

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**UNIDAD DE POSGRADO**

**Flavonoides de *Ephedra americana* (pinco-pinco),  
acción biológica sobre el sistema inmunológico (IgE)**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y  
Bioquímica

**AUTOR**

Pablo Enrique Bonilla Rivera

**ASESOR**

Bertha Pareja Pareja

Lima – Perú

2001

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
( Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA )  
ESCUELA DE POSTGRADO  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
UNIDAD DE POSTGRADO

FLAVONOIDES DE *Ephedra americana* (*pinco-pinco*), ACCIÓN  
BIOLÓGICA SOBRE EL SISTEMA INMUNOLÓGICO (IgE)

TESIS

PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTOR EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**PABLO ENRIQUE BONILLA RIVERA**

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
BIBLIOTECA CENTRAL

ASESOR: DRA. BERTHA PAREJA PAREJA  
*PROFESOR EMÉRITO DE LA UNMSM.*

Lima Perú

2001



## SUMARIO

### RESUMEN

### ABSTRACT

- I. INTRODUCCIÓN
- II. GENERALIDADES
  - 2.1. EPHEDRAS
  - 2.2. ASPECTOS BOTÁNICOS DE LAS EPHEDRACEAE
  - 2.3. ASPECTOS QUÍMICOS DE LAS EPHEDRACEAE
    - 2.3.1. ALCALOIDES DE EPHEDRAS
    - 2.3.2. COMPUESTOS FENÓLICOS EN EPHEDRAS
    - 2.3.3. TIPOS DE FLAVONOIDES Y BIOGÉNESIS
  - 2.4. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LAS EPHEDRACEAE
  - 2.5. LA EPHEDRA PERUANA
    - 2.5.1. ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA *Ephedra americana*
      - 2.5.1.1. MORFOLOGÍA
      - 2.5.1.2. ESTRUCTURA HISTOLÓGICA
      - 2.5.1.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA
    - 2.5.2. ASPECTOS QUÍMICOS DE LA *Ephedra americana*
      - 2.5.2.1. ALCALOIDES
      - 2.5.2.2. COMPUESTOS FENÓLICOS
    - 2.5.3. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LA *Ephedra americana*
  - 2.6. SISTEMA INMUNE
  - 2.7. ANTIOXIDANTES
- III. PARTE EXPERIMENTAL
  - 3.1.0. MATERIAL Y MÉTODOS
  - 3.2.0. INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA
    - 3.2.1. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA
    - 3.2.2. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA *Ephedra americana*

3.2.3. ENSAYOS FITOQUÍMICOS

3.2.4. ENSAYOS CROMATOGRÁFICOS

3.2.4.1. C.C.F. DEL EXTRACTO TOTAL

3.2.4.2. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA RÁPIDA

3.2.4.3. C.C.F. DE LOS SUBEXTRACTOS

3.2.4.4. C.C.F. A ESCALA PREPARATIVA

3.2.4.5. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE  
COMPONENTES AISLADOS

3.2.4.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
ANTIOXIDANTE MEDIANTE C.C.F.

3.3.0. INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA

3.3.1. ENSAYO INMUNOESTIMULANTE

3.3.2. ENSAYO DE LA *Artemia salina*

3.3.3. ACTIVIDAD ANTIULCEROSA

3.3.4. ACTIVIDAD SOBRE LA MOTILIDAD INTESTINAL

3.3.5. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

3.3.6. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA Y SUBCRÓNICA

3.3.6.1. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA

3.3.6.2. ENSAYO DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA

3.3.7. ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

IV. RESULTADOS

4.1.0. RESULTADOS FITOQUÍMICOS

4.2.0. RESULTADOS BIOLÓGICOS

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

VI. CONCLUSIONES

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A la memoria de mis padres, Graciela y Pablo

A mi querida esposa Beatriz,  
a mis queridos hijos, Beatriz, Pamela, Marissa y Enrique;  
a mis hermanos,  
por su comprensión y aliento permanente.

## AGRADECIMIENTO

A LA DRA. BERTHA PAREJA P.  
POR SU VALIOSA ASESORÍA Y DEDICACIÓN.

A LA DRA. NANCY LOZANO R.  
POR SU CONSTANTE APOYO Y DEDICACIÓN.

AL DR. JORGE ARROYO ACEVEDO  
POR SU CONSTANTE COLABORACIÓN Y APOYO.

A LA DRA. LUZ OYOLA HERMOZO  
POR SU CONSTANTE APOYO Y DEDICACIÓN.

AL JURADO INFORMANTE DE LA TESIS:  
DRA. LUZ OYOLA HERMOZO.....PRESIDENTE  
DRA. BERTHA PAREJA PAREJA ...MIEMBRO  
DRA. NANCY LOZANO REYES.....MIEMBRO  
POR SUS VALIOSOS APORTES Y SUGERENCIAS.

AL JURADO EXAMINADOR Y CALIFICADOR:  
DRA. NANCY LOZANO REYES  
DRA. BERTHA PAREJA PAREJA  
DRA. LUZ OYOLA HERMOZO  
DR. MANUEL PALOMINO YAMAMOTO  
DR. JORGE ARROYO ACEVEDO.

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se realizó el estudio fitoquímico y la actividad biológica de la parte aérea de la especie vegetal peruana *Ephedra americana*, denominada comúnmente “pinco-pinco”, planta que crece y desarrolla en zonas altoandinas del Departamento del Cusco, en la provincia de Calca aproximadamente a 3500 msnm. Se ubicó y recolectó en el mes de mayo, y es utilizada en forma tradicional para el tratamiento de diversas afecciones.

Con la muestra en polvo, se realizó la marcha fitoquímica, determinándose la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos tipo flavonoides, taninos, glicósidos, etc.

Mediante ensayos de solubilidad se observó que los metabolitos secundarios eran de mediana y alta polaridad.

Se confirmó la presencia de flavonoides mediante técnicas cromatográficas, y se procedió a la separación de los compuestos fenólicos por cromatografía en columna rápida, obteniéndose varias fracciones. Estas fracciones fueron purificadas mediante cromatografía a escala preparativa utilizando diversos sistemas de solventes elucidándose estructuralmente cinco flavonoides de conocida actividad antioxidante, denominados: Hesperidina; Crisina; 5,7,3',4'-tetrahidroxi-6,8-di-R flavona; 5,7,3'-trihidroxi-6,4'-dimetoxi flavonol y 4'-hidroxi-5,7-dimetoxi flavonona.

En el extracto etanólico se determinó actividad inmunoestimulante, efecto antioxidante, acción tóxica sobre la *Artemia salina*, acción antiulcerosa, acción sobre la motilidad intestinal, actividad antiinflamatoria, su toxicidad y actividad antimicrobiana.

Al realizar el estudio biológico en ratas, se observó una buena respuesta frente al sistema inmune, no teniendo actividad tóxica para el hombre.

Palabras clave: Efedra, compuestos fenólicos, flavonoides, hesperidina, crisina, sistema inmune, efecto antioxidante.

## ABSTRACT

In the present investigation we have developed the phytochemical study and determined the biological activity of the aereal parts of the vegetal peruvian species *Ephedra americana*, wich is commonly named "pinco-pinco". It grows in the highlands of the Department of Cusco-Perú, in the province of Calca, approximately at 3500 mosl. The species was located and collected in the monthes may, and it's used in traditional medicine for the treatment of various diseases.

The powder of the sample was used to perform the phytochemical screening, was identified the presence of alkaloids, fenolic compounds flavonoids types, tannins, glicosydes, etc.

By means of solubylite screening it was determined that the secondary metabolits were moderately and highly polar.

The presence of flavonoids was prubed by means of Thin Layer Chromatography and it was performed a separation by Flash Column Chromatograpy of the fenolic compounds, obtaining many fractions. These fractions were purified by means of Preparative Scale Chromatograpy using various solvent systems and were structurally elucidated five flavonoids with antioxidant activity accepted, denominates:

Hesperidin; Chrisyn; 5,7,3',4'- tetraxidroxi - 6,8 -di-R flavone; 5,7,3'-trihidroxi-6,4'-dimetoxi flavonol and 4'-hidroxi-5,7-dimetoxi flavonone.

In the etanolic extract it has been determinated the inmunostimulant activity, the antioxidant effect, toxic action by the *Artemia salina*, antiulcer activity, action on the intestinal motility, antiinflammatory activity, toxicity and antimicrobial activity.

On to perform the biological study in rats it has been observed one responded against the immune system, no having toxic activity for the humans.

Key words: Ephedra, fenolic compounds, flavonoids, hesperidin, chrisyn, immune system, antioxidant effect.

## I. INTRODUCCION

El progreso de la Química Orgánica, la Biología Molecular y otras ciencias aplicadas, unidas a la informática y los diferentes métodos espectroscópicos y espectrométricos que actualmente se usan, ha dado lugar al desarrollo de la Investigación Científica multidisciplinaria, sobre todo para el estudio de los principios activos de las plantas y su acción terapéutica.

Los metabolitos secundarios de las plantas medicinales son responsables de algunas propiedades curativas que en la medicina tradicional se les atribuye, y constituyen un gran potencial de reserva inexplorada de gran utilidad al hombre, la disciplina que las estudia es la Fitoquímica, que permite conocer los principios activos, evaluar las vías de biosíntesis, degradación y los mecanismos de regulación (1-5)

Se ha demostrado que los Productos Naturales como los flavonoides exhiben una fuerte afinidad con las membranas, ligándose mediante actividad enzimática e interactuando con otras membranas biológicas.

La presente investigación es sobre la planta *Ephedra americana* pinco-pinco, que posee una gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios, entre ellos los flavonoides que son ampliamente utilizados en la práctica médica.

Por eso nosotros estudiaremos los metabolitos que permiten a la planta medicinal crecer, multiplicarse, defenderse y sobrevivir, evidenciando su actividad inmunoestimulante y su posible utilidad para tratar disfunciones del Sistema Inmunitario y otras actividades biológicas.

## II. GENERALIDADES

### 2. 1. EPHEDRAS

La hierba “Ma Huang” usada en China desde la antigüedad para el tratamiento de una gran variedad de afecciones, como estimulante circulatorio, diaforético, antipirético, sedante de la tos, etc. todo lo cual ha sido confirmado mediante investigaciones modernas, pertenece al grupo de las “Ephedras”.

Las Ephedras, son plantas pertenecientes a la familia Ephedraceae, género *Ephedra*, con cerca de 60 especies que tienen un uso muy difundido en la medicina tradicional peruana, andina, asiática, europea y en muchas otras partes del mundo, debido a sus propiedades cicatrizantes, antiinflamatorias, etc. cuyos efectos se deberían a la presencia de determinados metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, fenilpropanoides, esteroides, etc.

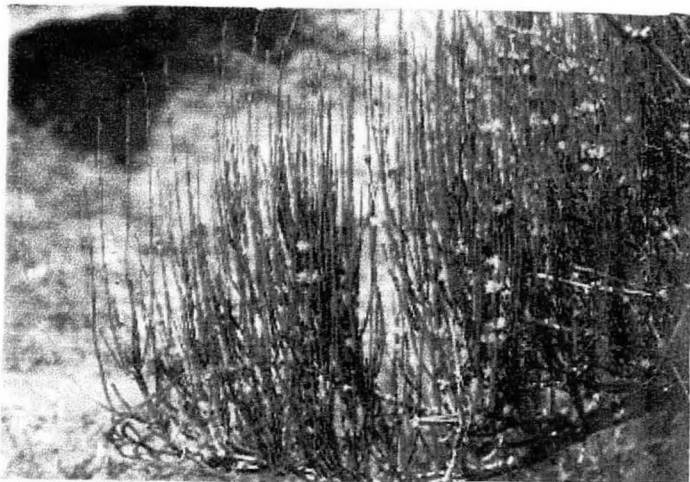
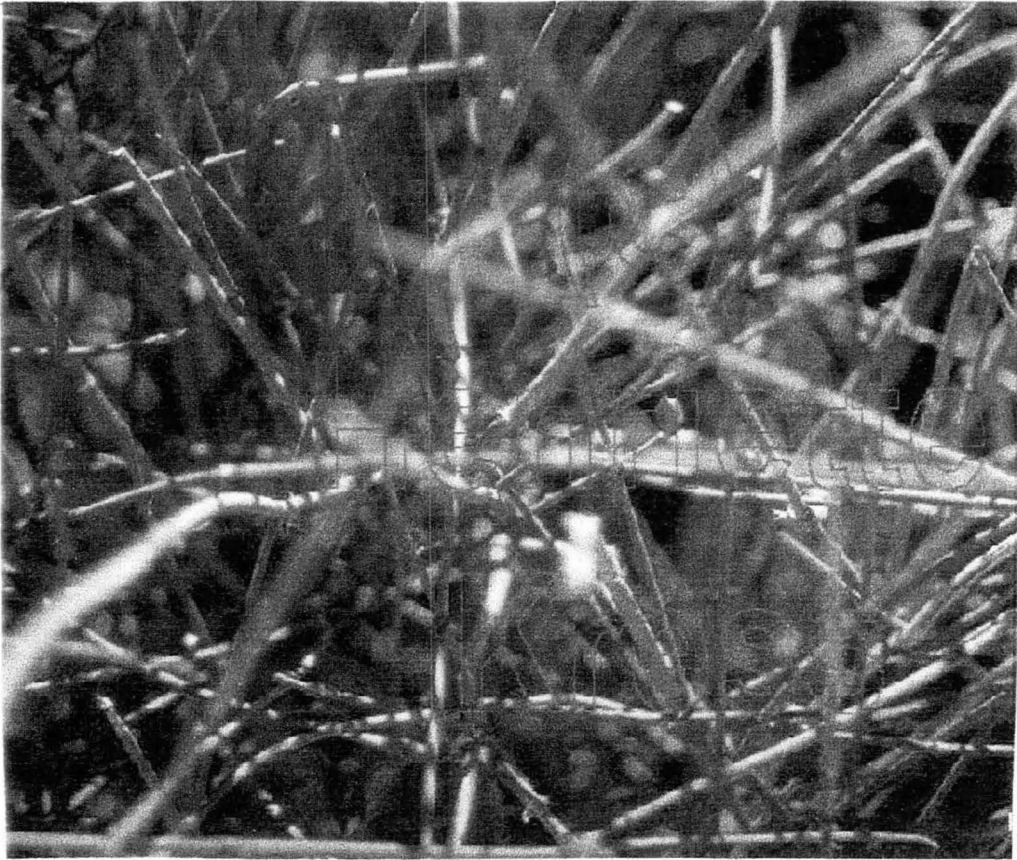
Entre las especies más conocidas tenemos: *Ephedra vulgaris* del Asia; *Ephedra helvetica* de Europa; *Ephedra multiflora* Phil., *Ephedra gracilis* Phil., *Ephedra andina* Poepp., *Ephedra americana* Humb. et Bonpl. ex Willd. ( *E. americana* Umb. et Bonpl. var. *Humboldtii* Stapf pinco-pinco, Perú), de Sudamérica. (20,21)

### 2. 2. ASPECTOS BOTANICOS DE LAS EPHEDRACEAE

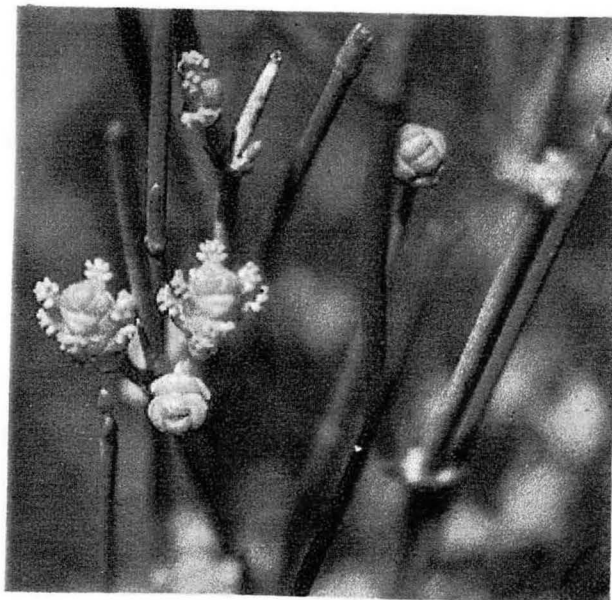
El género *Ephedra* pertenece a la familia EPHEDRACEAE o GNETACEAE del orden GNETALES, con numerosas especies, algunas conocidas desde la antigüedad por sus propiedades medicinales en diferentes partes del mundo; son plantas arbustivas o subarbustivas erguidas, trepadoras o rastreras, con ramas equisetiformes.

Crecen en Africa, Asia, Europa Central, América del Norte y en Sudamérica.  
Fotos 1, 2 (20,21)





**Foto N° 1 : Tallos de Ephedras**

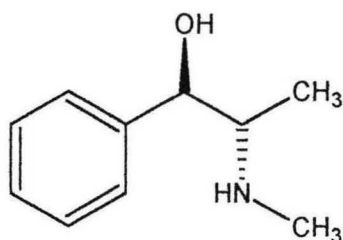


**Foto N° 2 : Flores y Tallos de Ephedras**

## 2.3. ASPECTOS QUÍMICOS DE LAS EPHEDRACEAE

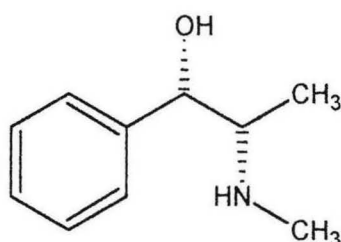
### 2.3.1. ALCALOIDES DE EPHEDRAS: Derivados de la $\beta$ - feniletilamina:

I) (1R, 2S) - (-) - Efedrina  $C_{10} H_{15} NO$



Efedrina

II) (1S, 2S)- (+) - Pseudoefedrina  $C_{10} H_{15} NO$



Pseudoefedrina

III) (1R, 2S) - (-) - N-metil efedrina  $C_{11} H_{17} NO$

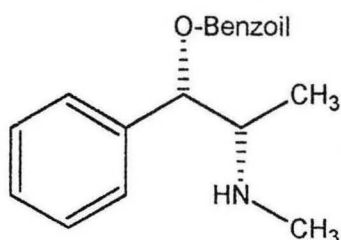
IV) (1S, 2S) - (+) - N- metil Pseudoefedrina  $C_{11} H_{17} NO$

V) (1R, 2S) - (-) - Norefedrina  $C_9 H_{13} NO$

VI) (1R, 2S) - (+) - NorPseudoefedrina  $C_9 H_{13} NO$

Se han aislado naturalmente de efedras la (-)-efedrina y (+)-pseudoefedrina, en tanto que (+)-efedrina y (-)-pseudoefedrina son productos de síntesis química.

VII) (1S, 2S)-(+)-O-Benzoil Pseudoefedrina  $C_{17} H_{19} NO$



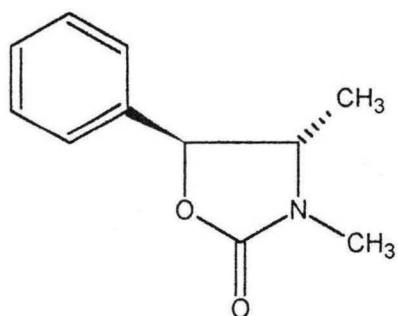
O-Benzoil Pseudoefedrina

VIII) Alcaloides oxazolidinicos: relacionados con los ácidos barbitúricos y las

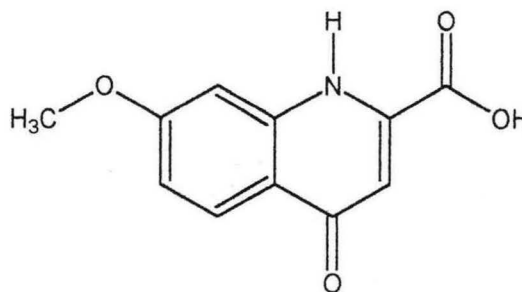
hidantoínas:

(4S, 5R) Efedroxano  $C_{11} H_{15} NO_2$  ó 4(S), 5(R) - 3, 4- dimetil -5 - feniloxazolidona

Efedralona:  $C_{11} H_9 NO_4$

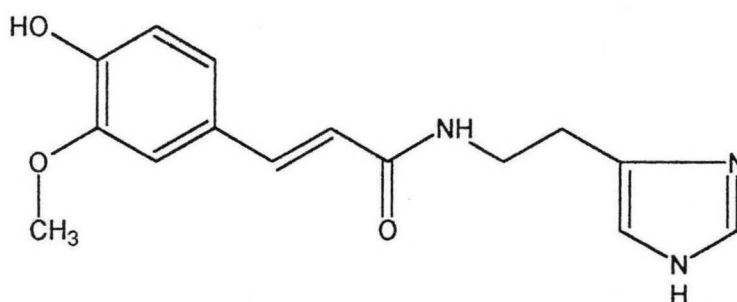


Efedroxano



Efedralona

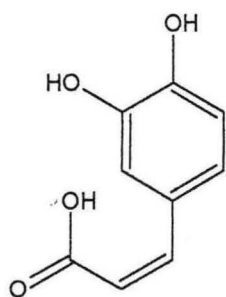
- IX) Otros alcaloides como:
- Efedina:  $C_8 H_{18} N_2 O_3$
  - Bencilmetilamina:  $C_8 H_{11} N$
  - Alcaloides Macrocíclicos de la espermina: Efedradina A, B, C y D.
  - Alcaloides Imidazólicos: Derivados del imidazol, derivado de la histamina amidado con el ácido ferúlico o ácido-4-hidroxi-3-metoxicinámico, denominado FERULOIL HISTAMINA ( 20-22)



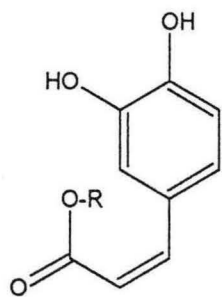
Feruloilhistamina

### 2.3.2. COMPUESTOS FENÓLICOS EN EPHEDRAS:

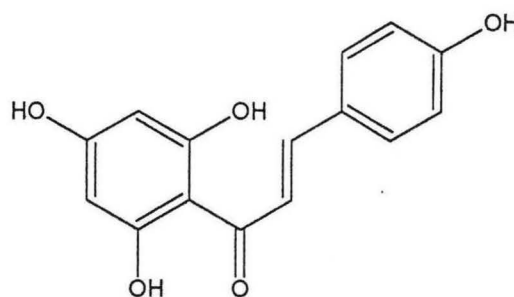
- I. Fenilpropanoides: ácido clorogénico, ácido cafeico, etc. y Chalconas.
- II. Flavonoides tipo flavona o flavonol y sus glicósidos: Kaemferol, Rutina, Herbacetina, Apigenina, Quercetina, Quercetin-3-O-galactósido, y otros Glicósidos y C-glicoflavonas.
- III. Proantocianidinas, Catequinas, Epicatequinas, Epigallocatequinas, Galocatequinas, Prodelfinidinas, Leucopelargonidinas, Leucocianidinas, Leucodelfinidinas, Mahuaminas A,B,C,D, (Bisflavonoles).
- IV. Flavanoles: Efedranina A.
- V. Tyrosinbetaína. (23-26)



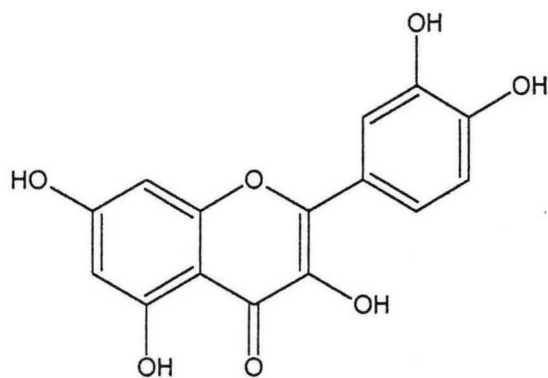
Acido Cafeico



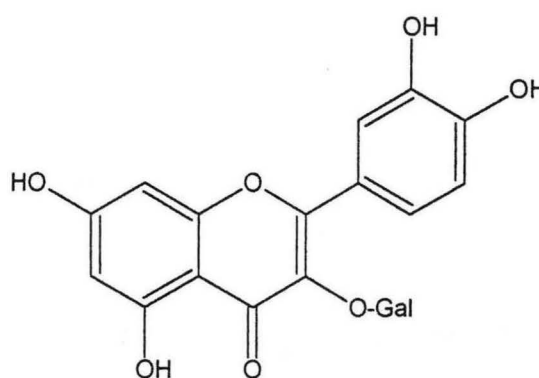
Acido Clorogénico  
R=C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>(OH)<sub>3</sub>COOH



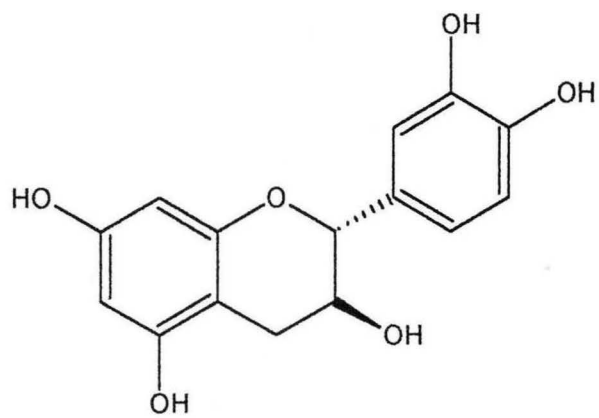
Chalcona



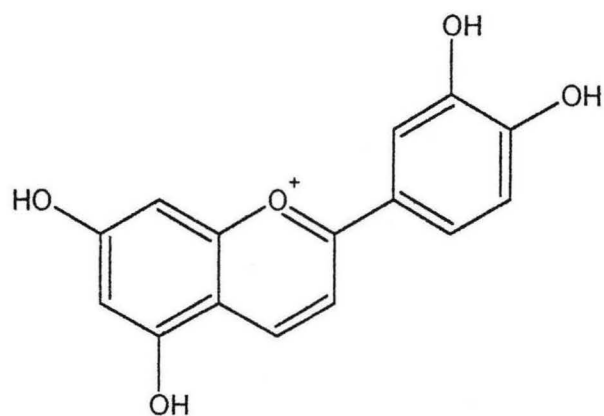
Quercetina



Quercetina-3-O-Galactosa



Catequina

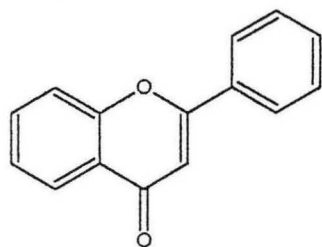


Cianidinol

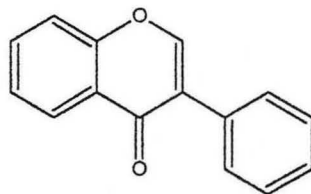
### 2.3.3. TIPOS DE FLAVONOIDES Y BIOGENESIS:

Los flavonoides son metabolitos secundarios que poseen una estructura de 15 átomos de carbono, dos núcleos fenílicos están unidos por un eslabón de tres carbonos:

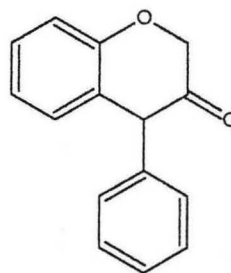
- a) FLAVONOIDES TIPICOS; son 1,3-diaril propanos.
- b) ISOFLAVONOIDES; son 1,2-diaril propanos.
- c) NEOFLAVONOIDES; son 1,1-diaril propanos.(5)



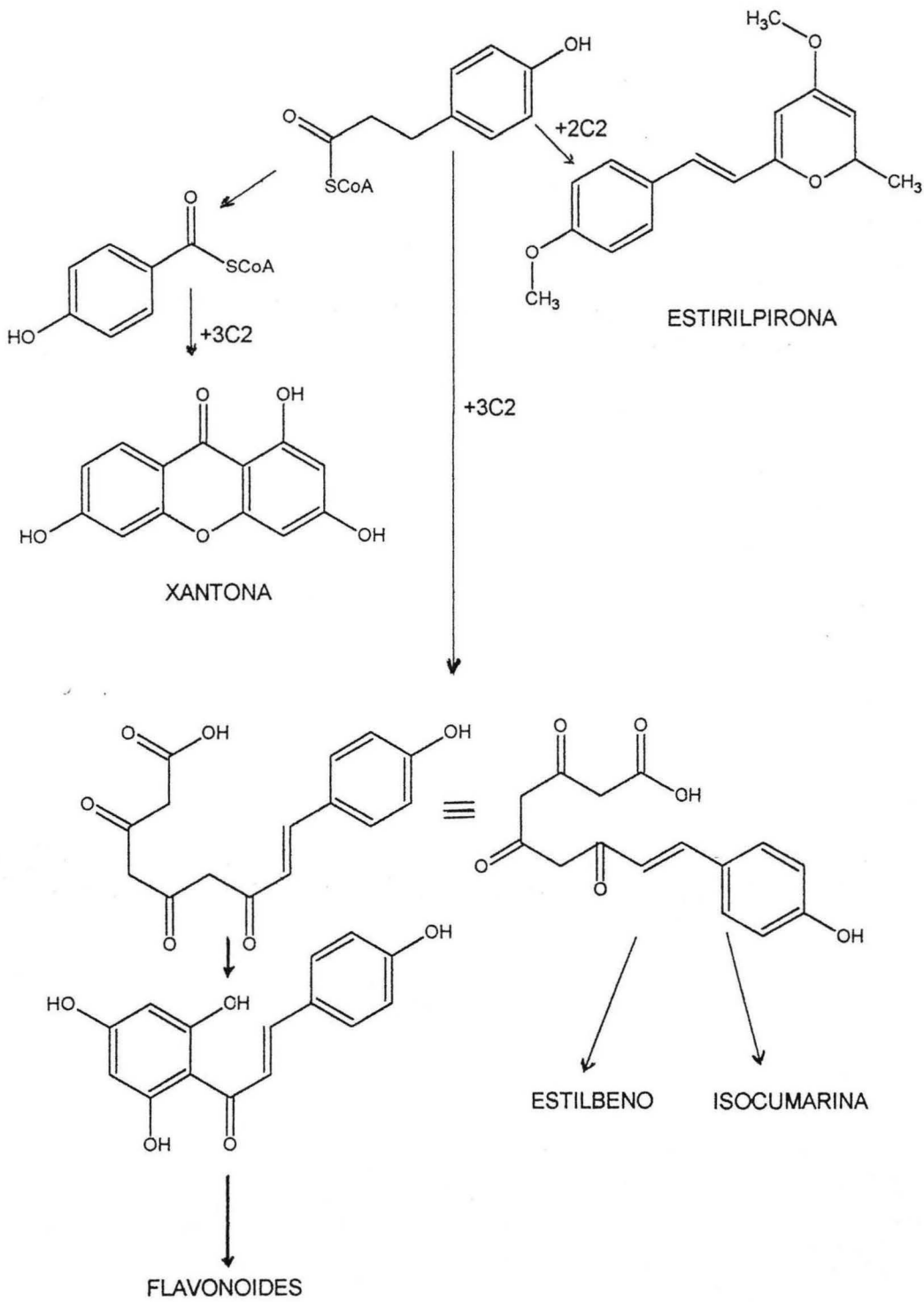
diaril-1,3



diaril-1,2



diaril-1,1



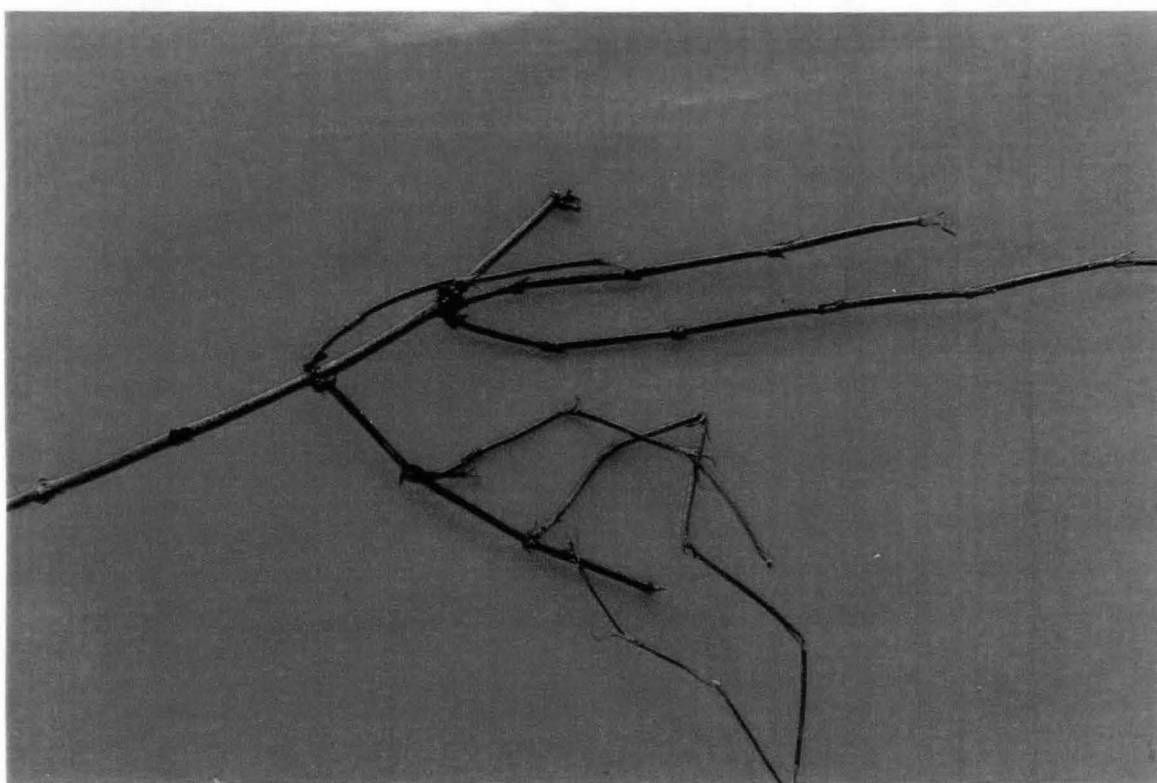


Foto N° 3 : *Ephedra americana* "Pinco-Pinco"



## 2. 4. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LAS EPHEDRACEAE

Son plantas de uso medicinal empleadas en el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias y genitourinarias. Poseen actividad antiinflamatoria. La inhibición de la biosíntesis de la prostaglandina E2 puede ser de gran importancia. (5, 20-26)

Con respecto a la actividad biológica reportada para algunos flavonoides aislados de efedras, se encontró que algunos tenían efecto antiviral, contra la infección del HIV-2 y el virus Herpes simplex. (2)

En la medicina oriental la ephedra es una droga usada para el tratamiento del asma y bronquitis, enfriamientos y resfriados, tos, fiebre, dolor de cabeza, congestión nasal y como un agente antialérgico.(Bruneton, 1995) (5). En China han investigado sus usos clínicos para el tratamiento del asma bronquial, bronquitis crónica, neumonía infantil, catarros, estados espásticos o como antiespasmódico, broncoespasmos, etc; en base al uso del sistema de historias clínicas bien establecidas de la medicina tradicional y convencional, mediante investigaciones fitoquímicas intensivas, estudios farmacológicos en animales de experimentación y estudios clínicos en humanos.

## 2. 5. LA EPHEDRA PERUANA

La yerba conocida por los nativos peruanos como “pinco-pinco”, es de amplio uso en la medicina tradicional, crece a lo largo de la Cordillera de los Andes, en las altiplanicies de Bolivia la conocen como “condorsara”, en la zona andina de Argentina y Chile la llaman “pingo-pingo”.

En nuestro país esta especie crece abundantemente en el Departamento de Arequipa en el balneario de Jesús en el camino a la laguna de Salinas, en las faldas del nevado de Pichu-Pichu. También crece abundantemente en el Departamento del Cusco en la provincia de Calca, en Cajamarca y otros lugares andinos.

En el Perú habita la *Ephedra americana* H & B var. andina (Foto N° 3) y *Ephedra andina* POEPP & ENDL, ambas indistintamente llamadas comunmente “pinco-pinco”; en Argentina se les conoce como “solupe”. (25,26)

### 2.5.1. ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA *Ephedra americana*.

2.5.1.1. MORFOLOGÍA: Planta subarborescente, hierba de tallos verdes, de 60 - 80 cm de alto, que desempeña la función del aparato asimilatorio, en cuyos nudos se disponen hojas diminutas como escamas opuestas, especie dioica, flores unisexuales, axilares y sésiles, provistas de una envoltura simple de 2 hojas en las masculinas, con 2-8 estambres y una especie tubular en las femeninas, con óvulo ortótropo con un sólo tegumento. Fruto con consistencia de drupa y que no es otra cosa que el ovario madurado.

2.5.1.2. ESTRUCTURA HISTOLÓGICA: Un corte transversal del tallo muestra:

1. Epidermis de un sola hilera de células irregulares, de paredes engrosadas.
2. Parénquima cortical, varias hileras de células irregulares, de membrana algo delgada y con inclusiones diversas.
3. Líber, varias capas de tubos cribosos ordenados y casi paralelos.
4. Cambium, una hilera continua de células entre el líber y el leño secundario.
5. Leño secundario; dispuesto en forma radial.
6. Leño primario aislado, sólo en tallos jóvenes.
7. Médula central, formada por células parenquimáticas muy amplias y de paredes delgadas.

### 2.5.1.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

División	: Gymnospermae
Clase	: Chlamydospermae
Orden	: Gnetales
Familia	: Ephedraceae
Género	: Ephedra
Especie	: <i>Ephedra americana</i> Humboldt & Boupland ex Willdenow

Nombre vulgar : “ pinco-pinco”

Sinonimia : Diego López, belcho, uva de mar, suelda con suelda, suelda-suelda, condorsara, pingo-pingo, likchanya, pachatara, pfiuco, pfirco, wacua.

## 2.5.2. ASPECTOS QUÍMICOS DE LA *Ephedra americana*:

### 2.5.2.1. ALCALOIDES:

Según Chávez y col. (25) esta especie medicinal contiene alrededor de 0.38 % de alcaloides totales, que estaría constituido fundamentalmente de efedrina, pseudoefedrina y otros alcaloides en pequeña cantidad. (21,22)

### 2.5.2.2. COMPUESTOS FENÓLICOS:

- Fenilpropanoides, catequinas, flavonas, flavonoles, glicósidos, dímeros flavónicos, etc.(23-27)

## 2.5.3. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LA *Ephedra americana*:

Según referencias históricas, etnobotánicas, de la medicina tradicional y de la etnofarmacología, la *Ephedra americana* “pinco-pinco” fue usada por los antiguos Peruanos y Araucanos (chilenos), considerándolos como un remedio universal, como antidisentérico, antiinflamatorio especialmente para las encías y piorrea, hemostático, diurético, afecciones renales, tratamiento de fracturas, sudorífico, antipirético, sedante de la tos, estimulante respiratorio especialmente para el asma bronquial, así también como midriático.

Por recientes estudios, sabemos que esta planta además de contener el alcaloide efedrina y sus derivados, contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos tipo flavonoides, que actuarían sobre el sistema inmune, estimulando a los receptores beta adrenérgicos que probablemente impiden la liberación de aminas vasoactivas (histamina, serotonina, prostaglandinas, etc.) que son las que desencadenan las reacciones anafilácticas, la actividad inmunoestimulante, se relaciona con el tratamiento del resfriado común, de algunos tipos de alergias, asma, cáncer y sida. Los mecanismos inmunes son causa de reacciones de hipersensibilidad y de cierto número de enfermedades degenerativas, inflamatorias y autoinmunes.(9,26)

Tienen además los flavonoides, propiedades antioxidantes y protectoras de la mucosa gástrica. La actividad antioxidante de metabolitos obtenidos de plantas es útil para conocer la formación y los mecanismos de eliminación de los radicales libres del organismo humano, que podrían atacar la pared celular. (20–24, 36-41)

## 2. 6. SISTEMA INMUNE

La respuesta a un antígeno se denomina respuesta inmune. El sistema linfático es de suma importancia para la defensa del cuerpo contra enfermedades infecciosas y brinda la defensa principal contra los cambios neoplásicos. Los mecanismos inmunes son causa de reacciones de hipersensibilidad y de cierto número de enfermedades degenerativas, inflamatorias y autoinmunes.

Los linfocitos son células derivadas del tejido linfático, son activados por antígenos que reconocen específicamente, luego se dividen y proliferan para producir un clon. Se dividen en:

- Células T, dependientes del timo, responden directamente a los antígenos que pueden ser algunos bacilos ácido resistentes, hongos, células extrañas, formando clones que le confieren inmunidad celular.
- Células B, equivalentes de bolsa, requieren cooperación de las células T antes de poder formar un clon, pero también pueden ser estimuladas directamente por antígenos, en particular por macromoléculas extrañas.

Las fitohemaglutininas o lecitinas estimulan la proliferación de los linfocitos.

Los organismos son continuamente invadidos por sustancias extrañas o antígenos, los organismos producen anticuerpos que se unen a los antígenos y los destruyen.

Estructuralmente la molécula de un anticuerpo está formada por dos cadenas polipeptídicas livianas y dos cadenas pesadas unidas por puentes disulfuro, cada cadena liviana o pesada incluye dos regiones; una variable (V) que difiere en los distintos anticuerpos y otra constante (C), que suele ser la misma en la mayoría de anticuerpos. La composición de las regiones variables de las cadenas VL y VH determina las propiedades del sitio de combinación del anticuerpo con el antígeno.

Todos los anticuerpos pertenecen al grupo de proteínas llamadas globulinas y del análisis de los genes de la cadena pesada se obtienen 8 tipos de secuencias en la región constante:  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_{2b}$ ,  $\gamma_{2a}$ ,  $\epsilon$ ,  $\alpha$ , correspondientes a las inmunoglobulinas: IgM, IgD, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgE, IgA, además de la región variable en 3 segmentos: V, D, J.

Las cadenas pesadas H, son diferentes para cada clase de inmunoglobulinas gamma, upsilon, alfa, epsylon y delta; teniendo cada una 250 unidades de aminoácidos, a excepción de la upsilon que contiene 650 unidades de aminoácidos.

Las cadenas ligeras L, kappa con 214 aminoácidos y C terminal cisteína y lambda con 215 aminoácidos y C terminal cisteína-serina.

Las inmunoglobulinas tienen distintas funciones de acuerdo con el tipo de cadena pesada de sus moléculas; estimuladas por el antígeno los linfocitos B proliferan y se transforman en células muy especializadas denominadas “plasmocitos” que poseen un retículo endoplasmático rugoso muy desarrollado y son capaces de secretar hasta mil moléculas de anticuerpos por segundo.

En algunos linfocitos de un clon dado pueden producirse modificaciones en algunos sectores de la región constante de la cadena pesada, secretándose las clases de anticuerpos, tales variantes les confieren distintas propiedades, así la IgG es un anticuerpo bivalente y constituye aproximadamente el 75% de los anticuerpos en una persona normal y fija el complemento, conjunto de proteínas séricas que destruyen a los microorganismos; la IgE constituye sólo un pequeño porcentaje de los anticuerpos denominados reaginas, y está especialmente implicada en la alergia, se une a ciertos receptores de membrana de las células cebadas, las cuales contienen grandes cantidades de histamina, la que provoca diversas reacciones alérgicas por la unión con el antígeno.(6-9)

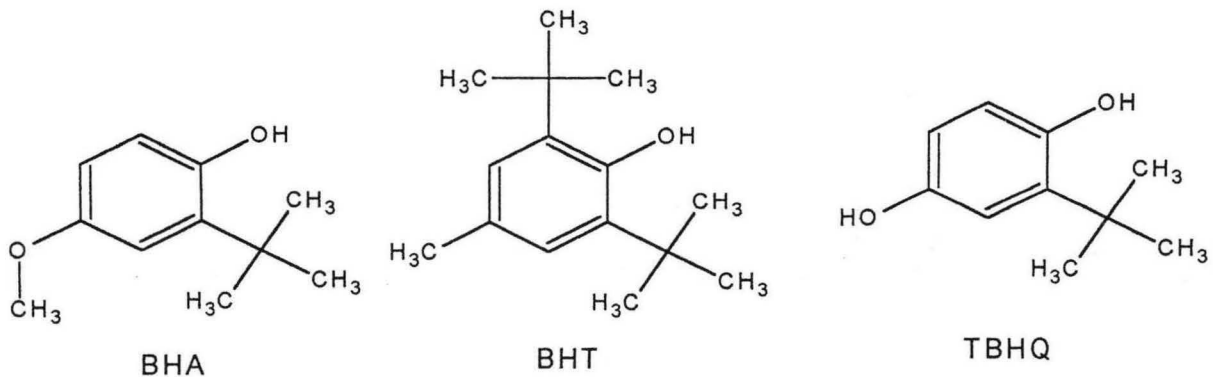
## 2.7. ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes previenen las modificaciones indeseables debidas a las oxidaciones, son aquellas sustancias que impiden o retardan las oxidaciones catalíticas y enranciamiento natural o provocado por la acción del aire, la luz, el calor, los residuos metálicos, etc.

Los antioxidantes pueden ser clasificados, según su estructura química como: fenoles, quinonas, aminas, enzimas, etc. y según su mecanismo de acción como: sustancias que interrumpen la reacción en cadena de formación de radicales libres, sustancias reductoras y agentes quelantes .

- a) BUTIL HIDROXI ANISOL (BHA) :2-t-butil-4-metoxi fenol
- b) BUTIL HIDROXI TOLUENO (BHT) :2,6-di-t-butil -p-cresol
- c) 2-t-butil hidroquinona (TBHQ)

- d) Derivados del Ácido Gálico ó Galatos: 3,4,5-trihidroxi benzoato de propilo
- e) dl-alfa -tocoferol
- f) Bioflavonoides de origen natural: quercetina, rutina, genisteína, prunetina, ramnetina, kaemferol, catequinas, etc.
- g) Fenilpropanoides: ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico, etc.



Estos compuestos pueden ser utilizados en el tratamiento de afecciones causadas por peroxidación lipídica por poseer actividad inhibitoria de formación de radicales libres oxigenados.

FARMACOCINÉTICA. Los antioxidantes más estudiados son el BHA, BHT, y el GP, se absorben rápidamente en el tracto gastrointestinal, se metabolizan y son excretados por la orina. Se afirma que causan inducción enzimática, se acumulan en los tejidos, afectan el crecimiento, la organización celular y exhiben una eliminación dosis dependiente. Su actividad y precauciones para su empleo, así como sus efectos adversos son ampliamente conocidos.

La aplicación principal de los antioxidantes como el BHA, BHT y el GP, es la prevención o retardo en la aparición de las alteraciones debidas a la oxidación en productos, principalmente grasos y algunos principios activos en alimentos, medicamentos y en los cosméticos para la prevención del envejecimiento cutáneo.

En esta investigación se ha estudiado y relacionado la estructura química y actividad biológica como antioxidante de compuestos fenólicos tipo flavonoides o fenilpropanoides de origen natural, que consideramos no tendrían niveles altos de toxicidad como las que muestran los compuestos antioxidantes sintéticos.

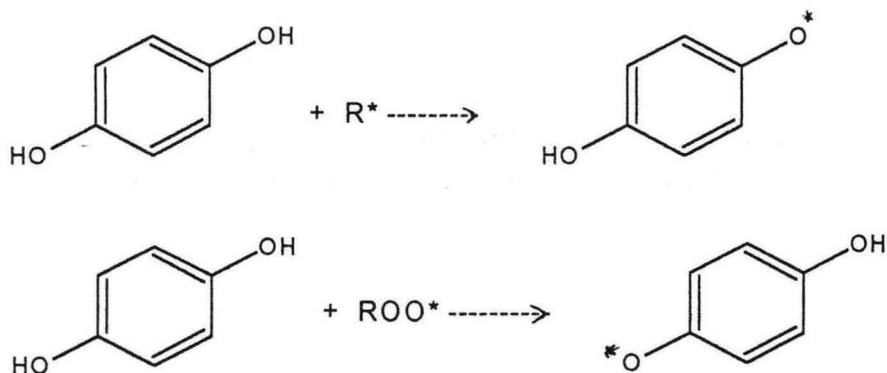
Los procesos oxidativos, a nivel celular están considerados como los principales causantes del envejecimiento. Las teorías del envejecimiento son muchas, entre estas la "Teoría de los radicales libres" se basa en la oxidación de los lípidos insaturados de la

membrana celular por compuestos fuertemente reactivos, dando lugar a pérdida de su integridad, modificando reacciones metabólicas celulares y produciendo envejecimiento tisular.

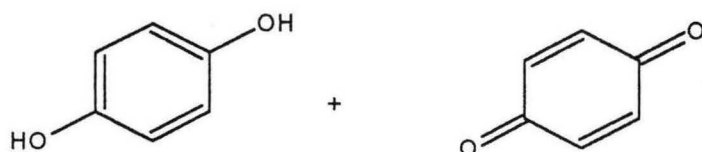
Radicales libres causantes de la oxidación: el anión superóxido  $O_2^{*}$ , el radical hidroperóxido  $HO_2^*$ , el radical hidroxilo  $OH^*$  (el más reactivo),  $RO^*$ ,  $ROO^*$  que se pueden originar en la respiración celular, en el metabolismo intermediario o por contaminación, drogas, herbicidas, alimentación inadecuada, etc., generándose enfermedades como: enfisema pulmonar, cáncer, artritis, cataratas, aterosclerosis, cirrosis hepática, etc.

Existen mecanismos protectores en el cuerpo humano como enzimas: superóxido dismutasa, catalasas, peroxidasas, etc. pero si éstas se deterioran, se saturan o existe un déficit, será necesario el aporte de sustancias antioxidantes por otras vías como la alimentación o la aplicación tópica de preparados con alto contenido de antioxidantes, especialmente de bioflavonoides de origen natural a partir de plantas medicinales.

MECANISMO DE ACCIÓN ANTIOXIDANTE. Los de tipo fenólico, actuarían por la donación de un hidrógeno o de un electrón al radical libre, quedándose él como una estructura resonante estable y consiguiendo la interrupción de la reacción en cadena. (10-19)



Finalmente:



### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1.0. MATERIAL Y MÉTODOS**

Se emplearon técnicas instrumentales, espectrofotométricas y métodos biológicos debidamente validados.

#### **3.2.0. INVESTIGACION FITOQUIMICA**

##### **3.2.1. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

La planta *Ephedra americana* “pinco-pinco” fue ubicada y recolectada en la provincia de Calca (Cusco) a 3500 m s n m., en el mes de mayo, época de floración.

La parte aérea fue secada a la sombra a temperatura ambiente y posteriormente pulverizada en un molino de cuchillas y almacenada en frascos color ámbar, para su posterior tratamiento fitoquímico y biológico.



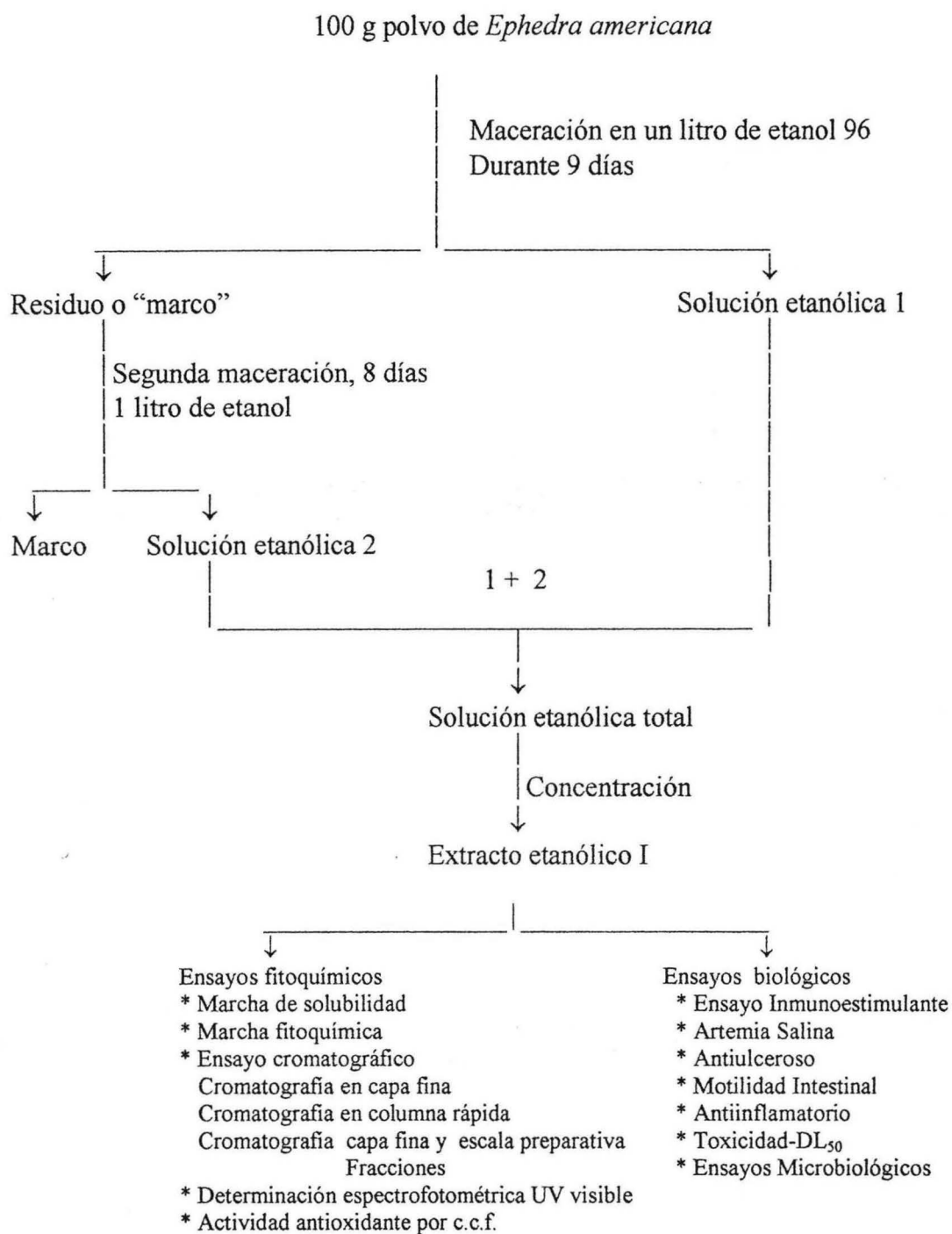


Fig. N° 1 DIAGRAMA DE FLUJO DE LA INVESTIGACION

### 3.2.2. TECNICA DE EXTRACCION DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA *Ephedra americana* :

Cien gramos de polvo de la parte aérea de *Ephedra americana* fueron macerados en 1000 ml. de etanol durante 9 días, protegido de la luz y el calor, haciéndose una segunda maceración en otros 1000 ml. de etanol durante 8 días más, se filtraron las soluciones alcohólicas y luego se juntaron y evaporaron a sequedad a una temperatura de 40 °C en una estufa de aire circulante, para obtener de esta forma el extracto etanólico I, que consistió en películas marrones y plumizas.

El extracto etanólico I se utilizó para realizar los ensayos fitoquímicos, como la marcha de solubilidad y la marcha fitoquímica; los ensayos cromatográficos y paralelamente los ensayos biológicos. (28-34)

### 3.2.3. ENSAYOS FITOQUÍMICOS:

SOLUBILIDAD. Se tomó muestras de 5 mg de extracto etanólico I, tratándoseles con diferentes solventes a fin de observar su comportamiento de solubilidad, como se ve en la tabla N° 2.

SCREENING FITOQUÍMICO. Se tomaron muestras de 5 mg de extracto etanólico I y se les aplicó reactivos de identificación como observamos en la tabla N° 3.

### 3.2.4. ENSAYOS CROMATOGRÁFICOS

#### 3.2.4.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO TOTAL O EXTRACTO CRUDO I

El extracto etanólico I se sometió a ensayos cromatográficos en capa fina unidimensional ascendente, utilizando como fase fija Silicagel G 60 y como fase móvil cloroformo y metanol en la proporción de 3:1; en un segundo ensayo se utilizó como solventes cloroformo y metanol en la proporción de 10:1; al no obtener resultados satisfactorios se utilizó un solvente más polar.

La muestra I demostró una alta polaridad, razón por la cual ninguno de los solventes anteriormente utilizados resultaban totalmente útiles.

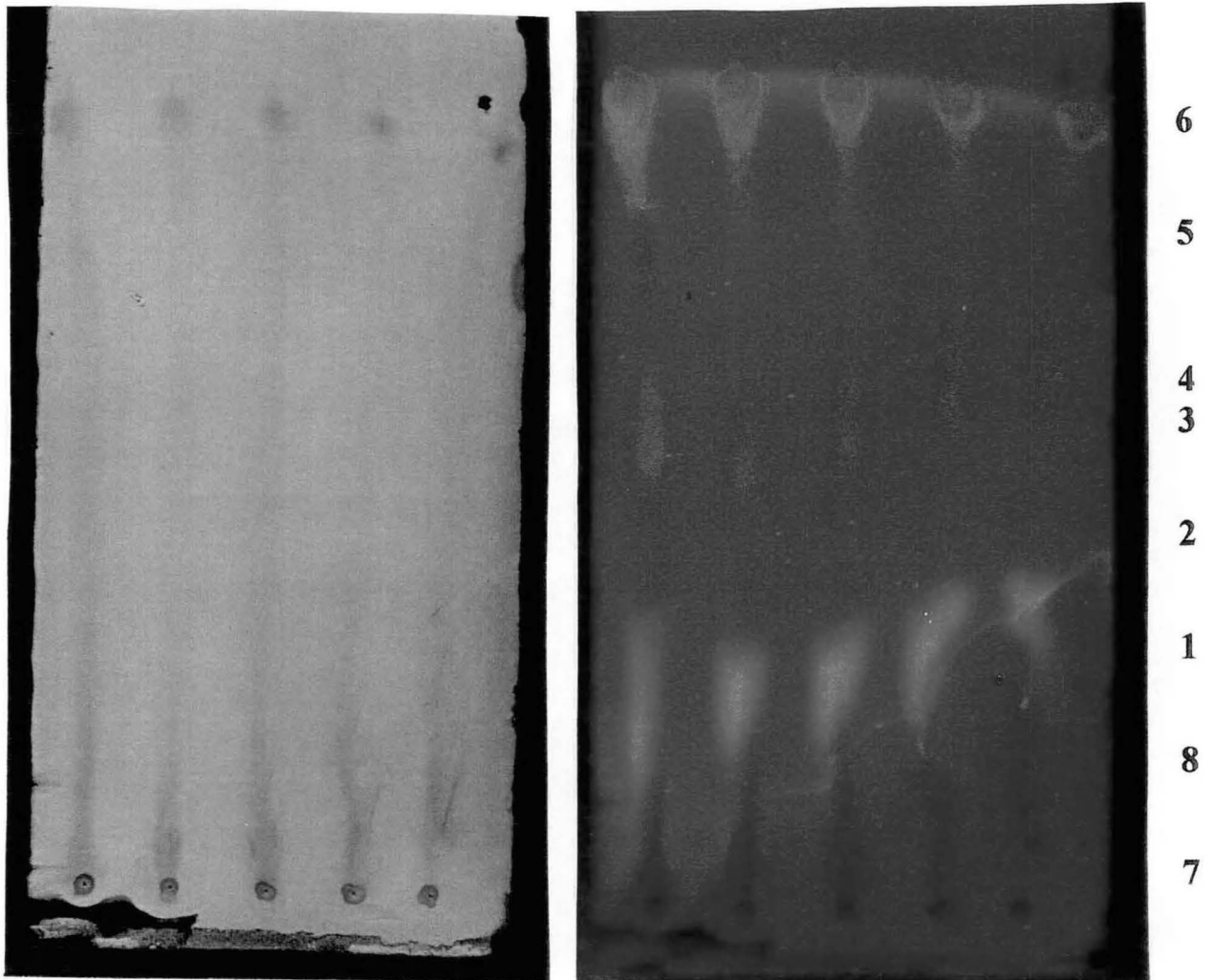
Se obtuvieron mejores resultados con el sistema BAW ( n – butanol : ácido acético : agua 4:1: 5 ) con un tiempo de corrido de cuatro horas. Fueron observados en la lámpara de luz UV 366 nm, comprobándose fluorescencias de colores celeste, verdosa, rojiza así como algunas de color púrpura; al revelar con ácido sulfúrico al 50% se observó a luz visible unas manchas amarillas verdosas que nos indicaban la presencia de compuestos fenólicos tipo flavonoides, igualmente al usar vapores de amoníaco; al revelar con luz UV 366 nm + ácido sulfúrico al 50%, se observó la intensificación de las fluorescencias, por ejemplo de celeste a celeste brillante; al revelar con tricloruro férrico, se observó que algunas manchas tomaban un color marrón grisáceo lo que indicaba que eran compuestos fenólicos; y revelando con el reactivo de Dragendorff, se observó manchas intensas de color rojo ladrillo lo que indicaba la presencia de alcaloides. Fotos N° 4, 5.

#### 3.2.4.2. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA RAPIDA DE I

Se realizó una cromatografía en columna rápida, con la finalidad de fraccionar el extracto total I, en subextractos con diversos solventes de polaridad creciente.

Procedimiento: Se preparó una columna de silicagel con 5 g del extracto total disuelto en 1 ml de etanol, el cual fue mezclado con unos gramos de silicagel hasta formar una papilla granular homogénea. Sembrando la papilla, en la parte superior de la columna, en la superficie de la silicagel.

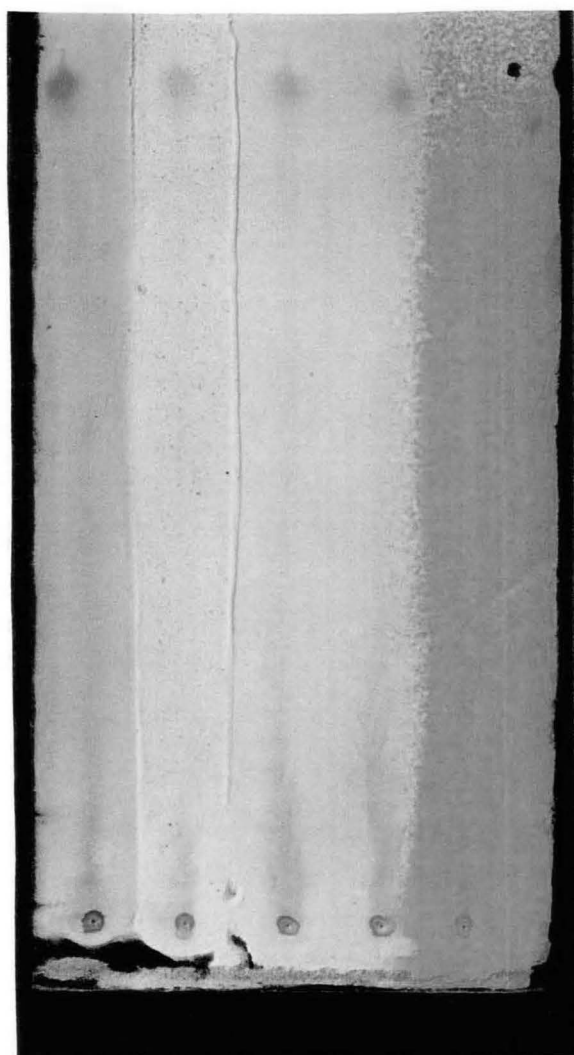
Luego se procedió a la elución utilizando sucesivamente los solventes: n-hexano, cloroformo, metanol y agua destilada; con la ayuda de una bomba de vacío, que facilitó la elución en forma rápida y continua, obteniéndose las soluciones que al concentrarse dieron los subextractos II, III, IV y V. Fig. N° 2. Tabla N° 5.



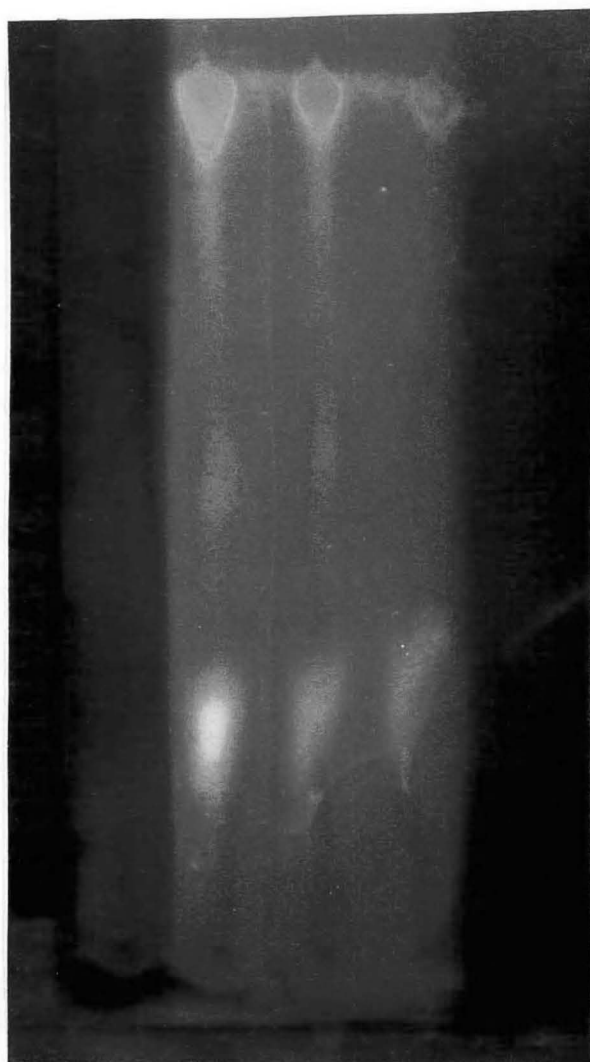
a)

b)

Foto N° 4 : Componentes de *Ephedra americana*: Compuestos fenólicos,  
Flavonoides(1-5); Alcaloides(7,8)  
C.C.F. : Silicagel G-60; BAW 4:1:5 ; Reveladores:  
a) Visible b) Luz UV 366 nm.



a)



b)

Foto N° 5 : Componentes de *Ephedra americana*: Compuestos fenólicos,  
Flavonoides(1-5); Alcaloides(7,8)  
C.C.F. : Silicagel G-60; BAW 4:1:5 ; Reveladores:  
a)  $FeCl_3$  ,  $H_2SO_4$  , Visible, Reactivo de Dragendorff  
b) Luz UV 366 nm.

### 3.2.4.3. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE LOS SUBEXTRACTOS

Se realizaron ensayos cromatográficos en capa fina, con la finalidad de controlar la separación de componentes, para detectar, identificar y ver el número de los metabolitos secundarios presentes en cada fracción.

Se investigó comparativamente el extracto total I con las fracciones metanólica II y acuosa III, utilizando como fase fija : Celulosa + F366 nm., como eluyentes: BAW 4:1:5 con un tiempo de corrido de 2 horas, revelándose con el Reactivo de Dragendorff, Vapores de amoníaco, Potasa alcohólica, Ácido sulfúrico al 50%, Tricloruro de fierro, Tricloruro de aluminio y Luz UV 366, 254 nm.

### 3.2.4.4. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA A ESCALA PREPARATIVA

Con la finalidad de aislar y purificar los componentes químicos o metabolitos secundarios presentes en el subextracto II, se realizaron cromatografías en capa fina a escala preparativa, utilizando como soporte placas de vidrio de 20x20 cm, como adsorbente silicagel G-60 ó Celulosa + F366 nm., como sistema de solventes BAW, y observándose con Luz UV 366 y 254 nm, fueron separados con mezclas de metanol cloroformo en forma repetitiva hasta lograr la pureza adecuada para su posterior elucidación estructural mediante Espectroscopía UV-Visible.

### 3.2.4.5. ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE COMPONENTES AISLADOS

Los componentes químicos aislados mediante cromatografía en capa fina a escala preparativa, fueron estudiados espectroscópicamente mediante lecturas al UV en metanol y correlacionados químicamente con reactivos de desplazamiento, los que unidos a los resultados cromatográficos y a las reacciones químicas específicas, nos permitieron sugerir las estructuras químicas.

## ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV

Luego de separar las manchas de las placas cromatográficas a escala preparativa, se procedió a extraerlos utilizando cloroformo y metanol para separarlos de la silicagel. Se obtuvieron 8 fracciones, de las cuales las fracciones 1, 3, 4 y 6 poseían fluorescencias, mientras que las 2, 5, 7 y 8 no poseían fluorescencia frente a la luz UV 366 nm.

Se sometieron todas las fracciones aisladas y purificadas al análisis espectrofotométrico UV observando que las fracciones 6, 7, y 8 se encontraban impuras o representaban mezclas de varios componentes razón por la cual no fueron sometidas a análisis posteriores, sin embargo debemos indicar que las fracciones 7 y 8 están constituidas de alcaloides.

Al analizar los espectros UV de las fracciones numeradas como 1, 2, 3, 4 y 5 comparando las longitudes de onda de los picos de cada fracción con una tabla de referencia (28) y correlacionando los datos obtenidos mediante reacciones de desplazamiento, nos permitió elucidar las estructuras propuestas. (28–35)

### 3.2.4.6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se utilizó la técnica cromatográfica en capa fina, por decoloración de extractos ricos en beta caroteno para la detección de captadores de radicales libres, según Joyeux y col. 1995, (41) se ensayaron la fracción metanólica II y la fracción acuosa III obtenidas como ya mencionamos mediante cromatografía en columna rápida, en las siguientes condiciones:

- I) MP. : extracto metanólico II  
Técnica: cromatografía en capa fina unidimensional  
Soporte o fase fija: Silicagel G-60 de 5 x 20 cm.  
Fase móvil: BAW 4:1:5 v/v  
Cámara rectangular de elusión  
Tiempo de desarrollo: 2 hs.

Frente de solventes: 12 cm.

Revelador: Extracto con beta caroteno en cloroformo + Luz UV 254 nm.

(100 g. de zanahorias + 100 ml de acetona, se filtra, al residuo se le agrega 100 ml de cloroformo se filtra y se deseca con sulfato de sodio anhidro)

Foto N° 6

II) MP. : extracto acuoso III

Técnica: cromatografía en capa fina unidimensional

Soporte o fase fija: Silicagel G-60 de 10 x 20 cm.

Fase móvil: BAW 4:1:5 v/v

Cámara rectangular de elusión

Tiempo de desarrollo: 2 hs.

Frente de solventes: 12 cm.

Revelador: Extracto con beta caroteno en cloroformo + Luz UV 254nm.

Foto N° 7



### 3.3.0. INVESTIGACION BIOLÓGICA

#### 3.3.1. ENSAYO INMUNOESTIMULANTE

##### ESTIMULACIÓN RETÍCULO ENDOTELIAL DE DELAVEAU Y COL.(1980)

Materiales: Animales de experimentación: ratas albinas marcadas y pesadas.

Extracto Etanólico total I, Tinta china N° 17, Twen al 5%, Suero fisiológico.

Equipos: Espectrofotómetro UV-Visible, Microscopio, Balanza Analítica.

TABLA N° 1 Método de Delaveau y col. Ensayo Inmunoestimulante (42)

GRUPO	TRATAMIENTO	N° DE RATAS
1	Control	8
2	Ext. Total Efedra 12.5 mg/kg	8
3	Ext. Total Efedra 50 mg/kg	8
4	Ext. Total Efedra 100 mg/kg	8
5	Isoprinosine 300 mg/kg Estimulante Sistema Inmune	8
6	Prednisona 100 mg/kg corticoide, Inhibidor Sistema Inmune	8

#### PROCEDIMIENTO:

1. Se determinó los datos basales de cada animal.
2. Se administró 0.5 ml de solución al 1% del extracto total en estudio ( dosis variadas durante cinco días).
3. Se esperó 24 horas y luego se administró 0.5 ml de solución de tinta china al 10% en suero fisiológico vía endovenoso, utilizando la vena sagital de la cola.
4. Se extrajeron muestras de sangre venosa a 1 hora, 2 horas y 3 horas.
5. Se hemolizó 10 ul de sangre en 5 ml de agua destilada.
6. Se leyó en el espectrofotómetro UV-Visible, longitud de onda 650 nm., filtro rojo, anotándose los resultados.
7. Se efectuaron frotis , tiñéndose con el colorante Giemsa , contándose las células.
8. Se tabuló y comparó los resultados obtenidos. ( 8,9,42 )

### 3.3.2. ENSAYO DE TOXICIDAD EN ARTEMIA SALINA

Para realizar el bioensayo de Toxicidad en *Artemia salina* Leach, se preparó la dilución del extracto total de la siguiente manera: se pesó 20 mg del extracto total I, disolviéndose en 2 ml de DMSO, se transfirieron 5, 50 y 500 ul a viales que corresponden a las diluciones de 10, 100 y 1000 ug/ml, preparándose 3 viales para cada concentración.

Se preparó también viales control conteniendo 50 ul de DMSO. Se realizó la incubación de los huevos de *Artemia salina*, luego de 48 hs., los huevos eclosionan, colectándose las larvas con una pipeta Pasteur, adicionándose 10 larvas a cada vial, ajustándose el volumen a 5 ml por vial con agua de mar.

Transcurridos 24 hs., se procedió a contar el número de larvas sobrevivientes en cada dilución, los datos se procesaron con el programa de computadora Finney (DOS) para obtener los valores de CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA, con intervalos de confianza del 95%. (46,47)

### 3.3.3. ACTIVIDAD ANTIULCEROSA

Se ensayó la actividad antiulcerosa del extracto etanólico I y la fracción metanólica II ; con tres niveles de dosis de cada extracto, los que fueron administrados por vía peroral a ratones, con lesiones gástricas inducidas por indometacina, el extracto I brindó mejor eficiencia antiulcerosa siendo dosis dependiente. (48,49)

#### **Material y Métodos**

##### **Lesiones gástricas en ratones inducidas por indometacina:**

Se utilizaron ratones albinos (25-30 g), con ayuno de 24 horas, fueron divididos en lotes de ocho animales; cada ratón recibió indometacina a la dosis de 60 mg/kg por

vía intraperitoneal. Los extractos fueron suspendidos en una solución de propilenglicol al 5% en agua destilada, siendo administrados en dosis de 10, 100 y 200 mg/kg, vía peroral, una hora después de la administración de indometacina; luego de cinco horas, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, se retiraron los estómagos y se contó el número de lesiones totales que presenta cada animal.

### 3.3.4 ACTIVIDAD SOBRE LA MOTILIDAD INTESTINAL

Se evaluó la motilidad intestinal del extracto etanólico I y la fracción metanólica II; con tres niveles de dosis de cada extracto, los que fueron administrados por vía peroral a ratones, que recibieron posteriormente carbón activado 0,1 ml de una suspensión al 5% en goma tragacanto, utilizado como marcador de avance de la materia fecal en el ratón, II evidenció disminución de la motilidad intestinal no siendo dosis dependiente. (50)

#### **Material y Métodos**

##### **Avance del tránsito intestinal, utilizando carbón activado como marcador en ratones :**

Se utilizaron ratones albinos (25-30 g), con ayuno de 24 horas, fueron divididos en lotes de ocho animales, cada ratón recibió los extractos que fueron suspendidos en una solución de propilenglicol al 5% en agua destilada, siendo administrados en dosis de 10, 100 y 200 mg/kg, vía peroral, media hora después de la administración de los extractos, se les dio por vía peroral carbón activado 0,1 ml de una suspensión al 5% en goma tragacanto; luego de media hora, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, se retiraron los intestinos y se midió el avance de la materia fecal, expresado en centímetros.

### 3.3.5. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Se ensayó la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico I y la fracción metanólica II ; los extractos fueron administrados por vía peroral a ratones con edema subplantar inducido por carragenina, I brindó mayor eficiencia antiinflamatoria (28,25%) (51,52)

## Material y Métodos

### Edema subplantar inducido por carragenina en ratones:

Se utilizaron ratones albinos (25-30 g) fueron divididos en lotes de ocho animales; cada ratón recibió 0,1 ml de una suspensión de carragenina al 2%, vía subcutánea, en la pata trasera izquierda.

Los extractos fueron suspendidos en una solución de propilenglicol al 5% en agua destilada, siendo administrados en dosis única de 200 mg/kg, por vía peroral, una hora después de la carragenina. Se midió el diámetro del edema inducido, utilizando un micrómetro, expresándose la inflamación en milímetros (Basal normal, basal inflamado, seguidamente a 1, 2, 3 horas post-tratamiento).

### 3.3.6. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA Y SUBCRÓNICA

#### 3.3.6.1. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA. DETERMINACIÓN DE DOSIS LETAL 50 (DL<sub>50</sub>) POR VÍA PERORAL:

Se tomaron ratones albinos, formándose grupos al azar de seis animales cada uno, un grupo recibió el solvente (para el extracto I suspendido en una solución de propilenglicol al 5% en agua destilada) que ayudó a disolver al extracto; hasta producir la muerte de todo el grupo. Se tuvo en cuenta el criterio de Williams para la calificación de los resultados de DL<sub>50</sub> (mg/kg); la sustancia es extremadamente tóxica, si la DL<sub>50</sub> <1; altamente tóxica < 50; moderadamente tóxica < 500; ligeramente tóxica < 5000; prácticamente no tóxica <15000; y relativamente inocua >15 000. (53)

### 3.3.6.2. ENSAYO DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA, CON DOSIS

#### EFFECTIVA MEDIA:

16 ratas se dividieron en dos grupos de ocho animales cada uno; el primero recibió suero fisiológico a la dosis de 2 ml/kg; el segundo 50 mg/kg de I; por vía peroral, durante tres meses; luego se les tomó muestra de sangre para exámenes de laboratorio clínico, guardándose los órganos para un posterior estudio anatomohistológico.

### 3.3.7 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

Se determinó la actividad antimicrobiana del Extracto Etanólico total I de *Ephedra americana*, frente a bacterias gram positivas y gram negativas por el método de disco placa cultivo; se ensayaron frente a las siguientes cepas: *Escherichia coli* ATCC 11313, *Salmonella cholerae suis serotipo typhimurium* ATCC 14028, *Streptococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella cholerae suis serotipo enteritides* ATCC 13076, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. (12 )

## IV. RESULTADOS

### 4.1.0. RESULTADOS FITOQUIMICOS

**TABLA Nº 2 MARCHA DE SOLUBILIDAD**

MUESTRA PROBLEMA	SOLVENTES	RESULTADOS
5 mg de extracto etanólico	0,5 ml. De agua destilada	+ -
5 mg de extracto etanólico	0,5 ml. De metanol	+ + + +
5 mg de extracto etanólico	0,5 ml. De etanol	+ + +
5 mg de extracto etanólico	0,5 ml. de n-butanol, de isobutanol, de tercbutanol, de isopropanol o de alcohol amílico.	+
5 mg de extracto etanólico	0,5 ml. De 2-octanol	+ -
5 mg de extracto etanólico	0,5 ml. De ciclohexanol	-
5 mg de extracto etanólico	0,5 ml. De AcOEt, o CHCl <sub>3</sub>	+ +
5 mg de extracto etanólico	0,5 ml. De diclorometano	+
5 mg de extracto etanólico	0,5 ml. de ciclohexano, de benceno, de tolueno o bencina	+ -
5 mg de extracto etanólico	0,5 ml. De n-hexano	-

( - ) Insoluble, ( + - ) Escasamente soluble, ( + ) Poco soluble, ( + + ) Medianamente soluble, ( + + + ) Soluble, ( + + + + ) Muy soluble o bastante soluble.

**TABLA Nº 3 MARCHA FITOQUIMICA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE  
LA *Ephedra americana***

Reactivo	Resultado	Metabolito
Ninhidrina	-	Aminoácidos libres
Tricloruro férrico	+ + +	Compuestos fenólicos
Gelatina	+ + +	Taninos
Shinoda (Mg + HCl)	+ +	Flavonoides
Hidroxilamina (NH <sub>2</sub> OH.HCL)	+ +	Oximas
Nitrato de cerio amoniacal (NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> Ce(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	+ +	Alcoholes
Molish (naftol + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> c.)	+ + +	Glucósidos
Vainillina sulfúrica	+ + +	Glucósidos
Benedict	+ + +	Glucósidos
Antrona	+ + +	Glucósidos
Tollen's	+ + +	Azúcares reductores
Feheling	+ + +	Azúcares reductores
Mayer	+ +	Alcaloides
Dragendorff	+ + +	Alcaloides
Indice afrosimétrico. espuma (1 g de MP + 10 ml. de H <sub>2</sub> O destilada)	+ -	Esteroides (saponinas)

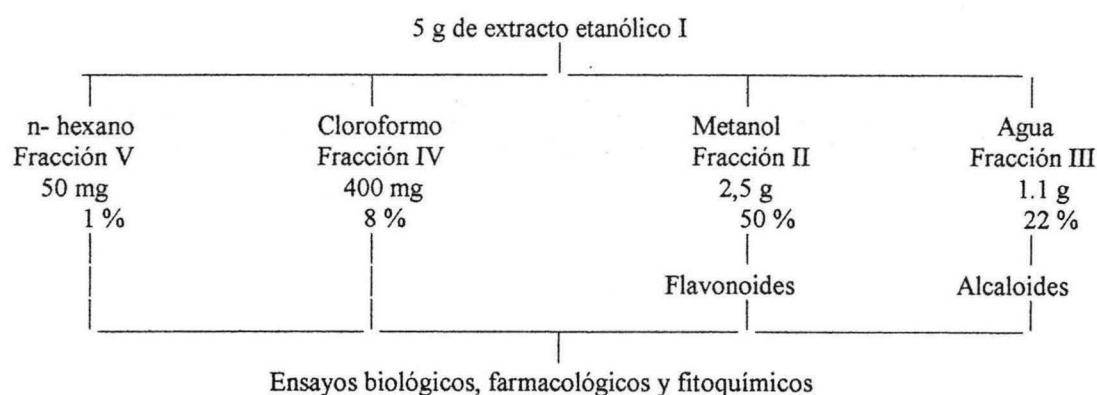
( + + + ) Abundante, ( + + ) Bastante, ( + ) Regular, ( + - ) Poco, ( - ) Nada.

**TABLA N° 4 CROMATOGRAMA DE LOS COMPONENTES DE *Ephedra americana***  
(Foto N° 4, 5)

Comp. N°	Rf.	Visible	Luz UV <sub>366</sub>	Fe Cl <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +Visible	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + Luz UV <sub>366</sub>	Reactivo Dragendorff	λ UV	Metabolito
1	0.26	Marrón claro	Fluorescencia celeste	Marrón gris	Marrón verdoso	Fluorescencia celeste brillante	—	280,326	Glicósido flavanona
2	0.39	Marrón claro	Púrpura	Gris	Marrón verdoso	Púrpura	—	284,298 (h), 344	Flavona
3	0.57	Marrón rojizo	Fluorescencia rojiza	Azulado	Verdoso	Marrón rojizo	—	276,364	Flavonol
4	0.65	Marrón claro	Fluorescencia púrpura rojiza	Azulado	Verdoso	Marrón rojizo	—	252 (h), 268,314	Flavona
5	0.78	Marrón oscuro	Púrpura	Gris	Verdoso	Púrpura	—	276,314	Flavanona
6	0.87	Marrón oscuro	Florescencia rojo	Marrón azulado	Marrón verdoso	Rojo intenso	—	—	Clorofila
7	0.04	Marrón	Púrpura	Marrón	Marrón	Púrpura	Rojo ladrillo	—	Alcaloides
8	0.13	Marrón	Púrpura	Marrón	Marrón	Púrpura	Rojo ladrillo	—	Alcaloides

**TABLA N° 5 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA RAPIDA DEL EXTRACTO I**

Subextractos	Peso del beaker	Peso del beaker + muestra	Peso del extracto y porcentajes
Metanólico II	106 g	108,5 g	2,5 g 50%
Clorofórmico IV	109,8 g	110,2 g	0,4 g 8%
n-hexano V	53,9 g	53,95 g	0,05 g 1%
Acuoso III	104 g	105,1 g	1,1 g 22%



Nota: El 19 % corresponde a lo que se quedó en la columna como grasas, pigmentos, impurezas, etc.

**Fig. N° 2. DIAGRAMA DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO ETANOLICO I OBTENIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN COLUMNA RAPIDA**

**TABLA N° 6 CROMATOGRAMA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS  
EXTRACTOS METANOLICO II Y ACUOSO III DE *Ephedra*  
*americana* (Fotos 6 y 7 )**

Comp. N°	Extracto Metanólico II			Extracto Acuoso III			
	Visible	Visible + caroteno	UV 254 + caroteno	Visible	Visible + caroteno	UV366 + caroteno	UV 254 + caroteno
1	Marrón claro	—	Oscuro	—	—	—	—
2	Marrón claro	—	Oscuro	—	—	—	—
3	Marrón	Naranja	Oscuro	—	—	—	—
4	Marrón	Naranja	Oscuro	—	—	—	—
5	Marrón	Naranja	Oscuro	—	—	—	—
6	Marrón	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	Marrón	—	—	Se decolora
8	—	—	—	Marrón claro	—	—	Se decolora



## 4.2.0. RESULTADOS BIOLÓGICOS

### 4.2.1 RESULTADO DEL ENSAYO INMUNOESTIMULANTE

**TABLA N° 7 EXTRACTO 1 SOBRE LA CAPTACIÓN DE LA TINTA CHINA  
(VALORES MEDIOS VM ± DESVIACIÓN STANDARD DE)**

Tratamiento	Primera hora (15'')	Segunda hora (15'')	Tercera hora (15'')
Control	0.05835 ± 0.006893	0.04249 ± 0.001754	0.02770 ± 0.001316
Efedra 12.5 mg/kg	0.04492 ± 0.005250	0.03840 ± 0.003402	0.01507 ± 0.001243
Efedra 50 mg/kg	0.04563 ± 0.005379	0.04345 ± 0.002548	0.02093 ± 0.002201
Efedra 100 mg/kg	0.06010 ± 0.004815	0.03084 ± 0.003402	0.01263 ± 0.001092
Isoprinosine 300 mg/kg	0.05339 ± 0.006300	0.04345 ± 0.002548	0.01231 ± 0.001069
Prednisona 100 mg/kg	0.05481 ± 0.004485	0.04345 ± 0.002548	0.02636 ± 0.003587
<b>P</b>	<b>0.0284</b>	<b>0.001</b>	<b>0.0001</b>

$$\% \text{ ARSI} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

**C = CONTROL**

**T = TRATAMIENTO**

**% ARSI = ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE**

**TABLA N° 8 PORCENTAJES DE ACTIVACION DE LA RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE EN RATAS**

Tratamiento (mg/kg)	Primera	%	Segunda	%	Tercera	%
Control	0.05835	0	0.04249	0	0.0277	0
Efedra 12.5	0.04492	23.0162811	0.0384	9.6257943	0.01507	45.5956679
Efedra 50	0.04563	21.7994859	0.04345	2.25935514	0.02093	24.4404332
<b>Efedra 100</b>	0.0601	2.9991431	0.03084	27.4182161	<b>0.01263</b>	<b>54.4043321</b>
<b>Isoprinosine 300</b>	0.05339	8.50042845	0.04345	2.25935514	<b>0.01231</b>	<b>55.5595668</b>
Prednisona 100	0.05481	6.06683805	0.04345	2.25935514	0.02636	4.83754513

Nota.- Se observa una mejor activación de la respuesta del sistema inmune para captar la tinta china, al administrar el isoprinosine y el extracto 1 a dosis de 100 mg/kg de la *Ephedra americana*.

**TABLA N° 9 ACCIÓN SOBRE ELEMENTOS BLANCOS DE LA SANGRE DE RATAS**

Tratamiento	Linfocitos	Segmentados
Control	56.3 ± 3.7	38.0 ± 4.1
Prednisona 100 mg/kg	33.0 ± 4.5	50.0 ± 7.2
<b>Isoprinosine 300 mg/kg</b>	<b>59.5 ± 3.3</b>	45.9 ± 8.5
Efedra 12.5 mg/kg	45.8 ± 4.3	48.8 ± 5.1
Efedra 50 mg/kg	40.3 ± 4.4	38.9 ± 0.9
<b>Efedra 100 mg/kg</b>	<b>57.5 ± 5.8</b>	39.3 ± 6.7
<b>P</b>	<b>0.001</b>	<b>0.570</b>

#### 4.2.2. RESULTADO DEL ENSAYO DE ARTEMIA SALINA

El valor de la CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CL50 obtenido para el extracto total I de la *Ephedra americana* fue de 2.9166 ug/ml.

#### 4.2.3 RESULTADO DE LA ACTIVIDAD ANTIULCEROSA

**Tabla N° 10 Valores medios de actividad antiulcerosa de extractos frente a lesiones gástricas inducidas por indometacina en ratones.**

TTO	DOSIS mg/kg	N° lesión gástrica	Eficiencia Antiul. %
Control	-----	58 + 2,5	0
I	10	53 + 3,1	8,6
I	100	40 + 1,6	31
I	200	32 + 3,6	44,8
II	10	46 + 4,1	20,7
II	100	40 + 5,1	31
II	200	48 + 5,5	17,2

#### 4.2.4 RESULTADO DE LA EVALUACION DE LA MOTILIDAD INTESTINAL

**Tabla N° 11 Valores medios del avance del carbón activado en ratones**

TTO	DOSIS mg/kg	Avance intest. Cm	Dism. De Motilid.%
Control	-----	58,7 + 5,5	100
I	10	36,4 + 3,1	37,9
I	100	35,2 + 2,6	40,03
I	200	40,3 + 4,6	31,3
II	10	55,3 + 3,1	5,8
II	100	57,3 + 6,1	2,4
II	200	50,4 + 3,5	14,1

#### 4.2.5. RESULTADO DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

**Tabla N° 12 Valores medios de actividad antiinflamatoria de extractos frente a inflamación inducida por carragenina en ratones.**

TTO	Dosis mg/kg	Edema	En	Mm	VM + DE		Eficiencia
		Basal N	Bas. Infla	1 hora	2 horas	3 horas	antiinf. %
Control	---	0,237 + 0,012	0,411 + 0,009	0,410 + 0,015	0,400 + 0,010	0,400 + 0,013	0
I	200	0,231 + 0,008	0,394 + 0,017	0,371 + 0,011	0,347 + 0,010	0,287 + 0,014	28,25
II	200	0,236 + 0,015	0,409 + 0,013	0,389 + 0,017	0,367 + 0,015	0,333 + 0,009	16,75

#### 4.2.6. RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE TOXICIDAD

##### 4.2.6.1 ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA, DL50:

La DL<sub>50</sub> para el extracto etanólico I, de la *Ephedra americana*, estaría sobre los 5360 mg/kg administrados a los ratones, dada la dificultad para concentrar más la solución con el producto; no obstante ello, se pudo observar, que los animales de experimentación no murieron a ese nivel de dosis utilizado, se calificaría al extracto I como una sustancia prácticamente no tóxica, según Williams.

##### 4.2.6.2 ENSAYO DE TOXICIDAD SUBCRONICA:

A la dosis de 50 mg/kg del extracto etanólico total I en ratas por vía peroral, luego de tres meses de tratamiento, los resultados de los exámenes de laboratorio clínico de muestras de sangre fueron: función renal no se vió alterada al evaluarse los valores séricos de urea y creatinina; en los valores de colesterol y lípidos totales se aprecia una tendencia a la disminución.

#### 4.2.7. RESULTADO DE LOS ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

**Tabla N° 13 Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Ephedra americana***

CEPA	REFERENCIA	mm. DE INHIBICION
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11313	8
<i>Salmonella cholerae suis</i> <i>Serotipo typhimurium</i>	ATCC 14028	11
<i>Streptococcus faecalis</i>	ATCC 19433	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	11
<i>Salmonella cholerae suis</i> <i>serotipo enteritides</i>	ATCC 13076	9
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	14
<i>Staphylococcus</i>	ATCC 12228	8

## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El extracto etanólico I o extracto total obtenido de la parte aérea de la *Ephedra americana*, demostró buena solubilidad en solventes polares como los alcoholes etílico y metílico, y en solventes de mediana polaridad como el acetato de etilo y cloroformo, lo que indica que los componentes químicos son de mediana y alta polaridad.

Tabla N° 2

Según la marcha fitoquímica efectuada se detectó la presencia de alcaloides y un alto porcentaje de compuestos fenólicos, entre ellos flavonoides libres y glicosidados, además de taninos. Tabla N° 3

Mediante ensayos cromatográficos se confirmó en el extracto etanólico I la presencia de alcaloides y flavonoides, utilizando como adsorbente silicagel G-60 y como fase móvil BAW que es un sistema de solventes de alta polaridad, observándose los cromatogramas con luz UV 366 nm., luz UV 254 nm., revelándose con FeCl<sub>3</sub> al 5%, Acido Sulfúrico al 50%, Reactivo de Dragendorff, etc., Fotos N° 4, 5.

Con la finalidad de aislar los componentes químicos se realizó el fraccionamiento del extracto total I mediante cromatografía en columna rápida, eluyendo con cuatro solventes de polaridad creciente: n-hexano, cloroformo, metanol y agua destilada, obteniéndose los subextractos correspondientes. Tablas N° 4 y 5, Fig. N° 2.

Al controlar los subextractos mediante c.c.f. se observó que los compuestos fenólicos estaban principalmente en el extracto metanólico II, mientras que los alcaloides pasan al extracto acuoso III.

Una vez detectados los metabolitos secundarios en el extracto metanólico II, fueron aislados y purificados mediante cromatografía en capa fina a escala preparativa, observados con luz UV 366 nm. y recuperados de la silicagel con mezclas de cloroformo metanol, logrando aislarse 8 fracciones de las cuales 5 fueron purificadas y se elucidó su estructura mediante correlaciones químicas con los datos obtenidos por espectroscopia UV-Visible en metanol, con reactivos de desplazamiento y por comparación con espectros UV dados en la literatura por Mabry y col. (28), sugiriéndose las estructuras de 5 flavonoides.

## ELUCIDACION DE ESTRUCTURAS

### Fracción I

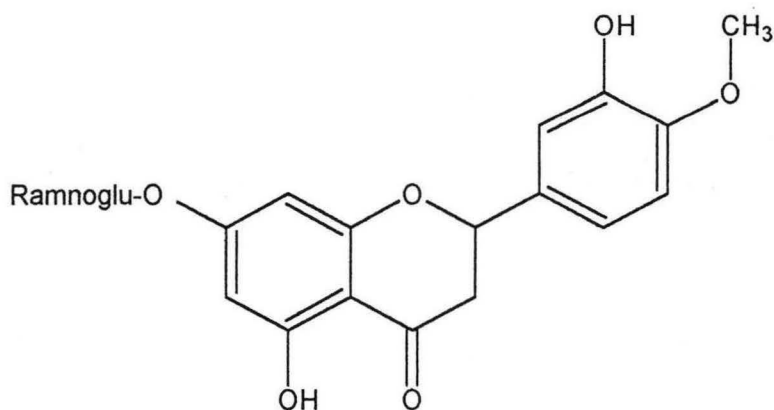
$\lambda$  MeOH = 280, 326 nm.

UV 366 = Fluorescencia celeste oscuro

UV 366 + H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> = Fluorescencia celeste brillante

Comparando con tablas (28) notamos que se trataba del:

5, 3' - dihidroxi - 4' - metoxi-7-O-ramnoglicosil flavonona (hesperidina)

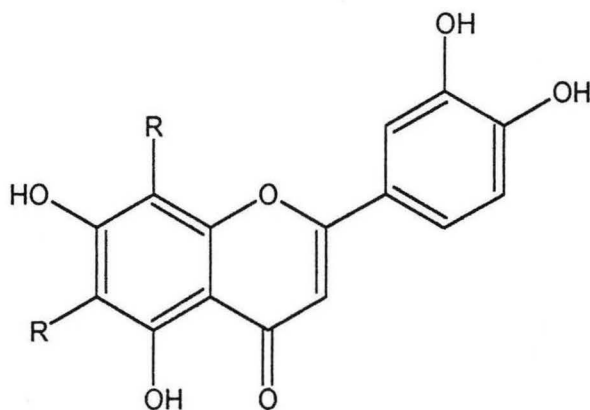


HESPERIDINA (flavonona)

### Fracción II

$\lambda$  MeOH = 284, 298 (h), 344 nm

Se procedió a realizar una interpolación entre los valores de longitudes de onda hallados y los dados en tablas (28), sugiriendo la siguiente estructura:

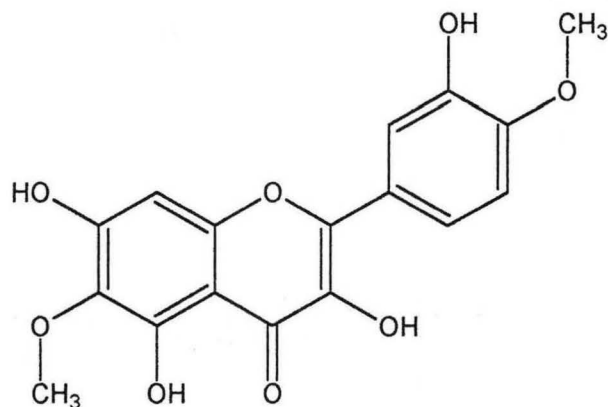


5,7,3',4'- tetrahidroxi - 6, 8 - di R flavona

### Fracción III

$\lambda$  MeOH = 276, 364 nm

Por interpolación entre los valores de longitudes de onda determinados experimentalmente y los reportados en tablas (28), se propuso la siguiente estructura:



5,7,3'trihidroxi - 6,4'- dimetoxi flavonol

### Fracción IV

Se determinó los valores de longitud de onda en metanol y se realizó reacciones de desplazamiento con los siguientes reactivos:

MeOH = 252 (h), 268, 314 nm

NaOMe = 264 (h), 274, 360

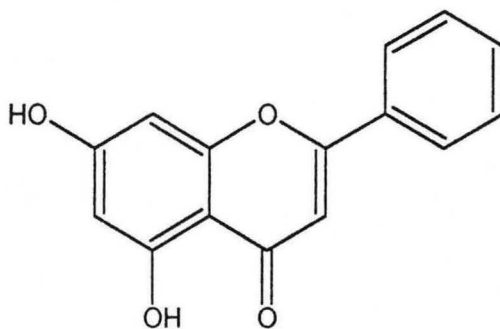
AlCl<sub>3</sub> = 250 (h), 276, 328, 384

AlCl<sub>3</sub> + HCl = 250 (h), 278, 324, 384

NaOAc = 274, 360

NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> = 272, 316

Comparando con tablas (28) y analizando las reacciones de desplazamiento concluimos de que se trataba de la crisina:

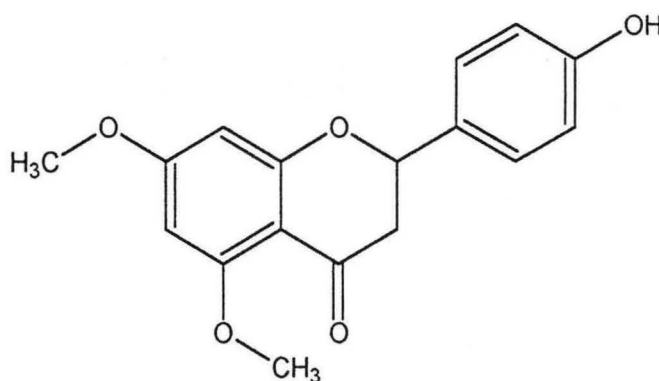


5, 7 - dihidroxi flavona

## Fracción V

MeOH	=	276, 314 nm
UV	=	Púrpura
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	=	Púrpura

Mediante interpolación de los datos del espectro UV obtenidos y los reportados en tablas (28), se ha sugerido la siguiente estructura:



4'-hidroxi – 5, 7 - dimetoxi flavonona

En Referencia a la determinación de la actividad antioxidante, como se observa en la tabla N° 6 y fotos N° 6 y 7, los resultados pueden interpretarse de la siguiente manera:

El extracto metanólico que está constituido principalmente por los 5 flavonoides ya analizados y numerados del 1 al 5, al ser revelados con el extracto de beta caroteno y exponerse a la Luz UV 254 nm los lugares cuyo Rf corresponden a los flavonoides no se decoloran o mantienen su coloración lo que indica que tienen actividad captadora de radicales libres.(41)

En tanto que el extracto acuoso, que contiene principalmente compuestos tipo alcaloides numerados con el 7 y 8, al ser revelados con el extracto de beta caroteno y ser expuestos a la Luz UV 254 nm no se observa mancha alguna en estos lugares del cromatograma, lo que nos indica que los alcaloides no tendrían actividad antioxidante o actividad captadora de radicales libres.

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE

Se evaluó el extracto etanólico total I de la *Ephedra americana* sobre la respuesta del Sistema Inmune, mediante el método de Estimulación Reticulo Endotelial de Delaveau y col. 1980 (42) Tabla N° 1, utilizándose 48 ratas albinas con pesos promedios entre 250 y 300 g, administrándose por vía peroral durante cinco días, el extracto etanólico total I, a tres niveles de dosis: 12.5, 50 y 100 mg/kg, y los estándares farmacológicos de inhibición la prednisona 100 mg/kg, que es un corticosteroide análogo al cortisol; el cual disminuye significativamente la respuesta inmune, al reducir la presencia de los linfocitos T (Bentley et al. 1996) (43) y de estimulación el isoprinosine 300 mg/kg, conocido también como inosiplex, metisoprinol, inosine pronobex, el cual es un agente que activa la respuesta del sistema inmune (inmunomodulador) (Betts y col.1978) (44); incrementa los linfocitos favoreciendo su respuesta inmune (Grieco y col.1984) (45). En Tablas N° 7,8 y Fig. N° 5,6 observamos que el extracto I en dosis de 100 mg/kg aumenta la respuesta inmune, en forma similar como lo hace el isoprinosine que es una sustancia que activa la inmunidad celular, como lo muestran las investigaciones de Betts y col.1978, y las de Grieco y col.1984; la inmunoestimulación ha sido corroborada al evidenciarse mayor captación de tinta china usada como sustancia cromófora de contraste y determinado mediante espectroscopía UV-Visible a una longitud de onda de 650 nm con filtro rojo en muestras de sangre de ratas previamente hemolizadas. Se extrajeron muestras de sangre venosa a 1,2 y 3 horas; se hicieron frotis tiñéndose con el colorante Giemsa y contándose las células.

También se observó que la prednisona redujo la respuesta inmune, al disminuir el número de linfocitos circulantes, en concordancia con los hallazgos de Bentley y col. 1996. La Tabla N° 7 muestra la captación de la tinta china expresada en valores medios con una desviación estándar correspondiente; con una probabilidad < 0,05 es decir una alta significación estadística. La Tabla N°8 muestra los resultados en porcentajes de la activación de la respuesta del sistema inmune en ratas, cuyos valores han sido obtenidos utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ARSI} = \frac{C-T}{C} \times 100 \quad \text{donde:} \quad \begin{array}{l} C = \text{CONTROL} \\ T = \text{TRATAMIENTO} \end{array}$$

**% ARSI = % ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE**

Se observó una mayor activación de la respuesta del sistema inmune para captar la tinta china, al administrar el isoprinosine ( 55.6%), seguido del extracto etanólico



total I de la *Ephedra americana* a dosis de 100 mg/kg y 12.5 mg/kg (55.4 y 45.6% respectivamente), observándose que el resultado dado por el extracto I es independiente de la dosis.

Mediante coloración Giemsa, se realizó la comprobación de los elementos blancos de la sangre de ratas, los resultados se muestran en la tabla N° 9, comparando la cantidad de linfocitos en el grupo control se observó un aumento de los mismos por acción del Isoprinosine, similar efecto es obtenido con dosis de 100 mg/kg del extracto etanólico total I de *Ephedra americana*, resultados que concuerdan con los obtenidos y anotados en las Tablas 7,8 y en los gráficos de figuras N°5,6 en anexos (8,43-45), y siendo los flavonoides metabolitos mayoritarios en concentración presentes en el extracto I, podrían ser los responsables de la actividad observada sobre el sistema inmune en ratas, por activación de los anticuerpos tipo IgE, además de los resultados publicados en la literatura.

La presente investigación al evidenciar un aumento de la respuesta inmune en ratas, indicaría que los productos naturales presentes en la *Ephedra americana*, podrían ser utilizados en pacientes con cuadros de disminución de la actividad del sistema inmunitario, previa evaluación clínica.

Mediante el **ensayo de biotoxicidad** general en las larvas del camarón de mar (46), se determinó un valor de Concentración Letal Media CL50 de 2.9166 ug/mL para el extracto etanólico total I, demostrando que es un extracto biológicamente activo, o sea que contiene sustancias de alta actividad biológica ya que se considera biológicamente activo si el CL50 es inferior a 1000 ug/mL. (Mc Laughlin y col. 1991) (47)

Al determinar la **actividad antiulcerosa** comparativa del extracto etanólico total I que contiene compuestos fenólicos y alcaloides y el subextracto metanólico II constituido principalmente por compuestos fenólicos, frente a lesiones gástricas inducidas por indometacina en ratones, como se observa en la tabla N° 10 el extracto total a dosis de 200 mg/kg demostró mayor eficiencia antiulcerosa de 44.8%, siendo dosis dependiente, esta actividad antiulcerosa evidenciada se explicaría por la alta cantidad de flavonoides presentes que estimularían la producción de prostaglandinas E<sub>2</sub> que concuerda con lo hallado por Beil W. y col. 1995 y por Reyes y col. en 1996. (48,49)

Al realizar la **evaluación de la motilidad intestinal** comparativa entre el extracto etanólico total I y el subextracto metanólico II, frente al avance de carbón activado en ratones, como se observa en la tabla N°11, el extracto II evidenció disminución de la motilidad intestinal a una dosis de 100 mg/kg, con un porcentaje de disminución de motilidad de 2.4%, no siendo dosis dependiente. La disminución de la actividad del músculo liso intestinal, sería debido a que los flavonoides inducen una disminución del ingreso de los iones calcio al interior de la célula.(Duarte y col. 1993) (50).

Al determinar la **actividad antiinflamatoria** del extracto etanólico total I y del subextracto metanólico II, los que fueron administrados por la vía peroral a ratones con edema subplantar inducido por carragenina, como se observa en la Tabla N°12, el extracto etanólico total I brindó, mayor eficiencia antiinflamatoria a una dosis de 200 mg/kg, con un valor de 28.25%. La actividad antiinflamatoria evidenciada se explicaría por la presencia de los flavonoides quienes además tienen una acción antioxidante, inhiben la enzima adenosina deaminasa (Koch y col. 1992) (51); y posiblemente también por inhibir la secreción de prostaglandinas (Kakbrender y col. 1992) (52).

Al evaluar la **toxicidad** del extracto total I, se encontró una DL50 sobre los 5360 mg/kg en ratones, por lo que se calificaría como una sustancia prácticamente no tóxica según Williams y col.1985 (53). Al realizar el ensayo de toxicidad subcrónica con dosis efectiva media del extracto etanólico total I, luego del estudio anatomohistológico, al evaluarse los valores séricos de úrea y creatinina se dedujo que la función renal no es alterada, en relación a los niveles de colesterol y lípidos totales, se aprecia una tendencia a la disminución.

Luego de los **ensayos microbiológicos** efectuados con el extracto etanólico total I, podemos decir que presenta un pequeño halo de inhibición de 11 mm. frente a la *Salmonella cholerae suis* serotipo typhimurium, al igual que frente al *Staphylococcus aureus*, en tanto que se observa mayor inhibición al *Bacillus subtilis*, 14 mm.

Tabla N° 13.

## VI. CONCLUSIONES

1. Se determinó la estructura de flavonoides de *Ephedra americana*, tales como: Hesperidina; Crisina; 5,7,3',4'-tetrahidroxi-6,8-di-R flavona; 5,7,3'-trihidroxi-6,4'-dimetoxi flavonol y 4'-hidroxi-5, 7-dimetoxi flavonona.

2. Se determinó que la *Ephedra americana* posee un significativo efecto antiinflamatorio, buena actividad antiulcerosa y que actúa sobre la motilidad intestinal. Tiene un DL<sub>50</sub> alto, no es tóxica y es biológicamente activa.

El extracto etanólico total I de la *Ephedra americana*, constituido principalmente por flavonoides, administrado por vía peroral en ratas, ha mostrado efecto antioxidante y actividad inmunoestimulante similar al isoprinosine utilizado como estándar farmacológico.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NAKAJIMA H. Segunda Reunión de Directores de Centros Colaboradores de la OMS para la Medicina Tradicional. *Bol Of Sanit Panam* 1990; 108 (1): 77-79.
2. AQUINO R, DE FEO V, DE SIMONE F, DE TOMMASI N, PIZZA C. Flora Officinale Dell'America Latina. Salerno: Edit. Gutenberg Va Gen. Ciro Nastri-Lancusi (S.A.); 1996 p. 17-20, 48-59.
3. GUERRERO L, NUÑEZ MJ. Compuestos Polares en Plantas Usadas en la Medicina Popular. *Industria Farmacéutica* 1991; VI (4): 53-58.
4. SAMPIETRO R A, ISLA I M, QUIROGA N E, VATTUONE A. M. Importancia del Estudio Fitoquímico en la Formación del Profesional Farmacéutico. *Acta Farm Bonaerense* 1997; 16 (4): 245-249.
5. BRUNETON J. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. INTERCEPT : Ltd. England UK; 1995
6. DE ROBERTIS E, DE ROBERTIS M F, HIB J, PONZIO R. Biología Celular y Molecular. 12ª. Edición, 2ª. Reimpresión Buenos Aires: Edit. EL ATENEO ; 1997 p. 438-441.
7. GUYTON A, HALL J. Tratado de Fisiología Médica. 9ª Edición México D.F. : Edit. Interamericana-Mc Graw – Hill; 1997 p. 487- 498.
8. ABBAS A K, LICHTMAN A H, POBER J S. Inmunología Celular y Molecular. 2ª. Edición México D.F. : Edit. Interamericana; 1995.
9. WHO MONOGRAPHS ON SELECTED MEDICINAL PLANTS. Herba Ephedrae. Geneva: World health Organization; 1999; 1: 145 – 153.
10. IRACHE JM, VEGA FA. Antioxidantes en Alimentos, Medicamentos y Cosméticos. *Industria Farmacéutica* 1990; marzo-abril : 55-60.
11. IRACHE JM, VEGA FA. Antiox. Alimen. Medicamen. y Cosméticos II. Reac. Oxid. y Mec. de Acción. *Industria Farmacéutica* 1990; mayo-junio : 85-90.
12. PATHAK D, PATHAK K, SINGLA A K. Flavonoids as medicinal agents-Recent advances. *Fitoterapia* 1991; LXII ( 5 ) : 371-389.
13. CAFFERATA FR LAZARO. El Problema del Envejecimiento Humano. *Acta Farm Bonaerense* 1991; 10 (2) : 113-122.
14. DE FEO V. Medicinal and magical plants in the northern Peruvian Andes. *Fitoterapia* 1992; LXIII ( 5 ) : 417 – 440.
15. MILLER L ALAN. Antioxidant Flavonoids: Structure, Function and Clinical Usage. *Alt Med Rev* 1996; 1 (2 ) : 103-111.
16. BANDEIRA MOREIRA A, MANCINI FILHO J. Caracterizacão de Compostos Fenólicos com Actividade Antioxidante em Semente de Mostarda (*Brassica alba* L.). *Rev Farm Bioquim Univ S. Paulo* 1997; 33 Supl 2 : 4 (P15).
17. KNEKT P, JARVINEN R, SEPPANEN R, HELLOVAARA M, TEPPONEN L, PUKKALA E et al. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol* 1997 Aug 1; 146 (3) : 223-230.
18. DA SILVA DIAS D, DO NASCIMENTO JM. Pharmacol. Actions of Proanthocyanidins. *Rev Portuguesa de Farmacia* 1998; XLVIII(1)jan-feb-mar:9-12.
19. BRUNET J, FARINE JC, GARAY RP, HANNAERT P. In vitro antioxidant properties of calcium dobesilate. *Fundam Clin Pharmacol* 1998; 12 : 205-212.
20. HEGNAUER R. CHEMOTAXONOMIE DER PFLANZEN Band 7 Basel-Boston-Stuttgart: Birkhauser Verlag; 1986 p.546.

21. JAN LUNDSTROM, ARNOLD BROSSI editores. THE ALKALOIDS B-Phenethylamines and Ephedrine of Plant Origin, Chemistry and Pharmacology. Vol. 35 NY. : Academic Press Inc. ; 1989 p. 77.
22. MANDRILE L ELOY, BONGIORNO de PFIRTER GRACIELA . Alcaloides de las Ephedras. *Rev Farm* 1994; 136 (1) : 27-36.
23. TSITSA TZARDI E, LOUKIS A, PHILIANOS S. Polyphenolic Compounds of *Ephedra campylopoda* . *Fitoterapia* 1987; LVIII ( 3 ): 200.
24. GURNI ALBERTO A, WAGNER MARCELO L. Progresos Realizados en Estudios Fitoquímicos de Especies Argentinas del Género *Ephedra* (Ephedraceae). *Acta Farm Bonaerense* 1988; 7 (1): 19-23.
25. CHAVEZ R A S. Estudio Farmacéutico de la *Ephedra andina*, pinco-pinco. *Bol Soc Quím Perú* 1937; 3 (4): 198-210.
26. BONILLA RIVERA PABLO E, ARROYO ACEVEDO JORGE, et al. Investigación fitoquímica, farmacológica y de toxicidad DL50 de *Ephedra americana* pinco-pinco. *Ciencia e Investigación* 1999; 2 ( 1 ) : 27 – 43.
27. GEISMAN TA, CROUT DHG. Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism. Freeman. Cooper & Co ; 1969.
28. MABRY TJ, MARKHAM KR, THOMAS MB. The Sistematic Identification of Flavonoids. Berlín: Springer – Verlag ; 1970.
29. DOMINGUEZ XORGE A. Métodos de Investigación Fitoquímica. Mexico D. F.: Edit. LIMUSA S.A. ; 1985 p. 81-83.
30. LOCK DE UGAZ OLGA. Investigación Fitoquímica, Métodos en el Estudio de Productos Naturales. 1ª Edición Lima : PUCP Fondo Editorial ; 1988 p. 97-112. 2ª Edición Lima : PUCP Fondo Editorial ; 1994.
31. BLUNT JW, CALDER V L. Rev. Phase Flash Chromatography: A method for the rapid partit.of Nat. Prod. Extracts. *J Nat Prod* 1987 mar-apr ; 50 (2) : 290-92.
32. SEABRA ROSA M, CORREIA ALVES E A. Flavonoides de *Hypericum undulatum*. *Rev Portuguesa de Farmacia* 1990; XL (3 - 4): 26-28.
33. GOBBATO S, GRIFFINI A, LOLLA E, PETERLONGO F. HPLC quantitative analysis of biflavones in *Ginkgo biloba* leaf extracts and their identification by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *Fitoterapia* 1996; LXVII (2): 152-158.
34. DE LAURENTIS N, STEFANIZZI L, MILILLO M A, TANTILLO G. Flavonoids from leaves of *Olea europaea* L. cultivars. *Ann Pharmaceutiques Francaises* 1998; 56 (6): 268-273.
35. CHAMBERLAIN JOSEPH. Natural Products Research at the British Pharmaceutical Conference. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51: 491- 92.
36. CURTIUS-PRIOR PETER, VERE DUNCAN, FRAY PAUL Therapeutic Value of *Ginkgo biloba* in Reducing Symptoms of Decline in Mental Function. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51: 535-41.
37. HO K Y, HUANG J S, TSAI C C, LIN T C, HSU Y F, LIN C C. Antioxidant Activity of Tannin Components from *Vaccinium vitis-idaea* L. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51: 1075-1078.
38. HIBATALLAH JALILA, CARDUNER CHARLOTTE, POELMAN MARIE-CHRISTINE. In vivo and in vitro Assessment of the Free-radical-scavenger Activity of *Ginkgo Flavone Glycosides* at High Concentration. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51 : 1435-1440.
39. SLOLEY B D, URICHUK L J, MORLEY P, DURKIN J, SHAN J J, PANG PKT, COUTTS RT. Identification of Kaempferol as a Monoamine Oxidase Inhibitor and



- Potential Neuroprotectant in Extracts of *Ginkgo biloba* leaves. *J Pharm Pharmacol* 2000, 52: 451- 59.
40. YLVA NOREEN. Separation and Bioassay in Identification of Cyclooxygenase Inhibitors from Plants, with Emphasis on Flavonoids, *Acta Universitatis Upsaliensis* Uppsala, Suecia: 1997.
  41. JOYEUX M, LOBSTEIN A, ANTON R, MORTIER F. Comparative antilipoperoxidant and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. *Planta Med* 1995; 61: 126-129.
  42. GERSHWIN M, COOPER E. Animals models of comparative and development aspects of immunity and disease. New York : Pergamon Press ; 1988.
  43. BENTLEY A M, HAMID Q, ROBINSON D S. et al. Prednisolone treatment in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153 : 551-56.
  44. BETTS R F, DOUGLAS RG, GOERGE S D. Isoprinosine in experimental influenza A infection in volunteers. 78<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Las Vegas, Nevada 14-19 May 1978.
  45. GRIECO M H, REDY M M, MANVAR D. In vivo immunomodulation by isoprinosine in patients with the acquired immunodeficiency syndrome and related complexes. *Ann Intern Med* 1984; 101 : 206-207.
  46. MICHAEL A, THOMSON C, ABRAMOVITZ G. *Artemia salina* as a test organism for Bioassay. *Science* 1956; 123 : 464.
  47. McLAUGHLIN J L, CROWN GALL. Tumor on potato disc and Brine Shrimp lethality: two simple Bioassays for Higher plant screening and fractionation. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol 6 London: Edit. Academic Press. ; 1991.
  48. BEIL W, BIRKHLZ C, SEWING K F. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and H. pylori growth. *Arzneimittelforschung* 1995 Jun 45 (6) : 697-700.
  49. REYES M, MARTÍN C, ALARCÓN DE LA LASTRA-C, TRUJILLO J, TORO M V, AYUSO M J. Antiulcerogenicity of the flavonoid fraction from *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera. *Z- Naturforsch-C* 1996 Jul-Aug ; 51 (7-8): 563-69.
  50. DUARTE J, PEREZ V, UTRILIA P. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. *Yen Pharmacol* 1993 jul ; 24 (4): 857-862.
  51. KOCH H, JAGE R, GROH U, PLANCK. In vitro inhibition of adenosine deaminasa by flavonoid and related compounds. New insight into the mechanism of action of plant phenolics. *Methods find Exp Clin Pharmacol* 1992; 14 (6): 413-17.
  52. KAKBRENDER F, WUR G, VON BRUCHAUSEN F. In vitro inhibition and stimulation of purified prostaglandin endoperoxide synthase by flavonoids: structure activity relationship. *Pharmacology* 1992; 44 (1) : 1-12.
  53. WILLIAMS P, BURSON J. Industrial Toxicology Safety and Health Applications in the Work Place. New York : Edit. De Van Norstrand Rein Hold Company ; 1985 p. 45-49.
  54. Sitios Web: (Ephedra) SITE MAP: <http://www.OnHealthNetwork.com>  
(Ephedra) SITE MAP: <http://www.LooksMart.com> Herbal Information Center Home Page.  
(Ephedra) URL: <http://www.geocities.com/-earlecj/ep/ep/index.htm>
  55. COMITE INTERNACIONAL DE DIRECTORES DE REVISTAS MEDICAS Requisitos de uniformidad para manuscritos presentados a Revistas Biomédicas- Quinta Revisión. *Rev Esp Salud Pública* 1997; 71 (2): 89-102.

# ANEXOS

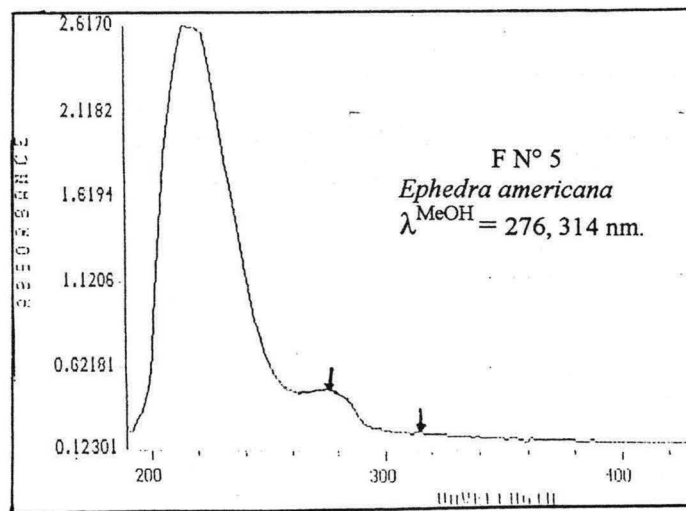
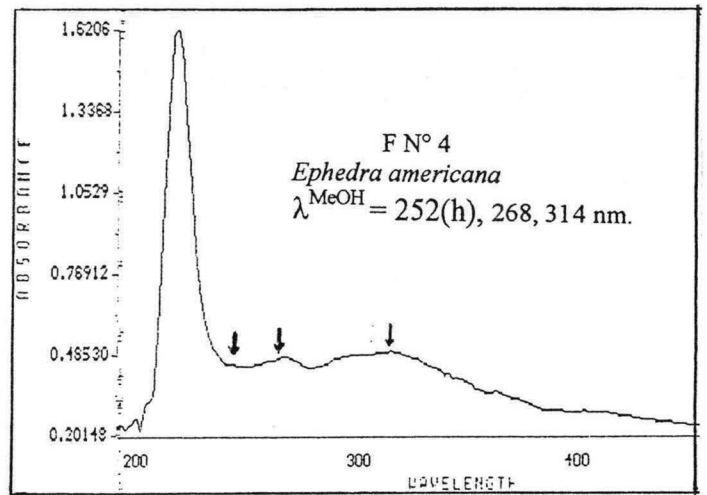
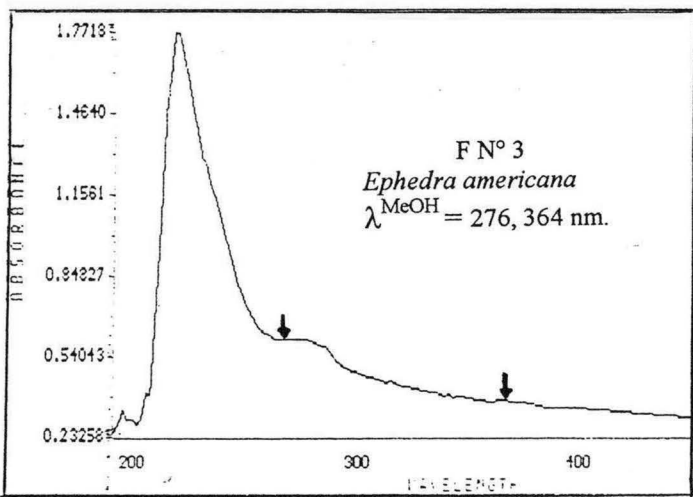
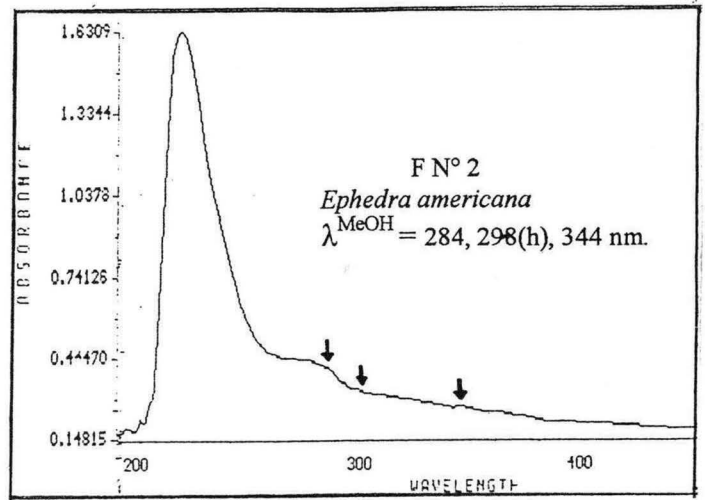
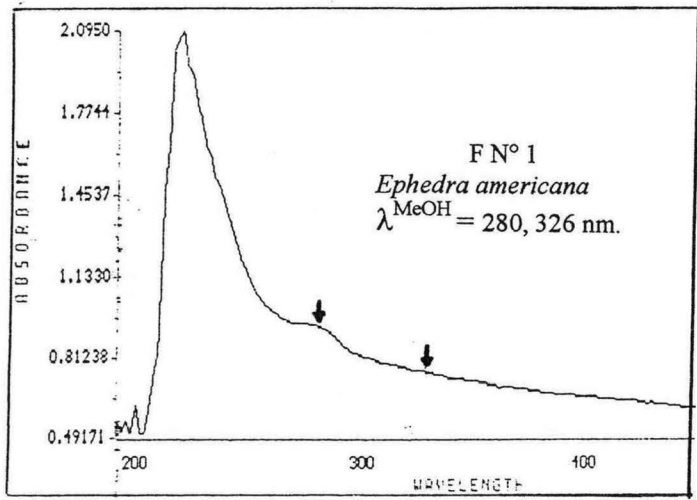


Fig. N° 3. ESPECTROS UV EN METANOL DE LAS 5 FRACCIONES AISLADAS DE LA *Ephedra americana*.



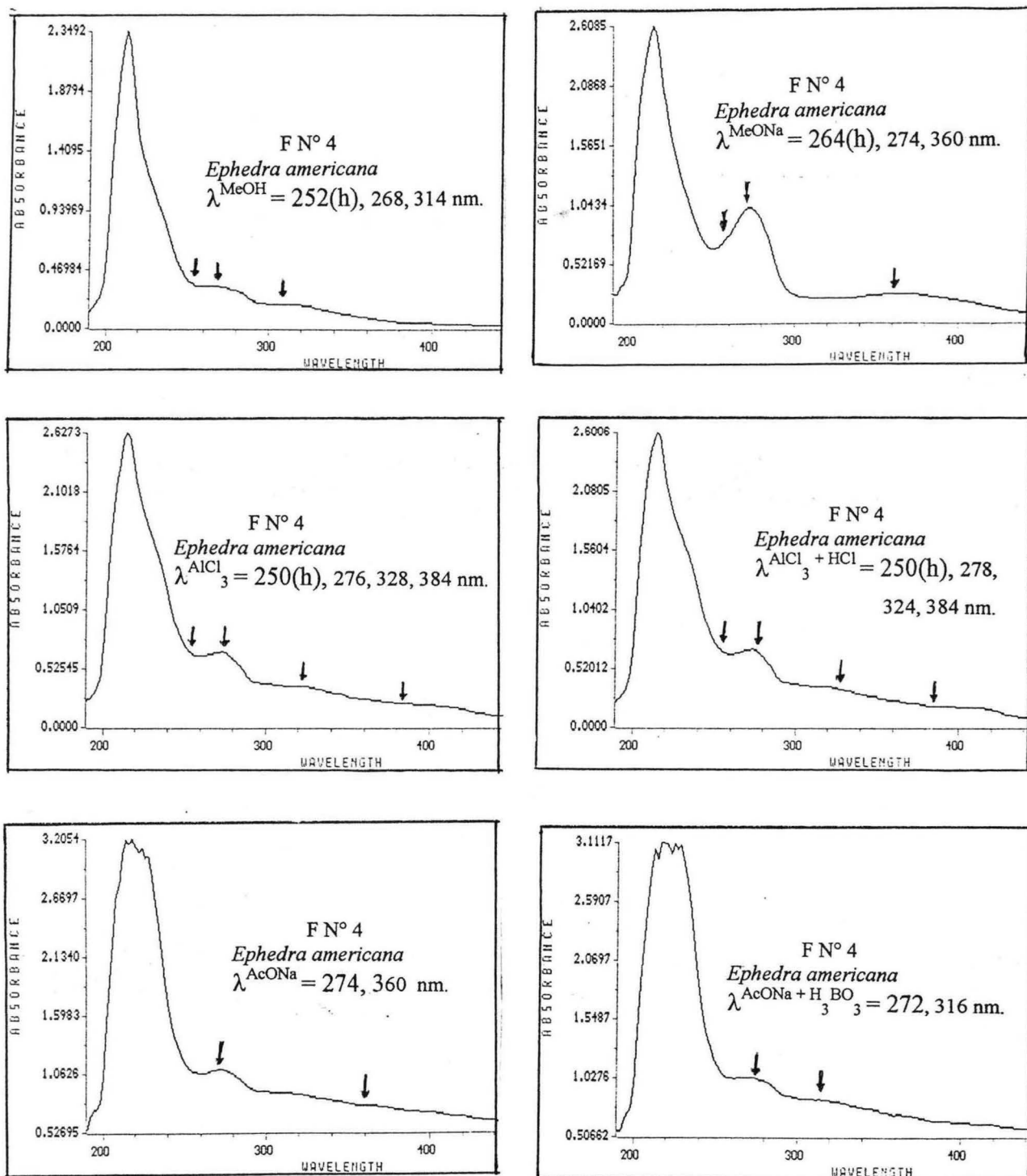
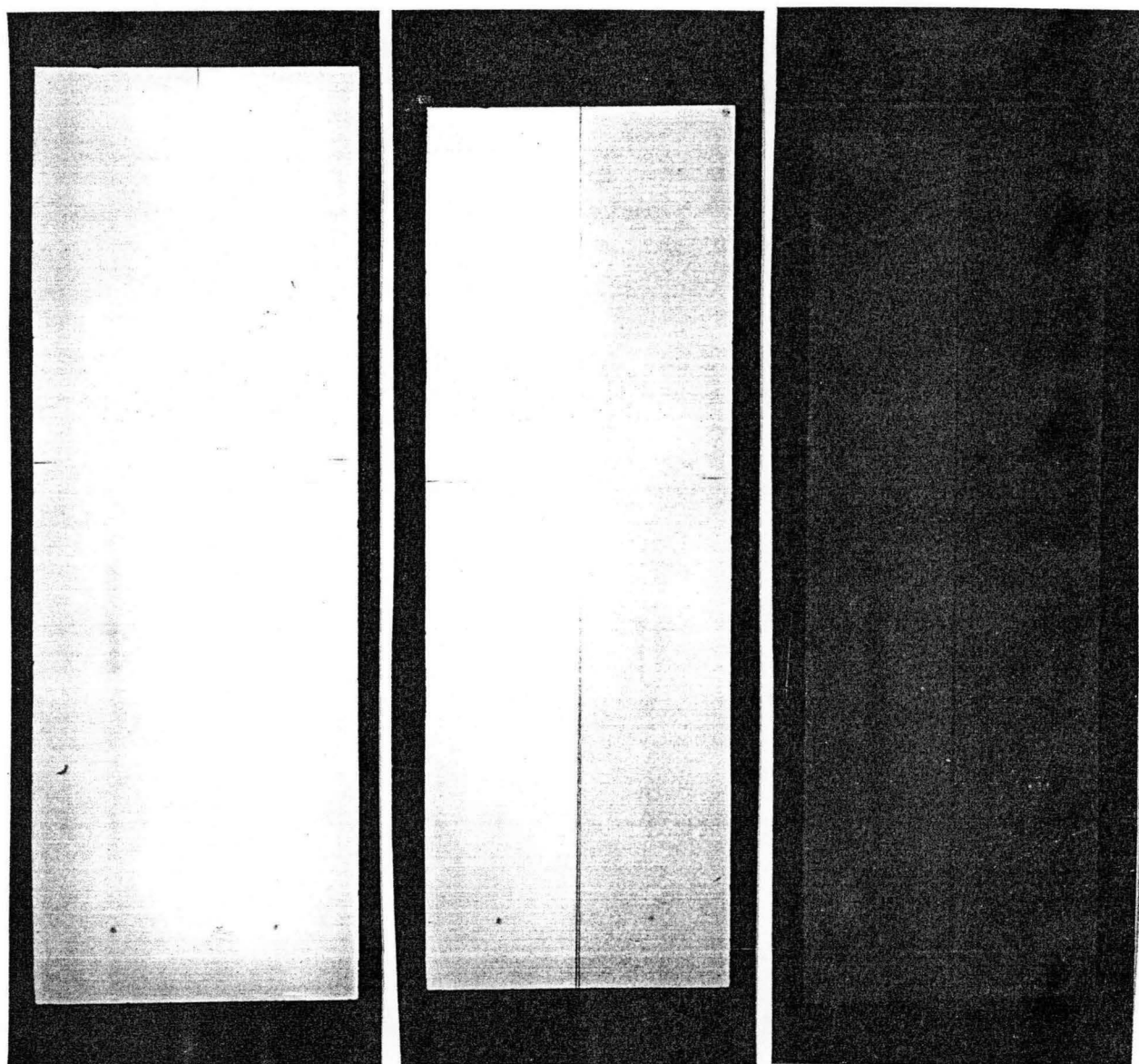


Fig. N° 4. ESPECTROS UV CON REACTIVOS DE DESPLAZAMIENTO DE LA FRACCIÓN N° 4 AISLADAS DE LA *Ephedra americana*.



1

2

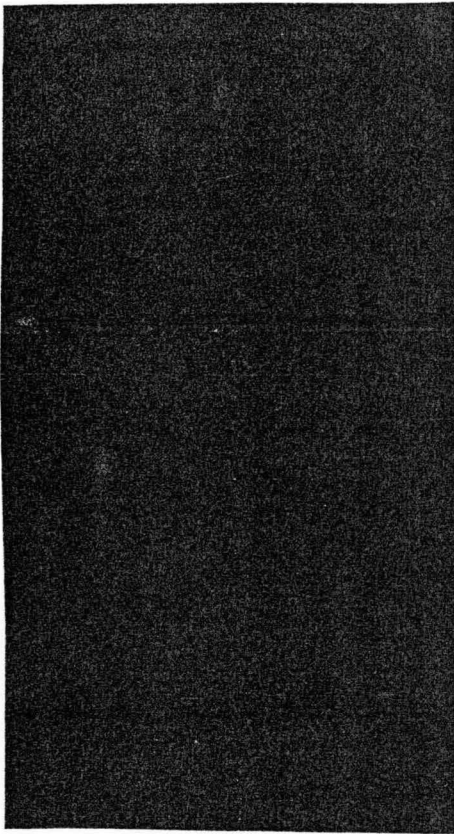
3

**Foto N° 6 : Determinación de la Actividad Antioxidante de la fracción metanólica II (Flavonoides)**

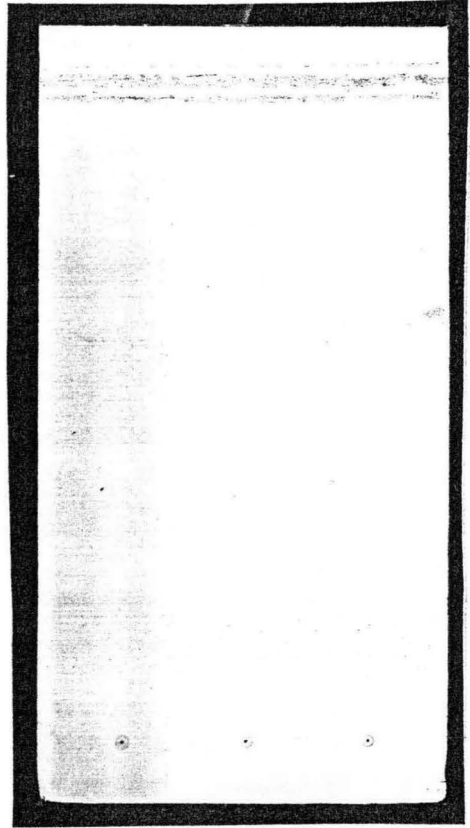
**C.C.F. : Silicagel G-60; BAW 4:1:5 ; Reveladores:**

**1) Visible 2) Beta caroteno en visible 3) Beta caroteno en UV 254 nm.**

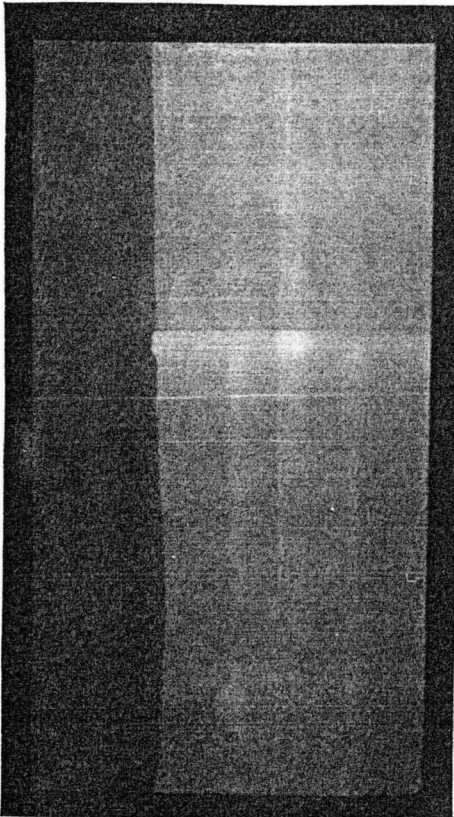
1



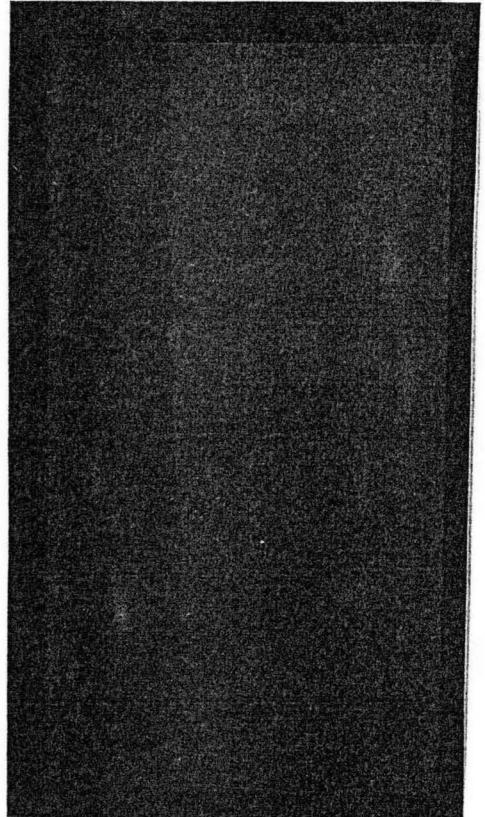
2



3



4



**Foto N° 7 : Determinación de la Actividad Antioxidante de la fracción acuosa III (Alcaloides)**

**C.C.F.: Silicagel G-60; BAW 4:1:5 ; Reveladores:**

**1) UV 366 nm. 2) Beta caroteno en visible 3) Beta caroteno en UV 366 nm.  
4) Beta caroteno en UV 254 nm.**

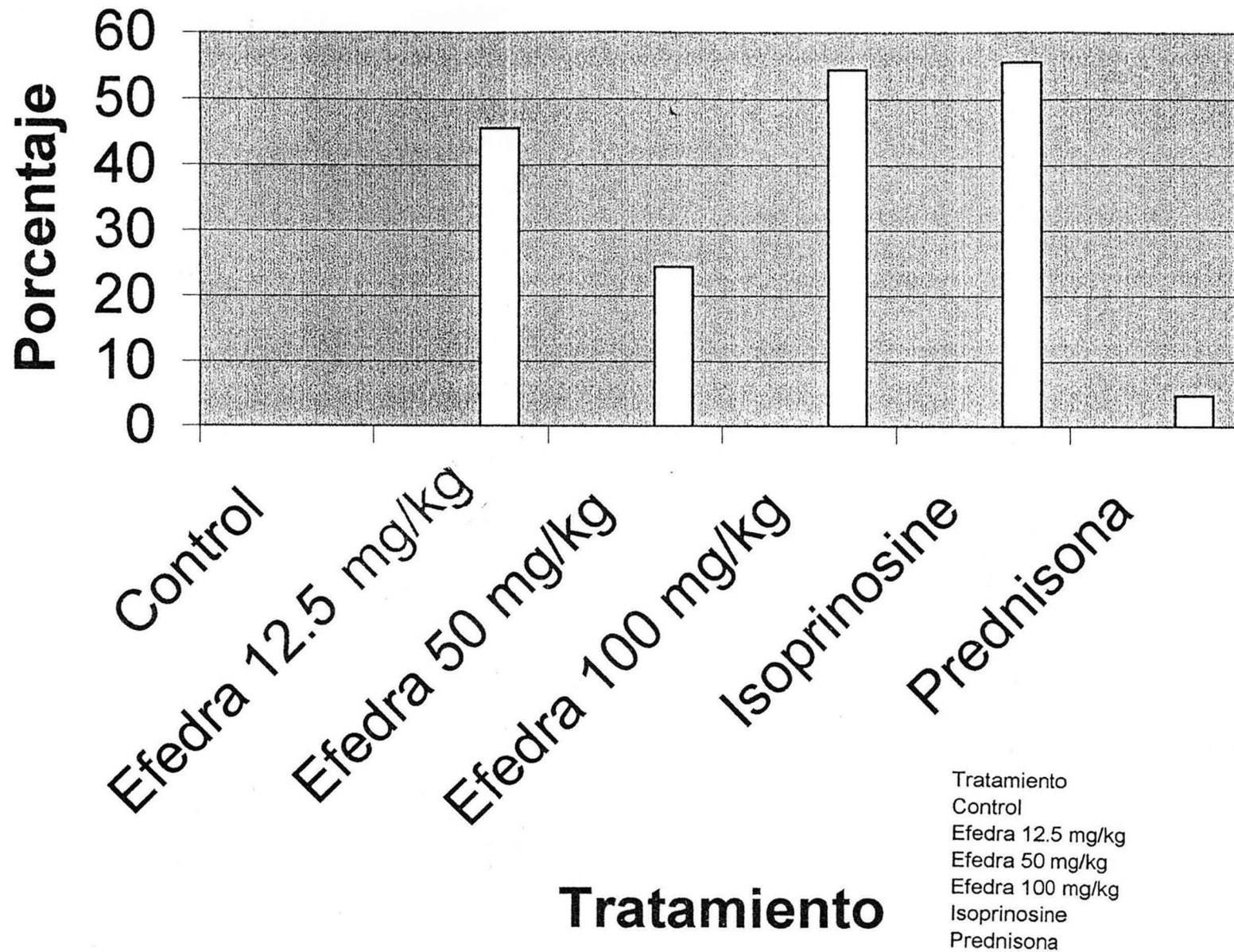


Fig. N° 5 ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE POR EXTRACTOS DE *Ephedra americana*.

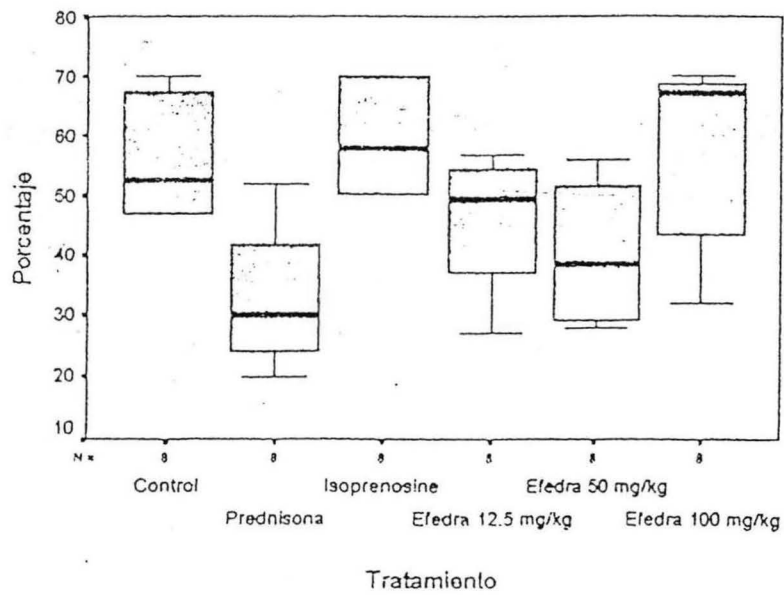


Fig N° 6 INFLUENCIA DE LOS EXTRACTOS DE *Ephedra americana* SOBRE LOS LINFOCITOS DE RATAS

Los linfocitos se incrementan a mayores dosis ( $p < 0.001$ ) como lo hacen con el isoprenosine, lo que explica un grado de actividad inmunoestimulante. (Abbas y Col 1995)

## Eficiencia antiulcerosa en ratones

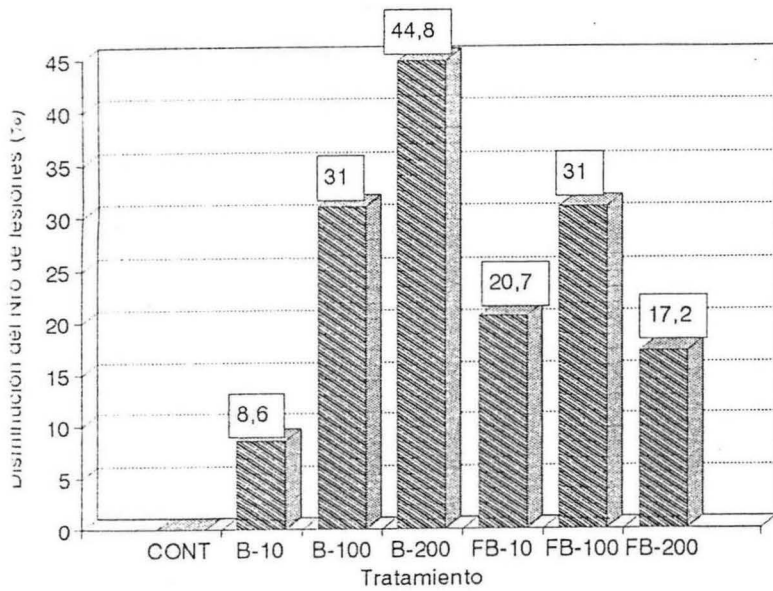


Fig. Nº 7 ACTIVIDAD ANTIULCEROSA POR EXTRACTOS DE *Ephedra americana*.  
CONT = CONTROL ; B = I ( Ext. EtOH ) ; FB = II ( Ext. MeOH )

## Motilidad intestinal en ratones

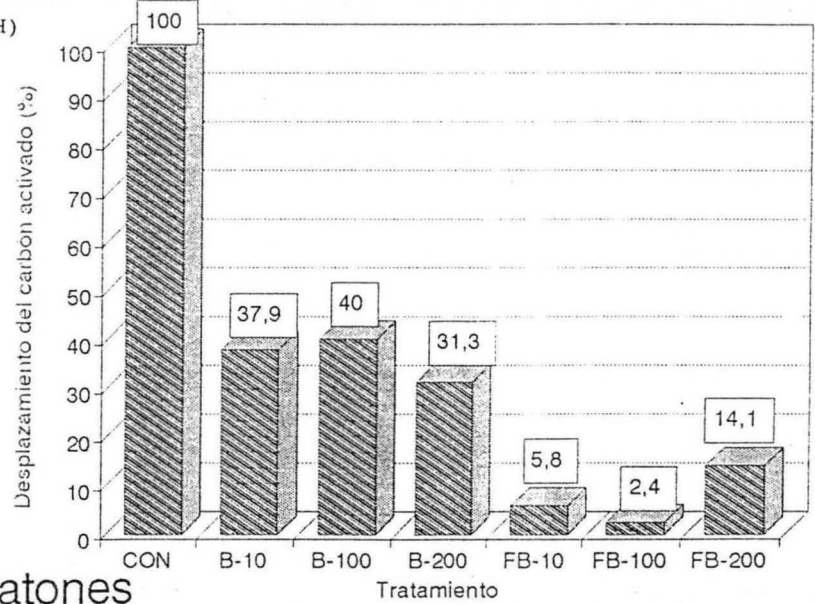


Fig. Nº 8 MOTILIDAD INTESTINAL POR EXTRACTOS DE *Ephedra americana*.  
CON = CONTROL ; B = I ( Ext. EtOH ) ; FB = II ( Ext. MeOH )

## Eficiencia antiinflamatoria en ratones

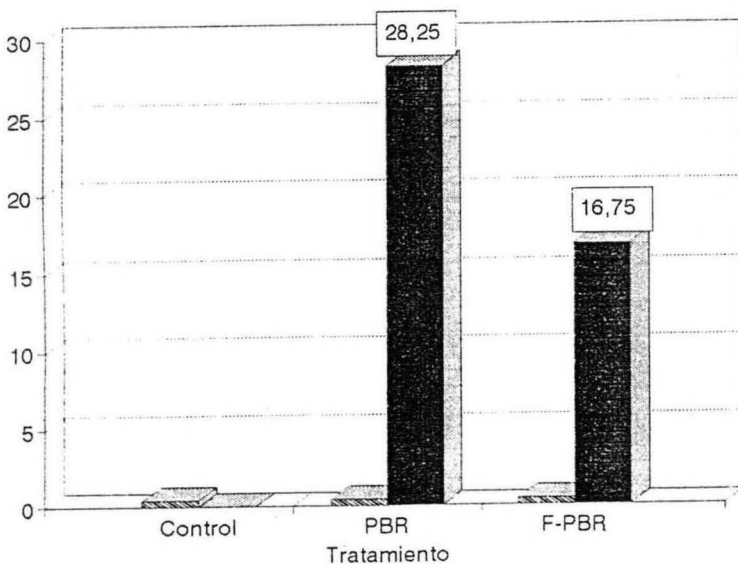


Fig. Nº 9 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA POR EXTRACTOS DE *Ephedra americana*.  
CONT = CONTROL ; PBR = I ( Ext. EtOH ) ; FPBR = II ( Ext. MeOH )