

**Instituto Superior de Ciencias Médicas  
“Victoria de Girón”**

**Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas**

**Contribución a la farmacología antiinflamatoria de la  
especie *Capraria biflora*, L.**

*Tesis presentada en opción al grado Científico de Doctor  
en  
Ciencias de la Salud*

**MSc. Liliana Vicet Muro**

La Habana  
2009

Instituto Superior de Ciencias Médicas  
“Victoria de Girón”

Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas

**Contribución a la farmacología antiinflamatoria de la  
especie *Capraria biflora*, L.**

*Tesis presentada en opción al grado Científico de Doctor  
en  
Ciencias de la Salud*

**Autor: MSc. Liliana Vicet Muro**

**Tutores**

**Dr.C. Armando Cuéllar Cuéllar**

**Dra.C. Dulce M<sup>a</sup> González Mosquera.**

**Dr. C. Prof. Peter De Witte**

**Asesor**

**Dr.C. Gustavo Sierra González**

La Habana  
2009

*“Las ciencias tienen las raíces  
amargas, pero dulces los frutos”  
Aristoteles*

*A mi familia*

## Agradecimientos

Quisiera agradecer en forma muy especial y con todo mi cariño a mis tutores: Dulce, Cuellar y Peter.

A **dulce** por su disposición, tiempo y por la confianza en momentos difíciles, por la amistad y cariño regalados.

A **Cuellar** por cada consejo oportuno y guía certera, por su ayuda incondicional.

A **Peter** por permitirme un espacio en su laboratorio, por su paciencia, amistad y ayuda.

Al doctor **Gustavo Sierra** por confiar en mí, por cada frase de cariño y aliento, por hacer realidad un sueño.

A **Maite Iyarreta** quien me acompañó en los comienzos. Porque sigue siendo un ejemplo de dedicación, un modelo a seguir.

A **Eli, yane, Dany y Arelys** por la entrega incondicional y las tantas horas compartidas.

A los doctores **Rogelio Cruz** y **Luis Riberón** por la oportuna crítica y sugerencias dadas en la corrección del informe.

Agradezco sinceramente a todos mis compañeros del Departamento de farmacia, a la Dirección y personal de la Facultad, a todos, pues de una u otra manera me ayudaron y acompañaron en este largo camino.

Al proyecto **Vfir** por el apoyo material para la ejecución del trabajo.

A **Maye, Dra Isabel y Dra Maria Elena** y personal Del Instituto "Finlay" por el apoyo brindado, por las frases de aliento, por cada apretón de manos....

A los chicos y chicas de Leuven: "**Thiery y Yohajin**", **Ann Sophie, Mikje, Maria Isabel, Maria Lorena, Anita, Roldan, Nele**..... quienes apoyaron mi trabajo, alegraron mis días y me ayudaron a sentir menos la distancia.

A mi **lisi** pues aun lejos, te sentí a mi lado.

A **Viti**, mi nené, por su ternura y por entender que Mamá, tiene que estudiar.

A **ti, mi amor**, por tu incondicionalidad y tu apoyo, por tus empujoncitos para que no me rindiera...por estar siempre.

A mi **Mami, Papi, negri, ocha** ....., a toda mi familia, por cuidar de mis amores cuando estuve lejos, por cada frase de aliento, por toda la ayuda prestada.

A todos, muchas gracias.

## **SÍNTESIS**

Se comprueba por primera vez, a través de técnicas experimentales, los efectos antiinflamatorio y analgésico de un extracto acuoso obtenido a partir de las hojas de *Capraria biflora* L. Estos estudios justifican de forma científica algunos usos de esta planta en la medicina tradicional. Adicionalmente se establece que a dosis de 2000mg/Kg el extracto acuoso de la planta no manifestó signos tóxicos ni mortalidad en estudios de toxicidad aguda. El biofraccionamiento, empleando una novedosa técnica farmacológica, permitió identificar las principales fracciones activas y comprobar que los flavonoides se encontraron como los compuestos fenólicos mayoritarios. El análisis cromatográfico y espectroscópico por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  permitió identificar la presencia de naringenina, derivados metoxilados de luteolina y apigenina, un derivado glucosilado de apigenina (ácido 7-O- $\beta$ -apigeninglucurónico), un derivado clorofílico (feoforbide) y el manitol, informados por primera vez para la especie. Se identificaron, por cromatografía gaseosa, los ácidos laúrico, palmítico y hendecanoíco. Los compuestos identificados contribuyen a los efectos farmacológicos comprobados en el extracto, y por tanto, justifican el uso de la especie en afecciones inflamatorias. Finalmente, se determinaron los índices farmacognósticos característicos de la droga, que servirán de referencia para la producción de las hojas de esta especie como posible materia prima y la estandarización como droga cruda, para su introducción en farmacopeas y guías nacionales.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>6</b>
1.1. Consideraciones generales sobre el uso actual de las plantas medicinales.	6
1.2. <i>Scrophulariaceae</i>	7
1.2.1. Antecedentes en el estudio químico de la familia <i>Scrophulariaceae</i>	7
1.2.2. Género <i>Capraria</i>	8
1.2.2.1. Principales usos atribuidos a <i>Capraria biflora L.</i>	9
1.2.2.2. Antecedentes en los estudios químicos y biológicos de <i>Capraria biflora L.</i>	10
1.2.2.3. Evaluaciones toxicológicas previas	12
1.2.2.4. Antecedentes de estudios farmacognósticos	12
1.3. Dolor e inflamación	13
1.3.1. Fitoterapia antiinflamatoria	15
1.4. Compuestos fenólicos	18
1.4.1. Flavonoides	18
1.4.1.1. Identificación	19
1.4.1.2. Características espectroscópicas	20
1.5. Consideraciones finales	21
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
2.1. Procesamiento del material vegetal	24
2.1.1. Recolección	24
2.1.2. Estandarización del secado	24
2.1.3. Definición del método de extracción	26
2.2. Evaluaciones preclínicas	26
2.2.1. Evaluación del efecto anti-inflamatorio	27
2.2.1.1. Edema plantar inducido por carragenina	27
2.2.1.2. Peritonitis inducida por carragenina	28

	Pág.
2.2.1.3. Evaluación de la migración leucocitaria en embriones de <i>Danio rerio</i>	29
2.2.1.4. Evaluación del efecto antiinflamatorio por vía oral	30
2.2.2. Evaluación del efecto analgésico	31
2.2.2.1. Inducción de contorsiones con ácido acético	31
2.2.2.2. Prueba del plato caliente	32
2.2.3. Evaluación de la toxicidad aguda del extracto acuoso	32
2.3. Evaluación fitoquímica	34
2.3.1. Obtención del extracto acuoso	34
2.3.2. Fraccionamiento del extracto acuoso	34
2.3.2.1. Metodología 1	34
2.3.2.1.1. Evaluación cualitativa y farmacológica de las fracciones	34
2.3.2.1.2. Aislamiento y purificación de los compuestos mayoritarios presentes en la fracción butanólica FB <sub>1</sub>	34
2.3.2.2. Metodología 2	35
2.3.2.2.1. Evaluación cualitativa y farmacológica de las fracciones	36
2.3.2.2.2. Aislamiento y purificación de los compuestos mayoritarios presentes en la fracción de cloroformo (FC)	36
2.3.2.2.3. Aislamiento y purificación de los compuestos presentes en la fracción de n-butanol (FB <sub>2</sub> )	38
2.3.3. Análisis espectroscópico de los compuestos aislados	38
2.4. Determinación de los parámetros de calidad de la droga obtenida a partir de las hojas de <i>Capraria biflora</i> L.	39
2.4.1. Ensayos cualitativos de identificación del material vegetal	39
2.4.2. Ensayos específicos	39
2.4.3. Otros índices farmagnósticos	41
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
3.1. Procesamiento del material vegetal	43
3.1.1. Recolección	43
3.1.2. Estandarización del secado	44
3.1.3. Definición del método de extracción	47

	Pág.
3.2. Evaluaciones preclínicas	49
3.2.1. Evaluación del efecto anti-inflamatorio	49
3.2.1.1. Edema plantar inducido por carragenina	49
3.2.1.2. Peritonitis inducida por carragenina	53
3.2.1.3. Evaluación de la migración leucocitaria en embriones de <i>Danio rerio</i>	54
3.2.1.4. Evaluación del efecto antiinflamatorio por vía oral	56
3.2.2. Evaluación del efecto analgésico	58
3.2.2.1. Inducción de contorsiones por ácido acético	58
3.2.2.2. Prueba del plato caliente	59
3.2.3. Evaluación de la toxicidad del extracto acuoso	60
3.3. Estudio fitoquímico	63
3.3.1 Metodología 1	63
3.3.1.1. Evaluación cromatográfica de la fracción n-butanol y del crudo	63
3.3.1.2. Aislamiento por cromatografía preparativa (CCDp) a partir del crudo II	65
3.3.2. Metodología 2	65
3.3.2.1. Evaluación química y farmacológica de las fracciones	66
3.3.2.2. Aislamiento y purificación de los compuestos mayoritarios presentes en la fracción de cloroformo (FC)	68
3.3.2.3. Aislamiento y purificación de los compuestos presentes en la fracción de n-butanol (FB <sub>2</sub> ). (Fraccionamiento en columna)	71
3.3.3 Análisis espectroscópico de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	72
3.4. Determinación de los parámetros de calidad de la droga obtenida a partir de las hojas de <i>Capraria biflora</i> L.	80
3.4.1. Ensayos cualitativos de identificación del material vegetal	80
3.4.2. Ensayos específicos	80
3.4.3. Otros índices Farmacognósticos	82
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>85</b>
<b>5. RECOMENDACIONES</b>	<b>87</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## **INTRODUCCIÓN**

Las plantas medicinales son algo más que una nota al pie de la historia médica. El hombre desde tiempos remotos, empleó productos tomados de la naturaleza con el objetivo de curar los males que le aquejaban (Navarro, 1994). A medida que avanzaron las ciencias médicas y de modo particular el conocimiento teórico de la medicina, el uso de estos recursos se fue sentando sobre bases cada vez más científicas y mantiene aún una amplia validez a pesar del poderío y de la competencia de la Química Farmacéutica. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Parlamento Europeo han adoptado resoluciones que ponen de manifiesto la necesidad de racionalizar el empleo de los productos derivados de las plantas medicinales con el objetivo de limitar la prescripción, de aquellos productos de fitoterapia que carezcan de estudios previos para avalar el uso de los mismos, o de plantas de las que no se conocen suficientemente los riesgos de su utilización (WHO, 2000).

El reconocimiento de esta realidad no supone que se abandone la prescripción de las plantas medicinales y sus derivados, pero sí debe conducir al estudio de los remedios tradicionales por métodos científicos. Corresponde a la ciencia moderna conducir adecuadamente el estudio de esta medicina y precisar su eficacia real en cada caso (Harnischfeger, 2002).

En los momentos actuales industrias e instituciones científicas de todo el mundo realizan esfuerzos encaminados a la obtención de fármacos naturales que puedan resultar más que alternativas, terapias complementarias para resolver los problemas de salud que enfrenta la humanidad.

Las enfermedades que involucran procesos inflamatorios presentan una alta incidencia en la población mundial (Feria, 2004), es por ello que la búsqueda de alternativas naturales de tratamiento es un elemento importante en las investigaciones médico- farmacéuticas (Jalil y col., 2003; Okoli. y col., 2006; Laupattarakasem y col., 2006), de manera que puedan sustituirse o disminuir el consumo de los fármacos sintéticos y así, evitar la incidencia de sus efectos adversos.

La investigación en plantas medicinales usadas tradicionalmente como antiinflamatorias o en el tratamiento del dolor es una estrategia viable y lógica en la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios y analgésicos (Gupta y col., 2006). En este sentido, el empleo de las plantas medicinales permite en muchos casos mejorar el proceso patológico y en otros resolverlo sin llegar a producir efectos tóxicos (Cañavate, 1995).

La especie *Capraria biflora*, L., perteneciente a la familia *Schrophulareaceae*, es una planta con una larga historia en la medicina tradicional. Autores de reconocido prestigio como Juan Tomás Roig (Cuba) y Matos Abreu (Brasil), han recomendado el uso de esta planta en afecciones que involucran episodios dolorosos o mediados por inflamación. Basado en dichos efectos una considerable parte de la población latinoamericana incluye el extracto acuoso en sus terapias populares (Roig, 1988; Lans, 2007 a y b; Beira y col, 2004), en baños o lociones en afecciones ováricas y uterinas; en tratamiento de dolores menstruales y recuperación postparto, así como en el mejoramiento de las crisis de asma bronquial (Villar y Villavicencio, 1994), entre muchas otras aplicaciones.

Sin embargo, a pesar del amplio uso de esta planta en dichas afecciones, la literatura carece de informes que validen su uso como fitomedicamento antiinflamatorio o analgésico, por lo que se requiere profundizar en el estudio farmacológico y químico de dicha especie.

Tomando en consideración estos aspectos se propone el siguiente **problema científico**:

En la medicina tradicional la especie *Capraria biflora* L. es empleada como antiinflamatoria y analgésica en diversas afecciones, no existen investigaciones referenciadas que corroboren dichos usos tradicionales para las hojas de esta planta, por lo que es preciso realizar estudios biológicos y químicos que los avalen.

Este trabajo científico parte de la **hipótesis** de que el extracto acuoso obtenido a partir de las hojas de *Capraria biflora*, L. posee los efectos antiinflamatorios y/o analgésicos atribuidos por la medicina tradicional.

Para comprobar dicha hipótesis se plantea el siguiente **objetivo general**:

Realizar la evaluación químico-farmacológica del extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora* L que permita justificar su empleo en medicina tradicional.

A partir de este objetivo general se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

1. Comprobar los efectos antiinflamatorio y analgésico del extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora*, L..
2. Aislar compuestos presentes en extractos de las hojas de la especie que justifiquen el efecto antiinflamatorio de la planta
3. Evaluar índices farmacognósticos para las hojas de *Capraria biflora*, L. que permitan establecer parámetros de calidad.

La **novedad científica** puede ser apreciada en los siguientes aspectos:

El presente trabajo es un aporte al estudio farmacológico y fitoquímico de la especie *Capraria biflora*, L., pues se corrobora, por primera vez, sobre bases científicas las acciones antiinflamatorias y analgésicas del extracto acuoso obtenido de hojas de *Capraria biflora*, L, lo cual puede justificar su uso en la medicina tradicional. De igual manera se comprueba el empleo seguro de este extracto a dosis inferiores a 2000mg /kg de peso.

Se demuestra que los compuestos fenólicos presentes en el extracto acuoso contribuyen al efecto antiinflamatorio y se informa, por primera vez para la especie, la presencia de naringenina, y derivados metoxilados de luteolina y apigenina, así como un derivado glucosilado de apigenina (ácido 7-O- $\beta$ -apigeninglucurónico). Estos compuestos contribuyen a las actividades farmacológicas que se comprobaron para la planta y avalan su uso popular.

Igualmente se determinan algunos índices fármacognósticos que constituyen referencia para una futura estandarización de la producción y control de la calidad de esta droga y permitir una posterior introducción en farmacopeas y guías nacionales, favoreciendo un uso más sostenible de la especie.

La totalidad de los resultados expuestos en este trabajo podrán ser consultados por los profesionales de la salud vinculados al uso de los productos naturales, lo cual contribuirá al uso racional de esta especie botánica, aspecto en el cual radica el aporte práctico y social del presente trabajo.

## **1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1. Consideraciones generales sobre el uso actual de las plantas medicinales.**

El interés actual en la medicina herbolaria y la búsqueda de opciones terapéuticas alternativas tiene sus raíces en una creciente insatisfacción hacia la medicina convencional, tanto por su falta de éxito en algunas enfermedades como por los efectos colaterales que ciertos medicamentos provocan. También influyen el aspecto económico (precios mas bajos de los medicamentos herbolarios) y la tendencia, cada vez mas evidente en ciertos sectores de la población, de reencontrar valores y de adoptar modos de vida mas “naturales” (Casino, 1995).

Las plantas son fundamentales en el desarrollo de la medicina moderna y aunque se conoce que su acción preventiva o curativa se debe a la presencia en sus órganos de sustancias químicas que provocan su efecto fisiológico, en muchas de las plantas medicinales no se han estudiado aún los metabolitos biactivos. La detección de los principios activos es importante pues permite corroborar o rechazar las propiedades atribuidas a la planta y a la vez detectar nuevas posibles aplicaciones. Por otra parte, el conocimiento de los metabolitos facilita la dosificación y en algunos casos la administración, no obstante, existe la tendencia al uso de los extractos o polvos obtenidos de las plantas o sus órganos (Lock de Ugaz, 1988).

Aunque muchas plantas han sido estudiadas y validadas con holgura desde el punto de vista químico biológico, todavía muy poco se conoce de otras, tal es así que de las plantas vasculares conocidas solo el 1 ó 2 % se han investigado en algún aspecto y de las especies reconocidas como medicinales se estudian únicamente el 5 % (Morales, 1996). La industria farmacéutica y buena parte de la comunidad científica esta considerando en nuestros días las plantas medicinales como fuentes potenciales de moléculas bioactivas con estructuras diferenciadas e innovadores

mecanismos de acción y está siendo más flexible en cuanto a la formulación de estos agentes (UNESCO, 1998; Elisabetsky, 2004).

El estudio de los recursos terapéuticos locales desde un enfoque entnofarmacológico es una vía prometedora para encarar el estudio de las especies vegetales con probabilidad de encontrar sustancias farmacológicamente activas. La elaboración de hipótesis de actividad biológica en función de los datos colectados en la medicina popular permite al investigador confirmar una determinada o supuesta actividad biológica en una planta y rastrear dicha actividad hasta encontrar la sustancia responsable de la misma (Rondina y col, 1985).

## **1.2 Scrophulariaceae**

La especie objeto de estudio en este trabajo pertenece a la familia *Scrophulariaceae*, orden *Scrophulariales* (Cronquist, 1981). Esta familia esta compuesta por aproximadamente 220 géneros y unas 3 000 especies. Las plantas suelen ser herbáceas, anuales o perennes, algunas semiparásitarias y en pocas ocasiones árboles. Son caracteres anatómicos, los pelos glandulosos en los que las glándulas están divididas solamente por membranas verticales y los estomas rodeados por tres o mas células epidérmicas. Algunas especies son medicinales y otras muy útiles como ornamentales (Evans, 2000).

### **1.2.1 Antecedentes en el estudio químico de la familia *Scrophulariaceae***

Algunas especies de esta familia han sido muy estudiadas desde el punto de vista fitoquímico. Entre los géneros más conocidos están *Digitalis*, *Verbascum*, *Calceolaria*, *Linaria* y *Veronica*, entre otros (Evans, 2000). De manera general los compuestos que más se informan son saponinas, flavonoides, naftaquinonas y antraquinonas, auronas, iridoides, esteroides y triterpenos, y heterósidos cianogénicos, (Grayer-Barkmeijer, 1973; Taskova y col., 2002; Evans, 2000).

Los alcaloides no son muy comunes, pero se encuentran en algunas especies, particularmente los tipos quinazolina y quinolizidina. Al respecto, investigadores chinos, en años recientes, aislaron un alcaloide nombrado ácido 1,2,3,9-

tetrahydropyrrol (2,1-b) quinazolin-1-carboxílico en la especie *Linaria vulgaris* (Hua y col., 2002).

Sin lugar a dudas el género más estudiado es el *Digitalis*, en particular las especies *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata*; debido a la presencia en sus hojas de heterósidos cardíacos (Krüger y col., 1983 y Oh y col., 2005), también referidos para *D. ciliata*. (Kemertelide, 1965). Este tipo de compuesto es informado además en especies del género *Isoplexis*: *I. isabelliana* (Freitag y col., 1967), *I. chalcantha* (González y col., 1985), *I. canariensis* (Schaller y Kreis, 2006).

Bianco y colaboradores, (2004), informaron la presencia de glicósidos iridoides en la especie *Linaria capraria* Moris.: un derivado 6'-O-senecioil, y un derivado 6'-O-angeloil. Otros iridoides como el glicósido nombrado genestifoliosido fue aislado de *Linaria genestifolia* (Ahmad y col., 2006) también informado en el género *Verónica* por Albach y colaboradores en el 2003.

La presencia de flavonoides parece ser muy común en esta familia, destacándose los trabajos publicados por Nikolova y Asenov, en el 2006 y Saracoglu y colaboradores en el 2004 en especies del género *Veronica*. Otras investigaciones relacionadas describen la presencia de estos metabolitos en *Veronica liwanensis* y *Veronica longifolia*, *Veronica linariifolia* Pall. Ex Link sub. *Dilatata* (Ma y col., 1991). También se han informado en el género *Linaria*, específicamente flavonas y derivados (Tundis y col, 2005).

Investigadores de la Universidad de Naples, en Italia, por su parte, refieren el aislamiento del flavonoide 7-O- $\beta$  glucósido -luteolina a partir del extracto alcohólico de las flores de *Verbascum sinutum* (Senatore y col., 2007), así mismo se refiere por Doo-Youn Choi y colaboradores (2005) la presencia de Chrysoeriol, un flavonol, con actividad antioxidante y antiinflamatoria en las hojas de *Digitalis purpurea*.

### **1.2.2 Género *Capraria*.**

El género *Capraria* al que pertenece la especie *Capraria biflora* es de los menos conocidos y poco abordados en la literatura especializada. Las plantas de este

género se utilizaron como bebida por los aborígenes americanos al igual que por los pobladores de origen europeo (Edwin, 1971).

La especie *Capraria biflora*, L. en particular es usada como té de hierbas (Tanaka, 1976; D'Arcy, 1979; Morton 1981) y algunos autores le atribuyen una acción análoga al té de China (Edwin, 1971; Ideker, 1996) y es la única de su género a la que se le confieren usos medicinales.

Esta planta se conoce en nuestro país por varios nombres, en la zona central como escabiosa o esclaviosa, como magüiro o magüira en Vueltarriba y Vueltabajo y majuito en la parte occidental. En Camagüey algunos le llaman magüiro y otros le dicen viuda (Roig, 1988). Es conocida por otros nombres en otros países del área caribeña, como té del país en Puerto Rico, escobo en Colombia, en México es conocida como claudiosa; coat-weed en EUA y Jamaica (Morais y col., 1995), fregosa en Venezuela; en Martinica se conoce como the d'Amérique; the du pays en Guadalupe y chá-de-Calcada en Brasil (Matos, 1994).

#### **1.2.2.1 Principales usos atribuidos a *Capraria biflora*, L.**

La medicina Natural le ha atribuido muchos usos medicinales a esta especie, así por ejemplo, Roig (1988), la reconoce como tónico digestivo, antidiarreico, útil en las neumatosis y como astringente en las heridas; en baños o loción en afecciones ováricas y uterinas; en tratamiento a recién paridas, en la leuco y gonorrea, y en la diabetes. Delens y colaboradores (1992) la informan para el tratamiento de la fiebre provocada por la malaria y Morais y colaboradores (1995) como sudorífica, febrífuga y en afecciones del tracto urinario. Las hojas son usadas además para aliviar algunos desordenes dérmicos, como escabiosis y escozor (Craveiro y col., 1984). También se refiere su uso en el tratamiento de dolor de oído, hemorroides, reumatismo y procesos inflamatorios (Scofield, 2002). Es importante comentar que en ninguno de los casos se ha comprobado de forma experimental ninguna de estas acciones farmacológicas.

En Perú se emplea para el tratamiento del asma bronquial como planta sintomática por su acción como descongestionante local y disminución del estado de ansiedad,

permitiendo un mejor efecto terapéutico de otras plantas curativas o de sostén (Villar y Villavicencio, 1994). En Brasil, se preparan tinturas antisépticas, a partir de la raíz, que se aplican en forma de compresas y lavados como tratamiento local y preventivo en heridas infectadas (Matos, 1994). El efecto antibiótico manifestado por los extractos de la raíz y por la biflorina en particular; ha sido estudiado a profundidad por científicos brasileños. En Jamaica es empleada para el tratamiento de la fiebre, la influenza e indigestiones (Mitchell y Ahmad, 2006).

De los usos reportados para la *Capraria biflora*, L., podemos inferir que la especie posee un fuerte potencial como posible planta antiinflamatoria y analgésica, lo cual deberá ser comprobado experimentalmente en aras de justificar estos usos en la medicina tradicional

#### **1.2.2.2 Antecedentes de estudios químicos y biológicos de *Capraria biflora*, L.**

Los primeros trabajos fitoquímicos se desarrollaron por Gongalves de Lima en 1954, al aislar a partir de las raíces de la planta, un principio activo con actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas y otros gérmenes. La sustancia denominada biflorina, se identificó como una naftoquinona, a través de técnicas espectroscópicas (Prelog y col, 1958; Comin y col., 1963). Numerosos estudios se realizaron en estos años mejorándose la pureza del compuesto e incrementando el número de microorganismos testados (Gongalves de Lima y col., 1954; Gongalves de Lima y col., 1958; Gongalves de Lima y col., 1962).

Otras investigaciones desarrolladas con esta molécula permitieron verificar la actividad citotóxica y el potencial antioxidante de la biflorina tanto in vitro (Vasconcellos y col., 2005) como in vivo (Vasconcellos y col., 2007). Se demostró además que esta molécula era capaz de incrementar la respuesta lograda por el 5-Fluorouracil (5-FU) inoculado en modelos de tumores, lo cual demostró que la biflorina actúa como un agente inmunoadyuvante

Debemos añadir que aunque su presencia es rara en otras especies, esta naftoquinona no resulta exclusiva del género *Capraria* pues ha sido informada para la especie: *Syzygium aromaticum* o clavo (Cai y Wu, 1996) también conocida bajo el

nombre de *Eugenia caryophyllata* (Kim y col., 2001) perteneciente a la familia *Myrtaceae*.

Otros reportes fitoquímicos señalan la identificación de una estructura dimérica de la biflorina, nombrada bis-biflorina (Fonseca y col., 2003), para la cual no se informan estudios relacionados con una posible actividad biológica.

Por otra parte, en una investigación desarrollada por Heinrch y Rimpler (1989), se informó la presencia de dos iridoides, Harpagide y 8-o-Benzoylharpagide, en las partes aéreas de *Capraria biflora*, L., lo cual refuerza la presencia de este tipo de metabolito en la familia Schrophulareaceae y la posibilidad de utilizarlos como marcadores quimiotaxonómicos.

En 1995, Morais y colaboradores, reportaron la presencia de compuestos tipo taninos, en abundancia en los extractos acuosos de la planta, aunque no se informaron las características estructurales de los mismos.

En otro estudio realizado en el año 2000 en el Departamento de Química de la Universidad de Indias Occidentales (Jamaica), Collin y colaboradores, informaron el aislamiento de cuatro compuestos de estructura sesquiterpenoide, a partir del extracto de n-hexano de las partes aéreas de *Capraria biflora*, L.. Dos de estos compuestos, nombrados caprariolides, presentaron acción insecticida, dosis dependiente, frente al *Cylos formicarius elegantulus*, conocido como el gorgojo del boniato.

Recientemente, Fonseca y colaboradores (2006) realizaron la evaluación del aceite esencial obtenido por hidrodestilación de las hojas de esta especie. La caracterización se realizó por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. En el estudio se demostró la presencia de 9 compuestos, siendo los sesquiterpenos  $\beta$ -caryofileno y el  $\gamma$ -muroleno, los componentes mayoritarios del aceite volátil.

Es importante destacar que la presencia en la planta de las moléculas citadas en este epígrafe, no explican la totalidad de los usos de *Capraria biflora*, L. en la

medicina popular, particularmente sus acciones en enfermedades mediadas por el dolor o la inflamación, lo cual justifica el desarrollo de la presente investigación.

### **1.2.2.3. Evaluaciones toxicológicas previas**

No se dispone en la literatura de información precisa sobre la toxicidad de esta especie, y aunque se informa que dosis elevadas de extractos de *Capraria biflora* L. pueden producir debilidad general, sueño, rigidez y hasta parálisis muscular (Roig, 1988) manifestándose una especie de embriaguez con vértigo, pero no se refieren estudios científicos que confirmen uno u otro efecto. Al respecto Guzman (1975) y Morton (1981) atribuyeron estos efectos a una posible acción depresora sobre el Sistema Nervioso Central, aunque en ninguno de los casos se estima la dosis tóxica. Todo lo cual sugiere que para aseverar dichos efectos secundarios se deben realizar estudios que permitan comprobar la acción sobre dicho sistema.

Resulta interesante destacar que ninguno de estos efectos se detectaron en las encuestas etnobotánicas realizadas a esta especie (Beira y col., 2004; Lans, 2007 a,b,c ).

### **1.2.2.4. Antecedentes de estudios farmacognósticos**

Los antecedentes de la evaluación farmacognóstica de las hojas de esta especie no se encuentran bien fundamentados, solo se dispone de un estudio efectuado por el departamento de Química Analítica de la Universidad Federal de Ceará, Brasil, en el cual Morais y colaboradores (1995), informaron los resultados del análisis de 5 plantas medicinales brasileñas donde se incluyó la especie *Capraria biflora*, L.. La investigación estuvo orientada en dos direcciones: la determinación de cenizas procedentes de la planta fresca y la valoración de la composición inorgánica de los extractos obtenidos por decocción de las especies frescas. Se informan los estudios de humedad y determinación de taninos como principal metabolito, pero debe destacarse que ambos análisis son imprecisos, pues en el primero se parte de la droga fresca para determinar el porcentaje de humedad y no se sigue el procedimiento establecido en las farmacopeas internacionales, la metodología utilizada no informa el porcentaje de humedad, solo el contenido de agua presente en el material vegetal,

lo cual no brinda una completa información sobre la calidad de la droga, en el segundo caso no se especifican los detalles en cuanto a condiciones del ensayo que permitan la repetibilidad del método propuesto para el control de la calidad de la droga. Los valores informados en la determinación de las cenizas totales también resultan no confiables pues igualmente son referidos a determinaciones realizadas con las hojas frescas.

### **1.3. Dolor e inflamación.**

El proceso inflamatorio es complejo e involucra una serie de fenómenos que pueden ser desencadenados por varios estímulos, entre los que se incluyen factores endógenos (necrosis tisular o rotura ósea) o factores exógenos como lesiones por agentes mecánicos (corte), físicos (quemaduras, radiaciones, frío, calor), químicos (corrosivos, venenos, toxinas), biológicos (bacterias, virus, parásitos, hongos) e inmunológicos (reacciones de hipersensibilidad) (Feria, 2004).

Estos estímulos activan al sistema macrofágico y en pocas horas los macrófagos comienzan a fagocitar los tejidos destruidos (Guyton, 2006). Otras sustancias endógenas como los autocoides, también están implicadas en la respuesta inflamatoria. Se forman a partir de ácidos grasos poli-insaturados de veinte átomos de carbono, principalmente ácido araquidónico, y agrupan: prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), leucotrienos (LTs), tromboxanos (TXs) y los fosfolípidos modificados, representados por el factor activador de plaquetas (FAP) (Campbell y Halushka, 1996).

Estos autores plantean que los eicosanoides son prevalentes y han sido detectados en casi todos los tejidos del cuerpo, su producción aumenta en respuesta a varios estímulos provocando diversos efectos biológicos y sus precursores están ampliamente distribuidos por todo el organismo. El ácido araquidónico esterifica a los fosfolípidos de las membranas celulares y a otros lípidos complejos. Las hormonas y otras sustancias aumentan la biosíntesis de los eicosanoides interactuando, probablemente, con receptores ligados a la membrana plasmática, que están acoplados a proteínas reguladoras ligadas al GTP (proteína P). Algunos estímulos

físicos parecen causar un flujo de calcio alterando la membrana celular y de esta forma, activando la fosfolipasa A<sub>2</sub>, con posterior liberación de ácido araquidónico donde una parte es metabolizada rápidamente vía ciclooxigenasas, lipooxigenasas o citocromo P-450. La ciclooxigenasa (COX) posee dos isoformas: COX-1 y COX-2. La COX-1 se expresa constitutivamente por la mayoría de las celulares, mientras que la COX-2 no es encontrada en condiciones normales sino que puede ser inducida por algunos factores séricos: citocinas y factores del crecimiento. Algunos autores describen la existencia de una tercera isoforma, COX-3, la cual no parece estar involucrada en procesos inflamatorios (Esplugues y Barrachina, 2004).

La PGE<sub>2</sub> y la PGI<sub>2</sub> aumentan la formación del edema y la filtración leucocitaria, además potencian la actividad algésica de la bradicinina y de otros autocoides. La acción de las PGs es consecuencia de su interacción con diversos receptores específicos localizados en las membranas celulares y asociados a proteínas G, (Coleman y col., 1994).

La 5-lipooxigenasa posibilita la síntesis de los leucotrienos, particularmente el leucotrieno (LTB<sub>4</sub>) ejerce una poderosa acción quimiotáctica que favorece la concentración de neutrófilos, su degranulación, agregación y adherencia a las paredes postcapilares y produce además hiperalgesia. Los LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> aumentan la permeabilidad vascular y la exudación plasmática. Los receptores de los leucotrienos admiten un receptor común LTD<sub>4</sub>/LTE<sub>4</sub>, su activación estimula la fosfolipasa C modulando la producción de inositolfosfato con la movilización de Ca<sup>2+</sup> y la génesis de metabolitos del ácido araquidónico con funciones de segundos mensajeros intracelulares (Esplugues y Barrachina, 2004;).

Los nociceptores poseen receptores para muchas de estas moléculas modificando la actividad de las neuronas primarias, activándolas directamente o disminuyendo su umbral de respuesta (sensibilización periférica). Los cambios ocurridos en la actividad de las neuronas primarias, sumado a modificaciones en su perfil bioquímico dan inicio a una serie de cambios en las sinapsis espinales, generando una hiperexcitabilidad de las neuronas del asta dorsal (sensibilización central) lo cual

contribuye en muchos casos a la persistencia del dolor en procesos inflamatorios (García y col., 2001).

### **1.3.1. Fitoterapia antiinflamatoria**

Muchas especies vegetales usadas tradicionalmente dadas las propiedades antiinflamatorias y analgésicas, han sido objeto de investigaciones en los últimos años, en aras de evaluar sus usos tradicionales y descubrir los metabolitos responsables de tales acciones. En la literatura se informa el empleo de muchas preparaciones galénicas obtenidas de plantas que tienen efecto antiinflamatorio y analgésico, haciendo especial énfasis dentro de estas, a extractos acuosos o infusiones que poseen compuestos fenólicos en su composición química (Vanacloxta y col., 2003 ; Borgi y col., 2007; Akindele y Adeyemi, 2007; Clavin y col., 2007).

El efecto antiinflamatorio demostrado por estos compuestos, especialmente flavonoides, puede atribuirse a su capacidad antioxidante así como a la inhibición de las enzimas lipoxigenasa y cicloxigenasa responsables de la síntesis de eicosanoides, altamente implicados en los procesos inflamatorios. Las antocianinas, resultan buenas captadoras de radicales, inhiben la peroxidación lipídica al igual que los antocianócidos (Wagner, 1985). Estas propiedades refuerzan en gran medida las propiedades antiinflamatorias. Tras la migración leucocitaria hay una degranulación que libera proteasas de los lisosomas y producen un aumento de oxígeno, iniciando la generación de radicales oxigenados, los cuales junto a las proteasas actúan destruyendo los organismos fagocitados. Pueden tener una acción nefasta cuando se rompe el equilibrio entre la producción y la utilización, pues las elastasas pueden destruir las fibras elásticas y los radicales libres dañar las membranas celulares por peroxidación lipídica. Por ello, la acción de los compuestos fenólicos puede bloquear indirectamente la propagación de radicales libres, reforzando la acción anti-proteasa directa de inhibición de la enzima (Cañavate, 1994).

Existen muchos ejemplos que demuestran con evidencia experimental el papel de estos metabolitos en el efecto antiinflamatorio comprobado para varias plantas medicinales, entre ellos están las investigaciones desarrolladas con algunos

flavonoides diméricos (biflavonoides) como el diinsinínol (Ogundaini y col., 1996), kaempferol y su derivado 3-O-glucósido (Parveen y col., 2007). Las flores de *Arnica montana* (Asteraceae) contienen quercetrina-3-O-glucósido, luteolina-7-O-glucósido y kaempferol-3-O-glucósido entre otros flavonoides, justificando el uso de esta droga como antiinflamatorio de uso externo (Mackinnon, 1992 y Jiménez, 1994), *Calendula officinalis* (Asteraceae) es otro ejemplo de planta medicinal usada como antiinflamatoria que contiene glicósidos de iso-ramnetina y quercetina con comprobada acción farmacológica (Jiménez, 1994, Fonnegra y Jiménez, 1999).

Un estudio desarrollado por Manga en el año 2004, permitió explorar a través de un ensayo biodirigido la actividad antiinflamatoria de extractos acuosos y metanólicos obtenidos a partir de hojas de *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae). El estudio pudo relacionar la actividad de la mayor parte de las fracciones activas a la presencia de quercitrina y quercetina determinadas por Cromatografía de Capa Delgada (CCD).

Investigadores del Hospital militar Central "Dr. Luis Díaz Soto" evaluaron el efecto antiinflamatorio del flavonoide 2"-O-ramnosil 4"-O-metil vitexina, aislado de las hojas de *Piper ossanum*. La dosis ensayada en inflamación crónica en ratas resultó muy activa, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el flavonoide y el piroxicán utilizado como control positivo (Martínez y col., 2004).

En el año 2005 investigadores chinos determinaron, por primera vez, la presencia de procianidinas en partes no comestibles de *Nelumbo nucifera Gaertn*, en dicho estudio también demostraron la actividad antioxidante e inhibitoria de lipoxigenasa de las procianidinas aisladas (Ling, 2005), las cuales han sido identificadas también en la decocción de cortezas de *Uncaria tomentosa*, popular droga antiinflamatoria conocida como uña de gato (Gonçalves y col., 2005).

Otros metabolitos que pueden contribuir también a los efectos antiinflamatorios y analgésicos, son los esteroides, sobre todo en forma heterosídica. Algunos de estos compuestos actúan por un mecanismo corticosteroide, actuando directamente a nivel del receptor citosólico de la hormona o interfiriendo la transcripción del mensaje genético (Rodríguez, 2002)

De las cumarinas se puede destacar a la wedelolactona, principio aislado de *Elipta alba* y *Wedelia calendulacea*, con una actividad antiinflamatoria similar al ácido nordihidroguayáretico, fármaco de referencia como inhibidor de la 5-lipooxigenasa (Handa, 1992).

Existe otro grupo de plantas que poseen compuestos con cierta analogía estructural con el ácido araquidónico. En este grupo se incluyen inhibidores de la ciclooxigenasa como los gingeroles obtenidos de *Zingiberáceas*, urushiol aislado de *Toxicodendron radicans*; cardenoles y cardanoles aislados de *Schinus terubinthifolius* y *Anacardium occidentale*; espilantol aislado de *Spilanthes olerancea* y dodecatetraenoil-isobutilamida de *Echinacea purpurea* y como inhibidores duales a la capsaicina de *Capsicum annuum*, se obtienen valores in vitro comparables con la indometacina y el ácido nordihidroguayáretico (Cañavate, 1994).

Entre los compuestos que inhiben la vía clásica del complemento están los ésteres del ácido caféico: clorogénico e isoclorogénico; los triterpenos: ácido- $\beta$ -boswélico de *Boswellia serrata* (incienso) y ácido glicirretínico, que actúa además por un mecanismo corticomimético al inhibir el metabolismo de las hormonas fisiológicas y actuar sobre el metabolismo del ácido araquidónico. Otros triterpenos activos son la aescina de *Aesculus hippocastanum*, y saikosaponinas de *Bupleurum falcatum* y otras especies, con acción mixta (Cañavate, 1994).

También se destacan las lactonas aisladas de *Arnica*, *Eupatorium* y *Tanacetum* especies, que actúan a nivel de proteincinasa C (PKC), enzima que incrementa la actividad PLA<sub>2</sub>. Estos compuestos también pueden actuar como antirreumático por un mecanismo supresor sobre linfocitos (Barnes y Adcock, 1993).

Según los antecedentes bibliográficos mencionados, los compuestos fenólicos en general y los flavonoides en particular se encuentran entre los metabolitos secundarios presentes en esta familia botánica mas vinculados con las principales acciones farmacológicas atribuidas a esta especie, por ello se considera necesario abordar algunos aspectos relacionados con el estudio químico de esta familia de compuestos.

## **1.4 Compuestos fenólicos**

### **1.4.1. Flavonoides**

Los estudios con flavonoides aparecen muy bien representados en la literatura especializada, fundamentalmente, dirigidos a la identificación, evaluación y validación de técnicas que pueden ser utilizadas para el control de la calidad de drogas que los contienen. Las técnicas cromatográficas son las más referidas pues permiten separar las sustancias o aislarlas de un medio más o menos complejo, lo cual las hace muy ventajosas tanto en el análisis cualitativo como cuantitativo. La gran variedad estructural de estos metabolitos explica el amplio espectro que describe la literatura en cuanto a condiciones cromatográficas establecidas (British Pharmacopoeia, 2004).

Los flavonoides pueden extraerse satisfactoriamente con disolventes en frío o en caliente, tanto de muestras frescas como secas. Los disolventes de elección para la extracción son generalmente 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 cuando se trata de material fresco (Cody, 1982; Cimanga e Hisham, 1998) y mayor para las muestras secas (Lock de Ugaz, 1988), es bastante común el uso del agua como disolvente, especialmente para el caso de glicósidos muy polares. Los aglicones de los flavonoles y flavonas son raramente encontrados como constituyentes internos de los vegetales (Harbrone, 1982), ellos son frecuentemente localizados sobre las superficies externas de hojas (Harborne 1988). Esos flavonoides tienden a ser menos polares, especialmente cuando están metilados o acilados y requieren disolventes menos polares para su extracción, tales como el éter, hexano y diclorometano. Los extractos obtenidos se evaporan y se le realizan particiones sucesivas con éter etílico, acetato de etilo, cloroformo y n-butanol entre otros disolventes. Los flavonoides menos polares quedan en la fase etérea, los medianamente polares en la fase acetato de etilo o cloroformo y los más polares en la de n-butanol. Para el análisis por CCD de las agliconas se utilizan frecuentemente mezclas de n-hexano/acetato de etilo y cloroformo/acetato de etilo en diferentes proporciones. Desde el punto de vista de aislamiento y purificación a la cromatografía

en columna y la cromatografía en Capa delgada le corresponde el mayor porcentaje de publicaciones, seguida de la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE), siendo las condiciones propias de la cromatografía en fase reversa las más representadas ya sea C<sub>8</sub> ó C<sub>18</sub>, empleando usualmente como disolventes las mezclas de metanol/ ácido acético/ agua, metanol/ agua/ácido fórmico, acetona/ ácido acético/ agua en gradientes o en modo isocrático (Markhan, 1989 )

Para el aislamiento de los flavonoides es usada con mucha frecuencia la cromatografía en columna, utilizando celulosa microcristalina o gel de sílice (tamaño de partícula 0,06-0,03 y como fases móviles metanol: ter-butanol: ácido acético: agua, n-butanol: ácido acético: agua; se recomienda también como sistema de elución las mezcla cloroformo y acetato de etilo, benceno y metanol, entre otras como diclorometano/ metanol/ agua; acetato de etilo: metanol, en dependencia de la polaridad que muestren los componentes a separar. También es usada la poliamida, utilizando en este caso como eluyentes metanol: ácido acético: agua, agua: n-butanol: acetona: dioxano y tolueno: hexano: metiletilcetona: metanol. Son empleadas con mucha frecuencia el sephadex LH-20, amberlite XAD-7 y lichroprep RP-18 (Lock de Ugaz, 1988; Markan, 1989.). Un amplio número de combinaciones empaques/ disolventes han sido reportadas en la literatura para el estudio de flavonoides (Kingston, 1979; Daigle y Conkerton, 1983)

#### **1.4.1.1. Identificación**

Como características generales se observan: la solubilidad en disolventes polares, su carácter fenólico y la intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados.

Existen muchas técnicas para identificar a los flavonoides, entre ellas se encuentran las reacciones de coloración y precipitación, espectrofotometría ultravioleta, espectrofotometría infrarroja, espectrometría de masas, difracción de rayos X, y resonancia magnética nuclear, entre otros. Una de las reacciones de coloración más referida es la reacción de Shinoda, de la que resultan coloraciones características según el tipo de núcleo de los flavonoides (Miranda y Cuéllar, 2000) y la reacción con

tricloruro de aluminio y 2,4-Dinitrofenilhidrazina (2,4 D) por formación de complejos estables con colores mas o menos especificos para diferentes tipos de flavonoides (Salamanca, 2007) y con marcada absorción en la región ultravioleta visible que permiten su identificación (Mabry y col., 1970; Lock de Ugaz, 1988; Miranda y Cuéllar, 2000 ).

#### **1.4.1.2. Características espectroscópicas**

La espectroscopía de absorción ultravioleta visible es ampliamente usada para 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 características para cada tipo de flavonoide. Los espectros UV de los flavonoides registrados fundamentalmente en metanol presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos. El rango general de lectura se localiza a longitudes de onda entre 210 y 500 nm (Mabry y col., 1970).

Las flavonas y flavonoles muestran dos bandas definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoílo, y la banda II, entre 250-280 nm debido al anillo aromático A (funcionalidad benzoílo), aunque a veces se observan otras bandas de absorción. La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas la muestran en 310-350 nm, los flavonoles 3-O-sustituídos en 330-360 nm, y los flavonoles en 350-385 nm. La presencia de hidroxilos fenólicos en diferentes posiciones de la molécula puede establecerse estudiando el comportamiento del espectro UV metanólico al añadirle los denominados reactivos de desplazamiento: metóxido de sodio (NaOMe), acetato de sodio (NaOAc), cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) con y sin HCl, y ácido bórico ( $H_3BO_3$ ). Las flavanonas, isoflavanonas y flavanonoles presentan desplazamientos batocrómicos en la banda II (Lock de Ugaz, 1988)

Aunque para el caso de los flavonoides la Espectroscopía infrarroja no es muy aplicada debido a que estos espectros resultan menos informativos que los UV-VIS y requieren mayor material, existen algunas absorciones características pueden

resultar útiles, como la absorción C=O entre 1680 y 1640, aromáticos entre 1600 y 1500 y la de OH quilatado (o hidroxiketona) a 3500-3200 (Lock de Ugaz, 1988). El espectro infrarrojo aporta datos adicionales de la mayoría de los compuestos orgánicos y puede dividirse en dos partes: las bandas de vibración de sustituyentes específicos entre 1300 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  y las bandas de vibración del esqueleto hidrocarbonado (C-C y C-H) entre 650 y 1400  $\text{cm}^{-1}$ . En el análisis espectral, la zona entre 1400 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  es de gran utilidad. Las bandas entre 1650 y 1800  $\text{cm}^{-1}$  indican C=O y según el valor exacto, puede interpretarse la situación del carbonilo; la presencia de dobles enlaces (aislados o conjugados) y de sistemas aromáticos; los distintos tipos de sustitución sobre anillos bencénicos.

La Espectrometría de Masa también desempeña un papel importante en la determinación de la estructura de los flavonoides. Resulta muy ventajosa sobre todo por la baja cantidad de muestra necesaria para el análisis. Deben ser considerados al utilizar este método los pesos moleculares para los grupos básicos y el incremento de determinadas unidades si se trata de grupos hidroxilos, metoxilos y azúcares como principales sustituyentes (Lock de Ugaz, 1988).

La resonancia magnética nuclear se señala como una técnica de caracterización estructural de valor indiscutible. Los disolventes comúnmente empleados en la realización del espectro protónico son acetona- $\text{d}_6$  (2,05 ppm), cloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ) (7, 25 ppm), dimetilsulfóxido- $\text{d}_6$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ) (2,5 ppm), metanol- $\text{d}_4$  ( $\text{CDOH-d}_4$ ) (3,35 ppm) y piridina- $\text{d}_5$  (7,0; 7,35 y 8,5 ppm). Complementariamente el espectro de RMN de carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) ofrece el número y el entorno de los átomos presentes en la estructura, así como la identificación de las uniones entre los carbonos de la estructura y los azúcares que puedan estar presentes como sustituyentes en formas glicosídicas.

### 1.5. Consideraciones finales

No se han realizado estudios químicos sobre la especie *Capraria biflora* L. que validen su uso tradicional como antiinflamatorio.

Las principales aplicaciones etnomédicas de la planta refieren el uso de la decocción o infusión de las hojas como antiinflamatoria y analgésica y estas no se encuentran debidamente fundamentadas.

La presencia de flavonoides en la familia *Schrophulareaceae* resulta común, lo cual sugiere una posible presencia de estos metabolitos en el género *Capraria*, esto pudiera justificar el uso de la especie como antiinflamatorio y/o analgésico.

Los flavonoides pueden ser aislados de extractos 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. Empleando para su purificación la cromatografía sobre sephadex LH-20 y la cromatografía líquida de elevada eficacia en fase reversa (RP-18).

La utilización de las hojas como droga para la producción de medicamentos puede permitir un uso más sostenible de la especie.

Considerando estos antecedentes se estima recomendar el estudio químico y biológico de extractos provenientes de las hojas de esta especie como antiinflamatorio y analgésico.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Reactivos empleados en el trabajo experimental**

Los reactivos empleados en las diferentes fases experimentales se relacionan a continuación: n-butanol, cloroformo, isopropileter, metanol, tricloruro de aluminio (*Merck*); Acetato de etilo, hesperitina, hesperidina, naringenina, naringina, rutina, quercetina (*Acros organic*); amoniaco (*Panreac*); ácido acetilsalicílico, sulfato de morfina, carragenina, indometacina (*Sigma*); sulfato de sodio anhidro (*ANALAR*); ácido sulfúrico, anisaldehido, etanol absoluto, dimetilsulfoxido, ácido acético glacial. En todos los casos se consideraron las especificaciones de calidad (puro para análisis, calidad espectroscópica) según correspondiera a cada caso.

### **2.1. Procesamiento del material vegetal**

#### **2.1.1. Recolección**

La recolección del material vegetal se realizó en horas tempranas de la mañana, en áreas cercanas a la Universidad Central de las Villas, en el mes de Febrero del 2002; las partes aéreas se trasladaron en bolsas de nylon hasta el laboratorio de Farmacognosia y Química Farmacéutica donde se lavaron con abundante agua potable y se procedió a la selección de las hojas como material de interés. Previo al procesamiento del material, se realizó la comprobación botánica de la especie por el Dr. Cristóbal Ríos Albuerne, especialista en Taxonomía Vegetal del citado centro de estudios. Ejemplares de la planta se compararon con muestras identificadas en el herbario localizado en el Jardín Botánico de la citada institución, bajo el número 08132.

#### **2.1.2. Estandarización del secado**

**Métodos:** El secado se realizó por tres vías: a la sombra en bandejas metálicas cubiertas de papel de filtro sobre las cuales se esparcían las hojas; al sol utilizando

bandejas esmaltadas cubiertas por rejillas metálicas bien finas y mediante calor artificial utilizando estufa, *Thelco ® modelo 70*, y extendiendo las hojas en capas delgadas sobre bandejas metálicas a 30°C, según reportó Claus en 1985. El registro de secado se siguió con una frecuencia de 24 horas entre una pesada y otra para el caso de la sombra; de 5 horas para el sol y de 12 horas para la estufa hasta obtener peso constante, en todos los casos el material se removió varias veces para evitar fermentaciones o contaminaciones microbiológicas. Las mediciones se realizaron en balanza técnica monoplano, *Sartorius*. En todos los casos se realizaron tres réplicas para cada lote.

Una vez logrado peso constante en cada uno de los lotes, el material se trituró, de forma independiente, en un molino de cuchillas, *Retsch GmbH 5657 tipo SR-2*, utilizando un tamiz de 0.75 mm.

**Parámetros evaluados:** Para la estandarización del secado se evaluaron los siguientes parámetros: aspecto de la droga, tiempo de secado, humedad residual, esta última según metodología descrita en la Norma Ramal De Salud Pública (NRSP) #309, 1992.

La composición química de cada lote se evaluó cualitativamente siguiendo la técnica establecida para el tamizaje fitoquímico por Miranda y Cuéllar en el año 2000. Se utilizó la maceración como metodología de extracción y se empleó de manera sucesiva tres disolventes de diferente polaridad: éter etílico, etanol y agua destilada, macerando durante 48 horas para cada disolvente. Se realizaron los ensayos para los grupos de metabolitos fundamentales establecidos para cada disolvente, realizando tres réplicas en cada caso.

Adicionalmente cada extracto se evaluó en CCD empleando las siguientes condiciones: gel de sílice 60 (Merck, 0.25 mm) y cloroformo, EtOAc: MeOH: H<sub>2</sub>O (7:2:1 v/v), nBuOH: CH<sub>3</sub>.COOH: H<sub>2</sub>O (4:1:5, v/v/v, fase superior) como fase móviles para los extractos etéreos, alcohólicos y acuosos respectivamente. Los cromatogramas se examinaron bajo luz UV254 nm y UV366 nm previo al revelado con ácido sulfúrico 20% / Metanol (revelador universal), tricloruro de aluminio 1% en etanol visualizado a 365 nm para

flavonoides (Lock de Ugaz, 1988), reactivo de Dragendorff para alcaloides (Wagner y Blandt, 1996), reactivo de anisaldehído sulfúrico para revelar la presencia de terpenoides (Wagner y Blandt, 1996) y tricloruro de hierro para compuestos fenólicos (European Pharmacopoeia, 2005).

### **2.1.3. Definición del método de extracción**

Con el objetivo de definir el método más adecuado para la obtención del extracto acuoso se realizó un estudio comparativo preliminar entre cuatro métodos de extracción: decocción, infusión, maceración por 48 horas y extracción por Soxhlet manteniendo en todos los casos de manera constante la relación droga/agua (10 g de droga seca/ 100mL de agua). Se tomaron como parámetros de análisis la determinación de sólidos totales, siguiendo las especificaciones de la *NRSP # 310*, (1992) y los resultados del tamizaje fitoquímico según establecen Miranda y Cuéllar, (2001).

Adicionalmente los extractos se evaluaron por cromatografía de placa delgada (CCD) empleando placas de gel de sílice GF para cromatografía en capa fina, *Merck* (dimensión 5x10cm) y como fase móvil la mezcla, n-butanol: ácido acético: agua (4:1:5, fase superior). Se emplearon como reveladores: luz UV  $\lambda$ : 254 y 366, y como soluciones reveladoras: solución de tricloruro de aluminio (1 %) y tricloruro férrico (1%).

Una vez definido el método de extracción, el extracto acuoso correspondiente se liofilizó en el Laboratorio de Tecnología del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), siguiendo, los procedimientos normados en dicho centro y empleando un equipo Liofilizador, *Edwards High Vacuum LTD, modelo EPG-592*. El liofilizado obtenido se conservó a 4 °C hasta la evaluación farmacológica, momento en el cual se reconstituyó con agua destilada en cantidad suficiente para establecer las dosis previstas en cada diseño experimental.

## **2.2. Evaluaciones preclínicas**

En todos los casos se tuvo especial cuidado en el cumplimiento de las consideraciones éticas internacionales para el cuidado de los animales de laboratorio y las regulaciones

nacionales establecidas para la experimentación animal. Los diseños experimentales se evaluaron y aprobaron por el comité de bioética de la unidad de toxicología experimental (UTEX) del Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara (Anexo 1).

### 2.2.1. Evaluación del efecto antiinflamatorio

En la evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de *Capraria biflora* L. se utilizaron tres modelos experimentales: el edema plantar inducido por carragenina (Winter, 1962) y la peritonitis inducida por carragenina (Griswold y col., 1987) y la evaluación de la migración leucocitaria en embriones de peces cebra (Lieschke y col., 2001).

#### 2.2.1.1. Edema plantar inducido por carragenina

**-Material biológico:** Se utilizaron ratas Wistar de  $210 \pm 40$  g de peso, hembras, dispuestas en cinco grupos de seis animales cada uno.

**-Descripción de la técnica:** Se midieron los volúmenes de la pata posterior derecha de las ratas con pie de rey, *Mitutoyo, Stainless Hardened*, se realizaron tres réplicas (con un coeficiente de variación menor del 4%) para la determinación del valor basal. Posteriormente se trataron los grupos experimentales: un control negativo que recibió solución salina fisiológica y uno positivo al que se le administró Indometacina (10mg/Kg de peso (i.p)) como sustancia de referencia; tres grupos problema que recibieron el extracto acuoso de *Capraria biflora* L. a dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg de peso (i.p), manteniéndose un volumen de administración constante de 0,5 mL. Transcurrida media hora, se administró 0,1 mL de una disolución de carragenina 1% en la aponeurosis plantar derecha de todos los animales. Los volúmenes de la pata inflamada se midieron a las 2, 3, 4, y 5 horas después de comenzado el experimento.

Los porcentajes de inflamación se calcularon mediante la expresión:

$$\% \text{ Inflamación} = [(V_t - V_o)/V_o] \times 100$$

Donde:  $V_t$  es el volumen de la pata inflamada en el tiempo y  $V_o$  el volumen basal de la pata.

### 2.2.1.2. Peritonitis inducida por carragenina

**-Material biológico:** se emplearon ratones Swiss, de ambos sexos, con  $27 \pm 2$  g de peso, distribuidos en cinco grupos de 10 animales cada uno.

**-Descripción de la técnica:** Se procedió según la técnica establecida por Griswold y col. (1987), y descrita en protocolo en el Manual de Investigaciones (CYTED, 1995). Se administraron a cada uno de los grupos la solución salina fisiológica, la Indometacina 7mg/Kg de peso (i.p); y el extracto acuoso liofilizado de *Capraria biflora*, L. a dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg de peso (i.p), según correspondía con el grupo control negativo, control positivo y grupos tratados, respectivamente. Se utilizó un volumen de administración de 10 mL/Kg de peso. Una hora después se administró 0,25 mL (i.p) de la solución de carragenina 0,75%. Cinco horas más tarde se sacrificaron los animales, lavándose la cavidad peritoneal con 2 mL de PBS, después de un masaje se recogieron los fluidos peritoneales con una jeringa y se depositaron en tubos plásticos en baño de hielo.

Conteo de leucocitos: 20  $\mu$ L (0.02 mL) de muestra homogeneizada se añadieron a 1 mL de ácido acético al 2%, se agitó la solución y se aplicó sobre Cámara de Neubauer, y se contaron los leucocitos en los cuatro cuadrantes, con microscopio *Olympus*.

El número de leucocitos ( $10^6$ /mL) se determinó mediante la siguiente expresión:

**Leucocitos ( $\times 10^6$ /mL) =  $LC \times (10 \times 50 \times 1\ 000) / 4$** ; donde LC: leucocitos contados en los 4 cuadrantes; 10: altura de la cámara; 50: número de diluciones; 4: número de cuadrantes; 1 000: 1000mL

Se calculó para cada grupo los porcentajes de inhibición de la migración leucocitaria con respecto al grupo control, según la siguiente expresión:

$$\% \text{Inhibición} = [(X_{\text{control}} - X_{\text{problema}}) / X_{\text{control}}] \times 100$$

Donde X: valor medio del número de leucocitos.

**Análisis estadístico:** Los datos se procesaron por el programa SPSS de Windows, utilizándose las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon

### 2.2.1.3. Evaluación de la migración leucocitaria en embriones de *Danio rerio*

La ejecución de este novedoso ensayo se realizó en colaboración con el laboratorio de biología farmacéutica de la Universidad Católica de Leuven (bélgica), siguiendo la metodología descrita por Lieschke y colaboradores, 2001, con modificaciones. Para lo cual se utilizó como modelo in vivo embriones de pez cebra de 4 días post-fertilización (4dpf) transgénicos de la línea fli-1: EGFP, cultivados en el laboratorio.

**Preparación de las muestras de ensayo:** se preparó inicialmente una solución madre del extracto acuoso de *Capraria biflora* L, para la cual 5 mg del extracto acuoso se disolvieron en 100 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para dar una concentración de 50 mg/mL. De esta solución madre de la muestra de ensayo se tomaron alícuotas de 2, 6 y 10  $\mu$ L y se completaron hasta un volumen de 1mL con solución de Danieau`s para dar una concentración de 100, 300, 500  $\mu$ g/ mL respectivamente.

**Reactivo de tinción:** se preparó a partir de un kit diagnóstico para leucocitos conocido como **Leucognost® POX** compuesto por dos soluciones, solución A: 4-chloro-1-naphthol con tris (hidroximetil) aminometano, como solución tampón y solución B: Peróxido de Hidrogeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] preparado justo antes del ensayo.

Adicionalmente se emplearon en el ensayo solución Danieau`s (5mM NaCl, 0.17mM KCl, 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10–5% azul de metileno), solución 1-fenil-2 tiourea (PTU) al 0.03%, tricaina y una disolución de lipopolisacarido bacteriano (LPS) a una concentración de 1 mg/ mL.

Se conformaron 5 grupos, con 10 embriones cada uno, 3 grupos tratados con el extracto acuoso de *Capraria biflora*, L., un control positivo tratado con indometacina a concentración de 100  $\mu$ M como fármaco de referencia y un grupo control negativo que recibió DMSO.

#### **Desarrollo de la técnica:**

**1. Pre-incubaron:** Previo al ensayo 100 embriones (1dpf) se incubaron con PTU durante 3 días para evitar la pigmentación de los embriones.

**2. Incubación con muestra de ensayo:** Los embriones correspondientes a cada grupo se colocaron en una placa con solución de Danieau`s removiéndose completamente el PTU para evitar interferencias en el estudio. Trascurrido 10 min. se incubaron los embriones durante una hora con cada una de las soluciones preparadas anteriormente según correspondiera a los grupos tratados, grupo control negativo o grupo control positivo.

**3. Inducción de la inflamación:** los embriones se anestesiaron por inmersión en solución de Tricaine (50X). La inflamación se indujo por completa transección o corte de la cola auxiliándose de un microscopio para facilitar el corte.

**4. Incubación postcorte:** Los embriones de manera independiente se incubaron nuevamente en las soluciones correspondientes a cada grupo incluyendo 10µL de la disolución de LPS durante 7 horas.

**5. Sacrificio:** con el objetivo de fijar la migración leucocitaria, los embriones son tratados con solución de formaldehído al 4% por 5 min, que provoca la muerte de los embriones.

**6. Determinación de la migración leucocitaria:** los embriones por grupo son teñidos histológicamente por incubación en 1 mL de la solución del reactivo de tinción durante 10 minutos y observados al microscopio evaluando la migración de los leucocitos de manera independiente en cada embrión.

**7. Interpretación de los resultados:** para la interpretación de los resultados se utilizó una escala de migración leucocitaria considerando un valor de '0' , '1' '2' , '3' '4' en virtud de la expresión de la actividad de la enzima mieloperoxidasa con el reactivo de tinción. calculando el % de migración en relación al grupo control según la expresión siguiente

**% migración leucocitaria** = [%migración leucocitaria prueba / % migración leucocitaria control] x 100

#### **2.2.1.4. Evaluación del efecto antiinflamatorio por vía oral**

Con el objetivo de profundizar en los estudios del efecto antiinflamatorio se decidió en una segunda etapa precisar si el extracto conservaba la acción antiinflamatoria al ser

administrado por vía oral para lo cual se siguió el protocolo descrito en el epígrafe 2.2.1.1 para el modelo de edema plantar inducido por carragenina. En este caso el extracto se administró a las dosis de 200 y 400mg /Kg de peso.

## 2.2.2. Evaluación del efecto analgésico

Para la evaluación del posible efecto analgésico del extracto acuoso obtenido de las hojas de *Capraria biflora* L. se emplearon dos técnicas experimentales: inducción de contorsiones con ácido acético y prueba del plato caliente; para ambos procedimientos se siguió el protocolo descrito en el Manual de técnicas de investigación (CYTED, 1995).

### 2.2.2.1. Inducción de contorsiones con ácido acético

**-Material biológico:** Se utilizaron ratones Swiss, hembras, de  $27 \pm 2$  g de peso, distribuidos aleatoriamente en cinco grupos de 8 animales cada uno: un grupo control y 4 grupos tratados. El extracto acuoso liofilizado de *Capraria biflora*,

*L.* se administró por vía intraperitoneal a dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg de peso. Como agente algésico se empleó una solución acuosa de ácido acético al 0,6%; al grupo control se le administró solución salina fisiológica (NaCl 0,9 %) y como sustancia de referencia el ácido acetil salicílico a dosis de 100 mg/Kg. Las sustancias se pesaron en balanza microanalítica, Sartorius.

**-Descripción de la técnica:** Se administraron 0,5 mL (i.p.) del extracto acuoso de *Capraria biflora*, L. de las soluciones correspondiente a cada dosis, la solución salina fisiológica y el fármaco de referencia, según diseño experimental, 1 hora después se administró la disolución de ácido acético (0,6%) (i.p.). Inmediatamente después de la administración del agente algésico, cada animal se aisló en una caja individual para observar el número de contorsiones o estiramientos durante 20 minutos. Para determinar el porcentaje de analgesia se empleó la fórmula siguiente:

**% Analgesia**=[(Xc – Xp)/Xc] × 100, siendo Xp el número de contorsiones del grupo problema y Xc el número de contorsiones del grupo control.

### 2.2.2.2. Prueba del plato caliente

**-Material biológico:** Se utilizaron ratones Swiss, con  $27 \pm 2$  g de peso. Se distribuyeron en 5 grupos de seis animales cada uno, seleccionados aleatoriamente. Al igual que la técnica anterior se utilizaron tres niveles de dosis: 50, 100 y 200 mg/kg. de peso para el extracto acuoso liofilizado de *Capraria biflora*, L., un grupo control negativo que recibió solución salina fisiológica y un control positivo que recibió una dosis de 3mg/ Kg de peso de sulfato de morfina. Como agente algésico se empleó una placa caliente.

**Descripción de la técnica:** El extracto acuoso de *Capraria biflora* L. a dosis de 50, 100 y 200 mg/kg de peso, la solución salina y la sustancia de referencia se administraron por vía intraperitoneal en un volumen de 0,25 mL. Se efectuaron, antes del tratamiento, dos mediciones de tiempo de reacción a cada ratón espaciadas por diez minutos, el valor promedio de ambas determinaciones constituyó el tiempo de reacción basal antes del tratamiento ( $T_a$ ). una hora más tarde, después de la administración de los productos, se evaluó el tiempo de reacción post tratamiento ( $T_d$ ). Para cada grupo se calculó la media de los tiempos de reacción, los porcentajes de analgesia se determinaron por la siguiente expresión: **%Analgesia =  $[(T_d - T_a)/T_a] \times 100$**

En ambos casos Los datos se procesaron por el programa SPSS de Windows, utilizándose las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon evaluando las diferencias entre antes y después del tratamiento.

### 2.2.3. Evaluación de la toxicidad aguda del extracto acuoso.

Se realizó un estudio de toxicidad límite a dosis única con objetivo de evaluar el posible grado de toxicidad del extracto acuoso de *Capraria biflora*, L. El ensayo se realizó según las regulaciones de la Organización para la Cooperación Económica y para el Desarrollo (OECD, 1998; OECD, 2001) a través del test de dosis límite a un nivel de dosis de 2000 mg/Kg por vía oral (CYTED, 2002).

Para un ensayo preliminar se tomaron 4 animales (de ambos sexos), a los cuales se les administró el extracto acuoso a dosis de 2000 mg/Kg, 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 (20mL/Kg) con intervalos de tres horas y se permitió el acceso a los alimentos 3 horas después de la última administración. Se observaron durante 24 horas y al no presentarse mortalidad se procedió al ensayo principal (Chan, 1994).

**Descripción de la técnica:** Se utilizaron ratas Wistar, de  $200 \pm 30$  g de peso, de ambos sexos. Los animales se mantuvieron en el cubículo de experimentación en condiciones ambientales. La administración se realizó por vía oral mediante cánula intragástrica a dosis única del extracto acuoso de *Capraria biflora* L. de 2000 mg/Kg. Los animales del estudio se identificaron individualmente por un número mediante tatuajes en las orejas y las cajas por medio de tarjetas en las cuales se recogió la siguiente información: grupo de tratamiento, sexo, especie, línea y número de cada animal. La ubicación de los animales se realizó al azar en los dos grupos experimentales formados, asignándose 10 animales por grupo. Los animales se mantuvieron en ayunas durante toda la noche previa al experimento. Al grupo I se le administró el extracto acuoso a dosis de 2000 mg/Kg por vía oral, mediante cánula intragástrica dividido en cuatro administraciones. El grupo II se tomó como control y solo recibió agua destilada. Se permitió el acceso a los alimentos luego de transcurridas tres horas de la administración.

Se evaluaron los siguientes signos clínicos: 1- cambios en piel, pelos, ojos, membranas, mucosas, efecto sobre el SNC, actividad motora, comportamiento; 2- temblores; 3- convulsiones; 4- peso; 5- número de muertes y tiempo al que mueren; 6- salivación; 7- diarrea; 8- letargia; 9- sueño o coma; 10- observación macroscópica de órganos.

Los animales se observaron sistemáticamente durante las primeras 24 horas, en los 13 días restantes la observación se realizó una vez al día. Se controló el peso corporal antes de la primera administración, a los 7 días y al final del experimento, antes del sacrificio. Las pesadas se realizaron siempre a la misma hora de la mañana.

Se practicó necropsia a todos los animales después del sacrificio para la observación macroscópica de los órganos: corazón, riñones, intestinos, bazo, hígado y pulmones por un patólogo especialista.

**-Análisis estadístico:** Los datos se procesaron por el programa SPSS para Windows, utilizándose las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon para muestras independientes.

### **2.3. Evaluación fitoquímica**

#### **2.3.1. Obtención del extracto acuoso**

El material vegetal seco y molido (100g), se extrajo con 1L de agua dejando reflujar durante 30 min. Posteriormente el extracto se concentró hasta sequedad en un rotoevaporador, *Buchi R-200*.

#### **2.3.2. Fraccionamiento del extracto acuoso**

##### **2.3.2. 1. Metodología 1**

Se tomaron 10 g del extracto acuoso seco y se redisolviéron en agua (300 mL) y fraccionaron mediante sucesivas extracciones líquido-líquido con n-butanol, obteniéndose dos fracciones, butanólica y acuosa, las cuales se reunieron y concentraron hasta sequedad en rotoevaporador.

##### **2.3.2.1.1. Evaluación cualitativa y farmacológica de las fracciones**

Cada una de las fracciones se evaluó a través del tamizaje fitoquímico y análisis cualitativo por cromatografía en capa delgada (CCD) empleando placas de gel de sílice 60, y como fases móviles: cloroformo/ metanol (2:1) y (2:1:5); acetato de etilo/ metanol (85:15), (70:30) y (80:20); diclorometano/metanol (85:15); y n-butanol/ácido acético/agua (40:10:50) (BAW); para el revelado se empleó lámpara UV (CAMAG) a  $\lambda$  254-366nm y tricloruro de aluminio (1% en etanol).

Las fracciones se evaluaron farmacológicamente empleando el ensayo de migración leucocitaria en embriones de pez cebra según se describe en el epígrafe 2.2.1.3.

##### **2.3.2.1.2. Aislamiento y purificación de los compuestos mayoritarios presentes en la fracción butanólica FB1**

El extracto n-butánico se redisolvió en metanol y se adicionó sobre éter, centrifugándose a 3000 rev/min, obteniéndose un sobrenadante (S) y un crudo (II).

Estas fracciones se evaluaron por cromatografía en capa delgada en iguales condiciones que el extracto n-butanólico.

Se redujo el volumen del sobrenadante y se dejó en reposo 72 horas, al cabo de este tiempo se filtró y se lavó sucesivamente con acetona y metanol; el precipitado obteniendo nombrado Cb1 se sometió a evaluación espectroscópica.

### **Separación por cromatografía en capa delgada preparativa del crudo (CCDp)**

Se procedió a la separación y purificación de los compuestos mayoritarios presentes en el crudo II, para ello se realizó una cromatografía preparativa (CCDp), utilizando como fase móvil n-butanol/ácido acético/agua (40:10:50) (BAW) y como fase estacionaria gel de sílice. Las franjas obtenidas se rasparon y posteriormente se lavaron varias veces con metanol. Las fracciones correspondientes se evaluaron por CCD y se reunieron según su perfil cromatográfico en tres nuevas fracciones (FI-FIII).

Las franjas F-II y F-III se sometieron a cristalización en metanol caliente, lavando los precipitados con éter etílico. Se obtuvieron dos compuestos denominados Cb2 y Cb3. Los productos obtenidos se evaluaron por cromatografía en capa delgada bidimensional empleando la mezcla de n-butanol/ácido acético/agua (40:10:50) y ácido acético 10% como fases móviles y utilizando como fase estacionaria gel de sílice.

Esta metodología de fraccionamiento se resume en la figura 1.

#### **2.3.2.2. Metodología 2**

Con el objetivo de profundizar en el estudio fitoquímico del extracto acuoso obtenido según la metodología descrita en el epígrafe 2.3.1, se tomaron 20 gramos del extracto acuoso (seco) y se fraccionaron mediante extracciones sucesivas líquido-líquido con cloroformo (10 x 100mL) y n-butanol (10 x 100mL).

Cada una de las fracciones obtenidas: fracción de cloroformo (FC), fracción n-butanólica (FB<sub>2</sub>) y fracción acuosa remanente (FAr), se concentraron a sequedad en un rotoevaporador.

### **2.3.2.2.1. Evaluación cualitativa y farmacológica de las fracciones**

Las fracciones obtenidas en el proceso de partición se evaluaron a través de técnicas de tamizaje fitoquímico (Miranda y Cuellar, 2000) y por cromatografía en capa delgada (CCD) empleando placas de gel de sílice (ALUGRAM®, y *RP 18, Macherey-Nagel*) y como fases móviles tolueno: formiato de etilo:ácido fórmico (4:1:5); acetato de etilo: metanol: agua (7:2:1) y n-butanol: ácido acético: agua (BAW) (4:1:5, fase superior), (6:1.5:2.5). Para la visualización de las manchas en los cromatogramas se empleó lámpara UV (CAMAG) a  $\lambda$  254-366nm y tricloruro de aluminio (1% en etanol). Las fracciones se evaluaron farmacológicamente empleando el ensayo de inflamación inducida en embriones de pez cebra según se describe en el epígrafe 2.2.1.3.

### **2.3.2.2.2. Aislamiento y purificación de los compuestos mayoritarios presentes en la fracción de cloroformo (FC)**

Para la identificación de los ácidos grasos presentes en la fracción de cloroformo, una muestra del semisólido FC se analizó por cromatografía gaseosa. Se empleó para el análisis un cromatógrafo de gases, *Agilent Technologies*, con detector de ionización por llama, columna capilar de sílice fundida VA-WAX (polietilenglicol) de 30 m de largo y 0.53 mm de diámetro interno, se utilizó nitrógeno e hidrógeno para cromatografía, como gas portador y auxiliar respectivamente, con un flujo de 1.3 mL/min. La programación de temperatura en la columna fue de 120°C, isotérmico por 10 minutos, velocidad de calentamiento de 20°C por minuto hasta 180°C, permaneciendo por 70 minutos a esta temperatura.

Previo al análisis cromatográfico, la muestra se sometió a un proceso de esterificación según la técnica descrita por Christie W., (1993) con modificaciones, recomendada por la literatura para la derivatización de ácidos grasos. Para la preparación de la muestra de análisis 50 mg de FC se disolvieron en 1mL de tolueno y se refluaron con ácido sulfúrico al 1% en metanol durante dos horas, transcurrido este tiempo se adicionaron 5 mL de solución de cloruro de sodio al 5%, se transfirió a un embudo separador y se extrajo, dos veces, con 5 mL de n heptano. A la fase orgánica se le adicionó bicarbonato de potasio al 2%, se recuperó la fase orgánica en embudo separador y se

secó con sulfato de sodio anhidro. Posteriormente se filtró, se concentró a sequedad en rotoevaporador y se redisolvió en 2 mL de heptano en un matraz aforado, de esta muestra de ensayo se tomó 1  $\mu$ L para la inyección en el cromatógrafo de gases.

La identificación de los ácidos grasos presentes en la fracción se realizó por comparación de los tiempos de retención de los componentes de la muestra con los obtenidos para las soluciones al 10% de los siguientes patrones de ácidos grasos: metil hexanoato (caproato), metil heptanoato, metil octanoato (caprilato), metil nonanoato (pelargonato), metil docasanoato (behenato), metil hendecanoato (undecanoato), metil dodecanoato (laurato), metil tetradecanoato (miristato), metil hecadenanoato (palmitato), metil linoleato, metil oleato, metil octadecanoato (estearato). Todos los patrones procedían de la firma PolyScience, con un certificado de pureza de 99% y se inyectó en cada caso 1  $\mu$ L.

Adicionalmente y con el objetivo de separar el resto de los componentes presentes en la fracción de cloroformo (FC), se disolvieron 400 mg de FC, se aplicaron sobre columna cromatográfica de gel de sílice preempaquetada (4g), Grace Resolv y equipo *LaFlash*, System 100-25-2 UVF. Se eluyó con una fase móvil conformada por la mezcla acetato de etilo: metanol en una relación 8:2 (v:v) y un flujo de 10 mL/min. Cada una de las fracciones obtenidas se cromatografió en placa de gel de sílice, *ALUGRAM*®, *Merck*, y se eluyó con acetato de etilo: metanol (8:2, v/v); se reunieron según su perfil cromatográfico en tres subfracciones FC-I, FC-II y FC-III.

La subfracción FC-III se recromatografió en columna de sephadex LH20 y metanol: agua (6:4) como fase móvil, las fracciones resultantes se reunieron según perfil cromatográfico en las placas *RP 18*, empleando la misma fase móvil. La fracción purificada (C3) se destinó a caracterización espectroscópica.

De igual modo, la subfracción FC-II se recromatografió en columna de sephadex LH20 y metanol: agua (9:1) como fase móvil, las fracciones obtenidas se reunieron según perfil cromatográfico en las placas *RP 18*, empleando la misma fase móvil. La fracción purificada (C4) se comparó por CCD en dos condiciones con patrón de feoforbide, (en el primer caso: fase reversa: *alugramn*® *RP 18*, metanol: agua (9:1) y en segundo

caso: fase normal con gel de sílice, *ALUGRAM*®, acetato de etilo: metanol (8:2, v:v) y se destinó a evaluación espectroscópica.

Finalmente, la subfracción FC-I se recromatografió en sephadex LH20 y metanol:agua (6:4) como fase móvil, y las fracciones se reunieron según perfil cromatográfico en las placas *RP 18*, empleando la misma fase móvil. La fracción purificada (C5) se destinó a evaluación espectroscópica.

#### **2.3.2.2.3. Aislamiento y purificación de los compuestos presentes en la fracción de n-butanol (FB<sub>2</sub>)**

Con el objetivo de separar los componentes presentes en la fracción de n-butanol (FB<sub>2</sub>) se aplicaron 1.55g del sólido FB<sub>2</sub> sobre columna cromatográfica de gel de sílice preempaquetada (10g), *Merck Chimie SAS (SVF D26 tamaño de partícula 15-40µm)* en equipo *La flash* a 10 ml/min como velocidad de flujo empleando como fases móviles acetato de etilo: metanol 7:3 (v/v) y acetato de etilo: Metanol: agua 7:2:1 (v/v/v) obteniéndose fracciones de 10ml cada una.

Las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica se reunieron según su perfil cromatográfico en placa de gel de sílice y acetato de etilo: metanol: agua (7:2:1 v/v/v) como fase móvil, para obtener tres subfracciones FB<sub>2</sub>-I, FB<sub>2</sub>-II y FB<sub>2</sub>-III. La subfracción FB<sub>2</sub>-II se recromatografió en sephadex LH20 y metanol: agua (6:4) como fase móvil, las fracciones obtenidas se reunieron según perfil cromatográfico en placas *RP-18*, empleando la misma fase móvil. El compuesto obtenido fue nombrado como B3 y se sometió a análisis espectroscópico.

La metodología se resume en la figura 2.

#### **2.3.3 Análisis espectroscópico de los compuestos aislados**

Los compuestos nombrados Cb1, Cb2, C4, C5 y B3 fueron evaluados espectroscópicamente.

Se registró el espectro UV/Vis, en un equipo Genesy, tomando por separado 1mg de cada compuesto y diluyendo en 25mL de metanol. La lectura se realizó desde 200 hasta 400nm (Marby y col, 1970; Harbone, 1988).

El análisis por espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ), se realizó en dimetilsulfoxido (DMSO) y metanol como disolventes a 37 °C en instrumento Broker AMX 400-300 y 400MHZ para el protónico y 100 MHZ para el de carbono. Los corrimientos químicos se informan en ppm tomando como referencia al trimetilsilano.

#### **2.4. Determinación de los parámetros de calidad de la droga obtenida a partir de las hojas de *Capraria biflora* L.**

Con el objetivo de evaluar los índices farmacognósticos para las hojas de *Capraria biflora* L. que permitan establecer parámetros de calidad, se realizaron los ensayos referidos NRSP # 309 (1992) y la British Pharmacopoeia, (2004)

##### **2.4.1. Ensayos cualitativos de identificación del material vegetal**

**A) Descripción macroscópica** Se realizó la descripción macroscópica de las hojas de *Capraria biflora* L, tomando en consideración los apuntes de León, (1957) y Roig, (1988) para la especie y las especificaciones de Evans, (2000) para esta descripción. Se tomaron hojas provenientes de ejemplares que se encontraban al inicio de la floración y fructificación en pleno estado de desarrollo. La descripción detallada se realizó considerando forma del limbo, color, textura y disposición en el tallo.

**B) Descripción microscópica:** Se le realizaron cortes longitudinales y transversales a muestras procedentes de la droga fresca y se observó detalladamente al microscopio óptico, empleando solución de hidrato de cloral para favorecer la observación y ensayos histoquímicos utilizando disoluciones de Sudan III para sustancias lipídicas y disolución de cloruro férrico para sustancias fenólicas según descripción de Aquino y colaboradores, 2001.

##### **2.4.2. Ensayos específicos**

En todos los ensayos específicos se usó el método estadístico de Bowker para el cálculo de las especificaciones, (Espinosa, 1987) (ICH, 2005). En este caso se procesaron 25 muestras; para determinar el límite unilateral de máximo en cada prueba, se tomó como criterio que el 99,5% esté contenido dentro de los límites con un 95% de confianza.

**A) Pérdida por desecación:** De la muestra de ensayo correspondiente al lote secado en estufa (lote III) se pesó 1g, con un error máximo de 0,5 mg, se transfirió a un pesafiltro, previamente tarado y se desecó a 105 °C durante dos horas. El pesafiltro se colocó en una desecadora, donde se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente y se pesó, colocándose nuevamente en la estufa durante dos horas; se repitió esta operación hasta obtener una masa constante.

**B) Cenizas totales:** De la muestra de ensayo (lote III), se pesó con exactitud 0,5 g en un crisol previamente tarado. Se calentó hasta carbonización, en mechero de gas, hasta que no se observaron humos densos. Se incineró a 650 °C durante dos horas en un horno mufla, *Selecta-Horn*, posteriormente los crisoles se colocaron en una desecadora y se enfriaron hasta temperatura ambiente. El procedimiento se repitió hasta que la diferencia entre dos pesadas consecutivas no fue mayor a 0,5 mg.

Para informar los valores se realizaron los cálculos correspondientes según las expresiones:  $C_1 = (M_2 - M / M_1 - M) \times 100$  y  $C_t = C_1 \times 100 / (100 - H)$ ; donde  $C_1$  es el porcentaje de cenizas totales en base hidratada;  $C_t$ - Cenizas totales en base anhidra; M- masa del crisol vacío (g),  $M_1$  .masa del crisol con muestra(g),  $M_2$ - masa del crisol con cenizas (g); 100- factor matemático ; H- humedad residual del material vegetal.

**C) Cenizas insolubles en ácido clorhídrico:** Las cenizas insolubles en ácido clorhídrico (HCL) se obtuvieron al tratar el residuo de las cenizas totales con ácido clorhídrico concentrado. En el crisol, se añadió al residuo obtenido en la determinación de cenizas totales, 15 mL de agua y 10 mL de HCl. Se cubrió con un vidrio reloj y se hirvió, en una plancha de calentamiento, suavemente durante 10 minutos. Después se enfrió, se filtró a través de un papel de filtro libre de cenizas y se lavó con agua caliente hasta pH neutro en el filtrado. Las cenizas insolubles se incineraron y se dejaron enfriar en una desecadora y se pesaron. Se repitió la incineración hasta que la diferencia entre dos pesadas sucesivas no excediera de 1 mg.

Para informar los valores se realizaron los cálculos correspondientes según las expresiones siguientes:

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

**D) Cenizas solubles en agua:** Para informar los valores se realizaron los cálculos correspondientes según las expresiones:

$C_1 = (M_2 - M_4 / M_1 - M) \times 100$  y  $C_A = C_1 \times 100 / (100 - H)$ ; donde  $C_1$  -porcentaje de cenizas solubles en agua;  $M_4$  -masa del crisol con cenizas insolubles en agua (g);  $M_2$  -masa del crisol con cenizas totales (g); el resto de las denotaciones tienen el mismo significado que en los ensayos anteriores.

**E) Sustancias solubles:** El porcentaje de sustancias solubles en base anhidra se calcula mediante la fórmula siguiente:  $S_s = R \times 500 \times 100 / (M(100 - H))$ , donde:  $S_s$  sustancias solubles en base anhidra (%);  $H$  - humedad de la muestra (%); 500 y 100 (factores matemáticos para los cálculos);  $R$  -Residuo de la muestra (g);  $M$  -masa de la muestra (g). Con el objetivo de evaluar la capacidad extractiva de diferentes disolventes, en la especie botánica en estudio, la experiencia se realizó empleando tres disolventes diferentes: agua destilada, etanol, mezcla hidroalcohólica 50%.

### **2.4.3. Otros índices farmacognósticos**

Con el objetivo de profundizar en la caracterización del material vegetal se determinaron adicionalmente los siguientes índices farmacognósticos: hojas ennegrecidas, otras partes de la propia planta, materia orgánica extraña y materia inorgánica extraña según se describen en la NRSP # 309. Estos índices se determinaron a partir de 100g de material vegetal por separación manual de las materias extrañas y se empleó una lupa estereoscópica para facilitar la observación.

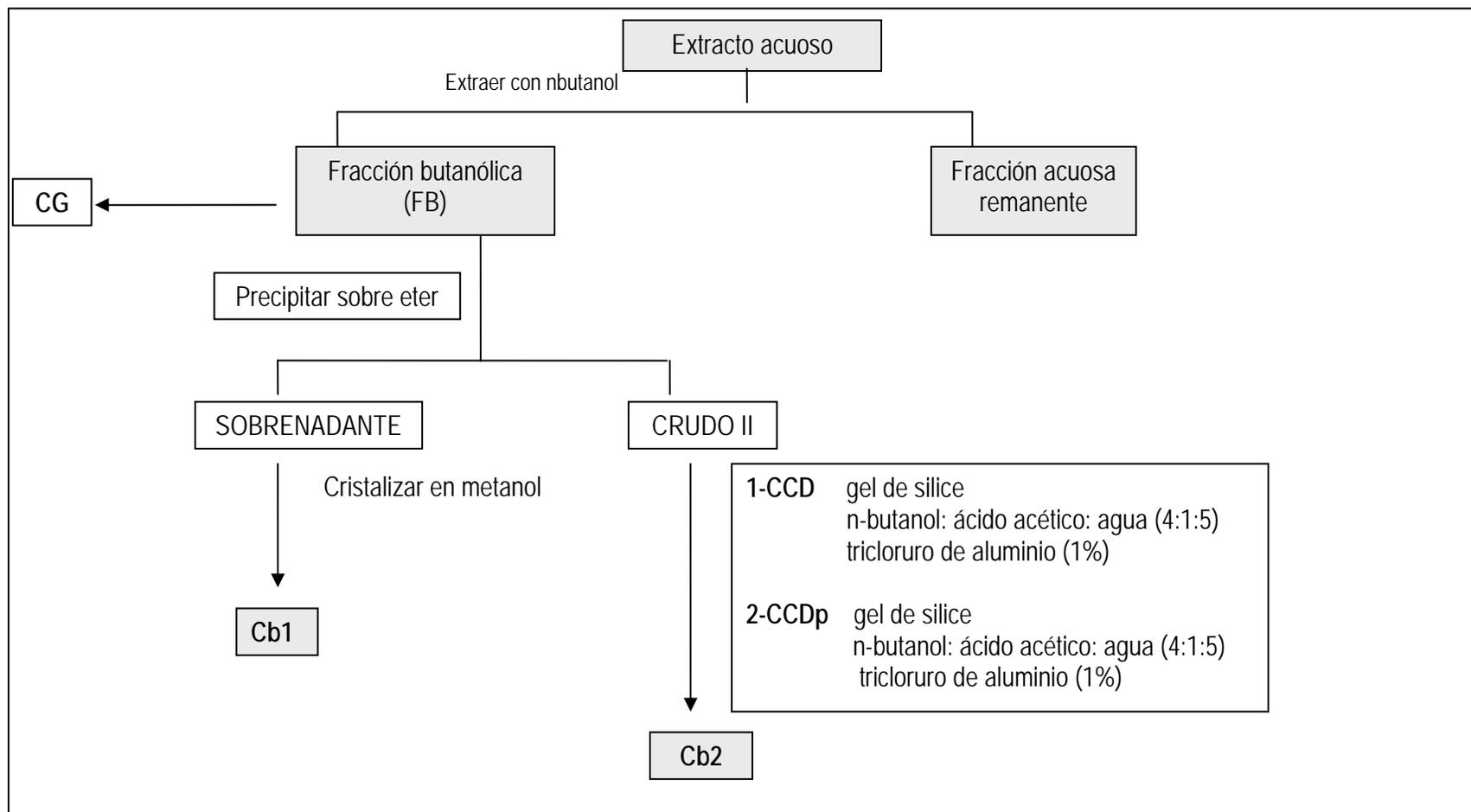


Figura 1. Diagrama de flujo metodología 1

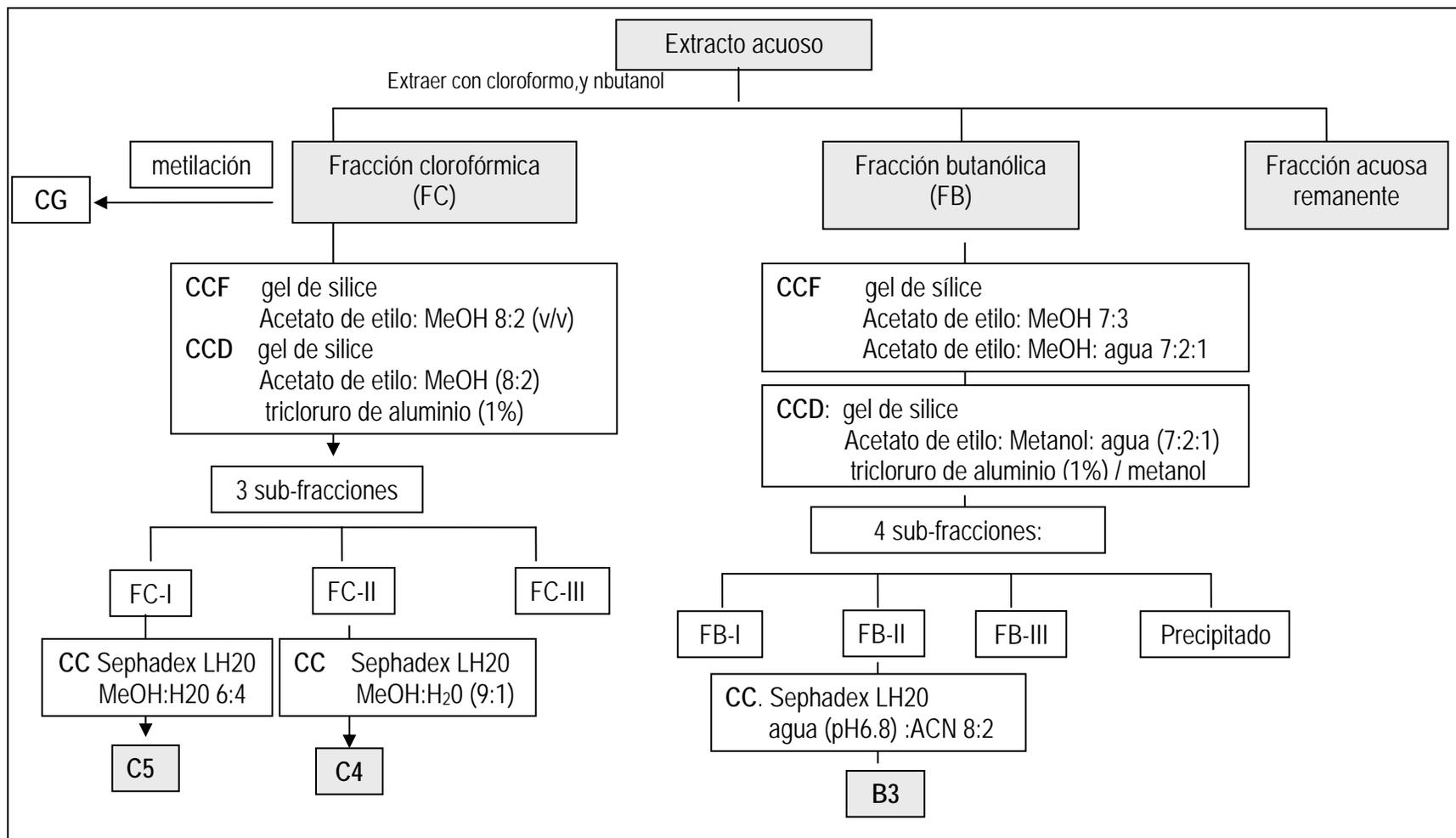


Figura 2. Diagrama de flujo metodología 2

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1. Procesamiento del material vegetal**

##### **3.1.1. Recolección**

Teniendo en cuenta la información etnobotánica (Roig, 1988; Villar y Villavicencio, 1994, Scofield, 2002; Lans, 2004 a yb) referida para la especie *Capraria biflora*, L. se decidió el estudio de las hojas en lugar de las raíces por ser las partes aéreas las más empleadas en la medicina tradicional, en enfermedades asociadas a procesos inflamatorios, esto permitiría además, un uso más racional de la especie botánica.

Para la recolección de material vegetal con fines farmacéuticos debe asegurarse la identidad de la droga; que debe ser recolectada e identificada por un personal experto y capacitado. En el presente trabajo, se realizó, la identificación taxonómica del material vegetal por un especialista en la temática, como criterio seguro de su identidad botánica, observándose una total correspondencia con las características del material recogido en herbario y con la descripción botánica establecida en la literatura (Edwin, 1971; León, 1957; Roig, 1988).

La recolección de drogas provenientes de plantas cultivadas asegura una fuente natural valiosa para la obtención de productos de calidad, lo que no siempre se logra en el caso de las drogas obtenidas de plantas silvestres. En la droga que nos ocupa la recolección del material se realizó de forma manual, pues es la técnica que se aconseja para plantas silvestres. Se realizó en horas tempranas de la mañana, tomando las partes aéreas y procurando dejar ramas suficientes para garantizar el normal desarrollo de la planta y así un uso sostenible de este recurso natural. Las plantas tras la recolección mantuvieron su normal desarrollo y permitieron realizar hasta tres colectas anuales; lo cual resultó ventajoso desde el punto de vista medioambiental al reducir el impacto sobre la biodiversidad de la zona.

Las hojas recolectadas se lavaron cuidadosamente con agua potable garantizando la limpieza del material vegetal.

### 3.1.2. Estandarización del secado

El secado del material en estudio se realizó por tres vías: a la sombra, al sol y mediante calor artificial a la estufa. El momento final del proceso se estableció al obtener peso constante, tras lo cual la droga se trituró en un molino de cuchillas y se determinó la humedad residual, los resultados aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de los índices de secado.

Método	Tiempo de secado (días)	Humedad residual (%) X± DS
sombra	15	8.10±0.04
sol	8	8.50 ±0.03
estufa	5	7.58±0.06

X: Media de 3 determinaciones; SD: Desviación Standard

Las hojas de la planta sometidas al secado a la sombra variante referida por Roig, 1988, tardaron en secarse 15 días, muy superior al alcanzado para los métodos en estufa y al sol, con 5 y 8 días respectivamente. Estos resultados pueden deberse fundamentalmente a las variaciones en cuanto a la humedad ambiental en el período de estudio pues el peso del material vegetal fluctuaba mucho de un día a otro lo cual sugirió que en esos periodos el material ganaba humedad lo cual justificaba su incremento en peso, este comportamiento resultaba mas evidente para el método a la sombra, lo cual motivó que se extendiera el proceso hasta 15 días.

Los valores obtenidos para el porcentaje de humedad residual en los tres métodos evaluados estuvieron dentro de los límites establecidos por farmacopeas internacionales y normas nacionales de droga compuestas por este tipo de material vegetal, donde se establece un valor del 10% como límite para este parámetro y para garantizar de este modo, una calidad adecuada del material posterior al secado (Sharapin, 2000). En todos los métodos evaluados el secado permitió eliminar suficiente cantidad de humedad como para favorecer la conservación de la calidad de la droga y prevenir el deterioro de la misma, ya sea por enmohecimiento, acción de enzimas y/o bacterias y posibles alteraciones químicas por este concepto. Esta

operación resulta ventajosa pues adicionalmente a que se fijan los constituyentes, se facilitan los procesos de trituración necesarios para obtener una forma más conveniente para su comercialización y almacenamiento (Claus, 1985).

Analizando el porcentaje de humedad residual y el tiempo de secado, se evidencia que el método de secado en estufa es más eficaz, por eliminar mayor contenido de agua del material vegetal en un menor tiempo, lo cual hace ventajoso el método con respecto al resto de los evaluados.

Por otra parte también es significativo el aspecto o características de la droga al finalizar el estudio, pues el material secado al sol y a la estufa mantuvieron su color verde intenso, en cambio la droga proveniente del secado a la sombra se mostró algo descolorida, lo cual pudiera ser un indicativo de un posible cambio en la composición y por tanto de deterioro de la droga.

Adicionalmente cada lote de material vegetal se evaluó a través de ensayos identificativos para los diferentes grupos químicos de los metabolitos secundarios presentes en la planta (Tabla 2).

Del análisis de estos resultados se pudo conocer que en ninguno de los extractos correspondientes a los diferentes lotes evaluados, se observó la presencia de coumarinas, resinas, ni glicósidos cardiotónicos, estos últimos reportados para varios géneros de la familia (Evans, 2000). De igual manera se puede inferir la presencia de lípidos, esteroides, saponinas, compuestos con grupos amino, alcaloides, quinonas, flavonoides, compuestos reductores, compuestos fenólicos y taninos, resultados novedosos para las hojas de la especie, pues no se informa en la literatura estudios anteriores que involucren un análisis cualitativo de los metabolitos presentes en la planta en estudio.

Los resultados cromatográficos confirmaron en los extractos la presencia de lípidos, esteroides, saponinas, aminoácidos, quinonas, flavonoides, compuestos reductores, compuestos fenólicos y taninos, no así para el caso de los alcaloides donde no se observó ninguna evidencia de su presencia en el cromatograma por lo que puede considerarse un falso positivo a los resultados vistos en el tamizaje cualitativo; en correspondencia con lo informado por la literatura, pues este tipo de compuesto raramente se informa en la familia *Schrophulareaceae* a la cual pertenece la especie en estudio (Evans, 2000).

Tabla 2: Resultados del tamizaje fitoquímico para los métodos de secado.

EXTRACTO	METABOLITO	FRESCA	ESTUFA	SOL	SOMBRA
Etéreo	Alcaloides	-	-	-	-
	Coumarinas	-	-	-	-
	Lípidos	++	++	++	+
	Esteroides	+	+	+	+
Alcohólico	Resinas	-	-	-	-
	Esteroides	+	+	+	-
	Saponinas	+	+	+	+
	Alcaloides	+	-	-	++
	Glicósidos cardiotónicos	-	-	-	-
	Compuestos reductores	-	-	-	-
	Coumarinas	-	-	-	-
	Compuestos fenólicos y taninos	+	++	-	++
	Quinonas	-	-	-	-
	Flavonoides	+	+	+	+
	Antocianidinas	-	+	-	+
Acuoso	Alcaloides	+	+	+	++
	Compuestos reductores	+	+	+	+
	Saponinas	+	+	+	+
	Flavonoides	+	++	++	++
	Compuestos fenólicos y taninos	+	+	-	++
	Aminoácidos	+	+	+	+

Desde el punto de vista cromatográfico no se observaron diferencias en cuanto a número de manchas y Rf observados en los extractos provenientes de los diferentes lotes evaluados, y aunque en casos como el sol algunas manchas aparecen menos intensas, no se observaron indicios de una posible degradación, puede considerarse en consecuencia que las diferencias observadas en el tamizaje fitoquímico pudieran estar dadas por posibles interferencias en algunos de los ensayos o por diferencias en cuanto a los límites de detección de ambas técnicas de identificación. No obstante los resultados obtenidos del tamizaje resultan valiosos pues nos brindan un

conocimiento tentativo de los metabolitos presentes en el material vegetal y permite establecer una estrategia para el estudio de los metabolitos de mayor interés.

El análisis de todos los parámetros descritos permitió sugerir el método a la estufa, como la variante más adecuado para el secado de las hojas de *Capraria biflora*, L..

### 3.1.3. Definición del método de extracción

Previo a las evaluaciones farmacológicas y con el objetivo de definir el método más adecuado para la obtención del extracto acuoso, se decidió realizar un estudio comparativo entre 4 métodos de extracción, la valoración de los sólidos totales y con estos el porcentaje de extracción y la cromatografía de capa delgada permitió tener criterios de selección para el tipo de proceso extractivo.

En esta experiencia se emplearon métodos convencionales de infusión y decocción así como la maceración y adicionalmente se estudiaron los extractos obtenidos por soxhlet. Este estudio permitió comprobar que todos los métodos lograban un extracto con similares características organolépticas (color pardo rojizo intenso, transparente, sin partículas en suspensión y olor característico aromático y un pH ligeramente básico) (Tabla 3).

Tabla 3: Parámetros físico-químicos de los extractos.

Parámetros		Infusión	Decocción	Maceración	Soxhlet
<i>Descripción organoléptica</i>	Color	Pardo rojizo	Pardo rojizo intenso	Pardo rojizo intenso	Pardo rojizo intenso
	Olor	Característico	Característico	Característico	Característico
% de extracción		5.3	7.9	14.34	30.5

Los valores obtenidos para los porcentos de extracción indicaron que si bien la extracción por infusión y decocción son los métodos más empleados por la población, estos lograron una extracción de 5,3 % y 7,9 % respectivamente, menor al ser comparada con el resto de los métodos estudiados (14,34% y 30,5%) para maceración y soxhlet.

En cuanto a los resultados del tamizaje fitoquímico desarrollado a los extractos (Tabla 4), no se observaron diferencias marcadas entre los métodos. Algunos

ensayos, como el del tricloruro férrico y el de compuestos reductores, resultaron más notables en los extractos obtenidos por maceración y soxhlet, estos resultados pueden estar determinados por las diferentes condiciones de extracción de cada método empleado, originando extractos de diferente concentración.

Tabla 4: Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos acuosos obtenidos por diferentes métodos de extracción.

Metabolito	Infusión	Decocción	Maceración	Soxhlet
Compuestos reductores	+	+	+	++
Saponinas	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	++	++
Compuestos fenólicos	+	+	++	++
Taninos	+	+	+	+
Aminoácidos	+	+	+	+

Los extractos se evaluaron además por cromatografía en capa delgada (CCD) sobre gel de sílice 60 y empleando n-butanol: ácido acético: agua (4:1:5) como fase móvil para valorar si el método de extracción modifica la composición de los extractos. El desarrollo cromatográfico mostró resultados coincidentes con el tamizaje fitoquímico, se observó que se trataba de un extracto de naturaleza muy compleja con 9 manchas mas o menos resueltas, intensas y con fluorescencia amarilla y azul frente a la luz ultravioleta y al ácido sulfúrico (al 50%) empleados como reveladores. En todos los extractos evaluados se observó similar comportamiento cromatográfico aunque resultaron más evidentes en los extractos obtenidos por soxhlet, en particular las manchas de color amarillo intenso con absorción en UV-VIS presumiblemente flavonoides si tomamos en consideración las referencias dadas por Mabry (1970) y Harborne (1988 b). Se observó también evidencia de la presencia de compuestos fenólicos dada la reacción frente al tricloruro de hierro, particularmente en las manchas con menor Rf muy cercanas o retenidas en el sitio de aplicación.

Los resultados cromatográficos indicaron que las diferencias observadas en el tamizaje fitoquímico estaban dadas fundamentalmente por baja concentración de los

compuestos en las muestras evaluadas y no en variaciones que pudieran indicar diferente naturaleza de los componentes químicos extraídos.

En virtud de estos resultados se estableció que la extracción por soxhelt constituía el método más adecuado para la obtención del extracto acuoso decidiéndose emplear esta variante extractiva en el desarrollo de las pruebas farmacológicas.

El extracto acuoso obtenido por este método se liofilizó y se conservó a 4 °C hasta el momento de cada ensayo. Justo antes de cada prueba farmacológica el liofilizado se reconstituyó con agua destilada en cantidad suficiente para establecer las dosis previstas en cada diseño experimental obteniéndose un extracto con características similares al extracto acuoso original, coincidiendo con lo informado anteriormente por López y colaboradores (2000).

### **3.2. Evaluaciones preclínicas**

Los estudios farmacológicos hasta ahora informados en la literatura para esta especie (Gongalves y col., 1958, Gongalves y col 1963, Gongalves y col., 2005, Vasconcellos y col. 2007) se centran en la acción antimicrobiana, antitumoral y antioxidante de extractos procedentes de las raíces y de la biflorina como principal compuesto aislado de este órgano de la planta. Sin embargo las principales aplicaciones etnomédicas de la planta refieren el uso de la decocción o infusión de las hojas de la especie, aunque esta no se encuentra debidamente fundamentada, ni se tiene información relacionada con la posible composición de los extractos obtenidos de las hojas, como parte utilizada en la mayoría de los países latinoamericanos donde la planta crece en abundancia.

Teniendo en cuenta estas referencias, se decidió evaluar farmacológicamente el extracto acuoso de las hojas de la planta con el objetivo de comprobar científicamente las acciones antiinflamatorias y/o analgésicas atribuidas en correspondencia a los usos tradicionales de la especie.

#### **3.2.1. Evaluación del efecto antiinflamatorio**

##### **3.2.1.1. Edema plantar inducido por carragenina**

El efecto antiinflamatorio del extracto se evaluó a través del edema inducido por carragenina. La administración subcutánea de una solución de este mucopolisacárido sulfatado, extraído del alga marina *Chondrus crispus*, en el nivel

de la aponeurosis plantar de la rata o del ratón provoca una reacción de carácter inflamatorio agudo, no específica que resulta de la acción secuencial de varios mediadores, como histamina, serotonina, bradiquinina y por prostaglandinas (Dirosa y col., 1971; Heller y col., 1998). Estos mediadores químicos producen un incremento en la permeabilidad vascular, promoviendo entonces la acumulación de fluidos en los tejidos y como consecuencia el desarrollo del edema (Williams y Morley, 1973; White, 1999) el cual es empleado como variable para la evaluación de la actividad antiinflamatoria en este modelo farmacológico (Winter, 1962). Además, diversos factores del complemento implicados en la inflamación actúan como amplificadores de la respuesta (CYTED, 1995). Se plantea que una hora después de la administración de la carragenina la histamina y la serotonina tienen un papel principal como mediadores. Aproximadamente a las 2 horas intervienen las cininas. Entre las 3 y 4 horas después de la inducción ocurre la respuesta vascular máxima que coincide con la fase mediada por las prostaglandinas PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub> (Sughisita, 1981; Burch y DeHaas, 1990).

Los resultados mostrados por el extracto acuoso se presentan en el gráfico 1.

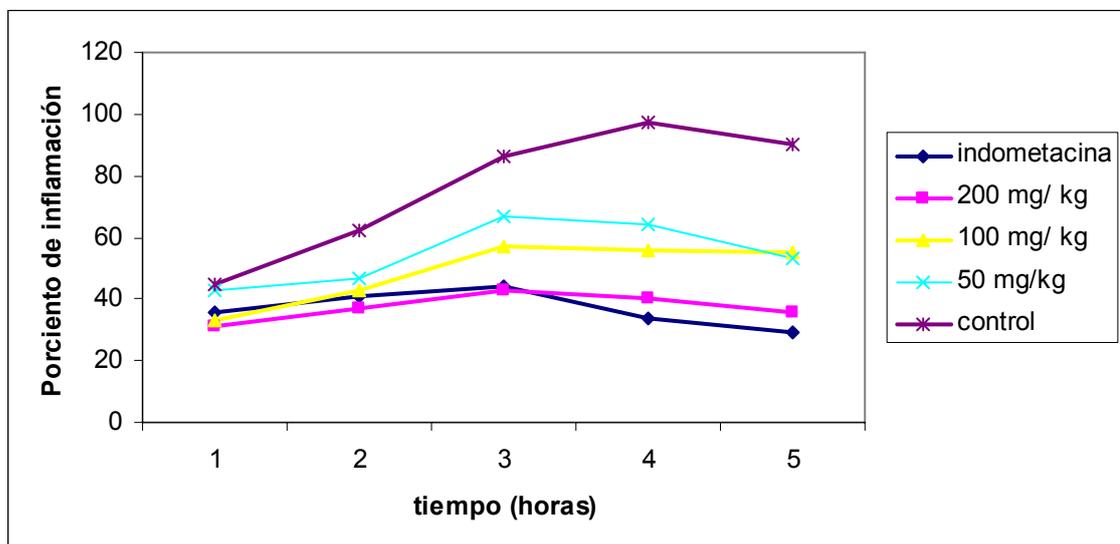


Gráfico 1. Efecto de la administración intraperitoneal del extracto acuoso sobre el edema inducido por carragenina

Los mayores porcentos de inflamación durante toda la experiencia, se observaron en el grupo control negativo al cual se le administró solución salina, teniendo su máximo de inflamación a las 4 horas con un 98.39 % de inflamación, en

correspondencia con el efecto de la administración de la carragenina (Dirosa y col., 1971; Heller y col., 1998).

En el grupo tratado con la indometacina, fármaco de referencia para este ensayo, se observó una disminución del porcentaje de inflamación en todos los tiempos evaluados, el máximo de inflamación ocurre a las 3h, aunque algunos autores como Da Silva y colaboradores (1994) refieren que este puede darse a las 4 horas.

La respuesta observada para la indometacina estuvo en correspondencia con lo informado en la literatura, según su mecanismo de acción. Esta sustancia inhibe la vía de las ciclooxigenasas (Clemente y Paulus, 1994) y por tanto, inhibe la formación y liberación de las prostaglandinas que en esta fase (entre las 3 y 4 horas) adquieren la máxima manifestación (Dirosa y col., 1971, Burch y Dehaas, 1991) principalmente por inhibición de PGE<sub>2</sub>.

Con respecto a los grupos tratados con el extracto acuoso de *Capraria biflora L.*, se observó que los valores de inflamación logrados tras la administración de la dosis de 50 mg/Kg de peso resultaron, en todos los tiempos, inferiores a los desarrollados en el grupo control, aunque no se observaron diferencias significativas en las primeras 3 horas ( $p < 0.05$ ) obteniéndose a esta dosis una pequeña y no significativa actividad. Solo después de las cinco horas de iniciado el experimento la disminución de la inflamación resultó estadísticamente significativa.

Para el resto de las dosis, 100 y 200 mg/Kg, los resultados estadísticos mostraron notables diferencias entre los grupos tratados y el grupo control a las tres y a las cuatro horas, manifestándose el efecto antiinflamatorio del extracto con más de un 30 % de inhibición de la inflamación.

Después de superadas las 3 horas las dosis de 100 y 200 mg/Kg de extracto mostraron un comportamiento estadísticamente comparable al observado para la Indometacina en las condiciones evaluadas ( $p > 0.05$ ).

Según los resultados del experimento el extracto acuoso de *Capraria biflora L.* posee efecto antiinflamatorio a dosis superiores a 100 mg/Kg similar a la Indometacina, especialmente a 200 mg/Kg, siendo dosis-dependiente en el intervalo de dosis experimentado.

Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Sivaprakasam (1996) para un extracto metanólico obtenido a partir de *Ochna obtusata* y a los obtenidos por Rezazadeh y colaboradores (2005) para la administración intraperitoneal de iguales dosis de un extracto metanólico obtenido de partes aéreas de *Stachys schtschegleevii*

La habilidad de reducir el edema producido por la carragenina mostrada por el extracto sugiere que la especie contiene uno o varios componentes químicos que pueden ser activos en condiciones de inflamación. Si se considera el papel de la carragenina en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y que también los radicales libres juegan un importante papel en el mantenimiento de la respuesta inflamatoria mediada por este agente (Boughton y col., 1993), sustancias que inhiban la síntesis de prostaglandinas o secuestrantes de radicales de oxígeno pueden disminuir la respuesta inflamatoria y pudieran justificar el efecto mostrado por el extracto ensayado.

La presencia en el extracto acuoso de hojas de *Capraria bilflora L.*, de metabolitos tales como flavonoides, y otros compuestos fenólicos pudiera explicar el efecto antiinflamatorio de este extracto, presumiblemente por inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Vane, 1971) y otros mediadores de la respuesta inflamatoria (Foegh y Ramwell, 2001).

Existen evidencias de que los polifenoles ejercen acción inhibitoria sobre la FLA<sub>2</sub> de secreción en experimentos *in vitro* (Gil y col., 1997) y justificar la respuesta observada.

Se conoce que los flavonoides pueden actuar inhibiendo diversas etapas del proceso inflamatorio; algunos disminuyen la infiltración celular; mientras que el otros resultan antagonista de algunos efectos de la bradicinina y la angiotensina; por ejemplo, el 8-glucósido de hipoletina inhibe la exudación proteica, la migración leucocitaria y la actividad de la beta-glucoronidasa; a su vez la quercetina inhibe la secreción de histamina por los mastocitos, la liberación de enzimas lisosómicas, el consumo de oxígeno, la generación de radicales libres y la quimiotaxis de los neutrófilos, por ultimo, por solo mencionar los mas conocidos, el kaempferol inhibe las fases exudativas y de proliferación en modelos experimentales crónicos (Cañavate, 1995).

Adicionalmente se ha demostrado que los flavonoides pueden inhibir Isoformas de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS) y de la ciclooxigenasa (COX-2), responsables de la producción de prostaglandinas y de óxido nítrico, los cuales constituyen mediadores pro-inflamatorios implicados en la inflamación. Este tipo de metabolito puede inhibir la acción de otros mediadores del proceso inflamatorio tales como la proteína C reactiva o diversas moléculas de adhesión (Robak y Gryglewski, 1996). La modulación de la cascada de acontecimientos moleculares que conducen al aumento en la expresión de estos mediadores incluye la inhibición de factores de transcripción tales como el factor nuclear kappa  $\beta$  (NF $\kappa$  $\beta$ ) y el factor AP-1, a través de la inhibición de diferentes proteínquininas. La capacidad de estimular un incremento de las defensas antioxidantes a través del factor Nrf2 pueden también contribuir a las propiedades antiinflamatorias de los flavonoides (González-Gallego J, 2007)

### **3.2.1.2. Peritonitis inducida por carragenina**

En esta prueba farmacológica la carragenina como agente irritante provoca una rápida infiltración de leucocitos polimorfo nucleares en el tejido dañado (Dawson, y col., 1991). Durante la fase subaguda de la inflamación los leucocitos y monocitos se adhieren a las células endoteliales y cruzan la pared de los vasos sanguíneos como consecuencia del poder atrayente de las quimoquinas (Lozada, 1995)

Los mayores valores para el número de leucocitos (Tabla 5) correspondieron al grupo control negativo siendo similares estadísticamente a los obtenidos para el grupo que recibió la dosis de 50 mg/Kg. de peso del extracto mostrando ( $p > 0.05$ ); con un 29,12 por ciento de inhibición de la migración.

En los grupos restantes, dosis de 100 y 200 mg/Kg, la cantidad de leucocitos en el foco inflamado resultó inferior al grupo que recibió solución salina, existiendo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) y manifestando a estas dosis un marcado efecto antiinflamatorio con un 49,74 y 58,76 por ciento de inhibición de la migración leucocitaria

Las dosis de 100 y 200 mg/Kg de peso mostraron un efecto inhibitorio comparable estadísticamente ( $p > 0.05$ ) con el logrado con la administración de Indometacina, con un por ciento de inhibición de la migración leucocitaria de 63,9.

Tabla 5. Efecto de de la administración del extracto de *Capraria biflora* L. en la migración leucitaria experimentada en la peritonitis inducida por carragenina

Grupos	Leucocitos 10 <sup>6</sup> /mL X± SD	% de inhibición de la migración leucocitaria
NaCl 0.9 %	3.88 ± 1.55	-
<i>Capraria biflora</i> 50 mg/Kg.	2.75±1.38	29.12
<i>Capraria biflora</i> 100mg/Kg	1.95±1.41*	49.74
<i>Capraria biflora</i> 200mg/Kg	1.60±1.08*	58.76
Indometacina 7 mg/Kg	1.40 ±0.92*	63.9

n=10. X: media, SD: Desviación standart. \*p<0.05 contra grupo control.

Los resultados mostrados *L.*, confirmaron el efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de *Capraria biflora* y justifican el empleo de las hojas en afecciones que involucran procesos inflamatorios, corroborando su uso tradicional.

### 3.2.1.3. Evaluación de la migración leucocitaria en embriones de *Danio rerio*

La ciencia farmacológica moderna investiga en la actualidad nuevas especies biológicas para la complementación o sustitución de antiguos modelos animales, el uso de los peces cebras (*Danio rerio*) es un gran paso en este sentido. En este contexto esta especie es un valioso modelo recientemente introducido en estudios farmacológicos complementarios (Pichler y col., 2003), especialmente se han empleado con gran utilidad en las investigaciones de enfermedades que incluyen migración leucocitaria, angiogénesis, como el caso de la inflamación (Hill y col., 2005; Parng y col., 2002; Langheinrich y col., 2002 y Dooley y col., 2000).

Entre las muchas ventajas de este modelo animal, se encuentra la escasa edad que deberán alcanzar los individuos para poder emplearse en estudios farmacológicos, estimándose que esta va desde tres días hasta solo algunas semanas en las pruebas mas largas (Goldsmith, 2004; Langheinrich, 2003; Peterson y Fishman, 2004; Stern y col., 2005), tiempo significativamente menor si se comparan con otras especies; como los roedores; el volumen de muestra necesario para evaluar resulta pequeño comparado con otras técnicas, por lo que resultan muy útiles en estudios

biodirigidos, es factible la obtención de líneas transgénicas donde se incremente la expresión de alguna propiedad fisiológica (Berghmans y col., 2007). Adicionalmente resultan muy fáciles de manejar y la observación es adecuada bajo el microscopio óptico.

En la experiencia se valoró la posible toxicidad que el extracto acuoso de *Capraria biflora* L pudiera ejercer sobre el desarrollo de los embriones de peces cebras. Como resultado de la aplicación del extracto, no se observaron muertes, ni daños aparentes en la anatomía del embrión en 24 h de exposición, resultando inocua en estas condiciones. Esto permitió estimar una DL 50 superior a concentraciones de 500 µg/mL.

La migración leucocitaria se determinó a través de la valoración de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO). Durante la inflamación una variedad de células (endoteliales vasculares, células del músculo liso, fibroblastos, neutrófilos, monolitos y macrófagos, entre otras) producen mediadores inflamatorios, oxidantes y radicales libres en defensa del agente causante del daño hístico.

Las MPO son liberadas por los neutrófilos y monocitos activados en la inflamación, estas enzimas catalizan reacciones en las cuales los radicales libres y los oxidantes son formados. Estos aspectos han condicionado que esta enzima sea usada ampliamente como marcador de la migración leucocitaria asociada a la inflamación y es propuesta como un reflejo de la actividad neutrofílica (Baldus y col., 2003; Brennan y col., 2003; Kettle y col., 2004; Kinnula, 2005 y Exner y col., 2006).

La actividad de la enzima se evaluó por tinción con un kit de diagnóstico conocido como **Leucognost® POX** el cual está compuesto por dos soluciones, solución (A) de 4-cloro-1-naphtol con tri-hidroximetil-aminometano y una solución (B) de Peróxido de Hidrogeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]. En este test, la MPO es oxidada y convertida en un compuesto carmelita oscuro insoluble, que constituye el indicador de la actividad de estas catalasas lisosomales y como consecuencia, una medida de la migración leucocitaria en el foco inflamatorio.

Los resultados de la determinación de la actividad de esta enzima se muestran en la Tabla 6 como porcentaje de la migración leucocitaria. En el grupo control se observó en mayor medida la migración leucocitaria, en este caso el uso del lipopolisacárido bacteriano (LPS), logra una estimulación de la respuesta inmune (Yasawa y col.,

2005). Los lipopolisacaridos, principal constituyente de la pared celular de las bacterias Gram negativas, inducen la reacción inmune innata por activación de los componentes de la respuesta proinflamatoria. La expresión de la citoquina por ejemplo puede ser activada por el LPS vía receptor TLR4, e involucra el NFK $\beta$  (Janeway y col., 2005)

Tabla 6. Efecto de de la administración del extracto de *Capraria biflora* L. en la migración leucocitaria en peces cebras (n= 10)

Grupos	% migración leucocitaria.
Capraria biflora L. 200 $\mu$ g/mL	39,04
Capraria biflora L. 300 $\mu$ g/mL	22,78
Capraria biflora L. 500 $\mu$ g/mL	18,22
Indometacina 100 $\mu$ M	15.68

Los grupos tratados tanto con el control positivo, indometacina, como por el extracto, disminuyen considerablemente la migración de leucocitos en el sitio de inflamación. El efecto inhibitorio de la actividad MPO mostró un comportamiento dosis dependiente resultando muy activo fundamentalmente a dosis de 500  $\mu$ g/ mL.

El estudio de la migración leucocitaria en este modelo animal, aparece bien documentado en la literatura (Brubacher y col., 2000; Zhang y col., 2005; Yazawa y col., 2005), aunque no se tienen referencias del uso esta técnica como medida de la inflamación, ni la utilización del test en el estudio farmacológico de plantas medicinales con potencialidades como antiinflamatorios.

La técnica aplicada proporciona información valiosa para estos fines y puede aplicarse a estudios biodirigidos con el fin de diferenciar fracciones con o sin actividad. Futuros trabajos deberán realizarse para el perfeccionamiento de la misma y la posibilidad de introducción en nuestro país como modelo viable para estudios farmacológicos.

#### 3.2.1.4. Evaluación del efecto antiinflamatorio por vía oral

En una segunda etapa de trabajo se decidió evaluar si el extracto manifestaba la acción antiinflamatoria al ser administrado por vía oral, se siguió el protocolo descrito

en el epígrafe 2.2.1.1 para el modelo de edema plantar inducido por carragenina. En este caso el extracto se administró a dosis de 200 y 400mg /Kg de peso.

En el grupo tratado con el control positivo (gráfico 2) se observa una disminución importante del porcentaje máximo de inflamación a partir de las 4 horas de haber administrado el agente irritante, disminuyendo considerablemente hasta llegar a un 13,22 % de inflamación a las 7 h. Se debe destacar que existen diferencias significativas con respecto al grupo control (-) en todos los tiempos evaluados.

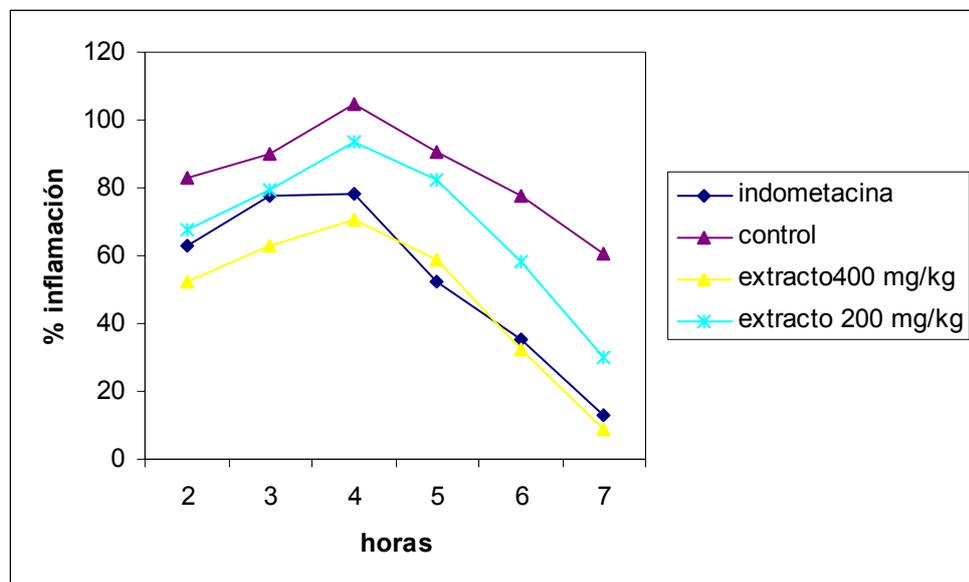


Gráfico 2. Efecto de la administración oral extracto acuoso sobre el edema inducido por carragenina

En todos los casos el máximo de inflamación se observa a las 4 horas de iniciado el experimento, con valores de 93.6 y 70.3% a dosis de 200 y 400 mg/Kg de peso respectivamente. Se obtuvieron diferencias significativas en la dosis de 400 mg/Kg de peso con respecto al grupo control (-) para todos los tiempos evaluados.

De este análisis podemos inferir que la fracción a dosis de 200 mg/Kg de peso solo disminuye significativamente la inflamación producida por el agente injuriante, después de transcurridas 5 horas del experimento lo cual podría estar dado por un efecto antiinflamatorio ligeramente tardío o debido a retardo en la absorción dada la vía de administración y se observó un mayor efecto para la dosis de 400 mg/Kg de peso ya que hubo diferencias en todos los tiempo con el grupo control (-).

Al comparar los valores obtenidos para el grupo tratado con el extracto a la dosis de 400 mg/Kg de peso y el control positivo (Indometacina) no se observaron diferencias significativas.

Los resultados de este estudio mostraron que el extracto acuoso de hojas de *Capraria biflora*, L. posee efecto antiinflamatorio también al ser administrado por vía oral, disminuyendo significativamente el edema inducido por carragenina. Se observó un comportamiento similar al observado por vía intraperitoneal, en este caso se obtuvieron los mejores resultados para la dosis de 400 mg/Kg de peso sin diferencias significativas con el grupo control positivo.

El efecto mostrado por el extracto acuoso resultó superior al obtenido por Umkoro y Ashorobi, (2006) para un extracto acuoso de *Momordica charantia* administrado por vía oral y similar al extracto fluido de caisimón de anís (*Piper auritum*) (Vega y Lagarto, 1999)

### **3.2.2. Evaluación del efecto analgésico**

El efecto analgésico acompaña frecuentemente al efecto antiinflamatorio en drogas no esteroidales, por lo cual en la mayoría de los casos se estudian ambas actividades con el objetivo de incrementar las potencialidades de los fármacos o medicamentos en estudio.

La actividad analgésica de una sustancia puede determinarse mediante varias pruebas antinociceptivas que se basan en la aplicación de estímulos dolorosos (algésicos) y la valoración de cambios típicos observables en la conducta del animal. La mayor parte de los métodos de estudio se fundamentan en la determinación del umbral de reacción al dolor provocado por el estímulo algésico. Dichos estímulos pueden ser de tipo mecánico, térmico, químico en dependencia del método experimental empleado (CYTED, 1995)

#### **3.2.2.1. Inducción de contorsiones por ácido acético**

Los resultados obtenidos por el extracto acuoso de la planta en este modelo farmacológico se muestran en la Tabla 7.

Pudo observarse que en las condiciones evaluadas, los mayores índices de contorsiones se observaron en el grupo control manifestándose diferencias significativas entre este y el resto de los grupos tratados ( $p < 0.05$ ). El análisis

estadístico no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los grupos tratados a las diferentes dosis. No se observó relación dosis respuesta en el intervalo de dosis evaluado.

Tabla 7: Efecto del extracto acuoso de *Capraria biflora* L en el test de algesia inducida por ácido acético.

Grupos	DOSIS (mg/Kg)	Número de contorsiones	% de inhibición
Control	----	59.60± 6.08	----
Extracto acuoso de <i>Capraria biflora</i> L.	50	31.25 ± 5.20*	47.56
	100	32.70±6.43*	45.13
	200	32.50±3.57*	45.47
Ácido Acetil Salicílico	100	18.60±3.80*	68.79

(n= 8 \*  $p < 0,05$  contra control)

Es importante hacer notar que los valores de analgesia logrados por el extracto acuoso de *Capraria biflora* resultaron inferiores a los logrados por el control positivo, de igual manera los porcentos de inhibición mostrados por el extracto a las dosis evaluadas resultaron inferiores a los obtenidos por Borgi y colaboradores (2007) para un extracto acuoso obtenido de las raíces de *Zizyphus lotus*. Los valores resultaron inferiores también a los logrados por Sivaprakasam y colaboradores (1996), en extractos de *Ochna obtusata*.

Estos resultados indican un moderado efecto analgésico probablemente como consecuencia de la acción antiinflamatoria manifestada.

### 3.2.2.2. Prueba del plato caliente.

Los resultados para la prueba del plato caliente (Tabla 8) mostraron un comportamiento similar al ensayo anterior. En todos los casos existieron diferencias entre el antes y el después del tratamiento, no mostrando diferencias significativas entre los grupos tratados con el extracto, sin relación dosis respuesta.

Los resultados demostraron que el extracto manifestó a las dosis evaluadas propiedades analgésicas moderadas, lo cual sugiere su uso en el tratamiento de dolores leves, siendo inferiores al fármaco de referencia. Tal efecto pudiera deberse

a una inhibición de la síntesis de prostaglandinas y mediadores de la respuesta inflamatoria y por tanto un efecto analgésico indirecto.

Tabla 8: Efecto del extracto acuoso de *Capraria biflora L* en el test de algesia inducida por placa caliente.

Grupos	Dosis (mg/Kg)	Tiempo de Reacción $\pm$ SD		% inhibición
		Antes	Después	
Extracto acuoso de <i>Capraria biflora L</i>	50	4,66 $\pm$ 1,99	8,00 $\pm$ 2,3*	71
	100	5.10 $\pm$ 1,76	8,50 $\pm$ 2,14*	67
	200	5.66 $\pm$ 1,81	9,66 $\pm$ 3,24*	70
Sulfato de morfina	3	3.75 $\pm$ 1,70	> 10.00*	100

\*p<0.05 antes y después del tratamiento con el extracto SD: desviación Standar

Se conoce que además del efecto proinflamatorio de las prostaglandinas, ellas provocan dolor, pues sensibilizan las terminaciones nerviosas y estimulan los receptores dolorosos (Dray, 1995; Roberts y Morrow, 2001), y estimulan la producción de mediadores como histamina, cininas, etc. Teniendo en consideración estos aspectos el efecto manifestado por el extracto pudiera deberse a alguno de estos mecanismos, lo cual deberá ser comprobado experimentalmente.

### 3.2.3. Evaluación de la toxicidad del extracto acuoso

Generalmente se considera que las plantas medicinales no son tóxicas porque provienen de origen natural y han sido utilizadas por distintas civilizaciones, desde nuestros antepasados. No obstante el uso continuado durante siglos no es una garantía de seguridad y lo natural no siempre es menos tóxico que lo sintético. Siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud, en Cuba se desarrolla un amplio programa encaminado a la validación de muchos de los “remedios” que se emplean por la población y que aun carecen de fundamentación científica, así como los posibles riesgos toxicológicos de su administración (colectivo de autores, 2004).

Los estudios de toxicidad constituyen, hoy en día, una parte muy importante dentro del desarrollo de nuevos fármacos y se extienden prácticamente a lo largo de todo el proceso, el objetivo de los mismos es evaluar el riesgo o peligro potencial que un

agente químico o físico puede ocasionar sobre la salud humana cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas. Estos estudios por tanto no se limitan sólo a los fármacos, sino a la mayor parte de las sustancias químicas como pesticidas, agroquímicos, cosméticos, plásticos, etc.

Las agencias regulatorias internacionales son muy exigentes en la ruta crítica para la evaluación de la seguridad de los productos naturales estableciendo diversos ensayos para determinar la toxicidad, logrando una armonización en cuanto a normas o guías. Pero muchas de estas pruebas se consideran agresivas para el animal ocasionándoles estrés y dolor. Es por ello que ha surgido un movimiento protector de los animales de laboratorio que ha posibilitado la introducción y validación de nuevas técnicas, que reemplazan estos modelos biológicos *in vivo* por otros *in vitro*, por lo que se logra un mayor refinamiento. El desarrollo de estos métodos alternativos ha posibilitado la introducción de marcadores más sensibles, específicos y de bajo costo, algunos de los cuales ya comienzan a introducirse en Cuba.

Dentro de la batería de ensayos de primera barrera se encuentran los estudios de toxicidad a dosis única como criterios para la estimación del potencial tóxico de una sustancia, referido como el estudio cuali y cuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas.

Como resultado de la administración de una dosis única de 2000 mg/Kg se obtuvo un 100% de supervivencia. Las observaciones sistemáticas diarias no mostraron evidencias de ningún signo de toxicidad en los grupos tratados. Por otra parte el análisis de los pesos corporales mostró un comportamiento normal a lo largo de la experiencia, no existiendo diferencias significativas con el grupo control ( $p > 0.05$ ). Los resultados obtenidos para los 7 y los 14 días indicaron que el tratamiento no ejerce ningún efecto en la variación de los pesos corporales. Finalmente se realizó el análisis macroscópico de los órganos, no observándose afectación en ninguno de ellos.

Sobre esta planta no se reporta información toxicológica en la literatura médica, solo advertencias de un posible efecto sedante sobre el sistema nervioso central a dosis excesivas (Roig, 1988; Guzman, 1975 y Morton, 1981). Debe destacarse que tras la

administración a 2000 mg/Kg de peso no se observan efectos sedantes sobre el sistema nervioso, no se evidenciaron tampoco, síntomas de somnolencia o sedación, al contrario se observó un ligero efecto estimulante en las primeras 8 horas post administración, estos resultados permitieron concluir que a estas dosis el extracto no manifiesta efecto sedante por lo que puede emplearse sin riesgo en ese sentido. El ligero efecto estimulante observado pudiera explicar el uso de las infusiones de hojas de *Capraria biflora* L.; como té de hierbas y sustituto del té de china (Edwin, 1971; Tanaka 1976; Ideker, 1996).

El extracto acuoso de *Capraria biflora* L. en las condiciones evaluadas, no induce mortalidad en ratones ni aparecen los signos de toxicidad, por lo que puede considerarse que el uso de este extracto resulta seguro aun mas que otros analgésicos convencionales. Al respecto por solo citar un ejemplo, la Indometacina tiene una DL<sub>50</sub> de 12 mg/Kg de peso en ratas y 50 mg/Kg de peso en ratones por vía oral y puede inducir efectos adversos en pacientes bajo tratamiento (Barnhart, 1989), lo cual hace ventajoso el uso del extracto acuoso de *Capraria biflora* L. como tratamiento alternativo o complementario que permita reducir las dosis de los antiinflamatorios convencionales.

Si bien los AINEs constituyen uno de los grupos de medicamentos más prescritos por presentar una gran variedad de indicaciones terapéuticas, dada su combinación variable de acciones antiinflamatoria, analgésica, antipirética y antiagregante plaquetaria, su utilización se ve limitada, por la posible aparición de efectos adversos potencialmente letales. Estos efectos adversos de los AINEs han sido conocidos desde su introducción, prácticamente a la par que sus propiedades terapéuticas; y son responsables de ingresos hospitalarios e incluso fallecimientos en todo el mundo. Ante esta problemática y la necesidad de reducir estos efectos se han desarrollado nuevos fármacos más selectivos (inhibidores de la cicloxigenasa 2) que, manteniendo sus propiedades terapéuticas, producen menores efectos indeseables. En muchos casos estos fármacos no han resuelto la totalidad del problema (Gonzalez y col., 2002), por lo cual la búsqueda de alternativas naturales parece ser una solución viable.

En este contexto las hojas de *Capraria biflora* pueden resultar una posibilidad de ampliación del arsenal terapéutico para nuestros servicios de salud. En etapas

futuros de trabajo deberán ensayarse alternativas de presentación o formulación que permitan disponer de un nuevo producto natural.

### **3.3. Estudio fitoquímico**

#### **3.3.1 Metodología 1**

Con el objetivo de obtener fracciones con menor complejidad en cuanto a número de componentes que permitan el aislamiento de algunos de ellos por métodos clásicos, se realizó el fraccionamiento del extracto acuoso, empleando el intercambio líquido-líquido agua-n-butanol (figura 1), conociendo que este es un buen disolvente para extraer los componentes tipo flavonoide (Markham, 1988).

##### **3.3.1.1. Evaluación cromatográfica de la fracción n-butanol y del crudo**

En el caso de la fracción de n-butanol las mejores fases móviles resultaron ser n-butanol: ácido acético: agua (BAW) (40:10:50) y la fase móvil acetato de etilo: metanol (85:15), no obstante se observó mejor resolución para la fase móvil n-butanol: ácido acético: agua (40: 10: 50) que para la fase móvil acetato de etilo: metanol (85:15) pues esta última mostró poca retención de los metabolitos.

Empleando la cromatografía con la fase móvil BAW a la fracción n-butanol se obtuvieron ocho manchas bajo condiciones UV a  $\lambda = 254\text{nm}$  cuyos valores Rf se correspondieron con 0,22; 0,4; 0,46; 0,52; 0,56; 0,62; 0,7; 0,78. Al observar el cromatograma bajo luz ultravioleta UV  $\lambda = 366\text{nm}$ , las manchas de Rf 0,52 y Rf 0,56 se visualizaron de color amarillo y la mancha de Rf 0,62 apareció con una coloración carmelita, además apareció una mancha adicional de color verde fluorescente a un Rf de 0,66.

Al revelar con el tricloruro de aluminio en ambas fases móviles se observaron manchas fluorescentes al UV 366 nm de color amarillo verdoso típicas de flavonas y flavanonas (Lock de Ugaz, 1988) y otras de color azul intenso que pudieran estar relacionadas con estructura tipo flavonoide o tipo coumarina (Wagner and Blandt, 1996) de esta manera puede considerarse esta fracción una buena alternativa para el estudio de estos metabolitos presentes en el extracto acuoso de la especie.

Con el objetivo de profundizar en el estudio de la fracción n-butanólica, esta se disolvió en metanol y se precipitó sobre éter, obteniéndose tras centrifugación dos fracciones un sobrenadante y un precipitado de color amarillo rojizo al cual se le

denominó crudo (II). Ambas fracciones resultaron activas en el test de inducción de inflamación en peces cebras y ricas en productos fenólicos y flavonoides.

Se redujo el volumen del sobrenadante y se dejó en reposo 72 horas, al cabo de este tiempo se obtuvo un nuevo precipitado que posteriormente se lavó con acetona y con metanol obteniendo 11 mg de un polvo de color blanco con apariencia cristalina, el cual fue denominado Cb1 que resultó capaz de inhibir también la inflamación en los embriones de peces cebras, aunque en menor medida que la fracción butanólica de la cual se originó.

En el caso del crudo (II) aparecieron tres manchas en el cromatograma (Figura 3) que coincidieron en valores de Rf con las que aparecen en la fracción n-butanólica (Rf 0.52; 0.56; 0.62) respectivamente y con coloración amarilla a UV  $\lambda = 366\text{nm}$  (Figura 3A).

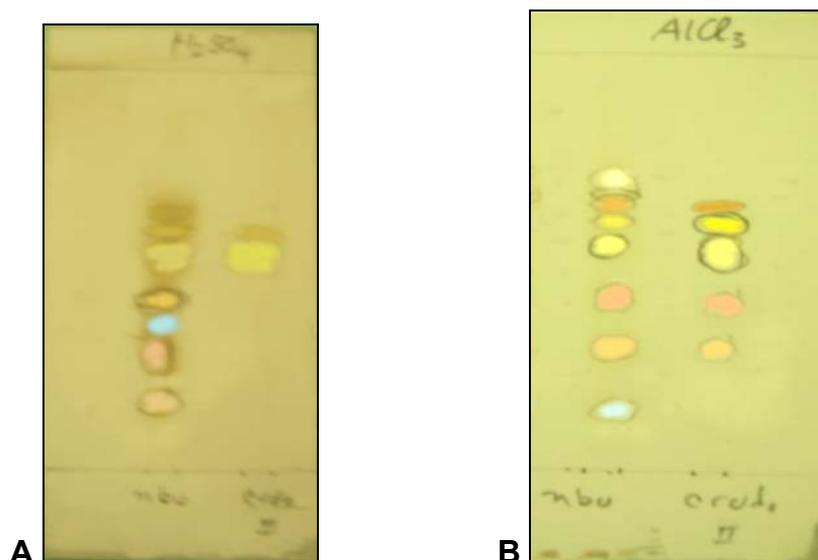


Figura 3. Cromatograma de la fracción n-butanol y del crudo II

A: Revelado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50%/agua al visible. B: Revelado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50%/ agua al UV 366nm.

C: Revelado con  $\text{AlCl}_3$  a UV 366nm

Al revelar las placas con ácido sulfúrico las manchas tomaron coloración parda oscura y al aplicar el calor estas se tornaron de color amarillo-pardo al visible, comportamiento típico de estructura tipo flavonoide (Mabry, 1988).

Con tricloruro de aluminio las manchas tomaron coloración mas intensa. Al exponer las placas bajo UV  $\lambda = 366\text{nm}$  se visualizaron desde azul, amarilla hasta parda. Se observaron las ocho manchas de la fracción n-butanol: cuatro manchas amarillas

que variaron de coloración desde amarilla clara, parda oscura hasta amarilla intensa con los valores de Rf de 0,72; 0,64; 0,6 y 0,52, observándose las tres últimas en el crudo con gran intensidad. Las manchas con Rf 0,41 y 0,3 aparecieron en las dos fracciones, también más intensas en el crudo; por último no se observó en el crudo la mancha azul claro fluorescente (Rf 0,14) (figura 3B).

### **3.3.1.2. Aislamiento por cromatografía preparativa (CCDp) a partir del crudo II**

Teniendo en cuenta los resultados fitoquímicos obtenidos para el crudo y la comprobación del efecto biológico se decidió continuar en el análisis de dicha fracción con la finalidad de aislar algún componente. Se realizó una placa preparativa para el crudo II obteniéndose seis franjas que se rasparon y se eluyeron con metanol caliente, posteriormente se evaluaron cromatográficamente por CCD y según el perfil cromatográfico se reunieron en tres nuevas fracciones.

Las tres fracciones se sometieron a cristalización en metanol, en las fracciones FII y FIII, luego de varias horas en reposo se encontraron dos productos en forma sólida que se lavaron con éter etílico, obteniéndose uno con apariencia cristalina de color amarillo (Cb2) y otro de color blanco (Cb3).

Los resultados cromatográficos bidimensionales confirmaron la pureza del sólido Cb2 corroborándose por la aparición de una sola mancha en el cromatograma.

### **3.3.2. Metodología 2**

Teniendo en cuenta los resultados ya descritos y considerando la riqueza química del extracto se decidió realizar otra metodología (figura 2) que incluyó extracciones previas con solventes menos polares que permitieran obtener fracciones más sencillas para lo cual se extrajo inicialmente con cloroformo, disolvente útil para la extracción de flavonoides menos polares y posteriormente se extrajo con n-butanol disolvente de probada eficacia para la extracción de este tipo de compuesto; De esta manera se obtuvieron tres fracciones: fracción de cloroformo (FC), fracción n-butanólica (FB) y fracción acuosa remanente (FAR), las cuales se concentraron a sequedad en rotoevaporador.

Como resultado del intercambio líquido-líquido con cloroformo se obtuvo un extracto de color verde amarillento que al ser rotoevaporado rindió 0.558g de un semisólido de un aroma similar al café, el cual se denominó FC. El posterior fraccionamiento

con n butanol originó un extracto de color carmelita que rindió 8,26g, mientras que la fracción acuosa final, también de color carmelita intenso, lo hizo para 10,93 g.

### 3.3.2.1. Evaluación química y farmacológica de las fracciones

Las fracciones obtenidas en el proceso de partición se evaluaron a través de técnicas de tamizaje fitoquímico según la metodología establecida por el Manual de prácticas de laboratorio de Farmacognosia ( Miranda y Cuéllar, 2001) y por CCD.

Los resultados del tamizaje fitoquímico se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados de evaluación fitoquímica cualitativa

metabolitos	extracto acuoso inicial	fracción clorofórmica	fracción n-butanólica	fracción acuosa remanente
Saponinas	+	+	-	-
Esteroides y/o triterpenos	+	+	-	+
Fenoles y/o taninos	+	Fenoles (+)	+	Taninos (+)
Ácidos grasos	+	+	-	+
Compuestos reductores	+	-	+	++
Flavonoides	+	+	++	+

Los flavonoides, compuestos de interés, se observaron todas las fracciones evaluadas, fundamentalmente en la clorofórmica y n-butanólica, aunque resultaron mas abundantes en la fracción n-butanólica, presumiblemente de tipo flavona, flavonol, o flavanona.

Según los resultados obtenidos, las saponinas parecen estar acompañando a los flavonoides fundamentalmente en el extracto n-butanólico lo cual es lógico pues este disolvente es descrito también para el aislamiento de este tipo de metabolito (Mabry, 1970).

La fracción acuosa remanente contiene mayoritariamente compuestos fenólicos posiblemente taninos ya informados para la planta en cantidades apreciables por Moráis y colaboradores, 1995 y Tejeda en 1998, así como compuestos reductores, los cuales pueden estar en forma glicosídica o en su forma libre (Miranda y Cuellar, 2000).

Con respecto al análisis cromatográfico cualitativo por CCD, (figura 4), se observó que las tres subfracciones resultaban aún muy complejas desde el punto de vista químico.

En la fracción clorofórmica, se observaron seis manchas a Rfs 0,18; 0,23; 0,25; 0,38; 0,58; 0,85 para las manchas 1-6 respectivamente al emplear acetato: metanol (8:2) como fase móvil. Las manchas 4 y 6 presentaron fluorescencia de color rojo bajo luz UV ( $\lambda_{254}$ ), indicativo de la presencia de clorofila (banda 6) y un derivado clorofílico (banda 4). Por otra parte, las bandas 1 y 4 presentaron fluorescencia azul ( $\lambda_{366}$ ) pudiendo corresponder con estructuras tipo flavonoide o coumarina (Wagner and Bladt, 1996). Finalmente, las manchas 3 y 5 mostraron desarrollo cromatográfico propio de estructuras tipo flavonoide (amarillo fluorescente con tricloruro de aluminio); esta última se mostró con gran intensidad y bien separada del resto de las manchas.

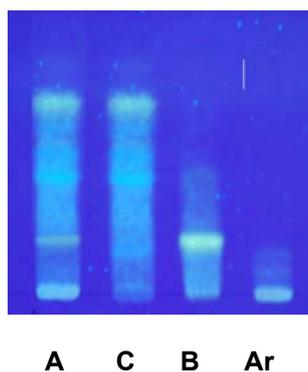


Figura 4. Cromatograma de las fracciones metodológica 2

*A: acuoso C: cloroformico B: butanolico Ar: acuosa remanente*

Por su parte la fracción n-butanólica mostró siete manchas con Rf 0,09; 0,12; 0,21; 0,41; 0,48; 0,51 y 0,52, estas tres últimas con fluorescencia azul y muy poco resueltas. La mancha 3 (Rf 0,21) se visualizó muy intensa (compuesto mayoritario) y con marcada fluorescencia amarilla, propia de flavonoides.

Finalmente, la fracción acuosa remanente, aunque mostró evidencias cualitativas propias de flavonoides, los compuestos presentes en esta fracción resultaron muy retenidos y poco resueltos en todas las fases móviles evaluadas, quedando reservada para futuras investigaciones.

Los resultados de la evaluación farmacológica de las fracciones (Tabla 10) muestran que la fracción clorofórmica presentaba menor actividad de la MPO y por

consiguiente mayor efecto antiinflamatorio seguida de la fracción butanólica, mientras que la fracción acuosa remanente presentaba una actividad antiinflamatoria muy reducida.

Tabla 10: Porcentaje de migración leucocitaria en modelo de peces cebras para las fracciones.

Muestras	% migración leucocitaria
Fracción clorofórmica 300µg/mL	6.66
Fracción butanólica 300µg/mL	33.33
Fracción acuosa remanente. 300µg/mL	83.33

### 3.3.2.2. Aislamiento y purificación de los compuestos mayoritarios presentes en la fracción de cloroformo (FC)

Considerando los resultados del tamizaje fitoquímico y conociendo que la extracción con agua caliente permite en muchos casos remover parte de los ácidos grasos presentes en el material vegetal e incorporarlos a los extractos (Alva y col, 2002; Iwueke y col, 2006) se procedió a la identificación de los compuestos de naturaleza lipídica presentes en el semisólido FC. Para ello se desarrolló la evaluación de la muestra por cromatografía gaseosa (CG), la cual constituye la técnica de elección para el análisis de ácidos grasos, según recomienda la literatura especializada (British Pharmacopoeia, 2004; European Pharmacopoeia 2005). Para este procedimiento los ácidos grasos se derivatizaron, previo a su determinación por CG, a través de la metodología reportada por Christie W., 1993.

En la figura 5 se presenta el cromatograma correspondiente a la muestra de ensayo con cuatro señales fundamentales a tiempos de retención 15,76; 17,86; 19,27; y 36,77 para los picos 1, 2, 3 y 4 respectivamente, siendo este último el que se encuentra en mayor proporción, al considerar las áreas bajo la curva.

Los resultados se compararon con el cromatograma correspondiente a la respuesta del blanco, observándose que no existieron interferencias con las señales de la muestra. Al analizar los tiempos de retención obtenidos para cada uno de los patrones y comparar los tiempos de retención de las señales presentes en el cromatograma de la muestra se pudo inferir que los picos de esta última se

correspondieron con el metil dodecanoato (laurato) con tiempo de retención de 17.98 min, el metil hendecanoato con 15.81 min y metil palmitato con 36.86 min. Se destaca que la respuesta del blanco no mostró interferencias tampoco para el caso de los patrones evaluados, ya que no aparece ningún pico con los mismos tiempos de retención de los patrones.

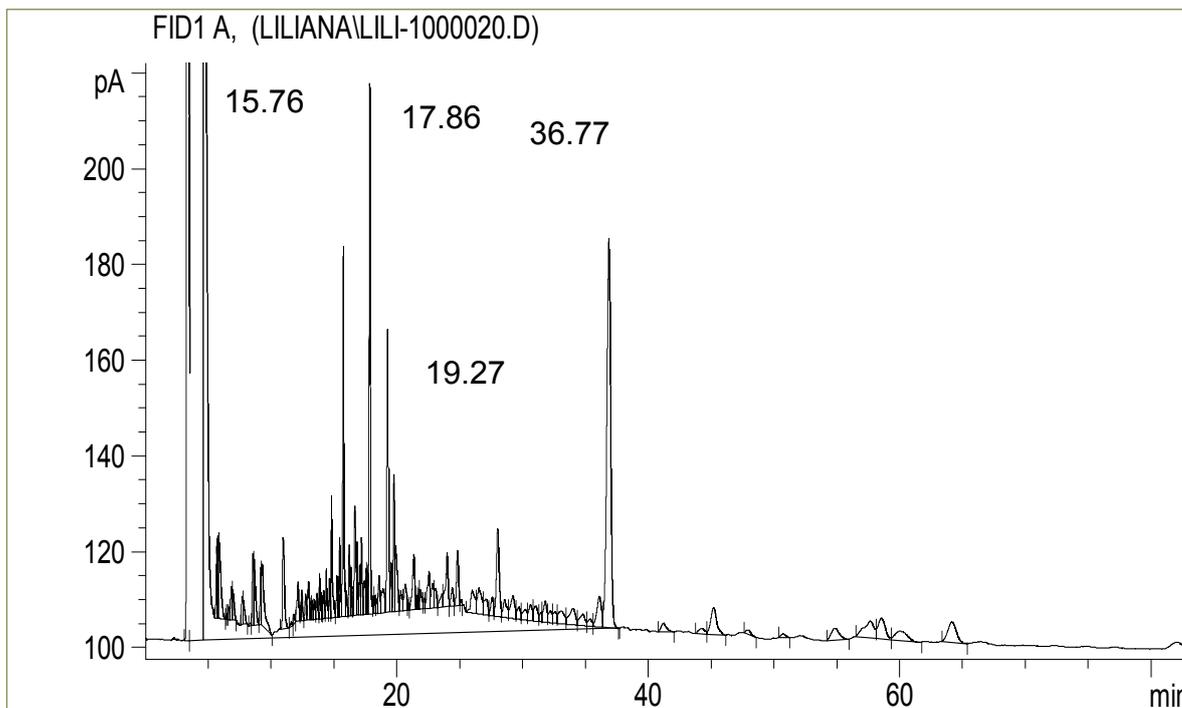


Figura 5. Cromatograma de la fracción clorofórmica metilada

La correspondencia de estos tiempos de retención con los mostrados en la respuesta de la muestra se corroboró con la adición de cada patrón a la muestra, de manera independiente en cada caso, donde se observó un enriquecimiento de los picos correspondientes, con valores de simetría muy cercanos a 1. Es oportuno señalar que ninguno de los ácidos empleados como patrones coincidió en  $R_f$  con la señal presente a 19.26 min la cual no pudo ser identificada y requerirá otros estudios complementarios. Los resultados alcanzados con la aplicación de la Cromatografía Gaseosa permitieron sugerir que los ácidos grasos Láurico, hendecanoico y palmítico estaban presentes en el extracto.

La presencia de estos compuestos es informada por primera vez para la especie y pudieran contribuir a la actividad antiinflamatoria mostrada por el extracto, pues se ha comprobado su presencia en plantas y extractos, con comprobada acción antiinflamatoria y útiles en trastornos que involucran esta patología. Por ejemplo: el

ácido palmítico está presente en cantidades importantes en la mezcla de ácidos grasos de la caña de azúcar, la cual resultó activa como antiinflamatoria y analgésica, considerándose que estos ácidos grasos pueden contribuir a los efectos mostrados (Ledón y col., 2003). El ácido láurico está presente en cantidades apreciables en la porción saponificable del extracto lipoesterólico del fruto del sabal, *Serenoa repens*, ampliamente utilizados en el tratamiento de la Hipertrofia Prostática Benigna y con comprobada actividad antiinflamatoria. Se estima que la acción farmacológica se debe a una doble acción manifestada por el extracto: antiadrenérgica y antiinflamatoria; la porción enriquecida en ácido láurico posee un efecto inhibitorio dual de las dos vías del metabolismo del ácido araquidónico (vía de la ciclooxigenasa y vía de la 5-lipooxigenasa) (Vanacloxta, 2003). Además, el extracto lipoestearico original posee una acción antiedematosa, demostrada en modelos experimentales in vivo, actuando sobre la fase vascular de la inflamación por inhibición de la histamina. No se tienen referencias de posibles aplicaciones o contribución del ácido hendecanoico.

#### **-Fraccionamiento en columna de la fracción clorofórmica**

Con el objetivo de separar el resto de los componentes presentes en la fracción de cloroformo (FC) se desarrolló una columna cromatográfica de gel de sílice, obteniéndose 160 fracciones de 10 mL cada una, al eluir con acetato de etilo: metanol en una relación 8:2 (v:v). Las fracciones obtenidas se evaluaron por CCD y se reunieron en 3 subfracciones FC-I (8-20) (139.9 mg), FC-II (22-25) (20.6mg) y FC-III (26-110) (74.4mg) según su perfil cromatográfico teniendo en cuenta la presencia de las bandas 5, 4 y 3 respectivamente (Figura 6).

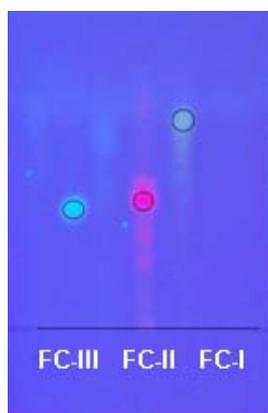


Figura 6. Cromatograma de las fracciones obtenidas a partir de FC

La subfracción FC-III, enriquecida en la banda 3, de fluorescencia azul al UV, se recromatografió en columna de Sephadex LH20 y metanol: agua (6:4) como fase móvil, se obtuvieron 30 fracciones que al ser reunidas según perfil cromatográfico en fase reversa y metanol: agua (6:4) originó un semisólido de color amarillo y aroma similar al del café lo cual sugirió la posible presencia de ácidos aromáticos. El análisis espectroscópico evidenció una mezcla muy compleja, por lo cual la muestra se destinó a futuras evaluaciones fitoquímicas.

El color verde intenso y fluorescencia roja a UV 254 mostrado por la fracción FC-II sugirió la presencia de un compuesto de estructura similar a la clorofila, esta se recromatografió en sephadex LH20 y metanol: agua (9:1) como fase móvil, para rendir 35 fracciones que se reunieron según cromatograma (Fase reversa y metanol: agua (9:1)) y destinada a caracterización por análisis espectral.

Adicionalmente, la subfracción FC-I que resultó enriquecida en la banda 5, de fluorescencia amarilla al UV al ser revelado con tricloruro de aluminio, con el objetivo de purificar el compuesto mayoritario (139.9 mg), se realizó una columna donde se obtuvieron 30 fracciones, las que se reunieron según perfil obteniéndose 93.9 mg de un sólido de color amarillo con relativa pureza y con Rf y comportamiento frente al tricloruro de aluminio que se correspondió al encontrado para la banda C5 en iguales condiciones experimentales.

### **3.3.2.3. Aislamiento y purificación de los compuestos presentes en la fracción de n-butanol (FB<sub>2</sub>).**

Con el objetivo de separar los componentes presentes en la fracción de n-butanol (FB<sub>2</sub>) obtenida de la segunda variante de fraccionamiento, se disolvieron 1.55g del semisólido FB<sub>2</sub>, se aplicaron sobre columna cromatográfica, según se describe en epígrafe 2.4.2.3 y se obtuvieron 110 fracciones (10mL).

Las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica se reunieron según su perfil en CCD y se obtuvieron 3 subfracciones considerando la presencia de las bandas 2, 3, y 5 respectivamente, denominadas F-BI(69-89) con 43.8mg, FB-II (30-68) con 103.4mg, FB-III (4-23) con 26mg y un precipitado (21 - 27) con 15.9mg.

Considerando la menor complejidad de la subfracción enriquecida en 3 (FB-II), se recromatografió en sephadex LH20 y metanol: agua (6:4) como fase móvil, para

rendir 45 fracciones que se reunieron según perfil en CCD. Se obtuvo como resultado una fracción denominada B3 (55.3 mg) que se destinó a evaluación espectroscópica.

### 3.3.3. Análisis espectroscópico de los compuestos aislados.

#### -Análisis espectroscópico del compuesto Cb1

En el análisis espectroscópico RMN<sup>13</sup>C del polvo blanco Cb1, (Figura 7, Anexo 2) obtenido por cristalización en metanol del sobrenadante, se observaron tres señales en  $\delta$  71.2946 ppm;  $\delta$  69.6394 ppm y  $\delta$  63.8471 ppm las cuales indicaron la presencia de carbonos de grupo-CH, con diferentes entornos químicos y la presencia de los carbonos de tipo -CH<sub>2</sub>. Estos resultados se corroboraron por las señales obtenidas en el espectro DEPT 135°. En el espectro RMN <sup>13</sup>C (DEPT 135°) (Figura 8, Anexo 3), aparecieron dos señales muy similares con corrimientos químicos a  $\delta$  71.1934 y  $\delta$  69.5468 ppm, que corroboran la presencia de carbonos de naturaleza (-CH<sub>2</sub>).

En el espectro RMN<sup>1</sup>H se distinguió con claridad la presencia de ocho protones (Figura 9, Anexo 4), donde aparecieron cuatro señales, dos dupletos entre  $\delta$  4.11ppm y  $\delta$  4.41ppm los cuales justifican la presencia de los protones de tipo -CH<sub>2</sub> (C<sub>sp3</sub>) acoplados a sus protones vecinos y una zona de señales múltiples con corrimientos que aparecieron a partir de  $\delta$  3.33ppm a  $\delta$  3.51ppm que indicaron la presencia de protones de -CH (C<sub>sp3</sub>). En la zona de los dupletos aparecieron dos de ellos con gran diferencia entre sus corrimientos químicos ( $\delta$  2.73ppm) lo que sugirió la existencia de acoplamiento geminal entre dos protones. Combinando estos resultados con los obtenidos de los espectros de RMN<sup>13</sup>C, DEPT 135° se pudo sugerir que la molécula del producto en estudio contenía dos grupo -CH<sub>2</sub>, cuatro grupo -CH, con simetría molecular.

En los espectros HSQC (Figura 10, Anexo 5) y HMBC (Figura 11, anexo 6) aparecieron señales que permitieron establecer la correlación entre los carbonos y los protones. En el espectro HSQC se observó una señal a  $\delta$  71.85 ppm que correlacionó con  $\delta$  3.45 ppm del espectro protónico y otra señal en  $\delta$  70.18ppm y  $\delta$  3.48ppm, lo cual justificó la presencia de grupos -CH. Se encontraron otras dos señales en  $\delta$  64,2ppm para el carbono y  $\delta$  3.42 y  $\delta$  3.51 ppm para los hidrógenos, de lo que pudo inferirse la presencia del grupo -CH<sub>2</sub>. En el espectro HMBC aparecieron varias señales, fundamentalmente, se comprobó la correlación entre el carbono que

aparece a  $\delta$  71.85ppm y los protones que aparecieron a  $\delta$  3.42, 3.48, 4.12, 4.32, y 4.39ppm correspondientes con los acoplamientos entre el carbono CH y los protones vecinos. Adicionalmente el espectro mostró cinco señales con corrimiento químico para el carbono de 69.9 ppm que correlacionaba con  $\delta$  3.42, 3.45, 3.51, 4.12 y 4.39 ppm, lo que justificó la presencia de otro grupo CH, también se observaron señales que justificaron la presencia de los grupos CH<sub>2</sub> en la estructura. Los corrimientos químicos observados en el espectro de RMN<sup>13</sup>C para el manitol, se correspondieron con los que se informan para el patrón de sustitución de este compuesto (Markham, 1989).

Tras el análisis espectroscópico por RMN <sup>13</sup>C, DEPT y <sup>1</sup>H y los experimentos bidimensionales HSQC y HMBC, además la comparación de los resultados en los espectros con los informados en la cartoteca, permitió asignar la estructura del **manitol** al compuesto nombrado como Cb1 (figura 12), en correspondencia con lo informado en la literatura (Pinto y col., 2004)

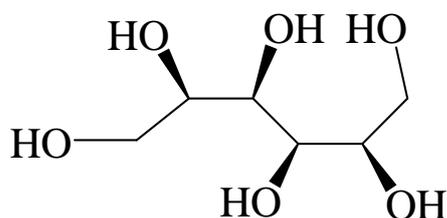


Figura 12. Estructura propuesta para el compuesto Cb1

La presencia de este compuesto en el extracto acuoso de la especie *Capraria*, pudiera justificar el efecto diurético de dicho extracto (Lorenzo, 2002), y por tanto avalar este uso tradicional de la planta, lo cual constituye un valioso aporte al conocimiento de esta especie. El manitol es un diurético osmótico de amplio uso en la medicina, fundamentalmente para reducir el edema por traumatismo craneencefálico agudo al provocar una reducción en el volumen cerebral y puede emplearse para disminuir la presión intracraneal (Martin y Smith, 2004).

Este azúcar acíclico es sintetizado por varias especies de plantas donde se encuentra en relativa abundancia, como por ejemplo, *Gelidium arbuscula* bory y *Gelidium cartilagineum* (Cárdell, 1977) *Ixora coccinea* (Pinto y col., 2004), *Genipa*

*americana*, L. ( Lima y col., 2007) aportando valor nutritivo a las mismas y su utilización en los llamados productos Ligh (Lima y col. 2007) lo cual puede aportar valor como nutracéutico al extracto acuoso de la especie evaluada, si adicionalmente consideramos el alto contenido de minerales que presenta (Tejeda, 1998).

### -Análisis espectroscópico del compuesto Cb2

El espectro UV-VIS manifestó el comportamiento típico para flavonoides tipo flavonana (Miranda y Cuellar, 2001; Lock de Ugaz, 1988), apareciendo las dos bandas características a 275 nm la primera y la segunda banda 306 nm., en correspondencia con los datos referidos en la literatura (Mabry, 1970)

En el análisis espectroscópico del polvo amarillo aparecieron 15 señales en RMN<sup>13</sup>C (Figura 13, Anexo 7; Figura 14, Anexo 8) las cuales justificaron la presencia del núcleo de tipo flavonoide (figura 15).

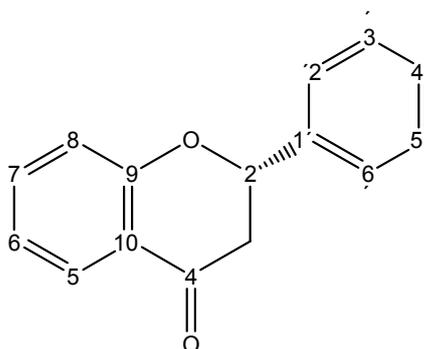


Figura 15. Núcleo base de los flavonoides

También apareció un corrimiento químico a campo bajo de  $\delta$ 196.4 ppm valor que es característico para el carbono carbonílico del anillo C que participa en una asociación por puente de hidrógeno con algún grupo vecino, así apareció en el espectro protónico una señal con un corrimiento a  $\delta$  12.6 ppm, valor que justifica la participación del grupo hidroxilo del carbono cinco del anillo A en un enlace de hidrógeno con el grupo que aparece en el carbono cuatro, en el patrón de sustitución del anillo A se observó la aparición de un singuleto de protón aromático a  $\delta$ -9.5 ppm, esto permitió sugerir dicho valor al carbono 8.

La aparición de un sistema AB comprendiendo 2 dobletes (2H) y las señales a  $\delta$  7.4 ppm y  $\delta$  6.8 ppm mostraron que el anillo B del flavonoide es para-sustituido. En el

espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apareció una señal con un corrimiento a 157.8 ppm que sugirió la presencia de un grupo hidroxilo en posición 4', también aparecieron señales a  $\delta$  115.2 ppm y  $\delta$  129.9 ppm lo que permitió establecer correspondencia con los carbonos 2', 6', 3' y 5' del propio anillo.

Por otra parte apareció un singuleto ancho a  $\delta$  10.8 ppm en el espectro RMN  $^1\text{H}$ , (Figura 16, Anexo 9)). 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.

De acuerdo con los resultados cromatograficos, la aplicación de métodos espectroscópicos (RMN  $^{13}\text{C}$  y RMN  $^1\text{H}$ ) y como resultado de la comparación de los espectros obtenidos para el compuesto evaluado y los que se muestran por el catálogo Aldrich, se evidenció una total correspondencia y se pudo establecer como propuesta estructural (figura 17) la estructura de la **Naringenina** para el sólido amarillodenominado Cb2, aislado de la fracción FB1.

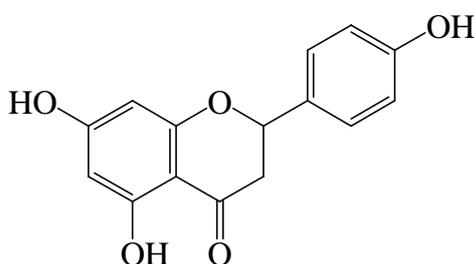


Figura 17. Estructura propuesta para el sólido Cb2

Los resultados cromatográficos de la evaluación contra patrones de flavonoides, bajo las condiciones descritas en el epígrafe 2.3.2, mostraron una mancha para este compuesto con un  $R_f$  de 0.62, teniendo total correspondencia con el  $R_f$  de la Naringenina en iguales condiciones cromatográficas (Mabry, 1970). Y similar comportamiento frente a los reactivos de identificación, corroborando la asignación estructural. Este flavonoide es informado por primera vez para la planta.

Estos resultados fitoquímicos constituyen uno de los aportes más valioso de esta investigación y proporciona el conocimiento científico necesario para continuar con los estudios de esta especie botánica. Este flavonoide posee efecto antiinflamatorio vía cicloxigenasa fundamentalmente (Zhang, 2006). Se comprobó

experimentalmente que este compuesto disminuye de manera marcada la liberación de PGE<sub>2</sub> y la expresión de la COX-2 (Raso y col., 2001), adicionalmente, estudios *in vitro* han demostrado que este flavonoide reprime la producción de óxido nítrico y la secreción del factor de necrosis tumoral manifestando acción inmunomoduladora, lo que puede reforzar la actividad a (Lyu y Park., 2005)

### -Análisis espectroscópico del compuesto B3

Los resultados espectroscópicos para el sólido C4, sugieren al feoforbide como la propuesta estructural para el dicho compuesto (figura 18), por comparación de los espectros realizados a la muestra de referencia y cartoteca del equipo de RMN. Los estudios cromatográficos contra patrón de feoforbide confirmaron dicha propuesta estructural.

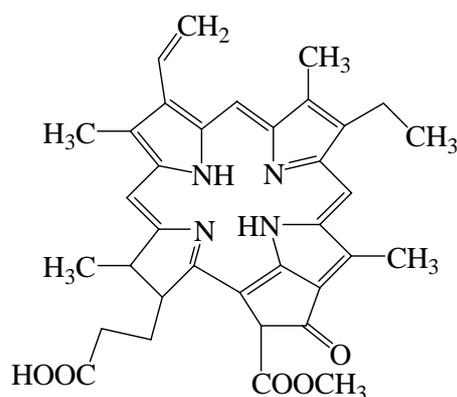


Figura 18. Estructura propuesta para el compuesto C4.

La presencia de este compuesto es informada por primera vez para la especie y constituye un aporte científico de la presente investigación. Estudios recientes (Heinrich, 2001) demostraron que derivados clorofílicos, en particular el feoforbide, manifestaron potentes efectos inhibidores del factor NF- $\kappa$ B, el cual participa en la cascada de la inflamación. Este compuesto se aisló a partir del extracto etanólico de hojas de *Solanum diflorum* y su presencia confirmó el uso tópico de las hojas de esta especie en el tratamiento de afecciones inflamatorias de la piel, reportado por la medicina tradicional a esta especie (Frei, 1998). Otras plantas (*Solanum lanceolatum* Cav, y *Urtica dioica*) presentaron también altos niveles de estos derivados en sus extractos, resultando también inhibidoras de NF- $\kappa$ B (Riemann 1999; Frei, 1998).

El uso de extractos ricos en estos metabolitos es valorado actualmente como terapia en otras afecciones como el cáncer (Sharman, 1999). Considerando estos elementos, la presencia del feoforbide en los extractos de *Capraria biflora* incrementa las potencialidades de esta planta como posible fitomedicamento.

### -Análisis espectroscópico del compuesto C5

El espectro UV-VIS del compuesto C5 también manifestó el comportamiento típico para flavonoides tipo flavona, apareciendo las dos bandas características de este tipo de compuesto (Miranda y Cuellar, 2001; Lock de Ugaz, 1988).

El análisis de los espectros RMN  $^1\text{H}$  (figuras 19 a y b, anexos 10 y 11) y el RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 20, anexo 12) del compuesto C5, sugirió la presencia de una mezcla de compuestos de naturaleza fenólica en dicha fracción, en los espectros se observaron un grupo de señales que son típicas de compuestos flavonoides con sustituyentes metilos.

Así los corrimientos químicos observados en el espectro RMN  $^1\text{H}$  entre 375-390 ppm justifican la aparición de agrupaciones  $\text{CH}_3$  en los compuestos que aparecen en la mezcla evaluada, por otra parte las señales del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  a 55.3 y 55.9 ppm pueden justificar la aparición de los grupos metilos en las posiciones 6, 7 y 4' del aglicón de flavonoide, pero el resto de las señales se correspondieron con la estructura de la **Luteolina y la Apigenina**, por tal razón los grupos metilos estarían ocupando las posiciones 7 y /o 4' en el aglicón (figura 21).

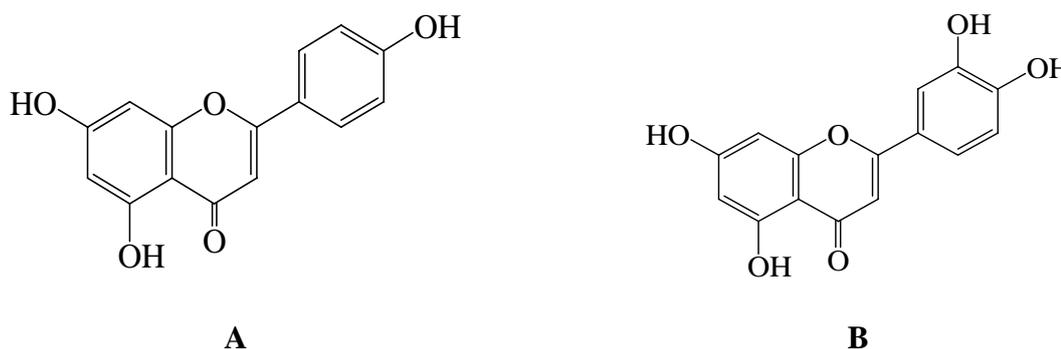


Figura 21. Posibles estructuras de los aglicones de los compuestos presentes en la mezcla C5( A -apigenina, B - luteolina)

Los flavonoides metilados tienden a ser menos polares y por tanto mas solubles en disolventes menos polares, lo cual justifica su presencia en cloroformo, esto sugiere

la posibilidad de extraerlos en mayor proporción usando este tipo de disolvente directamente del material vegetal (Harborne, 1988).

La presencia de estos compuestos se informa por primera vez para la especie y justifica el efecto antiinflamatorio del extracto al poseer probada efectividad como compuestos antiinflamatorios (Ziyan y col, 2007; Odontuya, 2005).

Como ya se comentó anteriormente, los flavonoides ejercen efectos antiinflamatorios a través de múltiples mecanismos, uno de los cuales es inhibir la generación de eicosanoides derivados de las vías enzimáticas COX o LOX. Según lo descrito en literatura existe una relación estructura-actividad antiinflamatoria de los flavonoides donde la presencia de OH en las posiciones 5 y 7 en el anillo A y en las posiciones 3' y 4' del anillo B favorecerían la actividad inhibitoria, mientras que la presencia de un sustituyente hidroxilo en meta (anillo B) anularía la actividad (Kim y col., 1999). En ambos compuestos identificados en la fracción C5, derivados de las agliconas apigenina y luteolina, (figura 21) encontramos la presencia de los grupos hidroxilo en anillo A, uno de los cuales además se encuentra metoxilado, presumiblemente en C-7. La presencia de grupos metoxilos, es compatible con una alta actividad para inhibir la 5-LOX si éstos están en el anillo A, pero no si se modifica el grupo diol del anillo B. Un OH en el C-2' y la glicosilación reducen considerablemente la potencia, independiente de la estructura básica del flavonoide (Moroney y col., 1988).

Adicionalmente Liang y colaboradores (1999) refieren que la apigenina y sus derivados inhiben la activación transcripcional de la ciclooxigenasa (COX-2), así como la oxido nítrico sintetasa (iNOS), las cuales tienen un importante papel en la liberación de mediadores proinflamatorios, por otra parte señala Walle (2007) que las flavonas metoxiladas poseen ventajas con respecto a sus análogas no metoxiladas pues se ha demostrado una mayor biodisponibilidad con respecto al resto, siendo especialmente favorecidas aquellas que poseen 1 ó 2 grupos metoxilos en relación con las polisustituidas lo cual puede explicar el gran efecto mostrado por la fracción clorofórmica proveniente del extracto.

### **-Análisis espectroscópico del compuesto B3**

Al igual que en los casos anteriores el espectro UV-VIS manifestó las dos señales intensas entre en 200 y 400 con comportamiento típico para flavonas (Miranda y

Cuellar, 2000; Lock de Ugaz, 1988); en correspondencia con los resultados de los ensayos de identificación (Miranda y Cuellar, 2001)

Las señales que aparecen en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 22, anexo 13) mostraron la aparición de dos grupos carbonilos, uno a  $\delta 172.7$  y otro a  $\delta 181.9\text{ppm}$ . Los corrimientos químicos que aparecieron el espectro de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  están en correspondencia con los datos de los espectros que aparecen para el aglicón de la **apigenina**.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 23, anexo 14) se observó un protón a 8.05 ppm indicando que la unión del ácido glucurónico al aglicón ocurrió en posición  $\beta$ . En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  aparecieron un grupo de señales características del aglicón de flavonoides y otro grupo que se correspondieron con la presencia de un glucósido unido al aglicón. (figura 24).

El análisis espectral y la comparación con la información de la cartoteca permitieron identificar la presencia del **ácido 7-O- $\beta$ - apigenin-glucuronido**

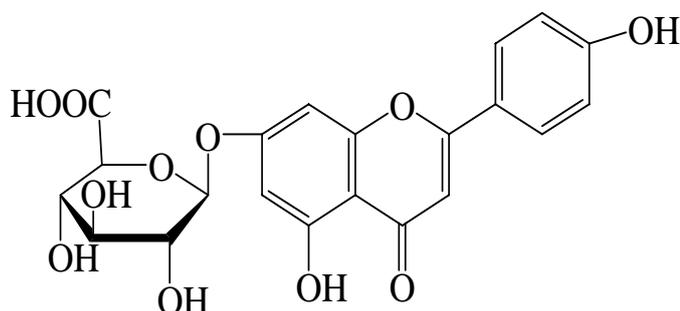


Figura 24. Estructura propuesta para el compuesto B3

Este glicósido de naturaleza hidrosoluble ha sido informado para otras especies con confirmada actividad antiinflamatoria como es el caso del *Tanacetum parthenium* (Williams y col., 1995) y en años recientes comprobada su acción antiinflamatoria. La presencia de este compuesto en el extracto acuoso de *Capraria biflora L* contribuye también a la acción antiinflamatoria del extracto.

De la bibliografía consultada se ha podido concluir que la actividad antiinflamatoria de un flavonoide disminuye cuando el OH del C-7 se encuentra glicosilado (Gil y col., 1994), esto pudiera explicar la menor actividad de esta fracción en comparación con la fracción C3.

En las fracciones 21-27 se observó la aparición de un precipitado cristalino en forma de agujas finas de color blanco que una vez filtrado y recristalizado en metanol (11.8mg) se evaluó a través de técnicas espectroscópicas.

El análisis de las características organolépticas sugirió que el compuesto cristalizado respondía a la estructura del manitol aislado del propio extracto butanólico en la metodología 1 lo cual se confirmó a través de las técnicas espectroscópicas con total correspondencia de las señales observadas en el espectro tanto protónico como de carbono <sup>13</sup>.

### **3.4. Determinación de los parámetros de calidad de la droga obtenida a partir de las hojas de *Capraria biflora* L.**

#### **3.4.1. Ensayos cualitativos de identificación del material vegetal**

##### **A) Descripción macroscópica**

Se evaluaron los caracteres morfológicos de las hojas de la planta tales como color forma y textura (Figura 25) coincidiendo con lo reportado por la literatura para la especie (León, 1957, D'Arcy, 1979, Roig, 1988). Resultó significativa la presencia de pelos glandulares en el envés de las hojas, que constituye un carácter morfológico importante en la familia *Scrophulariaceae* a la que pertenece la especie (Evans, 2000) y no referido antes en la literatura, resultando novedoso desde el punto de vista identificativo.

##### **B) Descripción microscópica:**

Los resultados de la evaluación microscópica coincidieron con lo referido por Aquino y colaboradores en el 2001, igualmente se detectó la presencia de sustancias de naturaleza lipídica, fundamentalmente en el tejido epidérmico dada la coloración rojiza observada con el reactivo de sudan. La presencia de compuestos fenólicos se hizo muy notoria al ser empleada la disolución de tricloruro de hierro recomendada para la identificación de este tipo de compuestos.

#### **3.4.2. Ensayos específicos**

Los ensayos específicos resultan tema obligado en la normalización y control de drogas vegetales como criterios de calidad del material vegetal. La determinación de los límites de especificación permite disponer de valores establecidos para el control

de la calidad de la droga a proponerse como materia prima. En cada ensayo se procesaron 25 muestras, y los resultados aparecen en la Tabla 11 (anexo 15) y cálculos estadísticos, usando el método de Bowker (Espinosa M, 1987) permitieron determinar el límite superior de especificación. Un resumen de los valores obtenidos para los tres ensayos, se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12: Resultados de los límites de especificación para los ensayos específicos.

PARÁMETROS	X±SD	LSE
Perdida por desecación (%)	7,38±0.09	8.05 (No mayor que 9)
Cenizas totales (%)	9,08 ±0,12	9,75 (No mayor que 10)
Cenizas solubles en agua (%)	4,48±0,24	5,15 (No mayor que 6)
Cenizas insolubles en HCl (%)	1,45±0,22	2,13 (No mayor que 3)

X: Media de 25 determinaciones; SD: Desviación Standard; LSE: Limite superior de especificación.

#### A) Pérdida por desecación

Como ya se abordó en el epígrafe referido a estandarización de secado, los valores obtenidos para este parámetro para la planta (7,38±0,09) resultan adecuados para garantizar la estabilidad del material vegetal, inferiores al valor de 10% exigido en las normativas nacionales e internacionales (NRSP, 1992; British Pharmacopoeia, 2004).

#### B) Cenizas totales

Los resultados que se obtienen por incineración son indicativos de la calidad de la muestra con que se trabaja y constituye una base para juzgar la identidad y pureza de la droga, brindando además una información de la posible adulteración con materias inorgánicas o cuerpos extraños, así como del contenido de sales inorgánicas presentes. Los valores obtenidos para la droga en estudio (9,08 ± 0,12 %) son relativamente bajos en correspondencia con los valores de contenido inorgánico referidos para la especie por Morais y colaboradores (1995), y resultan similares o inferiores para otras drogas vegetales registradas. Si consideramos otras drogas compuestas por este órgano, como por ejemplo, hojas de eucalipto, hojas de guayaba, hojas de caña santa, por solo mencionar algunos) observamos que los valores se encuentran entre 5 y 10%, similares al valor obtenido para las hojas de

*Capraria biflora* L propuesta como droga cruda. Este análisis nos permite afirmar que los resultados obtenidos se encuentran dentro de límites habituales para materiales vegetales.

### **C) Cenizas insolubles en ácido clorhídrico**

El porcentaje de cenizas insolubles en HCl es bajo ( $1,45 \pm 0,22$  %) no exceden los valores establecidos en la literatura. El valor de estas cenizas puede alertar sobre la presencia de metales pesados en la composición de la planta que pueden conferir toxicidad a los extractos. El resultado obtenido al ser bajos disminuye el riesgo de toxicidad por este concepto.

### **D) Cenizas solubles en agua**

Los porcentajes de cenizas solubles en agua ( $4,48 \pm 0,24\%$ ) se encuentran en los límites establecidos para drogas vegetales (NRSP, 1992) y justifican los valores encontrados para los compuestos inorgánicos en la planta, atendiendo a las determinaciones realizadas al extracto por absorción atómica donde aparecieron con mayor relevancia el sodio, potasio y magnesio, etc ( Tejeda, 1998).

### **E) Sustancias solubles.**

Los valores para los extractivos solubles se comportaron de la manera siguiente, 58,44; 41,57 y 50,69 para agua, etanol, etanol: agua (50:50 v/v) respectivamente. Si consideramos que este parámetro es un indicador de la capacidad extractiva de los disolventes para la droga en cuestión, el extracto acuoso mostró los valores mas altos, y la mayor cantidad en peso de los metabolitos presentes en la planta.

### **3.4.3. Otros índices farmagnósticos**

Aunque estos parámetros no están normados para esta droga podemos plantear que sus valores (Tabla 13) resultaron adecuados en correspondencia con los índices informados para otras drogas afines (NRSP, 1992), Solo para el caso de materia orgánica extraña pudo compararse con las monografías recogidas en la farmacopea pues el resto de los análisis no están incluidos en este tipo de documento (British Pharmacopoeia, 2004). El valor establecido para la materia extraña difiere de una droga a otra en dependencia del tipo de material, tamaño del órgano etc., sí por ejemplo: Al respecto puede concluirse que el resultado obtenido para este parámetro es inferior al de otras drogas oficiales como por ejemplo: *Partes aéreas de*

*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) no mayor del 8 %, hojas de *Atropa belladonna* no mas del 3%, corteza de *Rhamnus purshianus* D, no mayor del 1% .

El análisis de los resultados para las hojas de *Capraria biflora* nos permite afirmar que los resultados obtenidos se encuentran dentro de límites habituales para materiales vegetales y garantiza una adecuada calidad.

Tabla 13: Otros índices farmacognósticos para las hojas propuesta como droga

PARÁMETROS	X±SD
Hojas ennegrecidas.	0.1± 0.06
Otras partes de la propia planta.	0.216±0.02
<i>Materia orgánica extraña.</i>	0.005±0.002
<i>Materia inorgánica extraña.</i>	0.00215±0.004

X: Media de 3 determinaciones; SD: Desviación Standard

Los índices nos demuestran la calidad de la recolección y selección del material vegetal al ser muy pequeños los porcentajes de materias extrañas lo cual garantiza la calidad del material vegetal aspecto muy importante en el procesamiento de todo material vegetal.

Los resultados obtenidos para estos índices en la evaluación farmacognóstica pueden servir de referencia para la producción de las hojas de esta especie como posible materia prima y futuros estudios de estandarización.



A



B

Figura 25. Características macromorfológicas de las hojas de *Capraria biflora* L.

A:Material vegetal recolectado

B:*Capraria biflora* L. tomado de . **Flora of Panama**. D'Arcy. 1979

#### 4. CONCLUSIONES

1. El extracto acuoso de *Capraria biflora* L. posee potente actividad antiinflamatoria a dosis de 200 mg/Kg de peso (via ip) y 400mg/Kg (v.o) y moderada actividad analgésica a dosis de 200 mg/Kg de peso al comparar con los fármacos de referencia
2. Las técnicas cromatográficas y espectroscópicas empleadas, permitieron identificar por primera vez la presencia de naringenina, manitol, derivados metoxilados de apigenina y luteolina, el ácido 7-O- $\beta$ -apigeninglucurónido y feoforbide en el extracto acuoso de *Capraria biflora*, L. que contribuyen a justificar el efecto antiinflamatorio de la especie.
3. El análisis por cromatografía gaseosa de la fracción clorofórmica permitió la identificación de los ácidos palmíticos, laúrico y hendecanoico, identificados por primera vez para la especie.
4. Se determinaron parámetros farmacognósticos para la normalización de la especie como droga cruda, al encontrarse los mismos dentro de los límites establecidos por las normas cubanas.

## **5. RECOMENDACIONES**

1. Completar los estudios farmacológicos y toxicológicos que permitan hacer una valoración general del uso de la especie en patologías relacionadas con procesos inflamatorios.
2. Realizar procesos de purificación que permitan el aislamiento y caracterización espectroscópica de los derivados metoxilados de apigenina y luteolina presentes en la especie.

**BIBLIOGRAFIA**

1. **Ahmad VU, Kousar F, Zubair M, Khan A, Ali MS, Choudhary MI, Sener B.** A new iridoid glycoside from *Linaria genestifolia* Fitoterapia. 2006; 77(1): 12-4.
2. **Akindele AJ, Adeyemi O.O.** Antiinflammatory activity of the aqueous leaf extract of *Byrsocarpus coccineus*. Fitoterapia 2007; 78(1): 25-28.
3. **Albach DC, René J. Grayer, Soren Rosendal Jensen, Fevzi Ozgo kce, Nigel C. Veitch,** Acylated flavone glycosides from *Veronica*. Phytochemistry 2003; 64: 1295–1301
4. **Alva A; Vasquez O; Cuniberti R; Castillo A; Guerra W.** Extracción y caracterización de ácidos grasos de la Especie *Grias neuberthii* Macht (Sachamango) *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria* 2002, 2(1): 103-106
5. **Aquino T, Amorim EL, Lima CA, Albuquerque UP.** Padronizacao Botanica de *Capraria biflora* L (Scrophulareaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 2001; 20(4): 259-63
6. **Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher A M, Eiserich JP, Münzel T, Simoons ML, Hamm CW.** Myeloperoxidase Serum Levels Predict Risk in Patients With Acute Coronary Syndromes *Circulation*, Sep 2003; 108: 1440 - 1445.
7. **Barnes PJ . Adcock I:** Antiinflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1993; 14: 436-441.
8. **Barnhart ER. Monography** Indomethacin.43rd ed. *Physicians' Desk Reference* New Jersey: Medical Economics Co., 1989; p. 1345-50.

9. **Beira Á, León M C, Iglesias E, Ferrándiz D, Herrera R, Volpato G, et. al.:** Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales de Camagüey (Cuba). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61(2) 2004, 185-204.  
Disponible en [www.rjb.csic.es](http://www.rjb.csic.es) (consultado enero 2006)
10. **Berghmans S, Hunt J, Roach A y Goldsmith P.** Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Research* 2007; 75: 18-28
11. **Bianco A, Guiso M, Ballero M, Foddai S, Nicoletti M, Piccin A, Serafini M, Tomassini L.** Glycosidic monoterpenes from *Linaria capraria*. *Nat Prod Res* 2004; 18(3): 241-6
12. **Borgi W, Ghedira K., Chouchane N.** Antiinflammatory and analgesic activities of *Zizyphus lotus* root bark. *Fitoterapia*. 2007; 78: 16-19
13. **Boughton NK, Deakin AM, Follefant RL, Whittle BJ y Garland LG.** Role of oxygen radicals and arachidonic acid metabolites in the reverse passive Arthus reaction and carrageenin paw edema in the rat. *Br. J. Pharmacol* 1993; 110: 896-902.
14. **Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, et. al.** Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med* 2003; 349: 1595-1604.
15. **British Pharmacopoeia.** London: Her Majesty's Stationery Office, 2004.
16. **Brubacher J, Secombes C, Zou J, Bols N.** Constitutive and LPS-induced gene expression in a macrophage-like cell line from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Comp Immunol* 2000; 24:565-74.
17. **Burch RM, DeHaas C. A bradykinin antagonist inhibits carrageenan edema in rats.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1990; 342(2): 189-93
18. **Cai L, Wu CD.** Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *J Nat Prod* 1996; 59 (10): 987-90.

19. **Campbell WB e Halushka PV.** Autacóides derivados dos lípidos. Eicosanóides e factor activador plaquetario. En: Goodman A. As Bases Farmacológicas da terapêutica. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Rio de Janeiro. 1996; p.438-49.
20. **Cañavate J.** Fitoterapia de la inflamación. *Natura Medicatrex*. Invierno.1994-1995, 37-38:80-85.
21. **Cárdell E., calvo M y. Lecuona C.** Curvas anuales del contenido en agar-agar y aislamiento del d-manitol en dos algas de las islas canarias: *Gelidium arbuscula* bory y *Gelidium cartilagineum* (l.) gaill. var. *Canariensis* grün. *Anal. Inst. Bot. Cavanilles* 1977; 34 (1): 303-308.
22. **Casino G.** Etnofarmacología. c(1995).  
  
Disponible en: [www.elmundo.es/salud/1995/166/00936.html](http://www.elmundo.es/salud/1995/166/00936.html). (Consultado: nov 2007)
23. **Chan P, Wallae Ho A F.** Acute toxicity and eye irritancy. En: Raven press. Principles and methods of toxicology. Tercera edición. New York; 1994.
24. **Chistie W,** Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. Dundee, Scotland. 1993.
25. **Cimanga K, Hisham G.** Isolation of active compounds from the leaves of *Morinda morindoides*. *Phytochemistry* 1998; 38:1301
26. **Claus E P.** Farmacognosia. Segunda edición. Ciudad de la Habana: Edición Revolucionaria; Editorial Ciencia y Técnica 1985: p.1, 2, 28, 110,118.
27. **Clavin M, Gorzalczany S, Macho A, Muñoz E, Ferraro G, Acevedo C, Martino V.** Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *J Ethnopharmacol* 2007; 112(3): 585-9.
28. **Clemente PJ, Paulus HE.** Antirheumatic Drugs. En: Internal Medicine. Stein J.H. Mosby. 1994; p. 248.

29. **Cody V.** Plant flavonoids: Pharmacological and Structure Activity Relationships  
In: The Flavonoids-Advances in Research, Harbone, J B (Ed) Chapman and Hall. London: 1982.
30. **Colectivo de de autores:** Plantas Medicinales. Editora abril. Cuba. Tabloide 2004.
31. **Coleman RA, Smith WL, y Narumiya S.** Internatinal Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* 1994; 46: 205-29
32. **Collins DO, Gallimore WA, Reynolds WF, Williams LA, Reese PB.** New skeletal sesquiterpenoids, caprariolides A-D, from *Capraria biflora* and their insecticidal activity. *J Nat Prod.* 2000 ; 63(11): 1515-18.
33. **Coming J, Goncalves de Lima O. Grant H, Jackman L, Keller Schierlein W.** Uber die Konstitution des biflorins, eines O-chinons del ditertereihe. *Helv. Chim. Acta* 1963; 46: 409.
34. **Craveiro A.A., Matos F.J.A and Alencar J.W.,** Kovats Indices as a preselection routine in mass spectra library search of volatiles. *J. Nat. Prod.*. 1984; 47: 890-892.
35. **Cronquist, A:** An Integrated System of Classification of Flowerig Plants. Columbia University Press. New York. 1981.
36. **CYTED.** Manual de técnicas de investigación. Proyecto X-I. Búsqueda de principios bioactivos en Plantas de la Región. Subprograma X. Química Fina Farmacéutica. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 1995; 81-98.
37. **CYTED/CNPD.** Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para desenvolvimiento. Métodos de evaluación de la actividad farmacológica de plantas medicinales. 2002.
38. **D'Arcy.** Flora of Panama. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 1979; 66: 209-210.

39. **Da Silva JA, Braga A y José A.** Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol* 1994; 46:118-22.
40. **Daigle D.J. y Conkerton, E.J.** High Performance Liquid Chromatography of 34 Selected Flavonoids, *J. Chromatogr.* 1983, 240: 202-205.
41. **Delens M. y col.** Encuestas Etnofarmacológicas en los Estados Lara y Sucre de Venezuela. CESAP. 1992.
42. **Dirosa M, Giround JP and Willoughby D.** Studies of the mediators of acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *Journal of Pathology* 1971; 104: 15-29.
43. **Dooley K, Zon LI.** Zebrafish: A model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10:252-6.
44. **Doo-Youn Choi, Jeong Yong Lee, Mi-Ran Kim, Eun-Rhan Woo, Yoon Gyoon Kim y Keon Wook Kang.** Chrysoeriol potently inhibits the induction of nitric oxide synthase by blocking AP-1 activation *Journal of Biomedical Science.* 2005; 12: 949–959
45. **Dray A .** Inflammatory mediators of pain. *Br. J. Anaesth.* 1995; 75: 125 131.
46. **Edwin, G.:** Flora of Perú. Field museum of natural history botanic.. Vol XIII: 1971, p. 654..
47. **Elisabetsky E.** Etnofarmacologia como fonte de novos paradigmas de modo de ação de drogas. XVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares. 2004
48. **Espinosa M.** Normalización, Metrología y Control de la calidad. Editorial Pueblo y Educación; La Habana. 1987.
49. **Esplugues IV y Barrachina MD.** Mediadores celulares Inflamación e inmunidad. En: Flórez J. Farmacología humana. 5ta Edición. Ediciones Masson, SA. Barcelona. 2004; p. 347-51

50. **European Pharmacopoeia**. 5ta ed. Strasbourg, France. Council of Europe, 2005.
51. **Evans WC**. Trease and Evans. Pharmacognosy. 15th.ed. Reino Unido: Editorial Saunder; 2000. p. 95,63-66
52. **Exner M, Minar MD, Mlekusch MD, Sabeti MD, Amighi MD, Lalouschek MD, et al**. Myeloperoxidase Predicts Progression of Carotid Stenosis in States of Low High-Density Lipoprotein Cholesterol. *JACC*. 2006; 47:2212-2218
53. **Feria M**. Analgésicos antitermicos no esteroideos. Antiartríticos. En: En: Flórez J. Farmacología humana. 5ta Edición. Ediciones Masson, SA. Barcelona. 2004; p. 375-81
54. **Foegh ML, Ramwell PW**. The eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and related compounds. In: (B.G.Kartzung ed.). Basic and Clinical Pharmacology. 8th edition. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York. 2001; p. 311-325.
55. **Fonnegra R, Jiménez SL**. "Plantas Medicinales Aprobadas en Colombia", Universidad de Antioquia, Serie Yuluka, 1ª. Edición, , Medellín (Colombia). 1999.
56. **Fonseca A.M, Pessoa O.D.L, Silveira E.R., Monte FJ.Q, Braz-Filho R. y Lemos T.L.G**. Total assignments of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of biflorin and bis-biflorin from *Capraria biflora*. Magn. Res. Chem., 2003.
57. **Fonseca AM, Pessoa ODL, Lemos TLG, Nascimento F**. Constituents of the Essential Oil of *Capraria biflora* from Northeast Brazil. Journal of Essential Oil Research, 2006
58. **Freitag H, Spengel S, Linde HH, Meyer K**. The glycosides of the leaves from *Isoplexis isabelliana* (Webb) Masf. Helv Chim Acta 1967; 10; 50(5):1336-66.
59. **Frei B, Heinrich M, Bork PM, Herrmann D, Jaki B, Kato T, Kuhnt M, Schmitt J, Schühly W, Volken C, Sticher O**. Multiple screening of medicinal plants from Oaxaca, Mexico. Phytomedicine 1998; 5: 177±86

60. **Garcia Le, Martinez MP, Gonzalez HL.** Inflamación y Dolor: Cambios en el Sistema Nervioso Periférico y central. MEDUNAB 2001; 4(10)
61. **Gil B., Sanz M. J., Terencio M.C., Ferrándiz M. L., Bustos G., Payá M., Gunasegaran R., Alcaraz J.** Effects of flavonoids on *naja naja* and human recombinant synovial phospholipases A<sub>2</sub> and inflammatory responses in mice,. Pharmacology Letters, 1994, 54 (20): 333-338,
62. **Gil B, Sanz MJ, Terencio MC, Gunasegaran R, Payá M and Alcaraz MJ.** **Morillo** flavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A<sub>2</sub> with anti-inflammatory activity Biochemical Pharmacology 53:733-740, 1997.
63. **Goldsmith P,** Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2004; 4, pp. 504–5012.
64. **Goncalves de Lima, D´albuquerque O, Loureiro P, Carmona C, Bernard BZ.** Novas observacoes sobre a biblorina, antibiotico asolado da *Capraria biflora L.* Rev Quím industrial. 1954, 249, pág 28-30
65. **Gongalves C, Dinis T, Batista MT.** Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. Phytochemistry 2005; 66 (1): 89-98.
66. **Gongalves de Lima O. D´albuquerque IL.; Magalhaes N, b. Albuquerque, M.M.** Breve nota sobre a actividade antimicrobiana da biflorina purificada por particao Craig. Revista do Instituto de Antibioticos1958, 1(2):95-98,
67. **Gongalves de Lima O. D´albuquerque IL.; Navarro MC.** Novo método de extracao e purificacao da biflorina con possibilidade industrial. Rev. Inst. Antibiot. 1962; 1(2): 79-81.
68. **González AG, Bretón JL, Navarro E, Trujillo J, Boada J, Rodríguez R** Phytochemical Study of *Isoplexis chalcantha*. Planta Med. 1985 51(1): 9-11.
69. **González R. Poza P, Vives R., Cant G.** Antinflatmatorios inhibidores selectivos de la cicloxigenasa-2 (COX-2). *Alergol Inmunol Clin* 2002; 17: 247-254

70. **González-Gallego J., Sánchez-Campos S.y Tuñón M. J.** Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp.* 2007; 22(3):287-93
71. **Grayer-Barkmeijer R.J.** A chemotaxonomic study of *Veronica*: iridoid glucosides. *Biochem Syst* 1973, 1: 101–110.
72. **Griswold DE, Marshal DJ, Webb EF, Godfrey R, Newton I, Dimartino MJ, et. al.** A structurally novel antiinflammatory agent that inhibits lipoxigenase and cycloxigenase mediated metabolism of araquidonic acid. *Biochem Pharmacol* 1987, 36: 3463-70
73. **Gupta M, Mazumder UK, Gomathi P y Thamil Selvan V:** Antiinflammatory evaluation of leaves of *Plumeria acuminata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2006, 6: 36.  
Disponible en <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/6/36>, (consultado enero 2007)
74. **Guyton A, Hall J.** Resistance of the body to infection; En: Guyton A, Hall J. *Textbook of medical Physiology*. Elsevier-Saunder. Madrid. 2006; 429-36.
75. **Guzman, D. J.** Especies útiles de la flora Salvadoreña. Ministerio de Educación, Dirección de Publicaciones, San Salvador, El Salvador. 1975. p.703
76. **Handa SS, Chawla AK, Sharma AK.** Plants with antiinflammatory activity. *Fitoterapia* 199; 63 (1): 3-31.
77. **Harborne JB, Williams C.** *The flavonoids-Advances in Research*. Chapman and Hall. London: Academic Press; 1982.
78. **Harborne JB.** *Plants flavonoids in biology and medicinal properties*. Alan R. New York : Springer; 1988.
79. **a)Harborne JB.** *Preparative chromatography techniques. Application in natural product isolation*. Second edition. 1998.
80. **b)Harborne JB.** *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall (3).1998.

81. **Harnischfeger, G.** Post-harvesting technologies and procedures in the commercial production of medicinal and aromatic plants. En: Notes of Training Course on Quality control and standardization of herbal medicinal products. Panamá, 2002.
82. **Heinnch M. and. Rimpler H,** Harpagide and 8-o-Benzoylharpagide from the Mixe Medicinal Plant *Capraria biflora*. *Planta Med* 1989; 55: 622
83. **Heller A, Koch T, Schmeck J and Acker VK.** Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs*. 1998; 55:487-496.
84. **Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE.** Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci* 2005; 86:6-19.
85. **Hua H, Cheng M, Li X, Pei Y.** A new pyrroloquinazoline alkaloid from *Linaria vulgaris*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2002; 50(10): 1393-4
86. **ICH.** Harmonised Tripartite Guideline. "International Conference on Harmonization of Technical requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances, ICH- Q6 A, Geneva, 2005.
87. **Ideker, L:** *Capraria Mexicans (Scrophulariaceae)* endangered addition to the United States flora, *Sida* 1996; 17(2): 523.
88. **Iwueke, A., Nwodo, O. F., Okoli, C.** Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic activities of *Vitex doniana* leaves. *African Journal of Biotechnology*. 2006; 5 (20): 1929-1935,  
Disponible en <http://www.academicjournals.org/AJB> (Consultada: febrero 2008)
89. **Jalil S, Bozhanka Mikhovab, Rilka Taskovac, Maya Mitovab:** *In vitro* Anti-inflammatory Effect of *Carthamus lanatus* L. *Z. Naturforsch.* 58c, 830D832 c(2003). Disponible en <http://www.znaturforsch.com>, (consultado en enero 2007).

90. **Janeway, P. Travers, M. Walport, and M. Slomchik.** Immunobiology. The Immune System. Garland Publishing, New York and London, 2004.
91. **Jiménez SL.** "Plantas medicinales aprobadas en Colombia", En: "Simposio sobre Plantas Medicinales y/o Tóxicas", Herbario de la Universidad de Antioquia, Documentos ocasionales No. 1, Medellín, 1994.
92. **Kemertelide EP.** Cardiac glycosides from *Digitalis ciliata* trautv. I. Paper chromatographic study of the *digitalis ciliata* leaves. Digitoxin from *digitalis ciliate*. *Med Prom SSSR.* 1965; 14: 22-7.
93. **Kettle A J, Chan T, Osberg I. et al.** Myeloperoxidase and protein oxidation in the airways of young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 1317-23
94. **Kim HJ, Lee JS, Woo ER, Kim MK, Yang BS, Yu YG, Park H, Lee YS.** Isolation of virus-cell fusion inhibitory components from *Eugenia caryophyllata*. *Planta Med.* 2001; 67(3): 277-9.
95. **KIM Hee Kee, Cheon Bong Sun., Kim Young Ha, Kim Sung Yong, Kim Hyun Pyo.** Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structureactivity relationships. *Biochemical Pharmacology*, 58: 759-765, 1999.
96. **Kingston, D.G.I.** High Performance Liquid Chromatography of Natural Product. *J. Nat. Prod.* 1979, 42: 237-260.
97. **Kinnula VL** Production and degradation of oxygen metabolites during inflammatory states in the human lung. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 465-70
98. **Krüger D, Junior P, Wichtl M.** New Cardiac Glycosides from *Digitalis lanata*. *Planta Med.* 1983; 49(10):74-8.
99. **Langheinrich U, Hennen E, Stott G, Vacun G.** Zebrafish as a model organism for the identification and characterization of drugs and genes affecting p53 signaling. *Curr Biol* 2002; 12: 2023-8.

100. **Langheinrich U.** Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk, *Bioessays*. 2003; 25 : 904–912
101. **a)Lans C.** Comparison of plants used for skin and stomach problems in Trinidad and Tobago with Asian ethnomedicine. *J of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2007, 3:  
  
Disponible en <http://www.ethnobiomed.com/content/3/1/3> (consultado Enero 2008)
102. **b)Lans C.** Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2007, 3:13  
disponible <http://www.ethnobiomed.com/content/3/1/13> (consultado enero 2008)
103. **c)Lans C.** Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2007, 3:13  
  
Disponible en <http://www.ethnobiomed.com/content/3/1/13> consultado Enero 2008.
104. **Laupattarakasem P , Wangsrimongkol T, Surarit R , Hahnvajawanong C :** *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory potential of *Cryptolepis buchanani* . *Journal of Ethnopharmacology* 108 (2006) 349–354
105. **Ledón N. et al.** Anti-inflammatory and analgesic effects of a mixture of fatty acids isolated and purified from sugar cane wax oil. *Planta Med.* 2003 Apr; 69(4):367-9
106. **León A.** Flora de Cuba. Contribuciones ocasionales del Museo de Historia Natural del Colegio La Salle. 2da. España: Masson; 1957.Pag. 105
107. **Liang Y Huan YT, Tsay SH, Shiau SY, Chem CF, Lin JK.** Suppression of inducible cyclooxygenasa and inducible nitric oxide syntethasa by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carinogenesis* 1999; 20(10 ): 1945-52

108. **Lieschke GJ, Oates AC, Crowhurst MO, Ward AC, Layton JE.** Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood*. 2001; 98: 3087-3096.
109. **Lima R, Moreno A, Gonçalves J, Freire PT, Rodrigues BL.** Polimorfo ð de D-manitol extraído da *Genipa americana* L. VII Encontro Nacional da SBCC - Paraty, 2007. Disponible en [http://www.fisica.ufs.br/SBCC/VII\\_ensbcc/Resumos](http://www.fisica.ufs.br/SBCC/VII_ensbcc/Resumos). (Consultado enero 2008)
110. **LING Z; XIE Bi-Jun; YANGEr-Ling.** Isolation, characterization, and determination of antioxidative activity of oligomeric procyanidins from the seedpod of *Nelumbo nucifera gaertn.* *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005; 53(7): 2441-2445.
111. **Lock de Ugaz, O.:** Investigación fitoquímica . Métodos en el estudio de productos naturales. Primera edición. Universidad Católica del Perú. 1988. Págs. 91-100, 103,106-108 y 149-177
112. **López A, Vicet L, S Loy.** Caracterización tecnológica de los sólidos pulverulentos de *Capraria biflora* L. *Revista Cubana de Farmacia*. Vol 3.4 Suplemento especial. Pág.109. Junio 2000
113. **Lozada A.** Antiinflamatorios no esteroídicos. I parte. *Panorama actual de medicamentos*. 1995; 19: 571-6.
114. **Lyu SY, Park WB.** Production of cytokine and NO by RAW 264.7 macrophages and PBMC in vitro incubation with flavonoids. *Arch Pharm Res*. 2005 May;28(5):573-81
115. **Ma CY, Zhu KX, Yang DM, Yang JS, Yu DQ.** Studies on chemical constituents of *Veronica lina riifolia* Pall. ex Link. sub. *dilatata* (Nakai et Kitagawa) Hong 1991; 26(3): 203-8.
116. **Mabry J, Markhan k, Thomas M.** The systematic identification of flavonoids. Springer. New York : Harborne JB; 1970.

117. **MacKinnon S.** Arnica montana. Canadian Pharmaceutical Journal 1992;125(3)
118. **Manga H.M., Brkic D., Marie D.E.P., Quetin-Leclercq J.** In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae) Journal of Ethnopharmacology 2004; (92) : 209–214
119. **Markham K. Flavones,** Flavonols and their glycosides. En Methods in plant Biochemistry. Academic Press ; London 1989; 1:197-235.
120. **Markham K, Wilson R.** Flavones, flavonols and their glycosides. Phytochemistry 1988; 20:197-231
121. **Martin D y Smith M.** Medical Management of Severe Traumatic Brain Injury Hospital Medicine 2004, 65(11): 674-680
122. **Martínez C. García M., Martínez S M , Larionova M, Sebazco C, Machín M y Ruiz V .** Evaluación antiinflamatoria del flavonoide 2"- O- ramnosil 4"- O- metil vitexina en ratas. REV CUBANA PLANT MED 2004; 9(1)
123. **Matos, F. L.:** Farmacias vivas. Editorial UFC, Fortaleza CE. Pág. 210, 1994
124. **Miranda M, Cuéllar A,** Manual de Prácticas del Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Instituto de Farmacia y Alimentos. La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 2000: p. 53-66.
125. **Miranda M, Cuéllar A.** Farmacognosia y Productos Naturales. La Habana: Editorial Félix Varela; 2001:p. 274-280.
126. **Mitchell SA, Ahmad MH.** A Review of Medicinal Plant Research at the University of the West Indies, Jamaica,1948–2001 West Indian Med J 2006; 55 (4): 243 68
127. **Morais N.M.T; Nogueira C.M.D; López M.F.G y Vasconcelos, N. M.S.** Inorganic analytical study of medicinal plants. An Assoc. Bras Quim.. 1995; 44(4): 14-19.

128. **Morales, R.**, Farmacología y farmacognosia como fuentes de validación y contraste en etnobotánica, Monografía Jara. Bot., Córdoba 1996, 3: 93-98,
129. **Moroney M-A, Alcaraz M.J., Forder R.A., Carey F., Houtt J.R.S.** Selectivity of neutrophil 5-Lipoxygenase and Cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 40: 787-792, 1988.
130. **Morton, J.** Atlas of Medicinal plants of middle America. Springfield Ill. Charles C. Thomas Publisher. 1981.
131. **Navarro C.** El mundo vegetal, nuestro aliado. *Ars Pharm* 1994; 35: 419-430
132. **Nikolova M, Asenov A.** Surface flavonoid aglycones in newly studied plant species. *Nat Prod Res.* 2006; 20(1):103-6.
133. **NRSP.** Norma Ramal. Medicamentos de origen vegetal: Droga Cruda. Métodos de ensayo. La Habana. Cuba: Ministerio de Salud Pública (MINSAP); 1992.
134. **NRSP 310.** Norma Ramal. Medicamentos de origen vegetal: Droga cruda. Especificaciones Generales. La Habana. Cuba: Ministerio de Salud Pública (MINSAP); 1992.
135. **Odontuya G, Houtt J, Houghton P.** Structure-activity relationship for antiinflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. *Phytotherapy Research.* 2005, **19 (9): 782-786.**
136. **OECD.** Guideline for testing of chemicals. Organization for Economic Co-operation and Development. Guide No. 425, 2001. disponible en: <http://www.oecd.org> [fecha de acceso julio 2003]
137. **OECD.** Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental. Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, 1998. Organization for Economic Co-operation and Development. [fecha de acceso Noviembre 1998].

138. **Ogundaini A Farah M, Perera P, Samuelsson G, Bohlin L.** Isolation of two anti-inflammatory biflavanoid from *Sacrophyte pieriei*. *J NAT PROD* 1996; 59: 587-590.
139. **Oh JW, Lee JY, Han SH, Moon YH, Kim YG, Woo ER, Kang KW.** Effects of phenylethanoid glycosides from *Digitalis purpurea L.* on the expression of inducible nitric oxide synthase. *J Pharm Pharmacol.* 2005; 57(7): 903-10.
140. **Okoli. C. O., Akah P. A and Ezugworie, U.** Anti-inflammatory activity of extracts of root bark of *Securidaca longipedunculata* FRES (*Polygalaceae*) *Afr. J. Trad. CAM c*(2005) 2 (3): 54 63  
disponible en [www.africanethnomedicines.net](http://www.africanethnomedicines.net) (consultado: mayo 2007)
141. **Parng C, Seng WL, Semino C, McGrath P.** Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay Drug Dev Technol.* 2002; 1: 41-8.
142. **Parveen Z Dfng, Y; Saeed MK; Dai R; Ahmad W; Yu YH.** Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinense* Turez Extracts and its major flavonoids, kaempferol and Kaempferol-3-O-glucoside. *YAKUGAKU ZASSHI* 2007;1127 (8): 1275-1279
143. **Peterson RT and Fishman MC,** Discovery and use of small molecules for probing biological processes in zebrafish, *Methods Cell Biol.* 2004; **76** : 569–591.
144. **Pichler F, Laurenson S, Williams LC, Dodd A, Copp BR y Love DR.** Chemical discovery and global gene expression analysis in zebrafish. *Nature Biotechnology.* 2003 ; 21: 879 – 883
145. **Pinto AC, Echevarria A y MA Maciel,** Constituintes químicos das flores de *Ixora coccinea.* c(2004). Disponible en [http: www. Sbq.org.br/ranteriores/23resumos](http://www.Sbq.org.br/ranteriores/23resumos) (consultado enero 2008)
146. **Prelog V, Goncalves de Lima O, Keller Schierlein W.** Uber das biflorin. *Helv. Chim. Acta* 1958: 1386-90

147. **Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M, Di Carlo R.** Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. : Life Sci. 2001 Jan 12;68(8):921-31
148. **Rezazadeh S, Kebriaeizadeh A, Pirali M, Shafiei A., Gharuni S.** Anti-inflammatory and analgesic activity of methanolic extracts of aerial parts of *stachys schtschegleevii* sosn. and *stachys balansae* boiss. and *kotschy* ex boiss in rats. DARU 2005; 13(4): 165- 169.
149. **Riehm K, Behnke B, Schulze-Osthoff K.** Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the pro-inflammatory transcription factor NF- $\kappa$ B. FEBS Letters 1999; 442: 89±94
150. **Robak, J Gryglewski R J.** Bioactivity of flavonoids. *Pol. J. Pharmacol.* 1996; 48: 555-64.
151. **Roberts JL, Morrow JD.** Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout In: (eds A.G. Gilman, J.G Hardman, L.E Limbird) 10th Edn. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. McGraw Hill Co., New York, 2001. p. 687-731.
152. **Rodríguez J.** Artritis Reumatoide. Aplicación de la Terapia no Convencional en Cuba. *Revista Cubana de Reumatología.* 2002; IV( 1): 71-76
153. **Roig JT.** Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Editorial Científico-Técnico. La Habana. 1988; 510-11.
154. **Rondina R.V.D., Palacios P, Vaccaro M. del C., Phillip R y. Coussio J.D.** Metodología para la preparación y fraccionamiento Sistemático de extractos Vegetales con miras a su ensayo Farmacológico y eventual estudio químico. *Acta Farm. Bonaerense.* 1985; 4(1): 3-14.
155. **Salamanca G, Correa I L. y Principal J.** Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical* 25(2): 95-102. 2007

156. **Saracoglu I, Varel M, Harput US, Nagatsu A**, Acylated flavonoids and phenol glycosides from *Veronica thymoides* subsp. *pseudocinerea*. *Phytochemistry*. 2004; 65(16):2379-85.
157. **Schaller F, Kreis W**. Cardenolide genin pattern in *Isoplexis* plants and shoot cultures. *Planta Med*. 2006; 72(12): 1149-56.
158. **Scofield, D**. Medicinal usage: *Capraria biflora*, L. (Scrophulariaceae), *Scrophulariaceae*. The figwort family. c(2002).  
Disponibile en <http://the.seedsite.co.uk/scrophulariaceae>. (Consultado en octubre 2006)
159. **Senatore F, Rigano D, Formisano C, Grassia A, Basile A y Sorbo S**. Phytogrowth-inhibitory and antibacterial activity of *Verbacum sinutum*. *Fitoterapia*. 2007; 78: 244-247.
160. **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.
161. **Sharman W, Allen CM, Lier van JE**. Photodynamic therapeutics. *Drug Development Today* 1999; 4: 507±517
162. **Sivaprakasam P, Viswanathan S, Thirugnansambantham P, Kannappa M, and Vijayasekaran V**. Pharmacological screening of *Ochna obtusata*. *Fitoterapia*. 1996, 2: 117-25.
163. **Sofowora A.** Medicinal Plants and Traditional medicine in Africa. Published by John Wiley and Sons Ltd. 1st edition 131: 168 –171. (1982)
164. **Stern HM, Murphey RD, Shepard JL, Amatruda JF, Straub CT and Pfaff KL et al.**, Small molecules that delay S phase suppress a zebrafish bmyb mutant, *Nat. Chem. Biol*. 2005; 1 : 366–370
165. **Sugishita E, Amagaya S, Ogihara Y**. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *J Pharmaco-Biodyn*. 1981; 4: 565-75.

166. **Tanaka T.** Tanaka's cyclopedia of edible plants of the world. Keigagaku Publ. Co., Tokio. 1976
167. **Taskova R., Peev, D., Handjieva, N.,** Iridoid glucosides of the genus *Veronica spp.* and their systematic significance. *Pl. Syst. Evol.* 2002; 231: 1–17.
168. **Tejeda Y.** Evaluación farmacognostica y botánica preliminar de la *Capraria biflora* L. Facultad Química-Farmacia. Trabajo de diploma. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. 1998
169. **Tundis R, Deguin B, Loizzo MR, Bonesi M, Statti GA, Tillequin F, Menichini F.** Potential antitumor agents: flavones and their derivatives from *Linaria reflexa* Desf. No fecha  
  
Disponible en: <http://www.oecd.org/ehs/class/HCL6.htm> [fecha de acceso septiembre 2004]
170. **Umkoro S y Ashorobi RB:** Anti -inflammatory and membrane stabilizing property of *Momordica charantia*. *African Journal of Biomedical Research* 2006; (Vol. 9): 119 -124
171. **UNESCO.** FIT/504-RAF-48. Terminal Report: Promotion of Ethnobotany and the Sustainable Use of Plant resources in Africa. Paris. p. 60. 1998.
172. **Vanacloxta VB, Arteche A y Guenechea JL.** *Fitoterapia*, Vademecum de prescripción de Plantas medicinales. 4<sup>a</sup> edición. España: Masson; 2003.
173. **Vane JR.** Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat. New Biol.* 1971; 231: 232-235.
174. **Vasconcellos MC, Bezerra DP, Fonseca AM, Pereira MR, Lemos TL, Pessoa OD, et al.** Antitumor Activity of Biflorin, an o-Naphthoquinone Isolated from *Capraria biflora*. *Biol Pharm Bull.* 2007; 30 (8): 1416-21

175. **Vasconcellos MC, Montenegro RC, Militão GC, Fonseca AM, Pessoa OD, Lemos TL, et al.** Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. *Z Naturforsch.* 2005; 60(5-6): 394-8.
176. **Vega R, Lagarto A.** Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto de *piper auritum* HBK y toxicidad aguda local. *Rev Cubana Plant Med* 1999;1(4):11-4.
177. **Villar M.; Villavicencio O.:** Plantas medicinales peruanas en el asma bronquial. *Natura Medicatrix.* 1994; 37-38: 61-67.
178. **Wagner H.** Annual Proceedings of Phytochemical Society of Europe 1985; 25: 409.
179. **Wagner H. y Blandt S.** Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. 2<sup>nd</sup> Edition. Editorial Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 1996. 359-362
180. **Walle T.** Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoids subclass. *Seminar in cancer Biology.* 2007; 17: 354-366
181. **White M.** Mediators of inflammation and inflammatory process. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999; 103: 5378-5381.
182. **WHO.** World Health Organization. General Guidelines for methodologies and Research and Evaluation of Tradicional Medicine. WHO/EDM/TRM/2000.1. Geneva, Suiza, 2000
183. **Williams C A, Hout JRS, Harborne JB, Greenham J, Eagles J;** A biologically active lipophilic flavonol from *Tanacetum parthenium* *Phytochemistry,* 1995; 38(1): 267-270
184. **Williams TJ, Morley J.** Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. *Nature* (1973) 246: 215-217.
185. **Winter CA, Risley EA, Nuss GW.** Carrageenin induced oedema in hind paw of the rats an assay for antiinflammatory drug. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1962. Pág. 111; 544— 47.

186. **Yazawa R, Hirono I, Ohira T, Aoki T.** Induction of Japanese flounder TNF promoter activity by lipopolysaccharide in zebrafish embryo. *Mar Biotechnol.* 2005; V7:231-5
187. **Zhang DC, Shao YQ, Huang YQ, Jiang SG.** Cloning, characterization and expression analysis of interleukin-10 from the zebrafish (*Danio rerio*). *J Biochem Mol Biol.* 2005; 38:571-6.
188. **Zhang X, Hung TM, Phuong PT, Ngoc TM, Min BS, Song KS, Seong YH, Bae K.** Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Populus davidiana*. *Arch Pharm Res.* 2006 (12): 1102-8.
189. **Ziyan L, Yongmei Z, Nan Z, Ning T, Baolin L.** Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models. *Planta Med.* 2007 Mar;73(3) :221-6.

Anexo 1

INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS- VILLA CLARA  
UNIDAD DE TOXICOLOGÍA EXPERIMENTAL

El Comité de Ética de la Investigación de la Unidad de Toxicología Experimental:

CERTIFICA:

Que ha evaluado el cumplimiento de los requerimientos éticos de las investigaciones experimentales del proyecto:

Evaluación farmacológica y toxicológica del extracto acuoso de *Capraria biflora* L.

Bajo la dirección del Investigador principal: MsC Liliana Vicet Muro

Considerando que:

La propuesta presentada cumple con los requisitos necesarios para su ejecución

Este Comité decide: la ejecución de este proyecto de investigación sin modificaciones.

Para que así conste, firman el presente certificado los miembros del CEI presentes en la evaluación:

\_\_\_\_\_  
Presidente CEI

\_\_\_\_\_  
Miembro

\_\_\_\_\_  
Miembro

\_\_\_\_\_  
Miembro

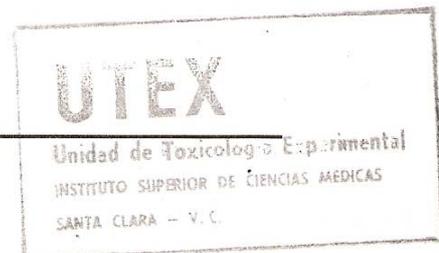
\_\_\_\_\_  
Miembro

Dado  Santa Clara  a los  7  días del mes de  Mayo  del año  2002 .

Comité de Ética de la Investigación. Unidad de Toxicología Experimental

Dirección: Instituto Superior de Ciencias Médicas –Villa Clara

Carretera Acueducto y Circunvalación. Santa Clara. Villa Clara



## Anexo 2

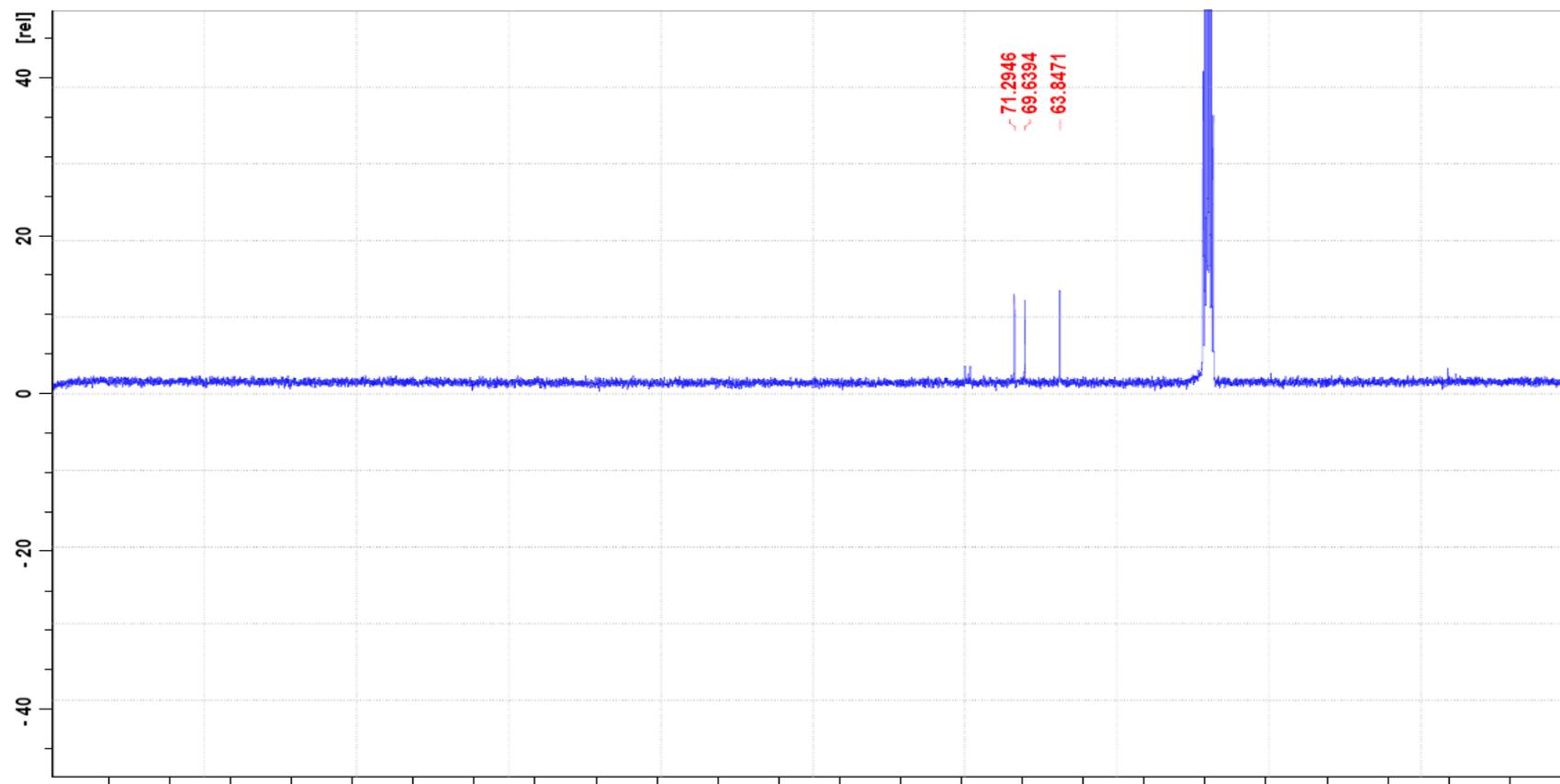


Figura 7. Espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto Cb1

### Anexo 3

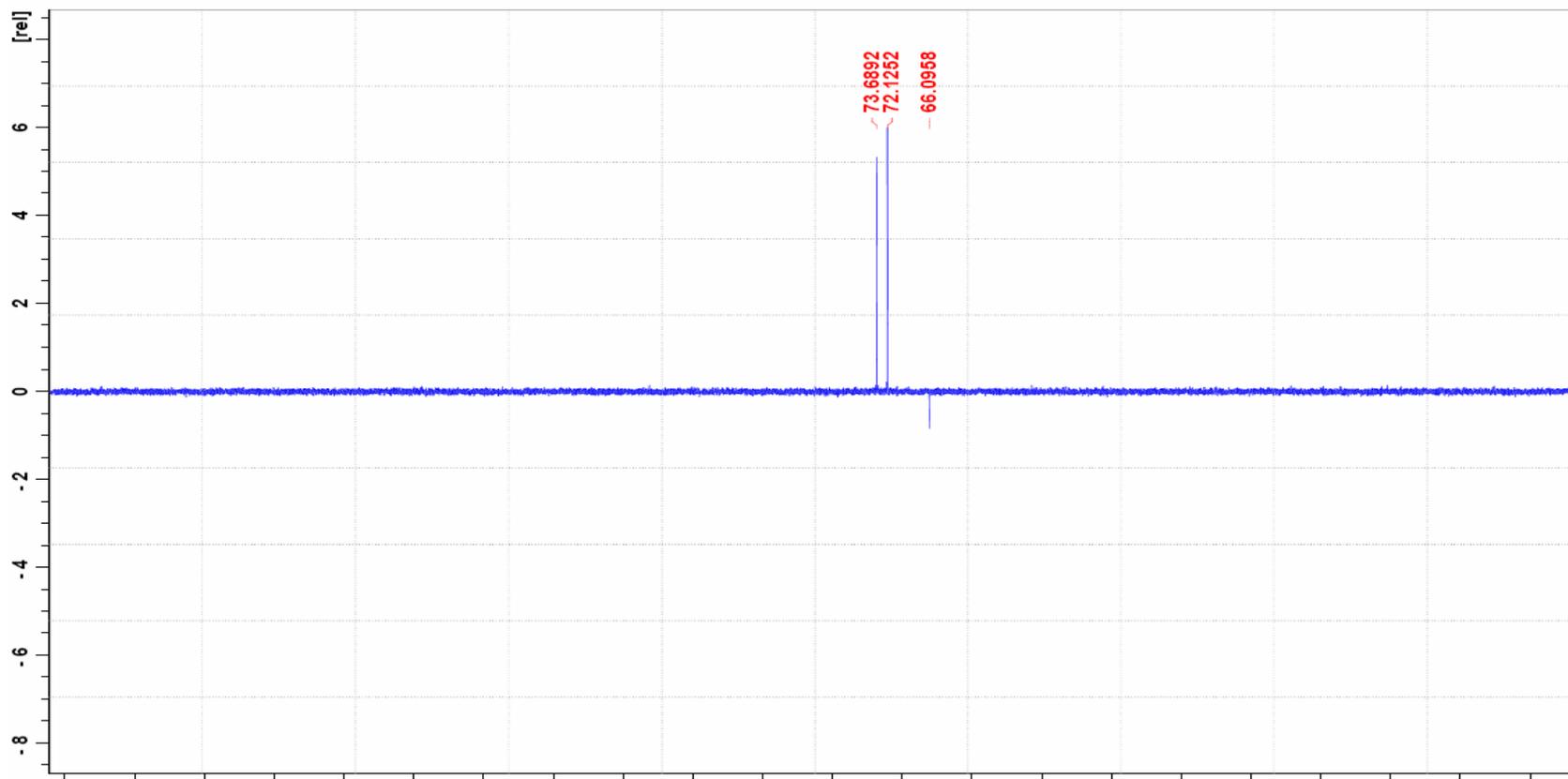


Figura 8. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto Cb1 (DEPT 135°)

## Anexo 4

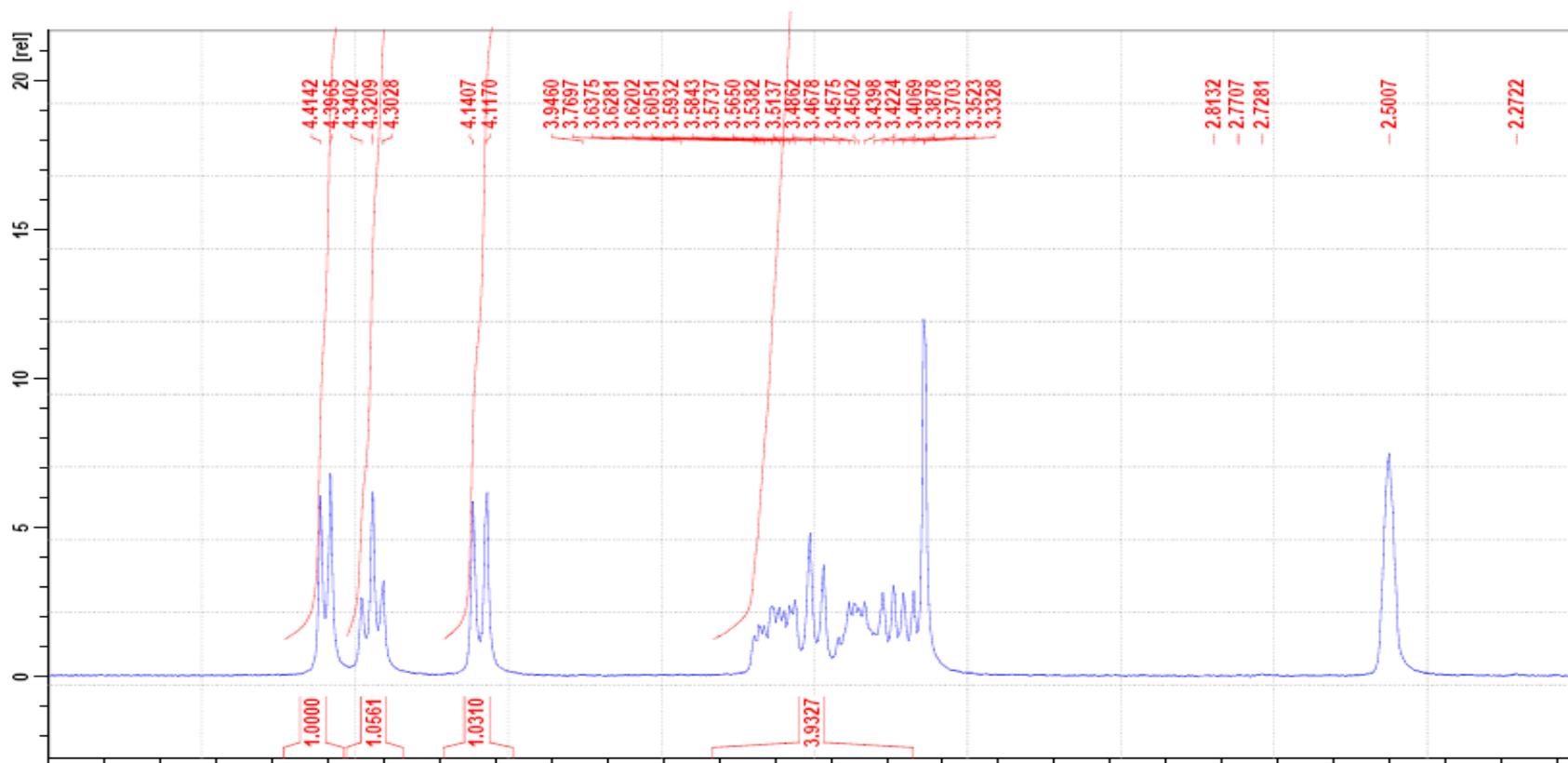


Figura 9. Espectro RMN 1H compuesto Cb1

Anexo 5

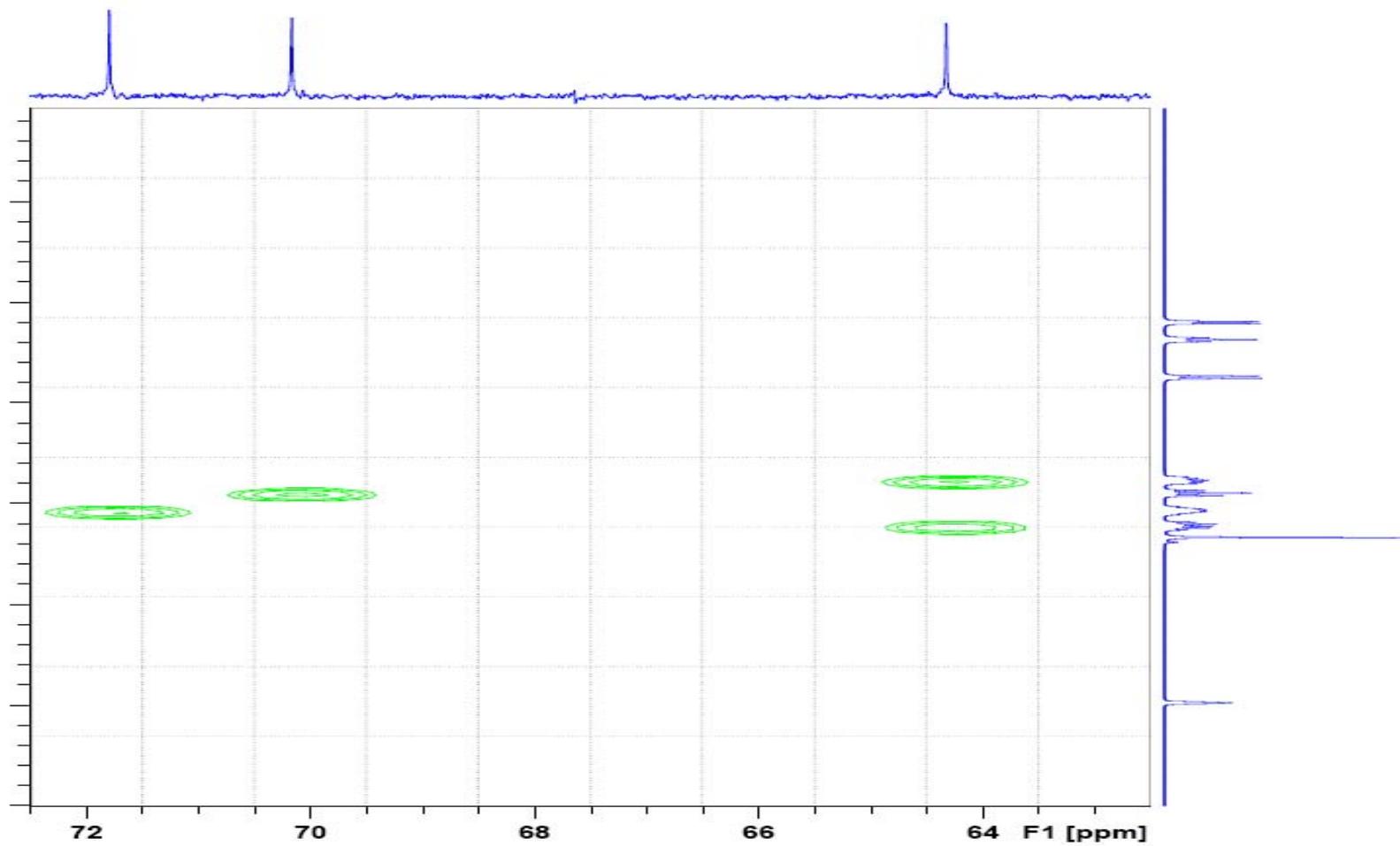


Figura 10. Espectro HSQC del compuesto Cb1

Anexo 6

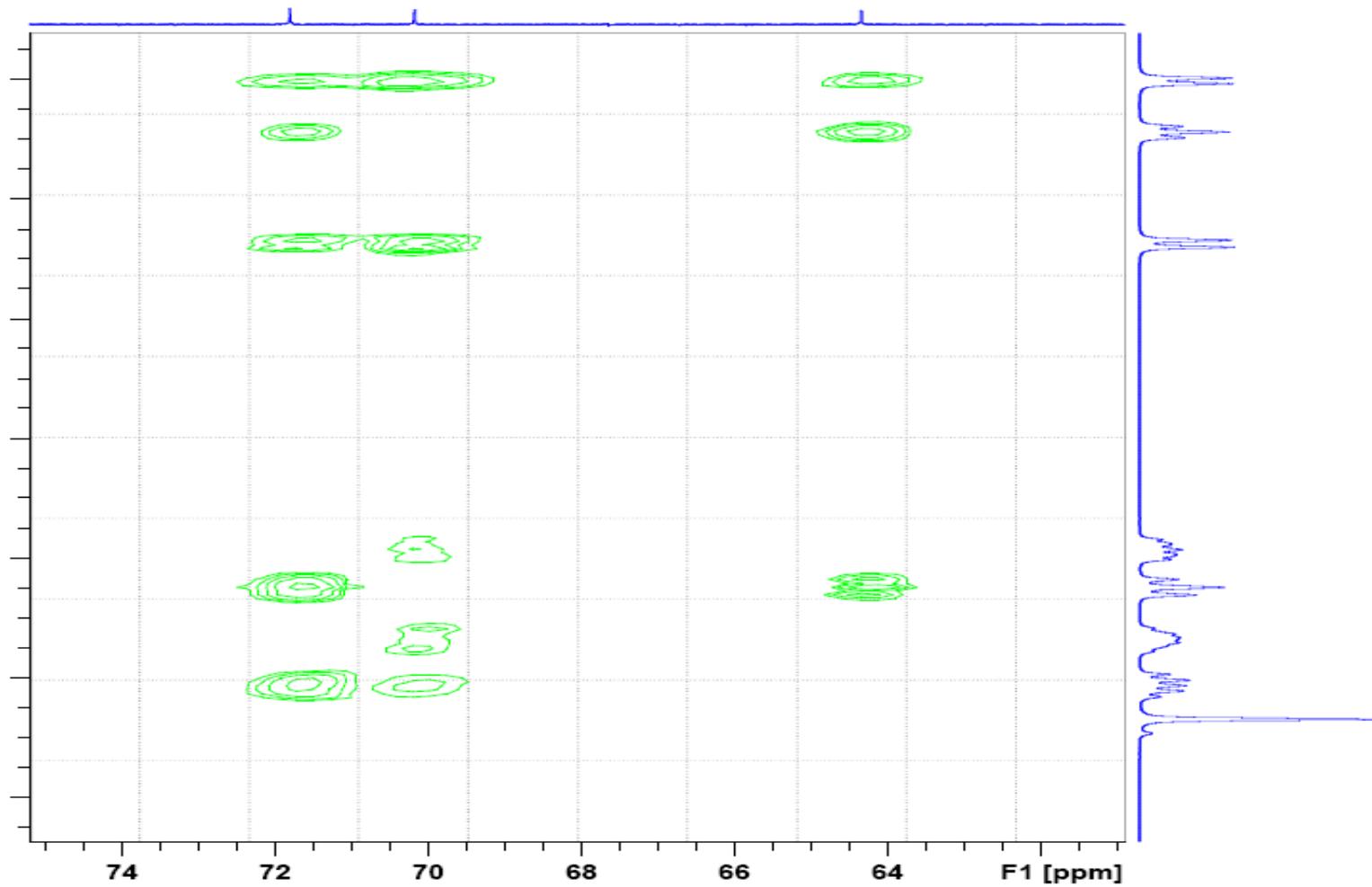


Figura 11. Espectro HMBC del compuesto Cb1

# Anexo 7

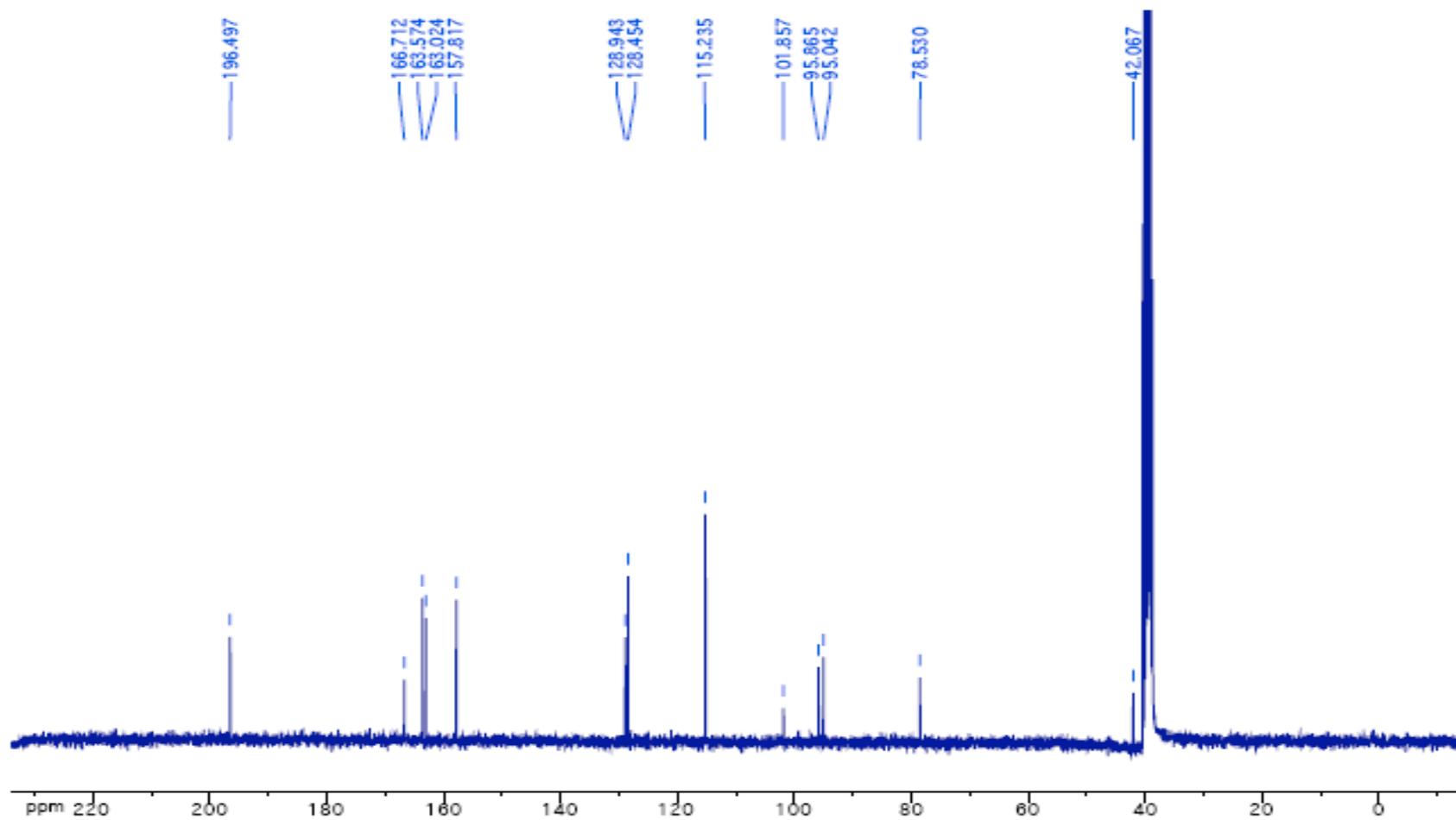


Figura 13: Espectro RMN 13C del compuesto Cb2

Anexo 8

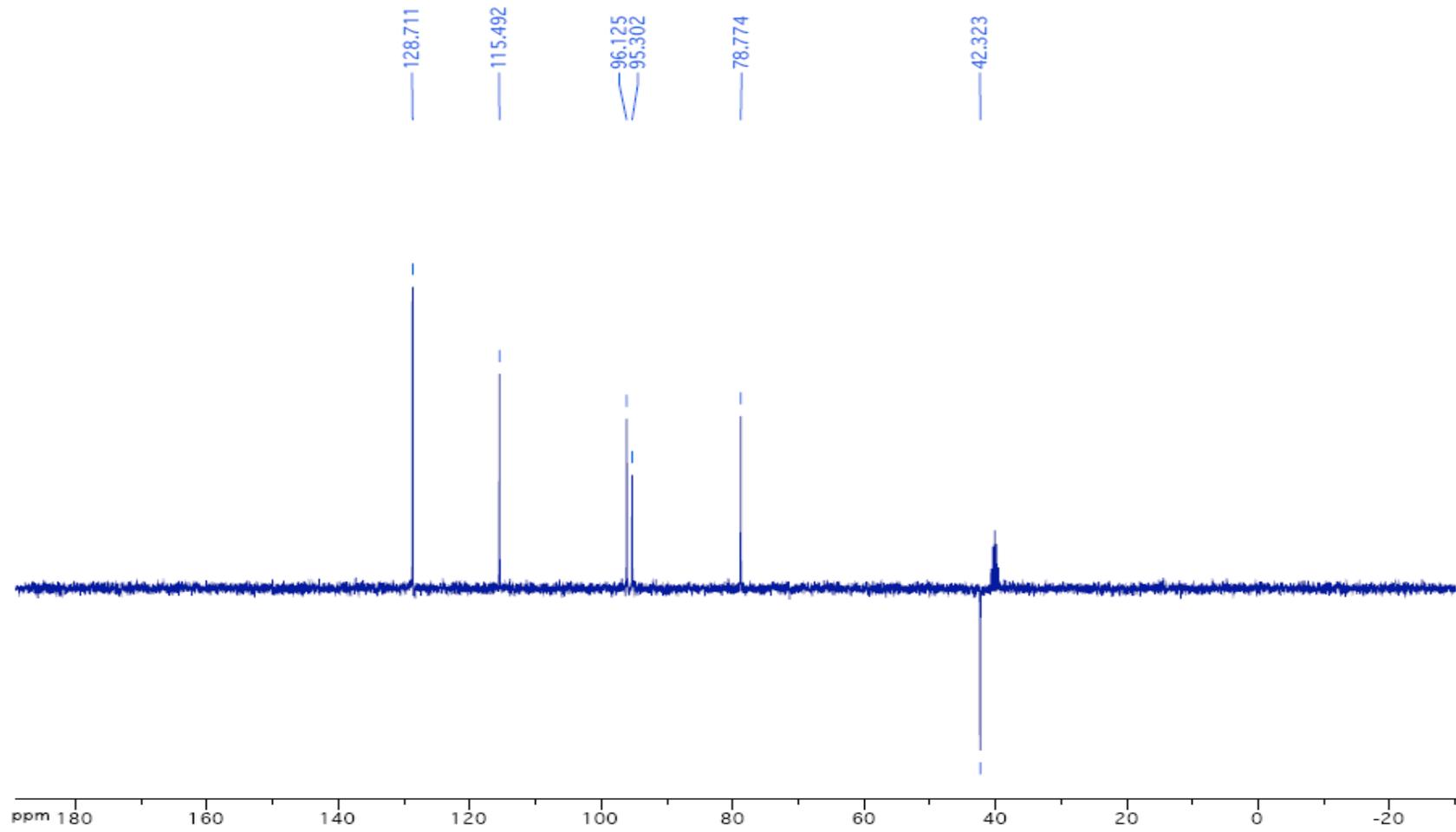


Figura 14: Espectro RMN 13C del compuesto Cb2 (DEPT)

## Anexo 9

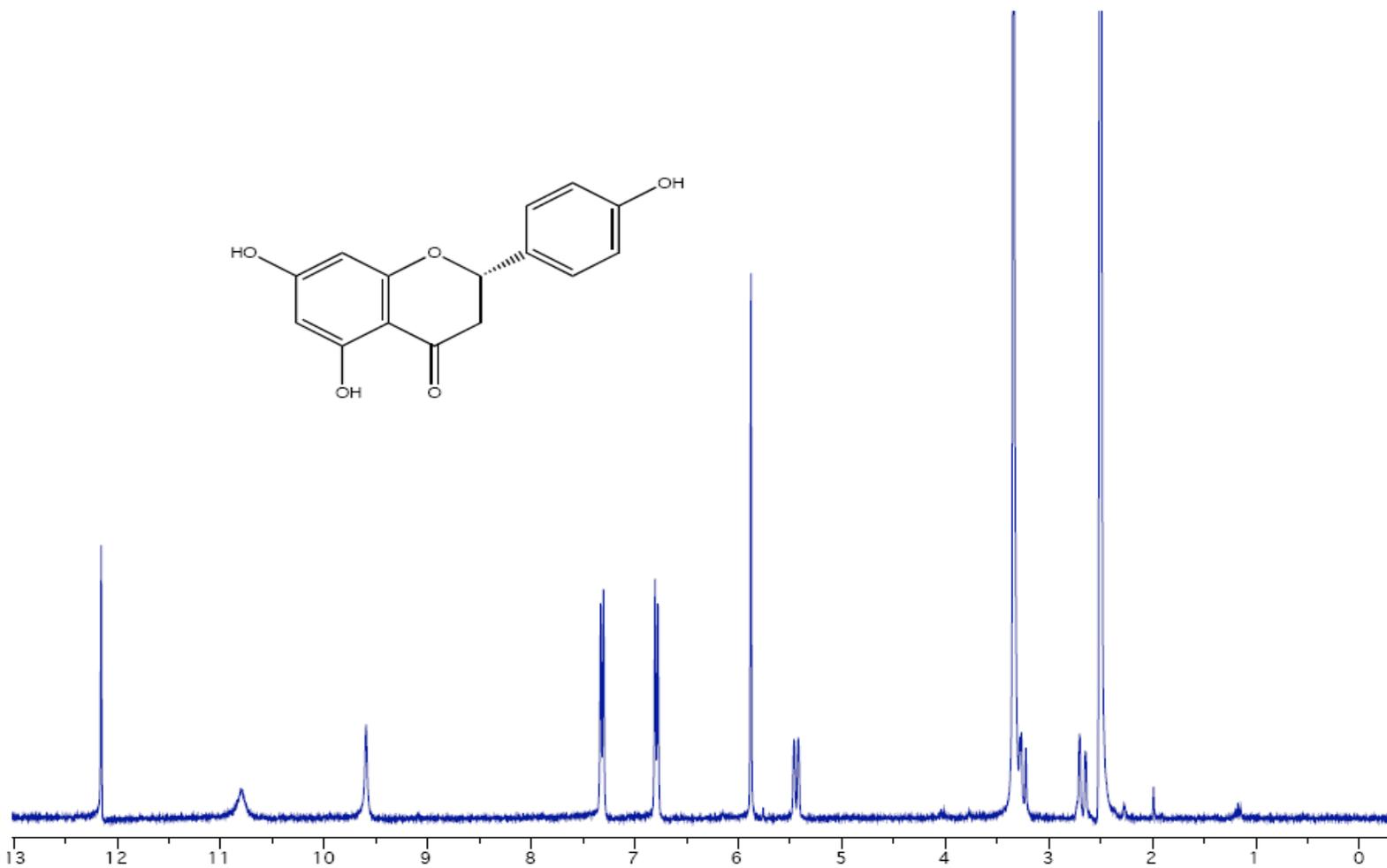


Figura 16: Espectro RMN 1H del compuesto Cb2

## Anexo 10

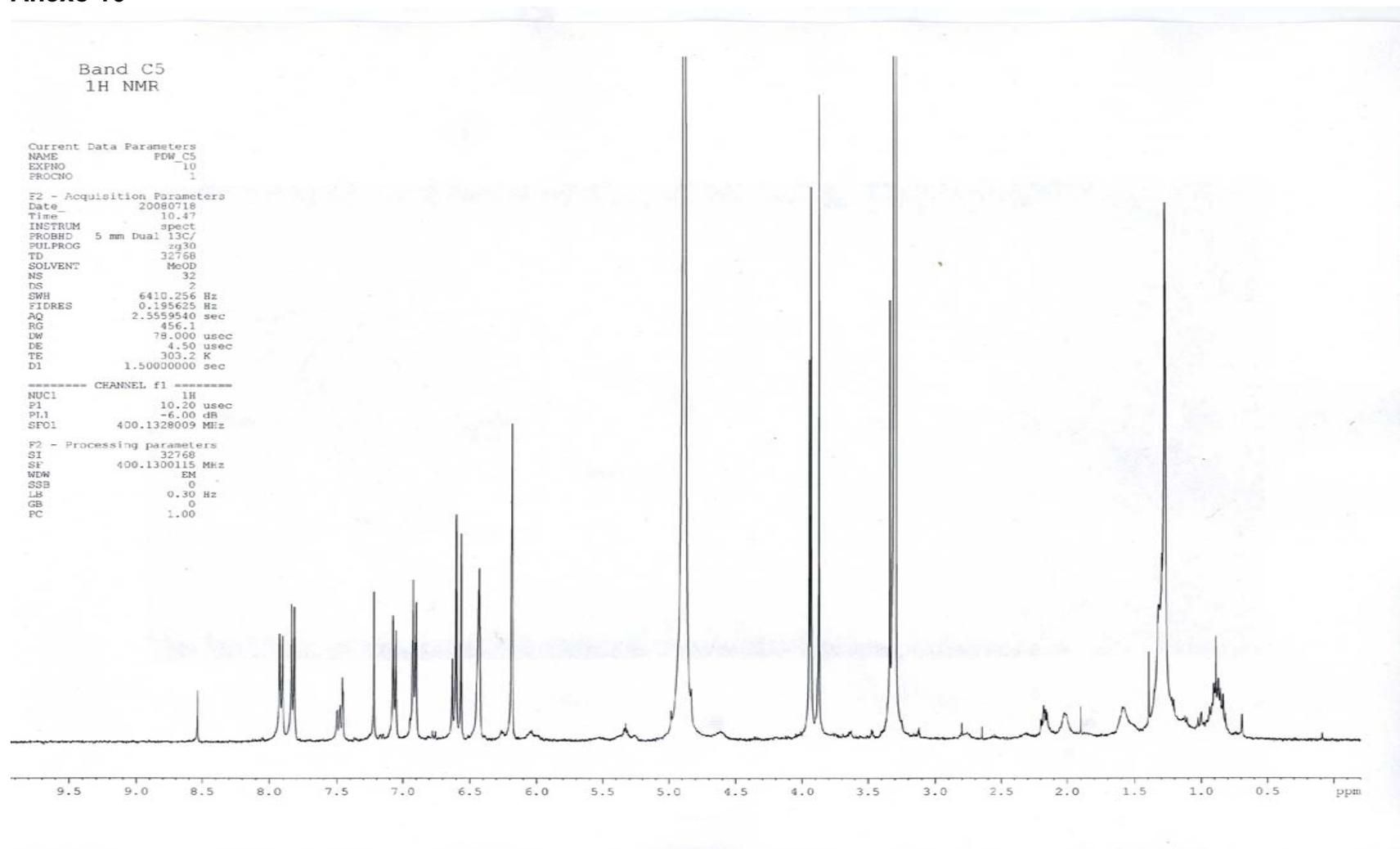


Figura 19 a): Espectro RMN 1H del compuesto C5

# Anexo 11

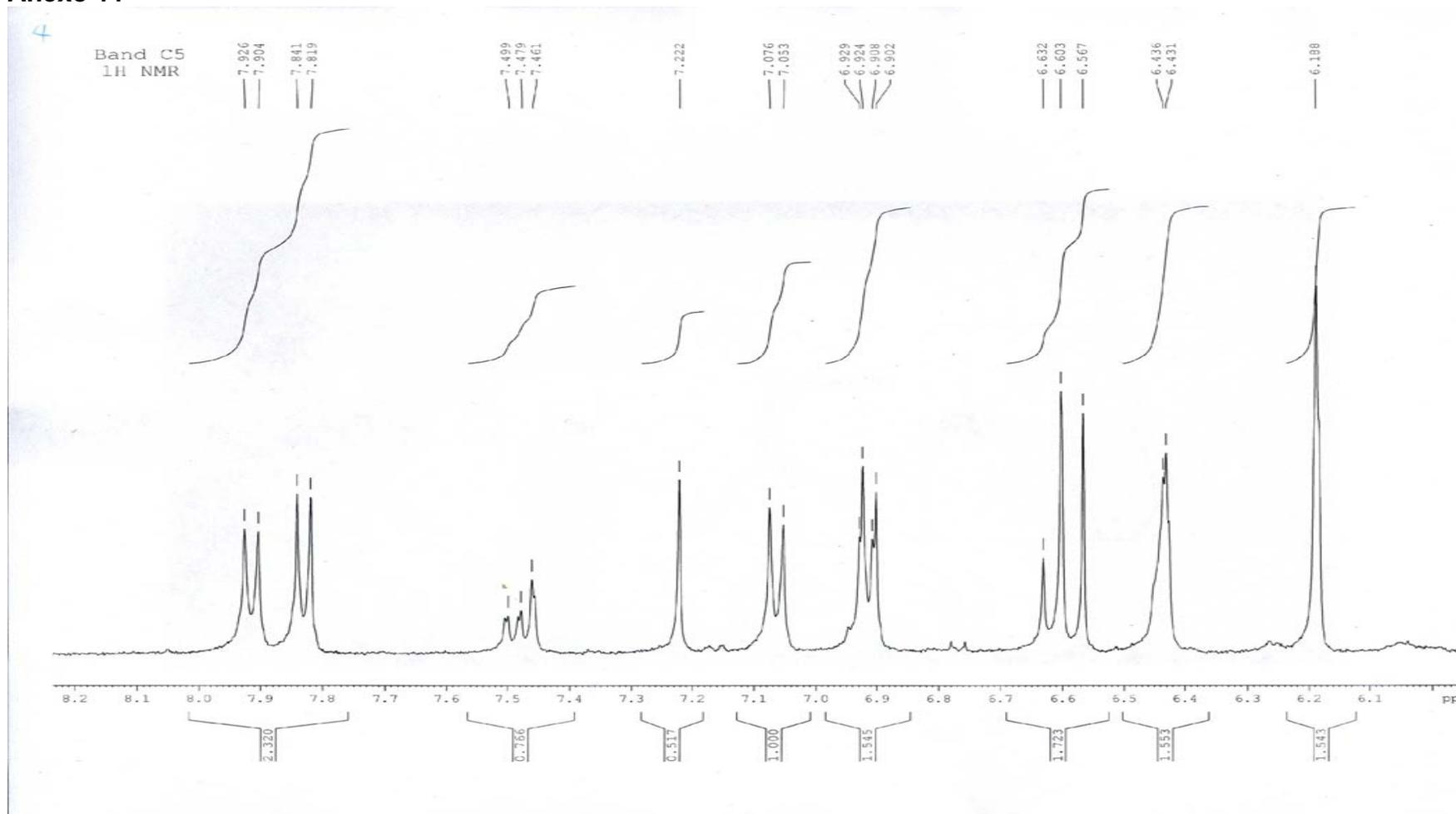


Figura 19 b. Espectro RMN 1H del compuesto C5

# Anexo 12

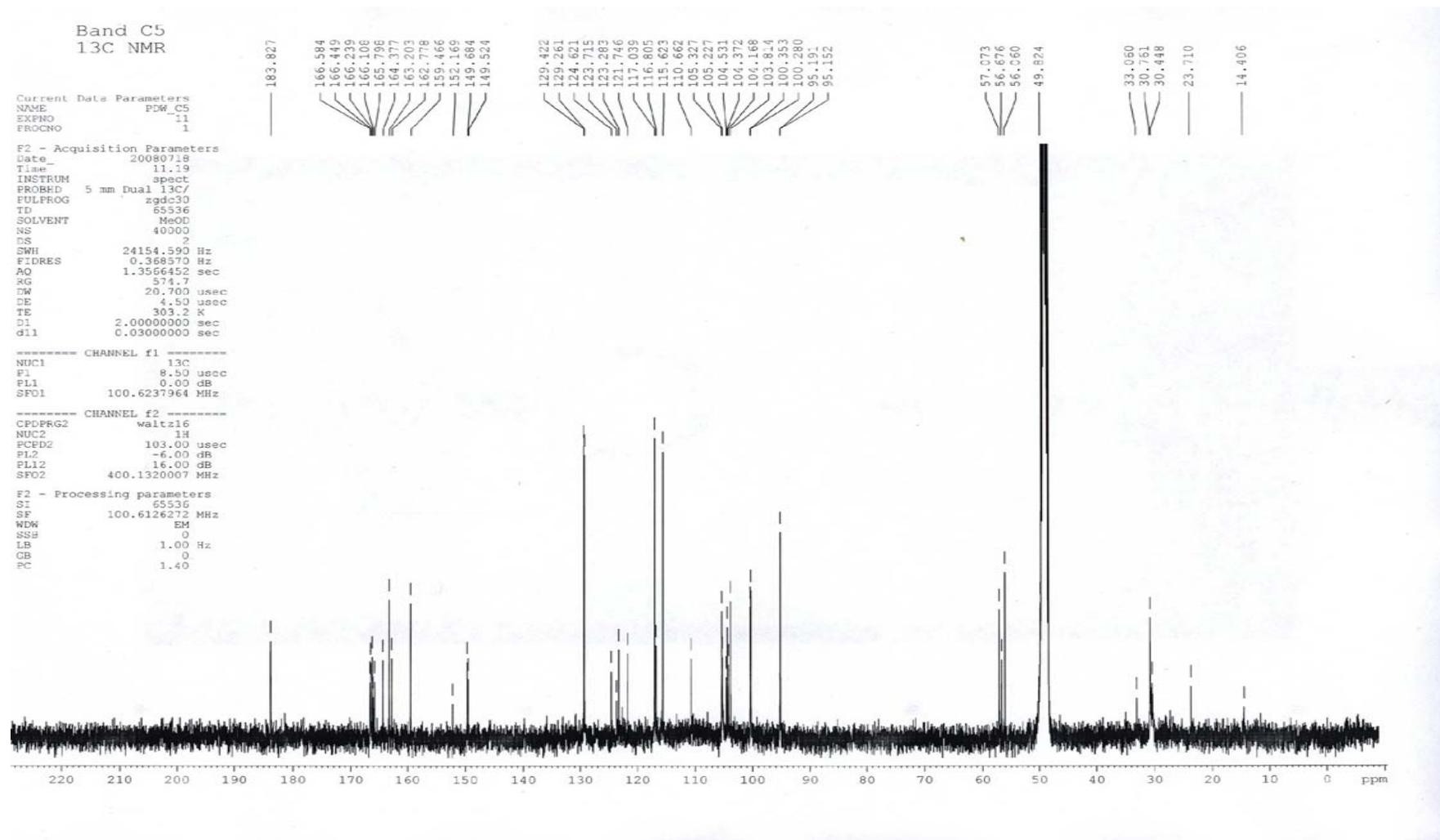


Figura 20. Espectro RMN 13C del compuesto C5

# Anexo 13

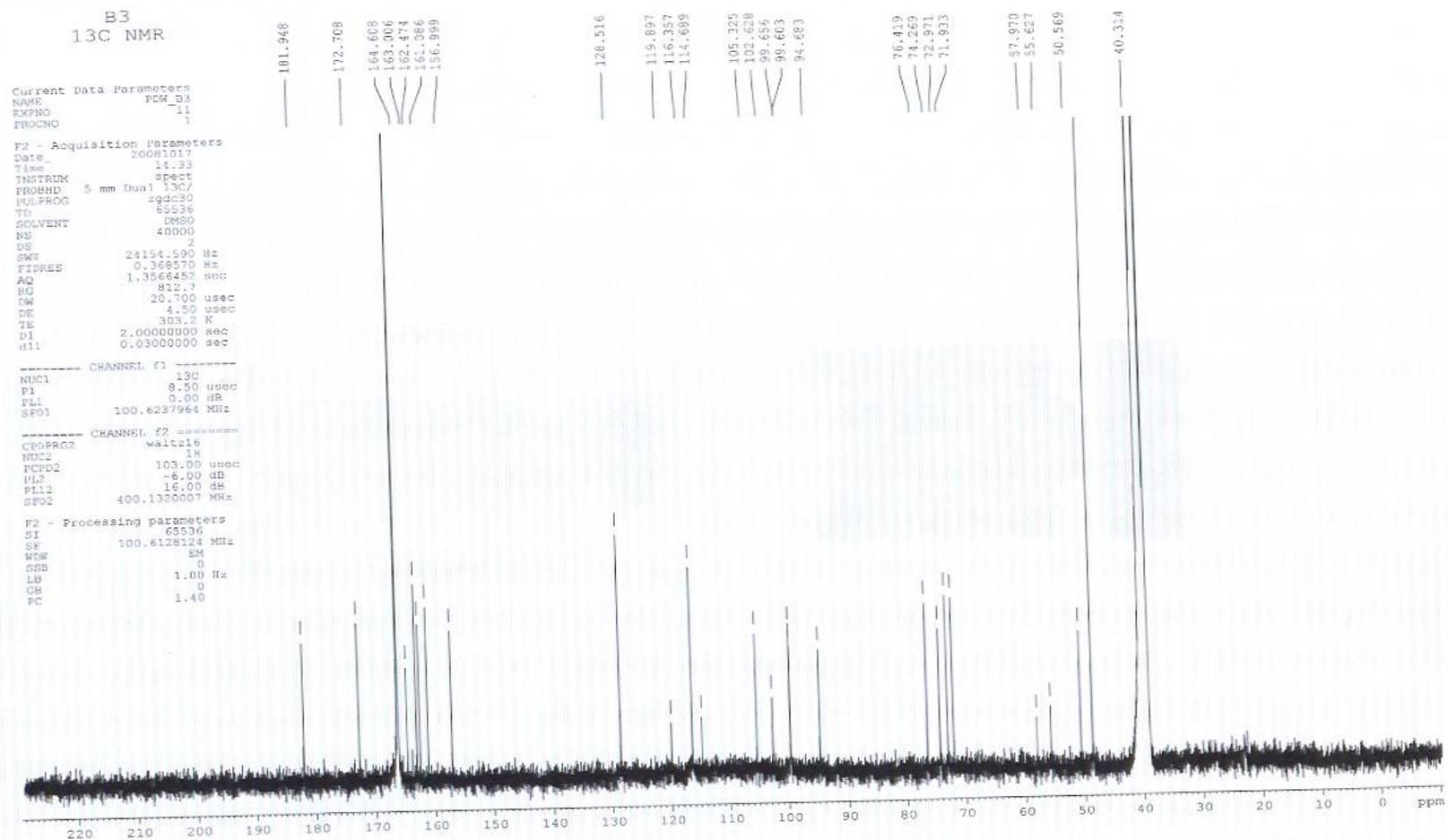


Figura 22. Espectro RMN 13C del compuesto B3

## Anexo 14

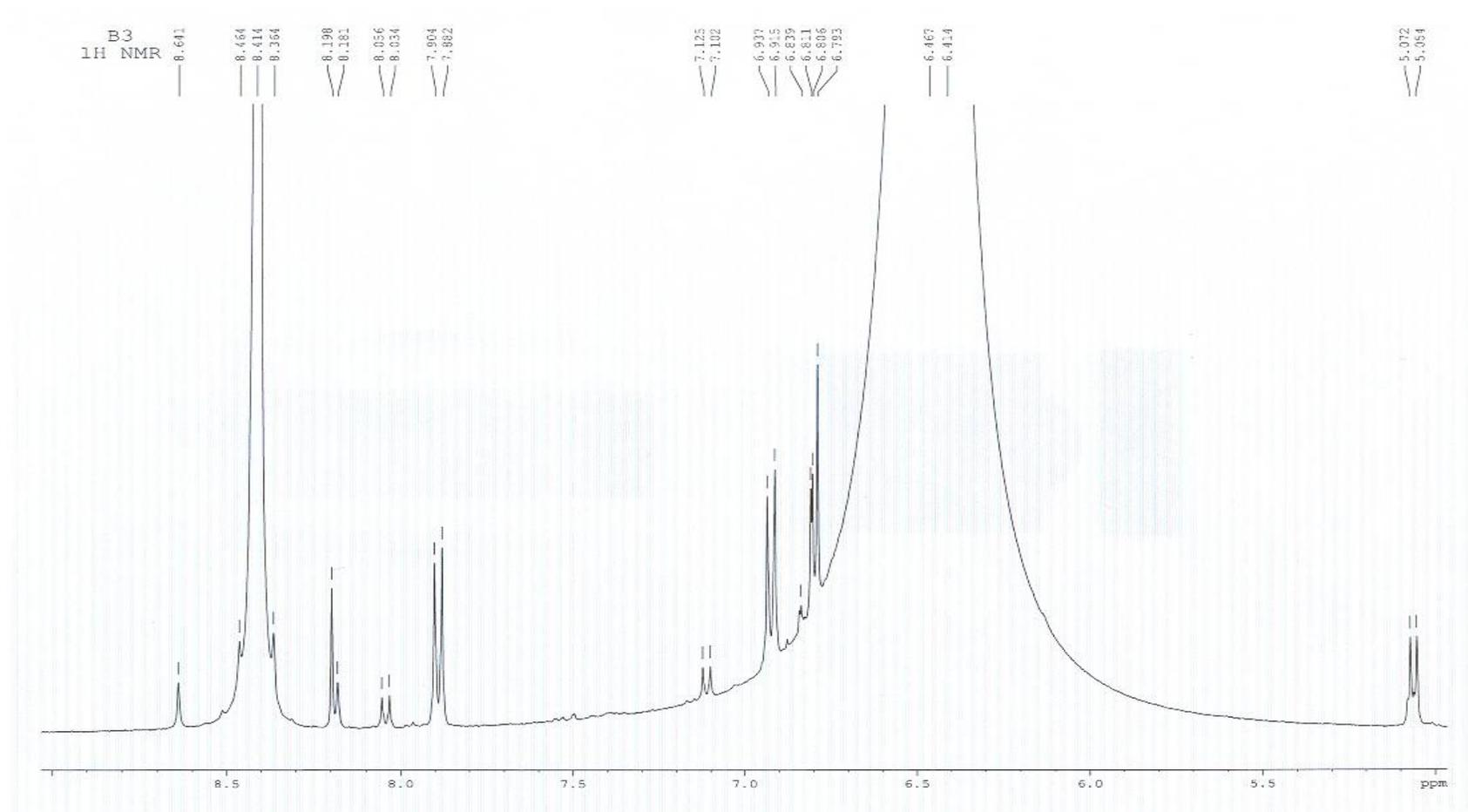


Figura 23. Espectro RMN 1H del compuesto B3

## Anexo 15

Tabla 11. Resultados obtenidos al aplicar el método de Bowker para determinar el límite de especificación de los índices específicos

Pérdida por desecación		Cenizas totales	cenizas solubles en agua	cenizas insolubles HCL
7,41		9,08	4,49	1,12
7,43		9,1	4,23	1,62
7,32		9,21	4,69	1,47
7,41		9,22	4,31	1,15
7,39		8,99	4,56	1,21
7,45		8,98	4,65	1,49
7,43		9,16	4,76	1,59
7,41		9,12	4,25	1,46
7,42		9,15	4,15	1,42
7,12		9,21	4,38	1,56
7,41		9,01	4,15	1,65
7,39		9,17	4,87	1,89
7,43		9,16	4,52	1,21
7,29		9,01	4,36	1,25
7,46		8,92	4,78	1,56
7,43		9,16	4,52	1,48
7,43		9,09	4,63	1,41
7,34		9,14	4,76	1,52
7,46		8,69	4,28	1,45
7,26		8,9	4,25	1,13
7,21		8,98	4,19	1,16
7,52		9,06	4,86	1,52
7,27		9,15	4,73	1,87
7,39		9,16	4,24	1,75
7,44		9,18	4,85	1,16
Media (X)	7,38	9,08	4,48	1,45
Desv. standart (SD)	0,09	0,12	0,24	0,22
K	7,52	9,14	4,24	1,27
LSE	8,05	9,75	5,15	2,13