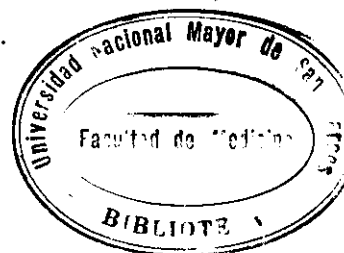


FLAVONOIDES DE *Ephedra americana* (pinco-pinco), ACCIÓN BIOLÓGICA SOBRE EL SISTEMA INMUNOLÓGICO (IgE)

Pablo Bonilla Rivera* Bertha Pareja Pareja**

* Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales. FFB, UNMSM. **
Profesor Emérito de la UNMSM.



RESUMEN

Se realizó el estudio fitoquímico y de la actividad biológica de la parte aérea de *Ephedra americana*, "pinco-pinco" planta que crece en zonas altoandinas del departamento del Cusco, en la provincia de Calca, Perú, aproximadamente a 3500 msnm. 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, confirmándose por cromatografía en capa fina. Se procedió a la separación de los compuestos fenólicos por cromatografía en columna rápida, obteniéndose varias fracciones. Estas fueron purificadas mediante cromatografía a escala preparativa utilizando diversos sistemas de solventes elucidándose estructuralmente cinco flavonoides de conocida actividad antioxidante, denominados: Hesperidina; Crisina; 3',4',5,7-tetrahidroxi-6,8-di-R flavona; 3',5,7'-trihidroxi-4',6-dimetoxi flavonol y 4'-hidroxi-5,7-dimetoxi flavonona. En el extracto etanólico se determinó actividad inmunoestimulante, efecto antioxidante, acción tóxica sobre *Artemia salina*, acción antiulcerosa, acción sobre la motilidad intestinal, actividad antiinflamatoria, su toxicidad y actividad antimicrobiana.

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

ABSTRACT

In the present investigation we have developed a phytochemical study and determined the biological activity of the aerial parts of a vegetal Peruvian species named *Ephedra americana* Known as “pinco-pinco”. It grows in the highlands of Cusco-Perú, in the province of Calca, approximately at 3500 m.o.s.l. The powder of the sample was used to for the phytochemical screening in wich we identified the presence of alkaloids, phenolic compounds, flavonoids types, tannins, glicosydes, etc. By means of a solubility screening test, it was determined that the secondary metabolites were moderately and highly polar. This was prued by means of Thin Layer Chromatograpy. Also, a separation of the phenolic compounds by Flash Column Chromatograpy has been performed, obtaining many fractions. These were purified by means of Preparative Scale Chromatograpy using various solvent systems and five flavonoids with accepted antioxidant activity were structurally elucidated: hesperidin; chrisyn; 3',4',5,7-tetrahidroxi-6,8-di R flavone; 3',5,7-trihidroxi-4',6-dimetoxi flavonol and 4'-hidroxi-5,7-dimetoxi flavanone. In the ethanolic extract it has been determinated the immunostimulant activity, the antioxidant effect, toxic action by *Artemia salina*, antiulcer activity, action on the intestinal motility, anti-inflammatory activity, toxicity and antimicrobial activity.

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

INTRODUCCIÓN

A los metabolitos secundarios de las plantas medicinales se les atribuye, en medicina tradicional, algunas propiedades curativas y constituyen un gran potencial de reserva inexplorada de gran utilidad al hombre, las disciplinas que los estudian son la Fitoquímica y la Farmacología que permiten conocer los principios activos, evaluar las vías de biosíntesis, degradación y los mecanismos de regulación. (1).

La presente investigación es sobre *Ephedra americana* “ pinco-pinco ”, que posee gran cantidad de flavonoides, 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.

GENERALIDADES

2.1. **EPHEDRAS** .- La hierba “ma huang” usada en China desde la antigüedad para el tratamiento de gran variedad de afecciones, estimulante circulatorio, diaforético, antipirético, sedante de la tos, etc., pertenece al grupo de las “Ephedras”.

El género *Ephedra* pertenece a la familia EPHEDRACEAE o GNETACEAE del orden GNETALES, con cerca de 60 especies, plantas arbustivas o subarbustivas erguidas, trepadoras o rastreras, con ramas equisetiformes.

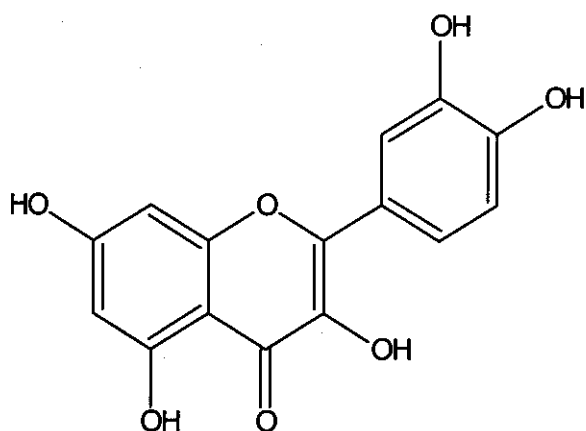
Crecen en Africa, Asia, Europa Central, América del Norte y en Sudamérica.

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. (2,3)

2. 2. ASPECTOS QUÍMICOS DE LAS EPHEDRACEAE

2.2.1. ALCALOIDES DE EPHEDRAS:
Derivados de la β - feniletilamina:



Quercetina

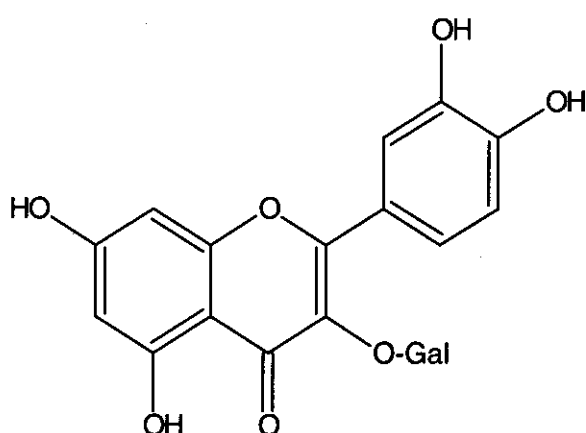
Efedrina $C_{10} H_{15} NO$; Pseudoefedrina $C_{10} H_{15} NO$; N-metil efedrina $C_{11} H_{17} NO$; N-metil Pseudoefedrina $C_{11} H_{17} NO$; Norefedrina $C_9 H_{13} NO$; NorPseudoefedrina $C_9 H_{13} NO$; O-Benzoil Pseudoefedrina $C_{17} H_{19} NO$; Efedroxano $C_{11} H_{15} NO_2$ ó 4(S), 5(R) - 3, 4- dimetil - 5 - feniloxazolidona; Efedralona $C_{11} H_9 NO_4$; Feruloilhistamina, etc. (2-4).

2.2.2. COMPUESTOS FENÓLICOS EN EPHEDRAS :

Fenilpropanoides: ácido clorogénico, ácido cafeico, etc. y Chalconas; Flavonoides tipo flavona o flavonol y

sus glicósidos: Kaemferol, Rutina, Herbacetina, Apigenina, Quercetina, Quercetin -3-O- galactósido, etc.;

Proantocianidinas, Catequinas, Prodelfinidinas, Leucopelargonidinas, Leucocianidina, etc. (5-7).



Quercetina-3-O-Galactosa

2.3. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LAS EPHEDRACEAE

Son plantas de uso medicinal empleadas en el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias y genitourinarias (1-7) La actividad biológica reportada para algunos flavonoides aislados de efedras, es un efecto antiviral, contra la infección del HIV-2 y el virus Herpes simplex. (8)

En la medicina oriental la ephedra es usada para el tratamiento del asma y bronquitis, enfriamientos y resfriados, tos, fiebre, dolor de cabeza, congestión nasal y como un agente antialérgico, según Bruneton, 1991.(1) En China han investigado sus usos clínicos para el asma bronquial, bronquitis crónica, neumonía infantil, catarros, etc.

2.4. LA EPHEDRA PERUANA

La hierba conocida por los nativos peruanos como “pinco-pinco”, crece abundantemente en el Cusco, Arequipa y Cajamarca, es usada en la medicina tradicional, crece en las altiplanicies de Bolivia y la conocen como “condorsara” En la zona andina de Argentina y Chile la llaman “pingo-pingo” y “solupe”.

En el Perú habitan la *Ephedra americana* H & B var. andina y la *Ephedra andina* POEPP & ENDL, ambas indistintamente llamadas comunmente “pinco-pinco”. (7).

Según referencias históricas, etnobotánicas, de medicina popular 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, hemostático, diurético, afecciones renales, tratamiento de fracturas, sudorífico, antipirético, sedante de la tos, estimulante respiratorio especialmente para el asma bronquial, así también como midriático.

2.5. SISTEMA INMUNE

La respuesta a un antígeno se denomina respuesta inmune.

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

Los organismos son continuamente invadidos por sustancias extrañas o antígenos, por lo que 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.

Todos los anticuerpos son proteínas llamadas globulinas y del análisis de los genes de la cadena pesada se obtienen 8 tipos de secuencias en la región constante: μ , δ , γ_3 , γ_1 , γ_{2b} , γ_{2a} , ϵ , α , correspondientes a las inmunoglobulinas: IgM, IgD, IgG₃, IgG₁, IgG_{2b}, IgG_{2a}, IgE, IgA, además de la región variable en 3 segmentos: V, D, J. La IgG es un anticuerpo bivalente y es casi 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 % de los anticuerpos

denominados reagentes, 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.(10-12).

2.6. ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes previenen las modificaciones indeseables debidas a las oxidaciones, son aquellas sustancias que impiden o retardan las oxidaciones.

Los antioxidantes pueden ser clasificados, según su estructura química en 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) Bioflavonoides de origen natural: quercetina, rutina, genisteína, prunetina, ramnetina, kaemferol, catequinas, etc.
- b) Fenilpropanoides: ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico, etc. (9)

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y MÉTODOS

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

INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA

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.

3.2.2. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Ephedra americana* :

Se maceraron 100 g de polvo de la parte aérea de *Ephedra americana* 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, los filtrados se juntaron y evaporaron a sequedad a 40 °C en una estufa de aire circulante, hasta obtener el extracto etanólico I, que se utilizó para realizar los ensayos fitoquímicos, como el de solubilidad, la marcha fitoquímica y los ensayos cromatográficos. (13)

3.2.3. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL EXTRACTO ETANÓLICO I.

El extracto etanólico I se sometió a cromatografía en capa fina unidimensional ascendente, en Silicagel G 60, con cloroformo y metanol en varias proporciones y BAW (4:1:5), por 4 hs. Se observó a la 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 la fluorescencia 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.

3.2.4. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA RÁPIDA 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.

Se preparó una columna de silicagel con 5 g del extracto total disuelto en 1 ml de etanol, el cual fue mezclado con 10 g de silicagel hasta formar una papilla granular homogénea que fue sembrada en la parte superior de la columna, sobre la superficie de la silicagel. Se procedió a la elución utilizando: 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. Las fracciones fueron controladas por c.c.f.

3.2.5. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA A ESCALA PREPARATIVA

Para aislar y purificar los 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.

3.2.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR C.C.F.

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, (14) se ensayaron la fracción metanólica II y la fracción acuosa III.

- a) MP : extracto metanólico II; fase fija: Silicagel G-60 de 5 x 20 cm.; fase móvil: BAW 4:1:5 v/v; 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).

- b) MP : extracto acuoso III; fase fija: Silicagel G-60 de 10 x 20 cm; fase móvil: BAW 4:1:5 v/v; tiempo de desarrollo: 2 hs; frente de solventes: 12 cm.

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

3.2.7. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPONENTES AISLADOS

Los componentes químicos aislados mediante cromatografía en capa fina a escala preparativa, fueron elucidados 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.

3.3.0. INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA

3.3.1. ENSAYO

INMUNOESTIMULANTE:
ESTIMULACIÓN RETÍCULO
ENDOTELIAL DE DELAVEAU
Y COL.(1980), en Gershwin y
Cooper. (23)

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

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

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

PROCEDIMIENTO

Se realizó el método de Delaveau y col. (Tabla N° 1 descrito en Gershwin y Cooper, 1988): se determinaron los

datos basales de cada animal, se administró 0.5 ml de solución al 1% del extracto total en estudio (dosis variadas durante cinco días), 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, se extrajeron muestras de sangre venosa a 1, 2 y 3 horas, se

hemolizó 10 ul de sangre en 5 ml de agua destilada, se leyó en el espectrofotómetro UV-Visible, longitud de onda 650 nm, filtro rojo, anotándose los resultados, se efectuó frotis, tiñéndose con el colorante Giemsa, contándose las células, se tabuló y comparó los resultados obtenidos. (12,23).

TABLA N° 1 MÉTODO DE DELAVEAU Y COL. ENSAYO INMUNOESTIMULANTE

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

3.3.2 ENSAYO DE TOXICIDAD EN ARTEMIA SALINA

Se preparó la dilución del extracto total: 20 mg del extracto total I se disolvieron 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*, a temperatura ambiental, luego de 48 hs. los huevos eclosionaron, 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. Transcurridas 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%. (15-16)

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. (17,18).

3.3.4. ACTIVIDAD SOBRE LA MOTILIDAD INTESTINAL

Se evaluó la motilidad intestinal por el 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. (19)

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. (20,21)

3.3.6. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA Y SUBCRÓNICA

3.3.6.1. TOXICIDAD AGUDA. DETERMINACIÓN DE DOSIS LETAL 50.

DL₅₀ 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 y Burson

para la calificación de los resultados de DL₅₀ (mg/kg); la sustancia es extremadamente tóxica <1 altamente tóxica < 50 moderadamente tóxica < 500 ligeramente tóxica < 5000 prácticamente no tóxica <15000 y relativamente inocua >15 000. (22).

3.3.6.2. TOXICIDAD SUBCRÓNICA, CON DOSIS EFECTIVA MEDIA:

Se dividieron 16 ratas 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 enteritidis* ATCC 13076, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

RESULTADOS

4.1.0. RESULTADOS FITOQUÍMICOS

TABLA N° 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	+

(+) Poco soluble, (+++) Soluble, (++++) Muy soluble o bastante soluble

TABLA N° 3 MARCHA FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Ephedra americana*

Reactivo	Resultado	Metabolito
Ninhidrina	-	Aminoácidos libres
Tricloruro férrico	+++	Compuestos fenólicos
Gelatina	+++	Taninos
Shinoda (Mg + HCl)	++	Flavonoides
Hidroxilamina	++	Oximas
Nitrato de cerio amoniacal	++	Alcoholes
Molish	+++	Glucósidos
Vainillina sulfúrica	+++	Glucósidos
Benedict	+++	Glucósidos
Antrona	+++	Glucósidos
Tollen's	+++	Azúcares reductores
Fehling	+++	Azúcares reductores
Mayer	++	Alcaloides
Dragendorff	+++	Alcaloides
Indice afrosimétrico	+ -	Esteroides (saponinas)

TABLA N° 4 CROMATOGRAMA DE LOS COMPONENTES DE *Ephedra americana*

Comp. N°	Rf.	Visible	Luz UV ₃₆₆	Fe Cl ₃	H ₂ SO ₄ + Visible	H ₂ SO ₄ + Luz UV ₃₆₆	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 roja	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 CROMATOGRAFÍA 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%

TABLA N° 6 CROMATOGRAMA DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS METANOLICO II Y ACUOSO III DE *Ephedra americana*

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
P	0.0284	0.001	0.0001

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

C = CONTROL
 T = TRATAMIENTO
 % ARSI = ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE

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

Tratamiento (mg/kg)	Primera %		Segunda %		Tercera %	
	VM	%	VM	%	VM	%
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
Efedra 100	0.0601	2.9991431	0.03084	27.4182161	0.01263	54.4043321
Isoprinosine 300	0.05339	8.50042845	0.04345	2.25935514	0.01231	55.5595668
Prednisona 100	0.05481	6.06683805	0.04345	2.25935514	0.02636	4.83754513

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
Isoprinosine 300 mg/kg	59.5 ± 3.3	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
Efedra 100 mg/kg	57.5 ± 5.8	39.3 ± 6.7
P	0.001	0.570

4.2.2 RESULTADO DEL ENSAYO DE ARTEMIA SALINA : El valor de la concentración letal media CL50 obtenido para el extracto total I 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 EVALUACIÓN 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

		Edema	En	Mm	VM + DE		Eficiencia
TTO	Dosis mg/kg	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. RESULTADO DE LA DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD.

4.2.6.1. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA, DL50:

La DL₅₀ para el extracto etanólico I, estaría sobre los 5360 mg/kg.

4.2.6.2. ENSAYO DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA:

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 INHIBICIÓN
<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 enteritidis</i>	ATCC 13076	9
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	14
<i>Staphylococcus</i>	ATCC 12228	8

DISCUSIÓN

El extracto etanólico I de *Ephedra americana*, demostró buena solubilidad en solventes polares como en alcohol etílico y metílico, Tabla N° 2, lo que indica que los componentes químicos son de mediana y alta polaridad.

Según la marcha fitoquímica efectuada, Tabla N° 3, se detectó la presencia de alcaloides y un alto porcentaje de

compuestos fenólicos, entre ellos flavonoides libres y glicosidados.

Mediante ensayos cromatográficos se confirmó en el extracto etanólico I la presencia de alcaloides y flavonoides, Tabla N° 4. Se realizó el fraccionamiento del extracto total I mediante cromatografía en columna rápida, Tabla N°5. 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 en el extracto acuoso III.

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, 5 fueron purificados y elucidados estructuralmente mediante correlaciones químicas con los datos obtenidos por espectroscopia UV, con reactivos de desplazamiento y por comparación con espectros UV dados en la literatura por Mabry y col. (13), sugiriéndose las estructuras de 5 flavonoides:

Fracción I λ MeOH = 280, 326 nm: 3',5'-dihidroxi - 4'-metoxi-7-O-ramnoglucosil flavonona (hesperidina)

Fracción II λ MeOH = 284, 298 (h), 344 nm: 3',4',5,7-tetrahidroxi-6,8-di R flavona.

Fracción III λ MeOH = 276, 364 nm: 3',5,7-trihidroxi - 4', 6- dimetoxi flavonol

Fracción IV λ MeOH = 252 (h), 268, 314; NaOMe = 264 (h), 274, 360; AlCl₃ = 250 (h), 276, 328, 384; AlCl₃ + HCl = 250 (h), 278, 324, 384; NaOAc = 274, 360; NaOAc + H₃BO₃ = 272, 316 nm: crisina: 5,7-dihidroxi flavona.

Fracción V λ MeOH = 276, 314 nm: 4'-hidroxi - 5, 7 - dimetoxi flavonona.

Determinación de la acción antioxidante mediante c.c.f, Tabla N° 6: el extracto metanólico II que está constituido principalmente por los 5 flavonoides, 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 (14), en tanto que el extracto acuoso, que contiene principalmente compuestos tipo alcaloides, 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, por lo que los alcaloides no tendrían actividad antioxidante o actividad captadora de radicales libres.

Se evaluó el extracto etanólico total I de la *Ephedra americana* sobre la respuesta del Sistema Inmune, mediante el método de Estimulación Retículo Endotelial de Delaveau y col. 1980 (23) 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 que disminuye significativamente la respuesta inmune, al reducir la presencia de los linfocitos T, según Bentley et al. 1996 (24) y de estimulación el isoprinosine 300 mg/kg, que es un agente que activa la respuesta del sistema inmune, según Betts y col. 1978 y Grieco y col. 1984 (25, 26). En Tablas N° 7,8 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 (25,26); 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 (24). 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:

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

donde:

C = CONTROL

T = TRATAMIENTO

**% 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 *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 N° 7,8 (12,24-26), 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. La presente investigación al evidenciar un aumento de la respuesta inmune en ratas, indicaría que los productos naturales presentes en *Ephedra americana*, podrían ser utilizados en pacientes con cuadros de disminución de la actividad del sistema inmunitario, previa evaluación clínica.

El valor de la CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CL50 obtenido para el extracto total I de *Ephedra americana* fue de 2.9166 ug/ml. 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, según Mc Laughlin y col. 1991. (16)

Al determinar la actividad antiulcerosa comparativa del extracto etanólico total I y el subextracto metanólico II, frente a lesiones gástricas inducidas por indometacina en ratones, Tabla N° 10, el extracto total I 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 E₂, según Beil W. y col.1995; y Reyes y col. en 1996. (17,18)

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, 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. Sería debido a que los flavonoides inducen una disminución del ingreso de los iones calcio al interior de la célula, según Duarte y col. 1993 .(19).

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, 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%. Esto se explicaría por la presencia de los flavonoides quienes además tienen una acción antioxidante, inhiben la enzima adenosina deaminasa, según Koch y col. 1992 (20); y posiblemente también por inhibir la secreción de prostaglandinas, según Kakbrender y col. 1992. (21).

ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA:

La DL₅₀ para el extracto etanólico I, de *Ephedra americana*, estaría sobre los 5360 mg/kg administrados a los ratones, calificándolo como una sustancia prácticamente no tóxica, según Williams y Burson. (22).

ENSAYO DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA:

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.

Luego de los ensayos microbiológicos efectuados con el extracto etanólico total I, Tabla N° 13, podemos decir que presenta un pequeño halo de inhibición de 11 mm. frente a *Salmonella cholerae* suis serotipo typhimurium, al igual que frente a *Staphylococcus aureus*, se observa mayor inhibición a *Bacillus subtilis*, 14 mm.

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 *Ephedra americana* posee un significativo efecto antiinflamatorio, buena actividad antiulcerosa y que actúa sobre la motilidad intestinal. Tiene un DL₅₀ alto, no es tóxica y es biológicamente activa.

El extracto etanólico total I de *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.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Bruneton J.** (1991) Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia 1ª Edición- Zaragoza : Edit. ACRIBIA S.A.; p. 157-161.
2. **Hegnauer R.** *Chemotaxonomie Der Pflanzen* (1986) Band 7 Basel-Boston-Stuttgart: Birkhauser Verlag; p.546.
3. **Jan Lundstrom, Arnold Brossi** ((1989) editores. THE ALKALOIDS B-Phenethylamines and Ephedrines of Plant Origin, Chemistry and Pharmacology. Vol. 35 New York. : Academic Press Inc. p. 77.
4. **Mandrile L Eloy, Bongiorno de Pflirter Graciela.** (1994) Alcaloides de las Ephedras. Rev Farm ; 136 (1) : 27-36.
5. **Tsitsa Tzardi E, Loukis A, Philianos S.** (1987) Polyphenolic Compounds of *Ephedra campylopoda* . Fitoterapia ; LVIII (3): 200.
6. **Gurni Alberto A, Wagner Marcelo L.** (1988) Progresos Realizados en Estudios Fitoquímicos de Especies Argentinas del Género *Ephedra* (Ephedraceae). Acta Farm Bonaerense ; 7 (1): 19-23.
7. **Chávez R A S.** (1937) Estudio Farmacéutico de la *Ephedra* andina, pinco-pinco. Bol Soc Quím Perú ; 3 (4): 198-210.
8. **Aquino R, De Feo V, De Simone F, De Tommasi N, Pizza C.** (1996) Flora Officinale Dell'America Latina. Salerno: Edit. Gutenberg Va Gen. Ciro Nastri-Lancusi (S.A.); p. 17-20, 48-59.
9. **Miller L Alan** (1996) Antioxidant Flavonoids: Structure, Function and Clinical Usage. Alt Med Rev ; 1 (2) : 103-111.
10. **De Robertis E, De Robertis M F, Hib J, Ponzio R.** (1997) Biología Celular y

- Molecular. 12^a. Edición, 2^a. Reimpresión Buenos Aires: Edit. El Ateneo; p. 438-441.
11. **Guyton A, Hall J.** (1997) Tratado de Fisiología Médica. 9^a Edición México D.F. : Edit. Interamericana-Mc Graw – Hill; p. 487- 498.
 12. **Abbas A K, Lichtman A H, Pober J S.** (1995) Inmunología Celular y Molecular. 2^a. Edición México D.F. : Edit. Interamericana.
 13. **Mabry TJ, Markham Kr, Thomas Mb.** (1970) The Sistematic Identification of Flavonoids. Berlín: Springer – Verlag.
 14. **Joyeux M, Lobstein A, Anton R, Mortier F.** (1995) Comparative antilipoperoxidant and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. *Planta Med*; 61: 126-129.
 15. **Michael A, Thomson C, Abramovitz G.** (1956) *Artemia salina* as a test organism for Bioassay. *Science* ; 123 : 464.
 16. **McLaughlin J L, Crown Gall.**(1991) 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.
 17. **Beil W, Birkhlz C, Sewing K. F.** (1995 Jun.) Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *H. pylori* growth. *Arzneimittelforschung* 45 (6): 697-700.
 18. **Reyes M, Martín C, Alarcón de la Lastra-C, Trujillo J, Toro M V, Ayuso Mj.** (1996 Jul-Aug) Antiulcerogenicity of the flavonoid fraction from *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera. *Z-Naturforsch-C* ; 51 (7-8): 563-69.
 19. **Duarte J, Pérez V, Utrilia P.** (1993 Jul.) Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. *Yen Pharmacol* ; 24 (4): 857-862.
 20. **Koch H, Jage R, Groh U, Planck.**(1992) 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* ; 14 (6): 413-17.
 21. **Kakbrender F, Wur G, Von Bruchausen F.** (1992) In vitro inhibition and stimulation of purified prostaglandin endoperoxide synthase by flavonoids: structure activity relationship. *Pharmacology* ; 44 (1) : 1-12.
 22. **Williams P, Burson J.** (1985) *Industrial Toxicology Safety and Health Applications in the Work Place*. New

- York : Edit. De Van Norstrand Rein Hold Company ; p. 45-49.
23. **Gershwin M, Cooper E.** (1988) Animals models of comparative and development aspects of inmunity and disease. New York : Pergamon Press.
24. **Bentley A M, Hamid Q, Robinson D S.**(1996) et al. Prednisolone treatment in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 153 : 551-56.
25. **Betts R. F, Douglas Rg, George S. D.** (May. 1978) Isoprinosine in experimental influenza A infection in volunteers. Abstracts of 78th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Las Vegas, Nevada 14-19.
26. **Grieco M. H, Redy M. M, Manvar D.** (1984), In vivo immunomodulation by isoprinosine in patients with the acquired immunodeficiency syndrome and related complexes. *Ann Intern Med*; 101 : 206-207.