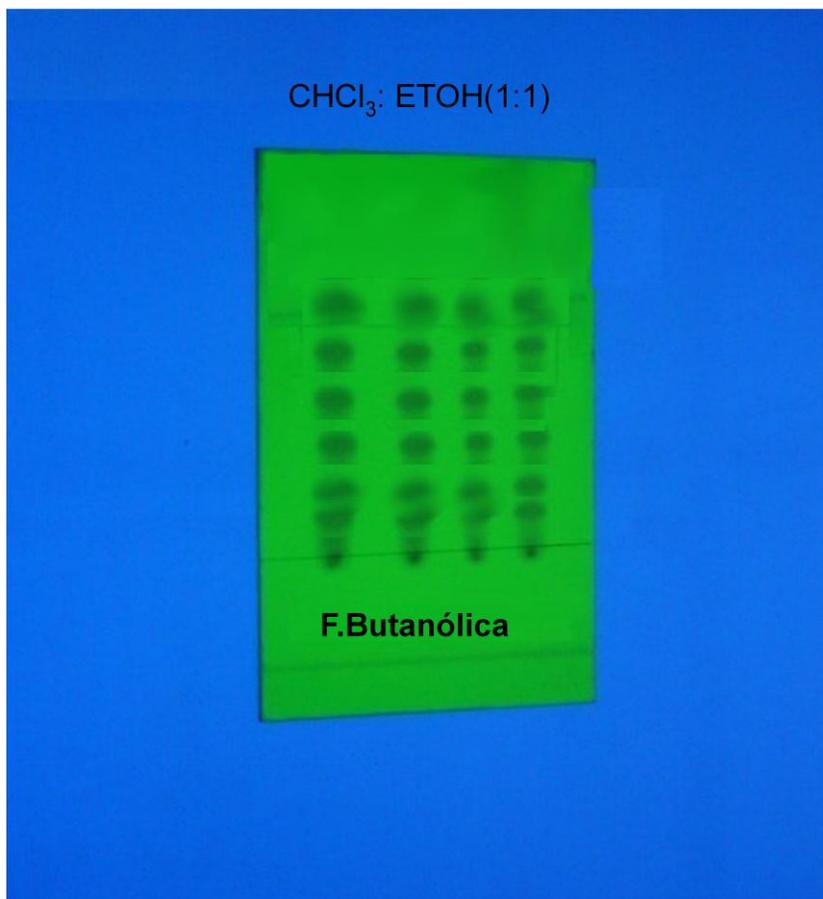


Figura 7. Cromatograma de la fracción butanólica

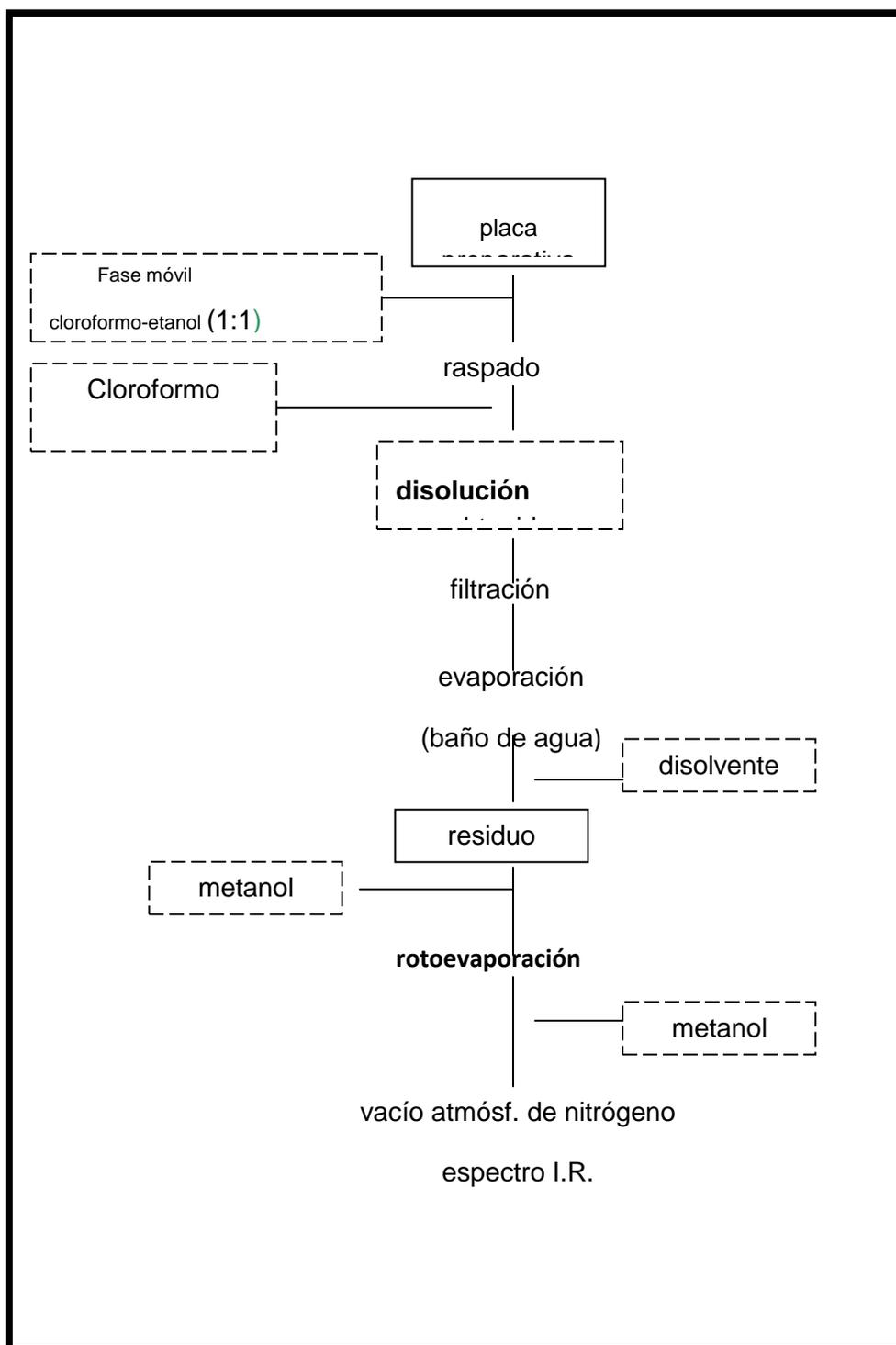


Figura 8. Preparación de las fracciones de CCD (prep) para IR

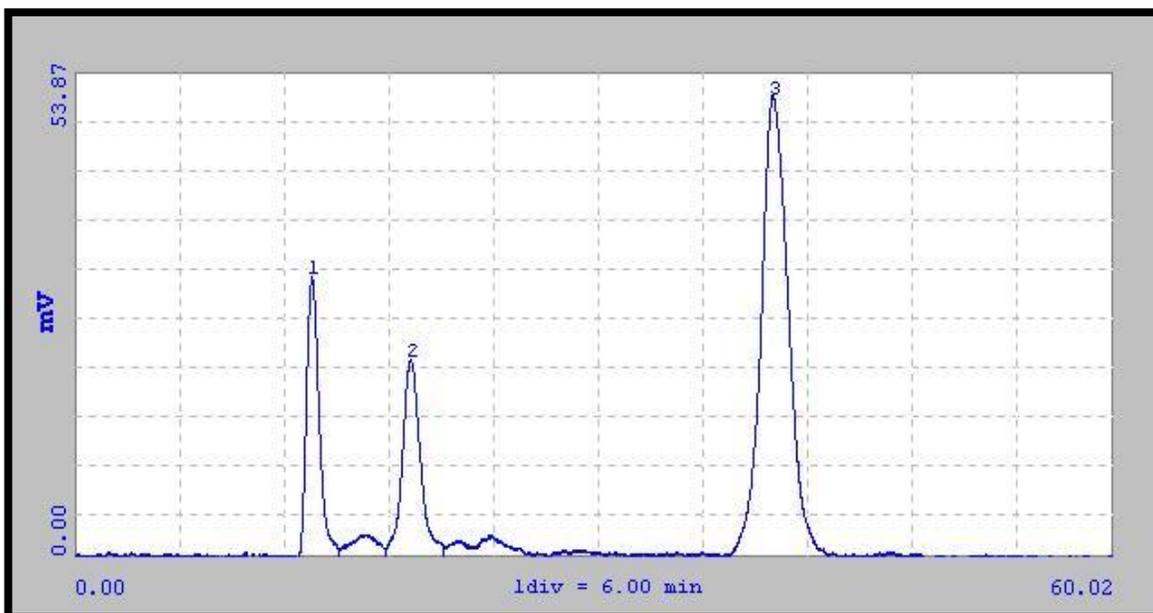


Figura 9. Fracción I de la CCD preparativa de la fracción butanólica.

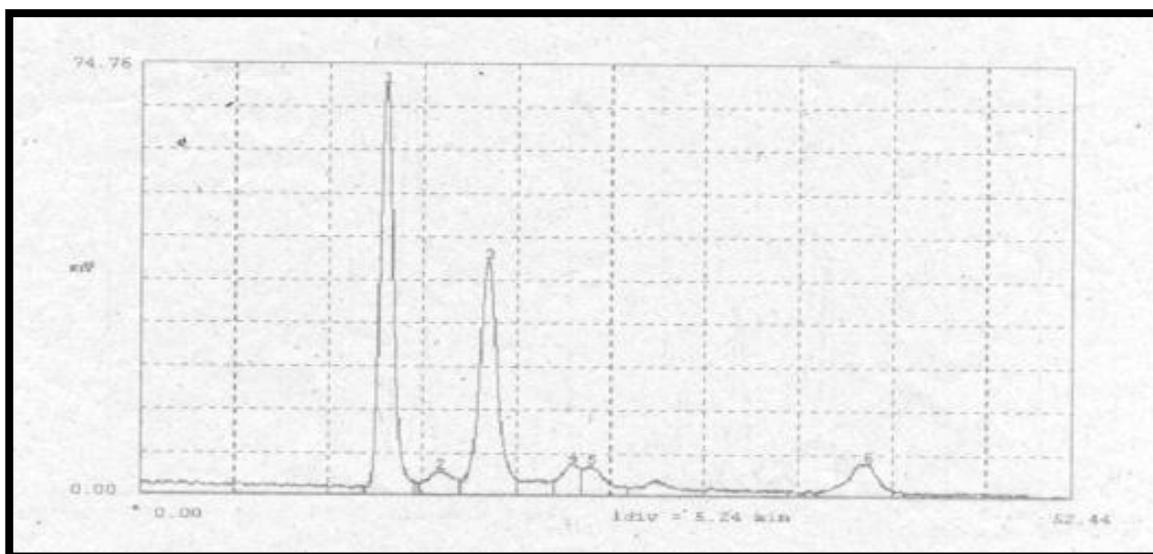


Figura 10. Fracción II de CCD preparativa de la fracción butanólica.

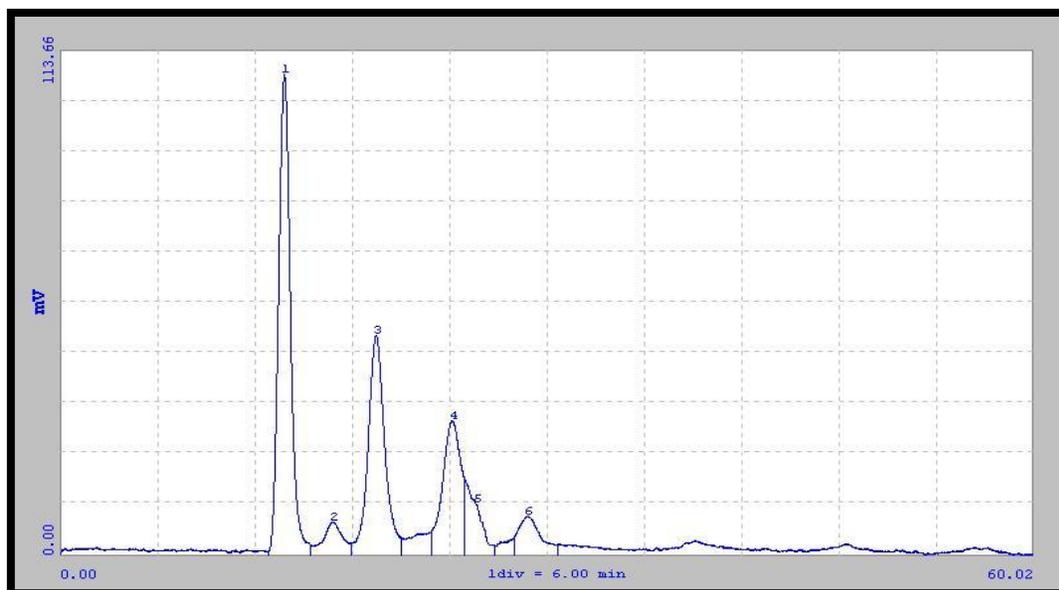


Figura 11. Fracción III de la CCD preparativa de la fracción butanólica.

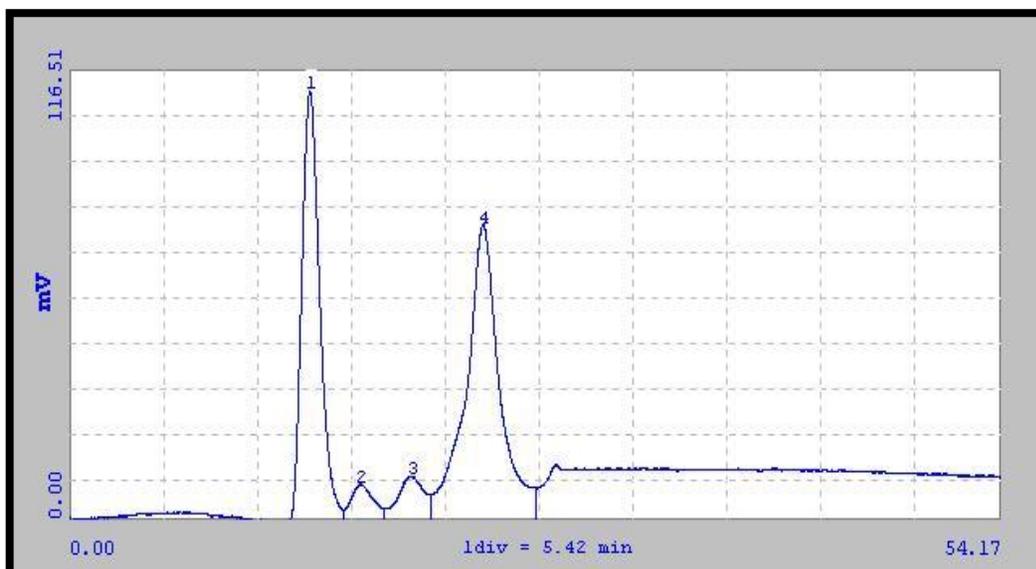


Figura 12. Fracción IV de la CCD preparativa de la fracción butanólica.

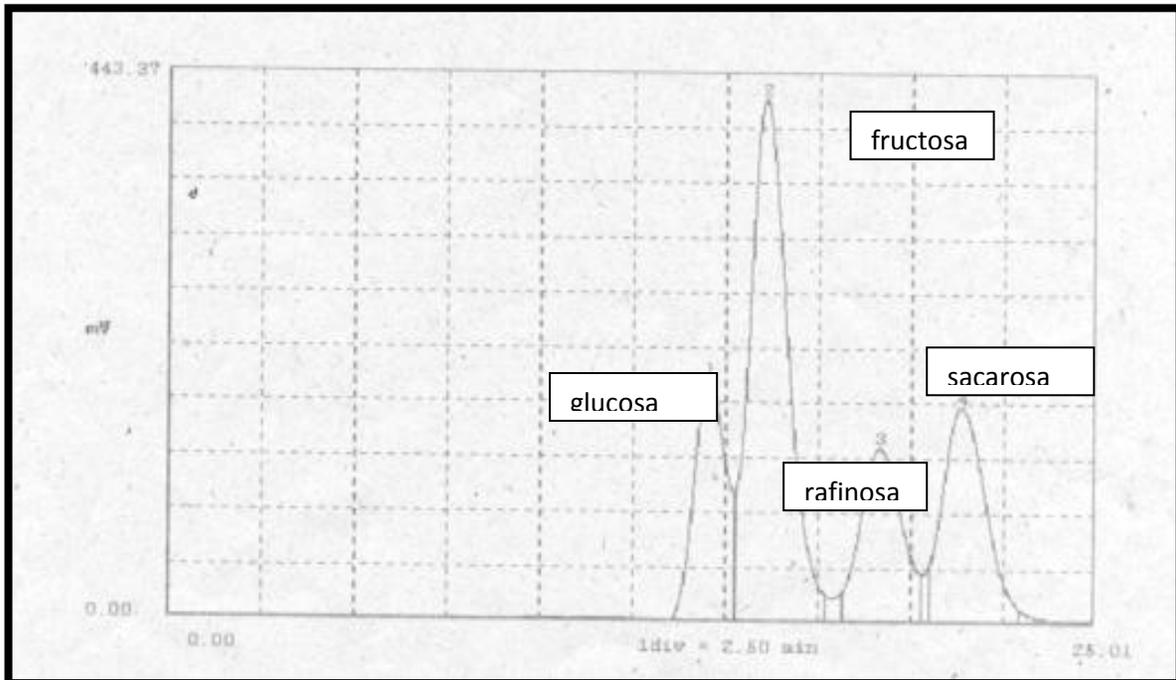


Figura 13. Cromatograma de patrones de carbohidratos

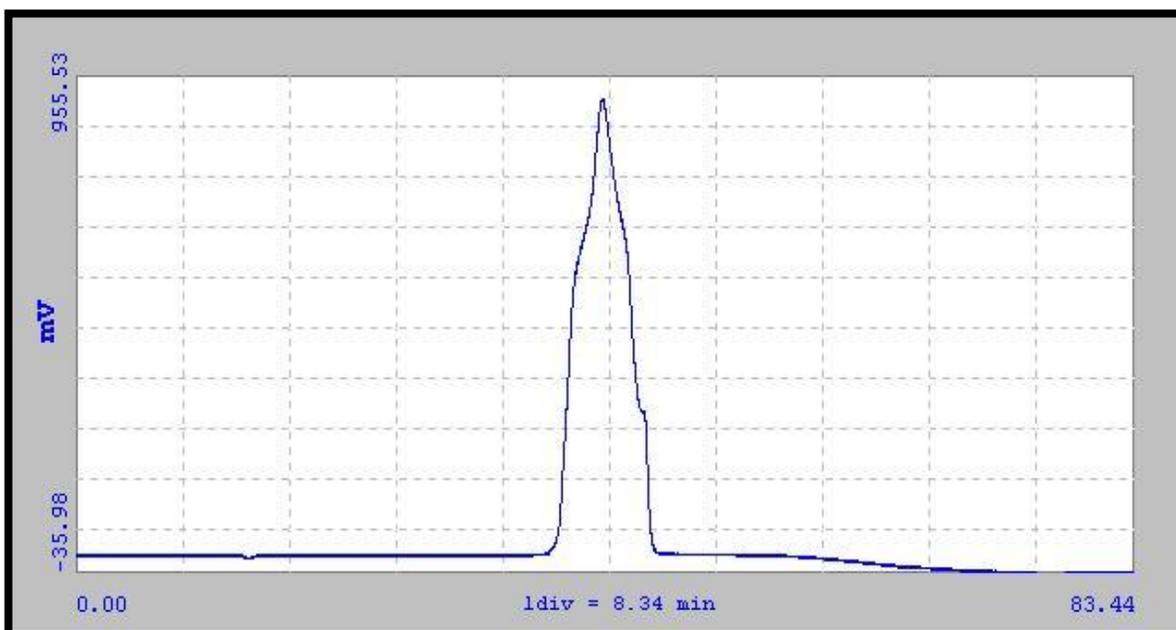


Figura 14. Cromatograma correspondiente a la naringina.

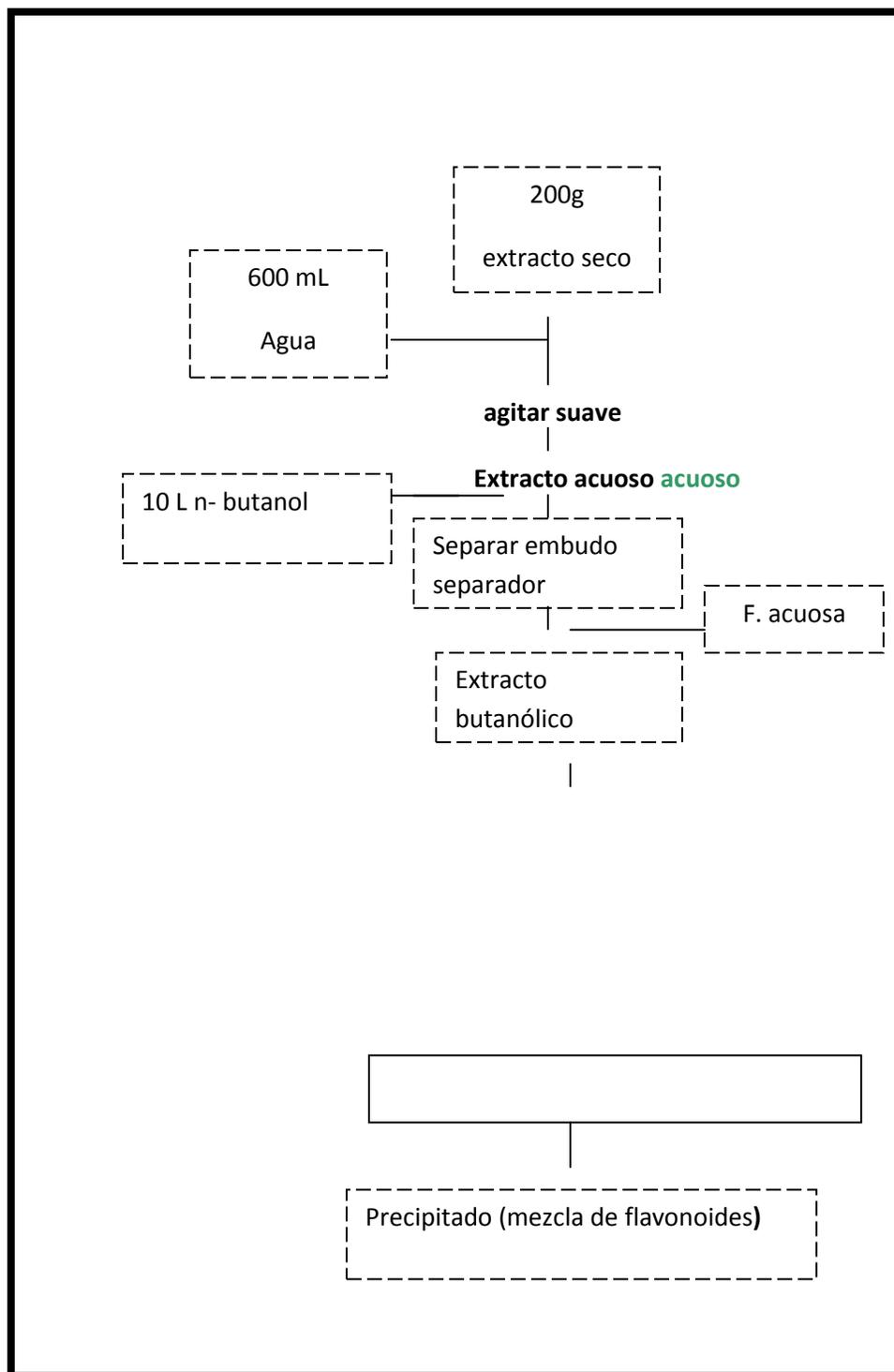
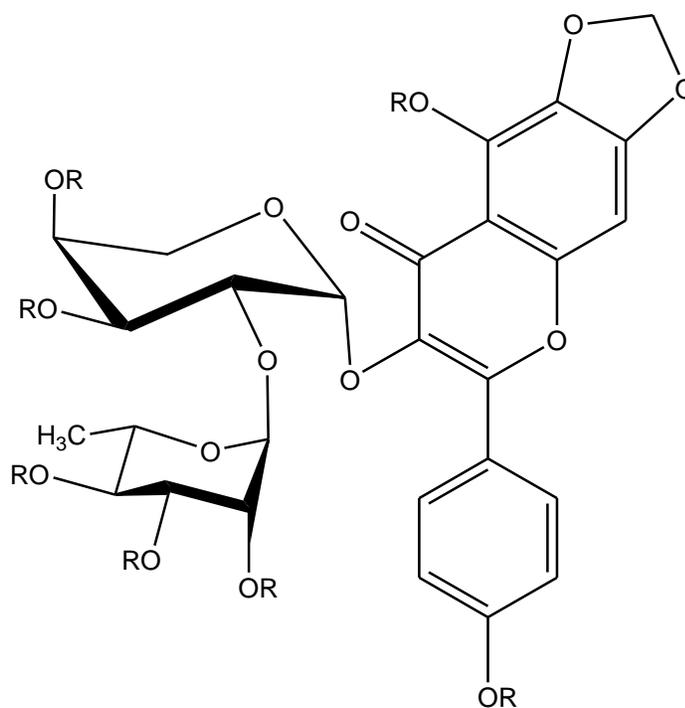
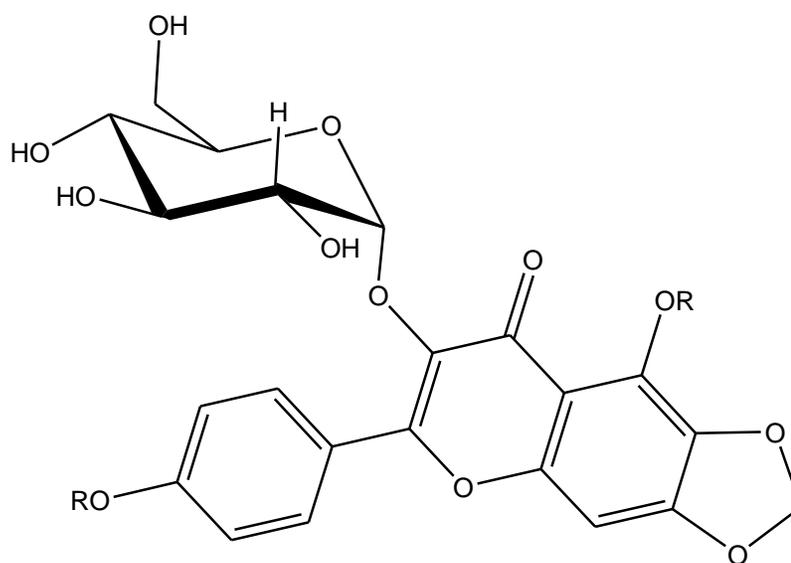


Figura 15. Metodología de obtención del crudo de flavonoides



1: R= H
5: R= Ac



4: R = H
8: R = Ac

Figura 16. Estructuras de los flavonoides aislados.

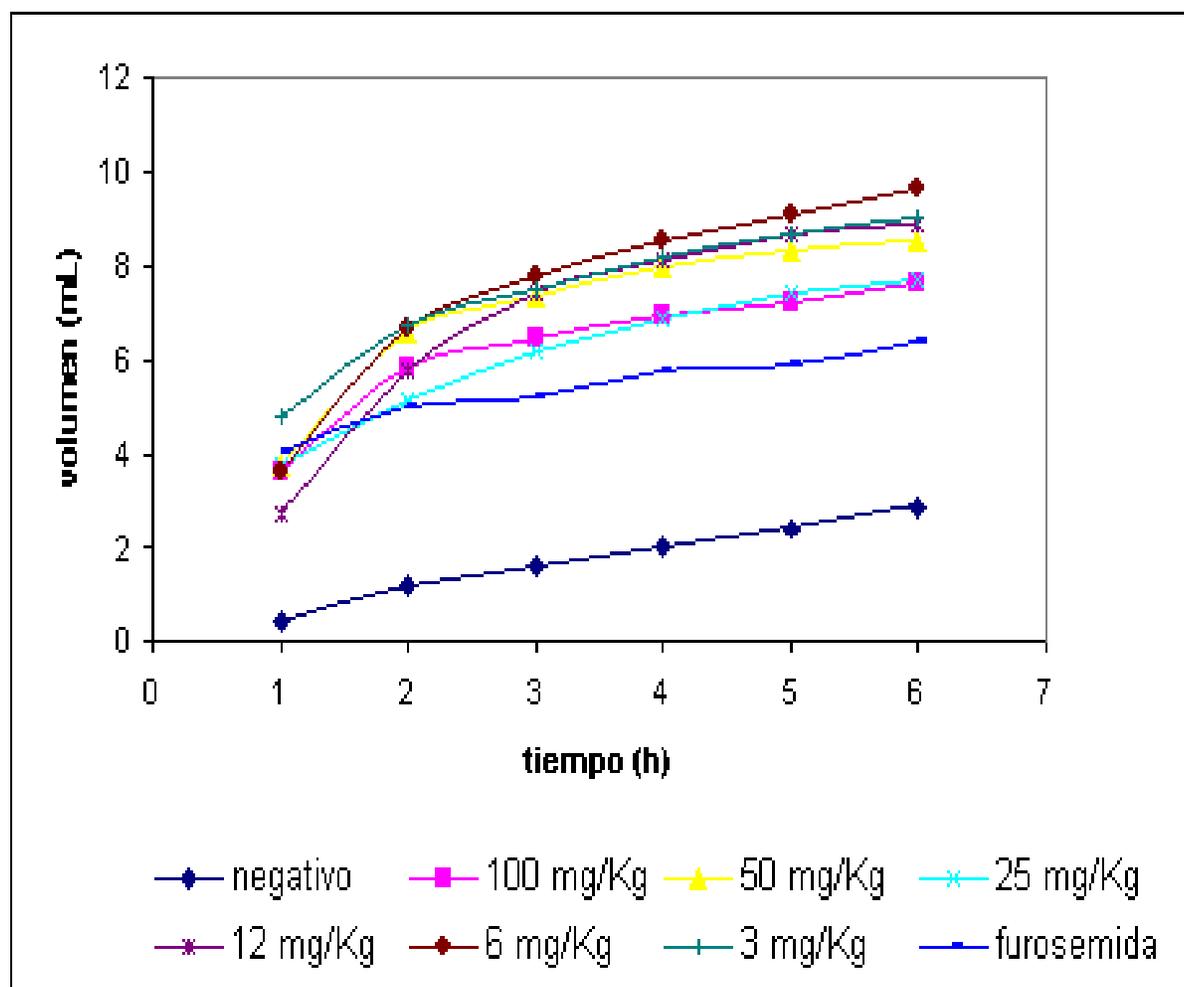


Figura 17 : Volumen de orina excretado en 6 h para el compuesto 1 y los controles

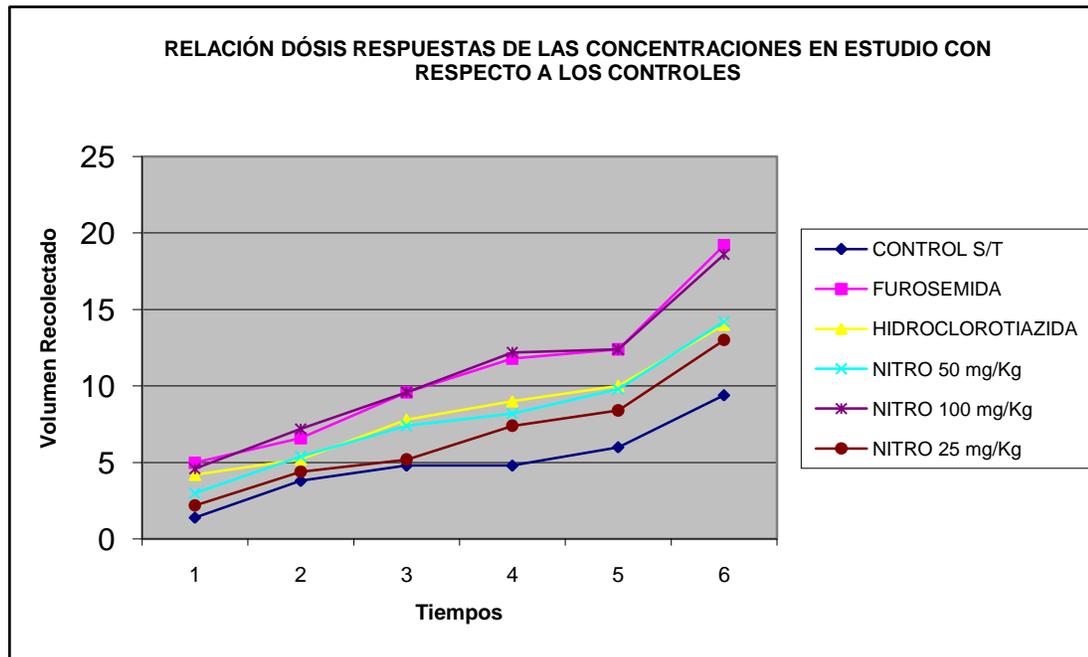


Figura18. Relación dosis respuesta de los controles y el compuesto 2.

Tabla I. Composición química de plantas medicinales con actividad diurética demostrada (familia Nictaginaceae)

PLANTA	METABOLITOS
Cardo	Flavonoides, sales de K.
Cardo corredor	Saponinas, sales de K.
Cerezo	Sales de K, Flavonoides.
Cola de Caballo	Flavonoides, sales de K.
Maíz	Sales de K, Flavonoides

Tabla II Actividad diurética de algunas especies de la familia Nictaginaceae

Tabla II.
Actividad
diurética
de
algunas
especies
de la
familia
Nictagina
ceae .

Especie	Concentración (g/mL)	Actividad diurética
Guizaso de caballo	10/100	1,6
	10/50	2,8
Mastuerzo	10/100	2,5
	10/50	3,1
Nitro Blanco	10/100	2,7
	10/50	1,9
Yagruma	10/100	1,1
	10/50	1,5

Tabla III. Relación de los extractos y volumen promedio de orina de 24 h.

CONC DE EXTRACTOS (%)	V. PROM. DE ORINA (mL) 24 HORAS
Extracto acuoso (1 %)	10,8
Extracto acuoso (5 %)	11,0
Extracto acuoso (10 %)	10,8
Extracto acuoso (15 %)	11,0

Tabla IV. Relación de grupos controles y volumen promedio de orina de 24h.

GRUPO CONTROL	V. PROM. DE ORINA (mL) 24 HORAS
Control para extracto al 1 %	10,0
Control para extracto al 5 %	10,5
Control para extracto al 10 %	10,3
Control para extracto al 15 %	10,0

Tabla V y VI. Relación peso, dosis de extracto y volumen de orina excretado en 24 h (extracto 1% y 5%)

Tabla V. Extracto acuoso al 1 %.

PESO (g)	DOSIS H ₂ O (2 mL/100g)	DOSIS EXTRAC. (3 mL/100g)	V. DE ORINA mL (24 h)
161	3,2	4,8	9,0
188	3,7	5,6	10,0
176	3,5	5,5	9,0
185	3,7	5,5	13,0
172	3,4	5,2	12,0

Tabla VI. Extracto acuoso al 5%.

PESO (g)	DOSIS H ₂ O (2 mL/100g)	DOSIS EXTRAC. (3 mL/100g)	V. DE ORINA mL (24 h)
200	4,0	6,0	10,0
199	3,9	5,9	11,0
210	4,2	6,3	13,0
180	3,6	5,4	9,0
196	3,9	5,8	12,0

Tabla VII. Relación peso, dosis y volumen de orina excretado en 24 h (extracto 10 y 15%)

Tabla VII. Extracto acuoso al 10 %

PARAMETRO	PESO (g)	DOSIS H ₂ O (2 mL/100g)	DOSIS EXTRAC. (3 mL/100g)	V. DE ORINA mL (24 h)
Volumen de Orina	174,5	3,5	5,2	10,0
	184,0	20,706	0,002	p < 0,05 SIGNIF.
Na ⁺	170,0	3,4	5,1	13,0
	190,0	16,814	0,008	p < 0,01 MUY SIGNIF.
	189,5	3,8	5,7	12,0

Tabla VIII. Extracto acuoso al 15 %.

PESO (g)	DOSIS H ₂ O (2 mL/100g)	DOSIS EXTRAC. (3 mL/100g)	V. DE ORINA mL (24 h)
201,5	4,0	6,0	12,0
199,5	3,9	5,9	9,0
211,0	4,2	6,3	10,0
200,0	4,0	6,0	12,0
218,0	4,3	6,5	12,0

K⁺	19,257	0,0002	p < 0,001 ALTAMENTE SIGNIF.
Cl⁻	11,782	0,0082	

Tabla IX. Valores de X² y probabilidad (p) para cada parámetro.

Tabla X. Relación de los valores de probabilidad (p) de los diferentes parámetros para parejas de grupos

grupo 1 – control grupo 2 – Furosemida

grupo 3 – hidroclorotiazida grupo 4 – extracto

GRUPOS	V DE ORINA (p)	Na⁺ (p)	K⁺ (p)	CL⁻ (p)
1 y 2	0,0039	0,0776	0,0080	0,0039
1 y 3	0,0039	0,0039	0,0039	0,0542
1 y 4	0,0038	0,0103	0,0039	0,0039
2 y 4	0,0534	0,6310	0,0039	0,1093
3 y 4	0,0049	0,0039	0,0039	1,0000

Tabla XI. Relación de los valores de media (X) y desviación estándar de cada parámetros evaluado, para los diferentes grupos

GRUPOS	V. ORINA mL	Na ⁺ (meq/24h)	K ⁺ (meq/24h)	CL ⁻ (meq/24h)
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
Control	10,43 ± 0,29 ^a	0,37 ± 0,05 ^a	0,28 ± 0,05 ^a	0,11 ± 0,01 ^a
Furosemida	13,70 ± 0,37 ^b	0,50 ± 0,11 ^{ac}	0,42 ± 0,09 ^{bc}	0,06 ± 0,02 ^b
Hidroclorotiazid a	15,23 ± 0,70 ^c	0,96 ± 0,12 ^b	0,47 ± 0,05 ^c	0,08 ± 0,12 ^{abc}
Extracto	12,60 ± 0,98 ^b	0,53 ± 0,10 ^c	1,04 ± 0,14 ^d	0,04 ± 0,02 ^{cb}

Si se repite al menos una letra indican que no hay significación estadística

Tabla XII. Relación de cepas bacterianas empleadas en el estudio antimicrobiano.

GRUPOS	SEXO	DOSIS (mg/kg)	NO. ANIMALES
	M	2000	5

Cepas bacterianas	No ATCC	Cepas bacterianas	No ATCC
Salmonella Typhi	7251	Salmonella Typhi	14028
Klebsiella pneumoniae	13883	Staphylococcus aureus	338626
Escherichia coli	25922	Staphylococcus aureus	6538
Shigella flexneri	12022	Staphylococcus epidermidis	12228
Shigella sonnei	25931	Entrobacter aerogenes	13048
Bacillus subtilis	6633	Entrobacter cloacae	23355
Proteus mirabilis	12453	Serratia marcescens	8100
Proteus mirabilis	7002	Citrobacter freundii	10625
Proteus vulgaris	13315	Citrobacter freundii	8090
Salmonella enteritidis	13076	Pseudomonas aeruginosa	27853
Salmonella Typhi	19430	Pseudomonas aeruginosa	9027

1	H	2000	5
2	M	0	5
	H	0	5

Tabla XIII. Descripción del experimento de toxicidad aguda

Leyenda: M – machos
H - hembras

Tabla XIV. Variación del peso de los animales durante el experimento.

PESO	Machos		Hembras	
	Z	p	Z	p
Inicio	- 1,57	0,1167	- 0,5227	0,6015
7 días	- 0,94	0,3772	- 0,7311	0,4647
14 días	- 1,36	0,1745	- 0,5222	0,6015

Tabla XV.

Comparación por sexo de los grupos tratados con el grupo control

Z-valores en la escala para la curva normal estándar
p-significación estadística.

Tabla XVI. Comparación por grupo al inicio a los 7 y a los 14 días

PESO	Z	p
Inicio	- 0,9831	* 0,3256
7 días	- 0,7556	* 0,4497
14 días	- 0,8315	* 0,4057

* $p > 0,05$

Tabla XVII. Esquema de tratamiento y niveles de dosis empleados en el ensayo

SUSTANCIA	GRUPO DE TRATAMIENTO	DOSIS	CANTIDAD DE ANIMALES
Agua destilada	Grupo 1	10 mg/Kg	5
Ciclofosfamida	Grupo 2	60 mg/Kg	5
Dosis1(extracto seco)	Grupo 3	500 mg/Kg	5
Dosis2(extracto seco)	Grupo 4	1000 mg/Kg	5
Dosis3(extracto seco)	Grupo 5	2000 mg/Kg	5

Grupos de tratamientos:

Grupo 1 Control negativo, Grupo 2 Control positivo, Grupo 3 Dosis 1, Grupo 4 Dosis 2, Grupo 5 Dosis 3

Tabla XVIII. Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratones Balb/c tratado con el con el extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*

TRATAMIENTO	ANIMAL	TOTAL DE EPC	TOTAL DE EPCMN	IG (%EPCMN) ÍNDICE DE GENOTOXIC	IC (EPC/ENC) ÍNDICE DE CITOTOXIC
-------------	--------	--------------	----------------	---------------------------------	----------------------------------

Control	1	1000	3	0,3	0,686
	2	1722	14	0,721	0,727
	3	2000	8	0,4	1,225
	4	1975	11	0,562	1,148
	5	1604	2	0,0995	1,0495
$(\bar{X} \pm DS)$		8301	38	$0,416 \pm 0,24$	$0,967 \pm 0,25$
500 mg/Kg	1	1475	4	0,252	0,77
	2	471	4	0,621	0,67
	3	446	4	0,896	0,57
	4	1881	9	0,51	1,09
	5	904	4	0,11	1,63
$(\bar{X} \pm DS)$		4706	17	$0,442 \pm 0,35$	$1,015 \pm 0,46$
1000 mg/Kg	1	878	8	0,91	0,97
	2	2001	5	0,249	0,915
	3	1750	12	0,685	0,655
	4	1720	3	0,208	0,65
	5	2000	0	0,0	0,88
$(\bar{X} \pm DS)$		8349	28	$0,415 \pm 0,37$	$0,814 \pm 0,15$
2000 mg/Kg	1	880	9	0,6	0,97
	2	2000	12	0,6	0,91
	3	2000	12	0,6	1,145
	4	2009	3	0,149	0,1845
	5	2000	2	0,1	1,17
$(\bar{X} \pm DS)$		8009	29	$0,362 \pm 0,28$	$0,852 \pm 0,46$
Ciclofosfamida	1	2001	33	2,03	1,6
	2	1639	123	6,355	0,288
	3	2022	113	5,627	0,255
	4	1960	163	8,315	0,66
	5	1936	106	5,375	0,445
$(\bar{X} \pm DS)$		9558	538	$5,530 \pm 2,27$	$0,650 \pm 0,56$

EPC:Eritrocitos policromáticos EPCMN: Eritrocitos policromáticos mononucleados
ENC: Eritrocitos normocromáticos

Tabla XIX. Media de colonias revertantes. Razón de mutagenicidad cepa TA 98.

Dosis $\mu\text{g/mL}$	Número de colonias.			
	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉
	20,5	17		
50	12	16,6	0,58	0,96
100	18,6	17,3	0,90	1,01
150	24,4	18,6	1,19	1,09
300	34	18,6	1,65	1,09
500	31	19,6	1,51	1,15

(-S₉) cepa sin activación metabólica (+S₉) cepa con activación metabólica

Tabla XX. Media de colonias revertantes. Razón de mutagenicidad cepa TA 100.

dosis (mg/kg.)	peso inicial $\bar{X} \pm SD$	peso a los 7 días $\bar{X} \pm SD$	peso a los 14 días $\bar{X} \pm SD$
1	251,34 \pm 21,99	270,34 \pm 32,62	255,12 \pm 28,09
2	261,79 \pm 28,62	277,94 \pm 33,46	266,33 \pm 29,58

Tabla XXI. Estudio de secado

Métodos \ Parámetro	Parámetro	Pérdida de peso (%)	Humedad residual (%)
	Tiempo (días)	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
Sombra	15	64,48±0,06	6,81±0,09
Estufa	3	82,02±1,00	5,600±0,06
Sol	4	78,43±1,72	6,33±0,02

Tabla XXII. Algunos parámetros farmacognósticos de las hojas de *Boldoa purpurascens Cav*

Parámetros	Media y límites de confianza (95%)
Pérdida por desecación %	82,02± 1,00
Humedad residual %	5,60± 0,06
Cenizas totales %	41,19±0,55
Cenizas solubles en agua %	34,096 ± 0,66
Cenizas insolubles en HCl %	2,32± 0,04

Tabla XXIII. Cuantificación de algunos metales presentes en las hojas de *Boldoa purpurascens*

ELEMENTOS	MUESTRAS 1 mg/Kg.	MUESTRA 2 mg/Kg
Litio	0,00	0,00
Plomo	< 0,2	< 0,2
Cadmio	< 3,0	<3,0
Hierro	37,3	42,6
Cobre	5,4	7,3
Cromo	<9,3	<9,3
Manganeso	12,0	11,9
Níquel	11,7	6,3
Sodio	1370,0	1432,0
Potasio	79600,0	90741,0
Magnesio	2689,0	3466,0
Calcio	282,3	367,9

Tabla XXIV. Tamizaje fitoquímico de las hojas de *Boldoa purpurascens*

EXTRACTOS	METABOLITOS	DROGA FRESCA	DROGA SECA		
			SOL	SOMBRA	ESTUFA
Etéreo	Ácidos grasos	+	+	+	+
	Coumarinas	-	-	-	-
	Alcaloides	-	-	-	-
	Triterp y esteroides	+	+	+	+
Alcohólico	Resinas	-	-	-	-
	Azúcares reduct.	-	-	-	-
	Saponinas	+	+	+	+
	Triterp y esteroides	+	+	+	+
	Alcaloides	-	-	-	-
	Coumarinas	-	-	-	-
	Taninos y/o fenoles	+	+	+	+
	Flavonoides	+	+	+	+
	Antocianidinas	-	-	-	-
	Quinonas	-	-	-	-
	Glicósidos cardiot	-	-	-	-
	aminoácidos	+	+	+	+
Acuoso	Alcaloides	-	-	-	-
	Taninos y/o fenoles	+	+	+	+
	Azúcares reduct.	+	+	+	+
	Flavonoides	+	+	+	+
	Saponinas	+	+	+	+
	Principios amarg.	-	-	-	-
	Mucílago	-	-	-	-

Frecuencia cm ⁻¹	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7
fracción I	3415,1	2923,8	2855,7	1641,2	1461,8	1109,3	462,1
fracción II	3417,0	2923,9	2854,6	1652,9	1388,7	1077,4	461,1
fracción III	3412,9	2925,3	2857,1	1653,5	1385,2	1076,3	465,2
fracción IV	3390,0	2931,9	1652,9	1389,3	1074,80	669,6	-

Tabla XXV. Bandas fundamentales del espectro IR de la fracciones I, II, III, IV

Tabla XXVI. Tiempos de retención de patrones y las fracciones I, II, III y IV.

MUESTRAS	PICOS	TIEMPO DE RETENCIÓN (min.)
	Rafinosa	14,15
	Sacarosa	16,80
Patrones	Glucosa	19,80
	Fructosa	21,40
	Naringina	40,00
	1	13,68
Fracción I	2	19,36
	3	40,29
	1	13,77
	2	16,83
Fracción II	3	19,51
	4	24,13
	5	25,27
	6	40,8
	1	13,80
	2	16,76
Fracción III	3	19,45
	4	24,14
	5	25,62
	6	28,78
	1	13,93
Fracción IV	2	16,88
	3	19,85
	4	23,99

Tabla XXVII. Corrimientos químicos y constantes de coplamientos en el espectro ^1H RMN de los compuestos 1 y 2

	PROTON	1	2
Aglicona	2',6'	8,05 (d, J 8,6 Hz)	8,09 (d, J 8,67 Hz)
	3',5'	6,91 (d, J 8,6 Hz)	6,95 (d, J 8,67 Hz)
	4'-OH	10,30 (s)	10,30 (s)
	5-OH	12,55 (s)	12,55 (s)
	8	6,90 (s)	6,94 (s)
	OCH ₂ O	6,17 (s)	6,21 (s)
α-L-Arabinosa	1	5,55 (d, J 7 Hz)	
	2	3,50 (m)	
	3	3,38 (m)	
	4	3,38 (m)	
	5	3,61 (dd, J 4,3, 11,5 Hz); 2,99 (t, Σ J 19,7 Hz)	
β-D-Xilosa	1		5,42 (d, J 6,85 Hz)
	2		3,25 (m)
	3		3,29 (m)
	4		3,29 (m)
	5		3,69 (dd, J 4,8, 11,4 Hz) ; 3,01 (d, Σ J 20,6 Hz)
α-L-Ramnosa	1	5,10 (br s)	
	2	3,77 (m)	
	3	3,50 (m)	
	4	3,17 (m)	
	5	3,80 (m)	
	6	0,90 (d, J 6 Hz)	

Tabla XXVIII. Corrimientos químicos en el espectro de RMN ^{13}C de los

compuestos 1, 2 y 7

	CARBON	1 (DMSO-D ₆)	2 (DMSO-D ₆)	7 (CDCl ₃)
Aglicona	2	156,5	156,5	155,0
	3	132,7	133,2	135,7
	4	177,8	177,8	171,9
	5	140,4	140,4	129,7
	6	129,4	129,3	137,8
	7	153,9	153,9	153,2
	8	89,6	89,4	96,1
	9	151,7	151,6	153,2
	10	106,9	106,8	112,9
	1'	120,5	120,5	128,1
	2',6'	130,7	130,7	130,0
	3',5'	115,3	115,2	121,4
	4'	160,3	160,2	152,3
	OCH ₂ O			
α-L-Arabinosa	1	99,3		
	2	77,1		
	3	69,7		
	4	76,8		
	5	66,0		
β-D-Xilosa	1		101,6	
	2		75,7	

	3		73,6	
	4		69,3	
	5		65,8	
α-L-Ramnosa	1	100,7		98,9
	2	70,5		71,1
	3	70,5		68,3
	4	71,8		70,8
	5	68,5		66,7
	6	17,5		16,7
β-D-Glucosa	1			98,8
	2			79,1
	3			74,3
	4			68,4
	5			71,4
	6			61,3
	CH ₃ CO			170,4, 170,3, 170,1 (2 C), 169,7, 169,6, 169,0, 168,8
	CH ₃ CO			21,1, 20,8, 20,7 (3 C), 20,6, 20,5, 20,4

Tabla XXIX . Corrimientos químicos y constantes de acoplamiento en el espectro RMN ¹H de los compuestos acetilados 5, 6 y 7

	PROTON	5	6	7
Aglicona	2',6'	7,99 (d, J 8,21 Hz)	8,01 (d, J 8,22 Hz)	8,01 (d, J 8,7 Hz)
	3',5'	7,24 (d, J 8,21 Hz)	7,24 (d, J 8,22 Hz)	7,20 (d, J 8,7 Hz)
	8	6,83 (s)	6,83 (s)	6,84 (s)
	OCH ₂ O	6,12 (s)	6,13 (s)	6,13 (ABq, ² J 1Hz)
α-L-Arabinosa	1	5,69 (d, J 5,90 Hz)		
	2	3,86 (dd, J 8,40, 5,90)		
	3	5,21 (dd, J 8,40, 6,45) ^a		
	4	4,79 (td, J 6,45, 4,5 Hz)		
	5	3,62 (dd, J 12,33, 4,5 Hz) 3,19 (dd, J 12,32, 6,45 Hz)		
β-D-Xilosa	1		5,58 (d, J 6,4 Hz)	
	2		5,16 (dd, J 8,22, 6,40)	
	3		5,24 (t, J 8,22)	
	4		4,88 (td, J 8,23, 4,57 Hz)	
	5		3,84 (dd, J 11,88, 4,57 Hz) 3,23 (dd, J 11,88, 4,57)	
α-L-Ramnosa	1	4,96 (br s)		4,92 (br s)
	2	5,13 (dd, J 3,33, 1,5 Hz)		5,06 (dd, <2, 3,42 Hz)
	3	5,41 (dd, J 9,98, 3,33 Hz)		5,42 (dd, J 3,42, 10 Hz)
	4	5,06 (t, J 9,98 Hz)		5,03 (t, 10 Hz)
	5	4,41 (dq, J 9,98, 6,26 Hz)		4,42 (dq, J 6,22, 10Hz)
	6	1,03 (d, J 6,26 Hz)		0,91 (d, J 6,22)
β-D-Glucosa	1			5,65 (d, J 7,67 Hz)
	2			3,76 (dd, J 7,7 9,4)
	3			5,30 (dd, J 10, 9,4 Hz)
	4			4,95 (t, J 10 Hz)
	5			3,59 (dt, J 10 Hz, Σ J 6 Hz)
	6			3,97 (dd, J 3,92, 12,4 Hz); 3,92 (dd, J 2,54, 12,4 Hz)

	CH ₃ CO	2,47 (s), 2,38 (s), 2,14 (s), 2,13 (s), 2,05 (s), 2,02 (s), 1,99 (s)	2,47 (s), 2,34 (s), 2,12 (s), 2,06 (s), 2,01 (s)	2,49 (s), 2,33 (s), 2,13 (s), 2,10 (s), 2,05 (s), 2,00 (s), 1,99 (s), 1,88 (s)
--	--------------------	--	--	--

^aApareció como un tripleto no simétrico (J 7,83 y 8,02 Hz)

Tabla XXX. Comportamiento de la diuresis de 4',5-dihidroxi-6,7-metilendioxi-flavona-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosida y el control negativo.

GRUPOS	v. orina mL (p)	Na ⁺ (meq/6h) (p)	k ⁺ (meq/6h) (p)	Cl ⁻ (meq/6h) (p)
7 y 1	0,001	0,001	0,020	0,001
7 y 2	0,001	0,001	0,081	0,001
7 y 3	0,001	0,008	0,043	0,001
7 y 4	0,001	0,003	0,005	0,001
7 y 5	0,001	0,001	0,003	0,001
7 y 6	0,001	0,001	0,043	0,001

Tabla XXXI. Comparación de los valores de volumen de orina de todas las dosis de la flavona y la Furosemida

GRUPOS	VOLUMEN DE ORINA EN 6 h	Na ⁺ meq/6h	K ⁺ meq/6h	CL ⁻ meq/6h
1	9,25	3,50	6,25	3,50
8	6,19	10,50	8,44	10,50
2	10,67	3,50	4,67	350
8	5,13	10,50	9,63	1,50
3	9,50	3,50	5,67	3,50
8	6,00	10,50	8,88	10,50
4	10,75	3,50	5,50	3,50
8	5,06	10,50	9,00	10,50
5	11,17	3,50	5,50	3,50
8	4,75	10,50	9,00	10,50
6	10,75	3,50	7,13	3,50
8	5,06	10,50	8,00	10,50

Tabla XXXII. Relación de los valores de media (\bar{X}) y desviación estándar (SD) de cada parámetro, para los diferentes grupos

Grupos	V. orina mL $\bar{X} \pm SD$	Na⁺ (meq/6h) $\bar{X} \pm SD$	K⁺ (meq/6h) $\bar{X} \pm SD$	Cl⁻ (meq/6h) $\bar{X} \pm SD$
Control (-)	2,90± 0,65	0,08 ± 0,02	0,02 ± 0,09	0,33 ± 0,08
Furosemida	6,42 ± 1,72	0,52± 0,26	0,04 ± 0,02	0,92 ± 0,27
D1=100mg/kg	7,66 ± 1,52	0,13 ± 0,02	0,03 ± 0,09	0,06 ± 0,02
D2=50mg/kg	8,58 ± 0,74	0,13 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,05 ± 0,01
D3=25mg/kg	7,73± 0,69	0,11 ± 0,02	0,03 ± 0,09	0,08 ± 0,04
D4=12mg/kg	8,90 ± 0,53	0,12 ± 0,01	0,03± 0,02	0,08 ± 0,04
D5=6mg/kg	9,65 ± 0,86	0,14 ± 0,02	0,03 ± 0,04	0,10 ± 0,04
D6=3mg/kg	9,03 ± 0,78	0,14 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,09

Leyenda: D1, D2, D3, D4, D5 y D6 dosis de la flavona administrada a los animales
(Compuesto 1)

Leyenda: 8 se denomina al grupo que se le administró la Furosemida
1,2,3,4,5 y 6 dosis de la flavona en estudio (100, 50 25, 12, 6 y 3 mg/Kg
respectivamente)

Tabla XXXIII. Relación de los valores de media (\bar{X}) y desviación

Grupos	1h	2h	3h	4h	5h	24h
	$\bar{X} \pm SD$					
I. Furosemida 4 mg/Kg	5,00±0,71a	6,60±0,89d	9,60±1,14g	11,8±1,48J	12,40±1,52m	19,20±2,95o
II.Hidroclorotiazid 10 mg/Kg	4,20±1,30a	5,20±0,84e	7,80±1,10h	9,00±0,71k	10,0±0,71n	14,00±1,22p
III.Agua destilada	1,40±0,55b	3,80±0,84f	4,80±0,84i	4,80±0,84l	6,00±1,41ñ	9,40±0,89Q
IV. Flavona (25 mg/Kg)	2,20±0,84c	4,40±0,55e	5,20±0,84h	7,40±0,84k	8,40±0,55n	13,00±2,00p
V. Flavona (50 mg/Kg)	3,00±1,22c	5,40±0,89e	7,40±1,34h	8,20±1,30k	9,80±0,84n	14,20±1,10p
VI. Flavona (100 mg/Kg)	4,60±0,55a	7,20±0,84d	9,60±1,14g	12,2±0,84j	12,40±1,14m	18,60±1,14o

Significación estadística a, b, c, d.... q