



Número de Proyecto:

Año:

(No llenar)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Facultad de Ciencias Veterinarias

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTOTÍTULO del PROYECTO: Estudio fitoquímico de *Salpichroa origanifolia*.

1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Aplicada

1.3. CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL: (Ver Códigos en Planilla Adjunta)
.....1.4. CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES: (Ver Códigos en Planilla Adjunta)
.....**2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO**

2.1. AREAS, CENTROS y/o INSTITUTOS: Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF).

2.2. OTRAS INSTITUCIONES:

2.3. EQUIPO de TRABAJO:

2.3.1 INTEGRANTES

Apellido y Nombre	Título Académico	Categ. Invest.	Responsabilidad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac Hs./Sem
Boeris, Mónica Alejandra	Dra	IV	D	Fisiología Animal	JTP Ex	8
Toso, Ricardo E.	Dr	II	I	Farmacología	Prof Adj Ex	4
Molina, Germán	Lic	-	I	Labcap	Técnico laboratorio	4

(1) D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO:

3.1. FECHA de INICIO: 01 / 06 / 09 FINALIZACIÓN: 31 / 12/11

4. RESUMEN del PROYECTO:

Se realizará un tamizaje fitoquímico para determinar la presencia de grupos químicos en *Salpichroa organifolia*, planta nativa que crece en la Provincia de La Pampa. La medicina popular le atribuye a esta planta propiedades calmantes, diuréticas y narcóticas. Investigaciones farmacológicas en ratones, llevadas a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos de la FCV, UNLPam confirmaron la acción terapéutica como antiinflamatoria y analgésica, además de disminuir la temperatura corporal. Reacciones de caracterización realizadas en estudios preliminares al extracto hidroalcohólico de la planta, determinaron la presencia de alcaloides, compuestos que poseen las acciones farmacológicas mencionadas. En este trabajo se investigarán fracciones metanólica, clorofórmica y acuosa y además se ampliarán estudios fitoquímicos realizados previamente a Extracto hidroalcohólico, Polvo y Cristales de *Salpichroa organifolia*. El objetivo de estos estudios estará orientado a confirmar la presencia de grupos químicos tales como alcaloides, triterpenos y esteroides, quinonas, lactonas y cumarinas, lípidos y aceites esenciales, saponinas, fenoles y taninos, amins, compuestos reductores, flavonoides, glicósidos cardiotónicos, mucílagos y carotenoides. Teniendo en cuenta que la presencia en cantidad y calidad de metabolitos secundarios en las plantas puede variar en distintas épocas del año, se repetirá el tamizaje fitoquímico en muestras vegetales recolectadas en septiembre, diciembre y mayo. Las fracciones aisladas que contengan grupos químicos identificados serán evaluadas empleando bioensayos para confirmar la presencia o no de la actividad farmacológica. Los resultados de este trabajo servirán como base a estudios posteriores que tendrán como objetivo intentar el aislamiento de los principios activos y la identificación del o de los principios activos responsables de la acción farmacológica.

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

5.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS y DESCRIPCIÓN de la SITUACIÓN ACTUAL del PROBLEMA

La *Salpichroa organifolia* (SALO) se desarrolla en terrenos disturbados de Argentina, Brasil, Bolivia, Paraguay y Uruguay, con un desarrollo vegetal durante la época estival (Marzocca, 1997)

Datos etnobotánicos aportados por un habitante de la ciudad de General Pico, La Pampa, indican su empleo para curar lesiones en la piel (Boeris, 2007). Investigaciones previas llevadas a cabo por Burton y Oberti (2000) determinaron la presencia de salpichrólidos, estructuras esteroidales que presentan diferencias estructurales dependiendo de la época del año y del origen geográfico de las poblaciones.

Los estudios previos realizados en extractos de *Salpichroa organifolia* demostraron la presencia de actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética en ratones (Boeris et al., 2004). Utilizando el test de la carragenina y el test de las contorsiones en ratones, se evaluó en distintos extractos purificados el efecto antiinflamatorio y analgésico comparándolo con otros AINEs utilizados en medicina veterinaria. En estos trabajos se determinó que el Polvo de SALO, purificado a partir de un extracto hidroalcohólico de la planta, tiene un efecto similar a la indometacina y al ácido acetil salicílico. Con respecto a la fenilbutazona se determinó que ésta supera el efecto del Polvo de SALO 5 horas pos administración pero el efecto del Polvo persiste más tiempo, y es mayor su efecto que el

exhibido por el ketoprofeno. El efecto analgésico del Polvo de SALO es superior al de la Fenilbutazona y ligeramente menor al del Ketoprofeno. Estudios complementarios determinaron que el Polvo de SALO no provoca los efectos secundarios clásicos de los AINEs (antiinflamatorios no esteroides) sobre la mucosa gástrica.

Estos resultados fundamentaron el inicio de estudios para determinar los grupos químicos presentes en los extractos de SALO. Se comenzó por purificar el extracto hidroalcohólico obteniéndose un polvo y cristales (Boeris, 2007). Se realizaron reacciones fitoquímicas a estas fracciones determinando la presencia de alcaloides y flavonoides.

Teniendo en cuenta estos estudios y que la planta tiene un desarrollo estival, florece y fructifica en primavera y verano (Marzocca, 1997) y considerando además lo expuesto más arriba donde se indica que los principios activos pueden variar en cantidad y calidad según la época del año, en este proyecto se propone realizar estudios fitoquímicos sobre muestras recolectadas en octubre cuando comienza el desarrollo vegetal, en diciembre-enero cuando recibe la máxima irradiación solar y en mayo cuando disminuye el follaje por influencia del frío.

Los ensayos fisicoquímicos que se emplearán en este trabajo serán cualitativos permitiendo la identificación de grupos químicos. Utilizando información bibliográfica sobre la correlación que existe entre estructura química y la actividad farmacológica de grupos químicos identificados se podrá inferir el posible origen de las acciones farmacológicas encontradas en los ensayos previos (Villar del Fresno, 1999). Hay ejemplos bien documentados de grupos químicos con actividad farmacológica como *Salix alba*, *Salix fragilis* y *Salix purpurea* que contienen en su composición química taninos catéquicos, flavonoides, estrógenos, glucósidos fenólicos y son analgésicos, antiinflamatorios, antipiréticos y antirreumáticos. *Harpagophytum procumbens* tiene en su composición química esteroides, flavonoles e iridoides y su acción es analgésica, antiinflamatoria, antipirética, antiartrítica, antiespasmódica y cicatrizante (Kuklinsky, 2000). Otros ejemplos que pueden mencionarse es el cajucarínolido, un diterpeno presente en *Croton cajucara* con efecto antiinflamatorio. También las saponinas esteroidales y los alcaloides tienen acción antiinflamatoria analgésica y la emetina y la quinina antipiréticos (Lock, 1994).

Las reacciones de caracterización por coloración o precipitación son simples, específicas y se puede utilizar un patrón, esto tiene como ventaja comparar el color con el que produce una solución a la que se le asignó representación (+), y también se comparan los precipitados con los obtenidos al añadir igual cantidad de reactivo a soluciones patrón de distintas concentraciones (Domínguez, 1979). Aunque la información que se obtendrá con estas determinaciones es limitada ya que además pueden aparecer reacciones falsas positivas o falsas negativas se estima que ofrecerán información valiosa para continuar los estudios de aislamiento e identificación del o los principios bioactivos.

Como antecedentes a trabajos como el que se iniciarán en este proyecto puede mencionarse que los estudios sistemáticos en vegetales en nuestro país se remontan a 1767 a cargo de Commerson y en 1872 fueron realizados por Lorentz y Grisebach. Poco después Parodi retomó la investigación fitoquímica y farmacognóstica de plantas nativas en 1881, estas líneas de investigación contenían una descripción botánica, la composición química y el uso de especies indígenas (Alonso, 1998). Domínguez llevo a cabo la primera investigación fitoquímica sistemática de plantas medicinales argentinas que consta en varias publicaciones desde 1904. Luego continuando en esta línea, Rondina y Coussio (1969) ampliaron las especies estudiadas.

Estudios similares a los propuestos en este trabajo donde se aplicaron marchas analíticas en vegetales fueron utilizados por grupos de investigación del Departamento de Bioquímica Vegetal y Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (Rondina y Coussio, 1969) y el Laboratorio de química orgánica de la Pontificia Universidad Católica del Perú (Lock de Ugaz, 1994).

De acuerdo a estos antecedentes, se establecerán protocolos para realizar determinaciones de alcaloides, triterpenos/esteroides, antraquinonas, lactona/cumarinas, lípidos/aceites esenciales, saponinas, fenoles/taninos, aminas, compuestos reductores, flavonoides, glicósidos cardiotónicos y cianogénicos, mucílagos y carotenoides.

Estos compuestos químicos presentan interés por ser fuente de agentes con actividad biológica, existen varias investigaciones llevadas a cabo con este protocolo, por ejemplo en el género *Zanthoxylum* (Diéguez, 2004) y género *Erythrina* (Pino-Rodríguez, 2004).

Debido a que hay escasos trabajos realizados en la parte química y farmacológica de *Salpichroa organifolia*, este análisis fitoquímico permitirá correlacionar el metabolito secundario con la actividad farmacológica evidenciada por los extractos obtenidos de la planta. Además se determinará si hay un momento propicio de recolección evidenciado por la presencia del compuesto químico de interés.

5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el(los) INTEGRANTE(S) del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)

Capítulos de libros

- CAPITULO: RICARDO ENRIQUE TOSO, MÓNICA BOERIS, MARIO IGNACIO SKLIAR, / PRODUCTOS NATURALES: UN CAMPO DE ACCIÓN PROMISORIO PARA LA MEDICINA VETERINARIA / PARA EL LIBRO: HILTON MACHADO MAGALHAES; FARMACOLOGÍA VETERINARIA, TEMAS ESCOLHIDOS III / Ed unica; GUAIBA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL; EDITADO POR LIVRARIA E EDITORA AGROPECUARIA; (2002), Pag 109 -120. I.S.B.N. 85-85347-96-1

Trabajo de Divulgación MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS APLICADOS AL DESARROLLO DE NUEVOS MEDICAMENTOS – Cuaderno de Ciencia y Técnica N° 2 Universidad Nacional de La Pampa, Resolución Rectoral N° 362/08 – Octubre, 2008.

Trabajos publicados

- BOERIS, M. A.; TOSO, R. E.; OCHOA, G. J.; MANSO, D. A.; CUCCOLO, M. E.; SKLIAR, M. I. / ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIINFLAMATORIAS DE *MARRUBIUM VULGARE* / CIENCIA VETERINARIA / ISSN 1515-1883 / 4: 1 - 6 (2002).
- BOERIS, M. A.; TOSO, R. E.; SKLIAR, M. I. / ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE *SALPICHROA ORGANIFOLIA* / ACTA FARMACÉUTICA BONAERENSE / ISSN 0326-2383 / 23 N° 2 (2004).
- TOSO, R. E.; TORIBIO, M. S.; MENGELLE, P.; BOERIS, P. / PLANTAS DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA, ARGENTINA, CON ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA Y ANTIESPASMÓDICA / InVet / ISSN 1514-6634 / 9: (2007).
- STEIBEL, P. E.; TROIANI, H. O.; ORIANI, D. S.; ARDOINO, S. M.; TORIBIO, M. S.; BOERIS, M. A.; TOSO, R. E. / BANCO DE EXTRACTOS VEGETALES DE PLANTAS NATIVAS Y NATURALIZADAS DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA / AVANCES DE LA FARMACOBOTÁNICA EN LATINOAMERICA (2004 – 2007) / 1era. EDICIÓN. / ISBN 978-987-05-2933-0 / Pag. 61 (2007).

5.3. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO:

- "ELABORACIÓN DE FITOFÁRMACOS INYECTABLES A PARTIR DE TINTURAS VEGETALES" / FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS, UNLPam. Res. 092.99 / FECHA DE ALTA: 1/07/99 / FECHA DE FINALIZACIÓN: 31/12/2000 / EVALUACIÓN: INTERNA Y EXTERNA.

- "EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DE MEDICAGO SATIVA SOBRE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL Y EL TIEMPO DE VACIADO GÁSTRICO" / FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS, UNLPam. Res. 028.01 / FECHA DE ALTA: 1/01/01 / FECHA DE FINALIZACIÓN: 31/12/02 / EVALUACIÓN: INTERNA Y EXTERNA.
- "EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE MARRUBIUM VULGARE" / FACULTAD DE CIENCIA VETERINARIAS, UNLPam / DIRECTOR: MÓNICA BOERIS / FECHA DE ALTA: 1 DE ENERO DE 2001 / FECHA DE FINALIZACIÓN: 31 DE DICIEMBRE DE 2003 / EVALUACIÓN: INTERNA Y EXTERNA.
- "ESTUDIOS DE LOS EFECTOS FISIOPATOLÓGICOS PRODUCIDOS POR EXTRACTOS DE SALPICHROA ORIGANIFOLIA EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA" / FACULTAD DE CIENCIA VETERINARIAS, UNLPam / DIRECTOR: MARIO IGNACIO SKLIAR / FECHA DE ALTA: 1 DE ENERO DE 2002 / FECHA DE FINALIZACIÓN: 31 DE DICIEMBRE DE 2004 / EVALUACIÓN: INTERNA Y EXTERNA
- "PROYECTO DE TRANSFORMACIÓN DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE FÁRMACOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS, UNLPAM, COMO UNA UNIDAD DE VINCULACIÓN ENTRE LA UNIVERSIDAD Y EL SECTOR SOCIAL Y PRODUCTIVO CON CAPACIDAD PARA EVACUAR CONSULTAS Y ASESORAR SOBRE EL CONSUMO Y PRODUCCIÓN DE PLANTAS MEDICINALES EN LA PROVINCIA DE LA PAMPA. GRUPO DE INVESTIGACIÓN DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE FÁRMACOS (CIDEF)". PRESENTADO EL 15/09/03. PERÍODO DE EJECUCIÓN 1/01/04 HASTA 31/12/04. RESOLUCIÓN SPU N° 98/03
- "ASPECTOS BOTÁNICOS, ECOLÓGICOS, ANTROPOLÓGICOS Y COGNITIVOS DE PLANTAS MEDICINALES NATIVAS DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA. CONTRIBUCIÓN A LA ECOLOGÍA BIOCULTURAL Y A LA AGROINDUSTRIA DE LA REGIÓN" / GRUPO DE INVESTIGACIÓN DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE FÁRMACOS (CIDEF). RESOLUCIÓN: 001/04 CS
- "DETERMINACIÓN DEL EFECTO GASTROPROTECTOR DE PLANTAS NATIVAS DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA, ARGENTINA". FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS, UNLPam. Res. 133/05 CD / FECHA DE ALTA: 1/01/05 / FECHA DE FINALIZACIÓN: 31/12/06 / EVALUACIÓN: EXTERNA. PROYECTO PRORROGADO HASTA EL 31/12/07 Res CD 048/2007.
- "EVALUACIÓN DEL EFECTO GASTROPROTECTOR DE GNAPHALIUM GAUDICHUDIANUM, JODINA RHOMBIFOLIA, LIPPIA TURBINATA, PLANTAGO LANCEOLATA Y RUTA CHALEPENSIS" RESOLUCIÓN CD ---.07 FCV - UNLPam
- "EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DE EXTRACTOS DE TRIBULUS TERRESTRE Y MARRUBIUM VULGARE SOBRE LA MOTILIDAD INTESTINAL Y EL TIEMPO DE VACIADO GASTROINTESTINAL" FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS, UNLPam. Res. 119/2008 CD / FECHA DE ALTA: 1/01/08 / FECHA DE FINALIZACIÓN: 31/12/09 / EVALUACIÓN: EXTERNA

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

Problema Científico

Los análisis fitoquímicos pueden orientarse desde diferentes puntos de vista, por ejemplo, algunas especies de *Dioscorea* son de gran importancia como materia prima para la producción de hormonas esteroidales a partir de la diosgenina (Lock, 1994). Es evidente que los estudios fitoquímicos en estos casos estarán orientados a determinar la cantidad y calidad de diosgenina. Pero en este ejemplo ya se conoce cual es el compuesto bioactivo de interés para producir los fitoestrógenos. El problema científico se presenta cuando se desconoce la naturaleza del o los compuestos bioactivos que expresan una determinada actividad farmacológica. En el caso de este proyecto son compuestos que producen una actividad similar a los AINEs. Las marchas fitoquímicas proponen una solución para iniciar estos estudios ya que permitirán determinar los grupos químicos presentes en los extractos que

exhiben la acción. Esta información resulta imprescindible para luego realizar estudios más avanzados que finalmente permitirán elucidar la estructura química de los compuestos.

Objetivos:

- Ampliar los estudios fitoquímicos en extractos de partes aéreas de *Salpichroa organifolia* para identificar la presencia de distintos grupos químicos.
- Repetir los ensayos en septiembre, diciembre y mayo.
- Realizar pruebas biológicas con las fracciones que contengan los grupos químicos identificados para determinar la correlación con la actividad farmacológica antiinflamatoria y analgésica.

Hipótesis:

- Se identificarán grupos químicos en las distintas fracciones obtenidas a partir de *Salpichroa organifolia* con distintos solventes a través de reacciones de caracterización.
- Se encontrará una correlación positiva entre los grupos químicos con antecedentes que avalen efectos antiinflamatorios y analgésicos con respecto a los efectos provocados en animales de experimentación tratados con las fracciones que los contengan.

Resultados esperados:

- La obtención de distintas fracciones facilitará la determinación de grupos químicos por reacciones de caracterización.
- La presencia de determinados compuestos químicos permitirá investigar la relación de estos metabolitos con la actividad farmacológica.
- La determinación de compuestos químicos establecerá la época de recolección óptima para lograr la mayor actividad biológica.
- Los grupos químicos identificados y los resultados de los bioensayos permitirán señalar una correlación entre estructura química – actividad farmacológica.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS.

Obtención de los extractos

Las muestras vegetales se cosecharán en septiembre, diciembre y mayo en zonas aledañas a la ciudad de General Pico, La Pampa, se secarán al abrigo de la luz y a temperatura constante. Un ejemplar de referencia fue identificado por los agrónomos Héctor Troiani y Pedro Steibel y depositado en el Herbario de la Facultad de Agronomía de la UNLPam, M. Boeris N° 17 (SRFA).

Metodología

Marcha Fitoquímica Preliminar

Se macerarán 5 g de materia seca y molida en 50 ml de metanol durante 20 horas a temperatura ambiente con 50 ml de metanol, luego el marco se extraerá en soxhlet 4 horas. El solvente de extracción se filtrará para obtener la Fracción A (FA). Se reservará una alícuota de 2 ml para determinar la presencia de taninos por la reacción de la gelatina y de cloruro férrico. Además se determinará la presencia de aminoácidos por la reacción de la Ninhidrina y flavonoides por la reacción de Shinoda.

La FA se llevará a sequedad en rotavapor y se extraerá con 15 ml de ácido clorhídrico al 1% a 50 °C. Se filtrará obteniendo una fracción ácida y una insoluble. La fracción insoluble se lavará con agua, se llevará a sequedad, se le agregará 5 ml de cloroformo, en caliente se filtrará obteniendo la Fracción B (FB). A esta fracción se le realizará la Reacción de Liebermann Burchard para determinar esteroides y de Borntrager para determinar quinonas.

La fracción ácida se alcaliniza con amoníaco y se extraerá con 25 ml de cloroformo (2x) para obtener la Fracción C (FC) que se utilizará para determinar la presencia de cardenólidos por la reacción de Kedde y esteroides por Liebermann Burchard. Esta misma fracción se llevará a sequedad y se acidificará con 2 ml de ácido clorhídrico para determinar la presencia de alcaloides por las reacciones de Mayer, Dragendorff, Hagen y Bertrand. La fase acuosa se extraerá con 25 ml de cloroformo:metanol (3:2, v/v) (2x) y se filtrará para obtener la Fracción D (FD). Esta fracción se llevará a sequedad y se agregará 2,5 ml de etanol, para determinar flavonoides por la reacción de Shinoda, leucoantocianidinas por la reacción de Rosenheim, cardenólidos y anillos lactona alfa y beta insaturados por reacción de Kedde, con el agregado de cloroformo se determinarán esteroides y triterpenos por la reacción de Liebermann Burchard y acidificada la fracción con ácido clorhídrico al 1 % se determinarán alcaloides por la reacción de Mayer y Dragendorff. La fase acuosa remanente es la Fracción E (FE) donde se determinarán flavonoides por la reacción de Shinoda y leucoantocianidinas por la reacción de Rosenheim.

A la droga vegetal seca se le realizará la reacción de Guignard y la reacción de Borntrager.

La Fracción F (FF) se obtendrá por decocción de 1 gr de droga vegetal seca en 10 ml de agua a 100 °C y se realizará la reacción de Ninhidrina y de Espuma.

Obtención de extractos hidroalcohólico, polvo, cristales y sobrenadante

Se describen a continuación los métodos de obtención de los extractos que exhibieron efecto antiinflamatorio y analgésico, a los cuales se les realizarán las reacciones de caracterización. Se repetirá este procedimiento con muestras vegetales recolectadas en los meses de septiembre, diciembre y mayo. En todas las pruebas colorimétricas se utilizará un patrón.

Extracto Hidroalcohólico (EHA): 50 g de partes aéreas desecadas y trituradas se macerarán durante 24 h (3 x) en 1 l de solución etanol - agua (1:1, v/v). El extracto se llevará a sequedad en rotavapor y se extraerá con metanol. El extracto metanólico se filtrará y el marco se secará en estufa para obtener el Polvo de *Salpichroa organifolia* (Polvo). El Polvo se colocará en una solución de agua acidulada : etanol durante 24 h obteniéndose cristales por precipitación (Cristales). La fracción sobrenadante también será utilizada para realizar reacciones de caracterización.

Reacciones de caracterización

Reacción de la gelatina

A 0,2 ml de la fracción problema se le agregan 0,2 ml de solución acuosa de gelatina al 0,5%. Se compara la turbidez o volumen de precipitado con el producido en las mismas condiciones por 0,2 ml de una solución acuosa de ácido tánico.

Reacción de Cloruro férrico

A una alícuota de 0,2 ml de la muestra se agrega solución acuosa o etanólica de FeCl₃ al 1% y se mezcla. La aparición de color verde sugiere la presencia de un derivado de catecol y de un color azul de un derivado de pirogalol. Se puede comparar el color con el producido en las mismas condiciones por 0,2 ml de una solución acuosa de ácido tánico.

Reacción de Shinoda

A una solución etanólica de 0,2 ml se le agrega la mitad del volumen de ácido clorhídrico concentrado, se mezcla y se agregan limaduras de magnesio. Se vuelve a mezclar y se deja 5 minutos, se le agrega 2 ml de agua y se trasvasa a un tubo y se agita con 0,4 ml de alcohol amílico. Se deja decantar y se compara el color de la fase amílica con el producido en las mismas condiciones por 0,2 ml de una solución metanólica de rutina.

Al extracto alcohólico incoloro o ligeramente amarillo se le coloca un pequeño trozo de magnesio y unas pocas gotas de HCl concentrado, el desarrollo inmediato de color es indicativo de la presencia de flavonas y flavonoides (amarillo a rojo), flavanololes (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo).

Reacción de la Ninhidrina

Se hace sobre papel, se coloca una gotita y se deja secar, se le agrega una cantidad similar de solución etanólica de ninhidrina al 0,2% y paralelamente se hace un ensayo en blanco. Se calienta el papel en estufa a 110-120°C hasta aparición de ligero color en el blanco. Se compara la mancha azul violácea con la de una solución testigo de triptofano en etanol al 50%.

Reacción de Liebermann Burchard

A 0,2 ml de solución clorofórmica se agregan 0,2 ml de anhídrido acético, se mezcla y agrega una gota de ácido sulfúrico concentrado. Se considera positiva la aparición de color azul, verde o naranja. Si el color es azul o verdoso se compara con el producido por una solución de colesterol en cloroformo, si es naranja se compara con el producido por diferentes soluciones de progesterona en cloroformo.

Reacción de Borntrager

Se agita la fracción líquida con 5 ml de hidróxido de sodio al 5% en agua y se observa el color que toma la fase acuosa. Se considera positiva si el color es rojo y se compara con el de una solución alcalina de 1-8-dihidroxi-antraquinona.

La reacción sobre la muestra seca en polvo se hace colocando 1 g de material pulverizado en tubo de ensayo, se agrega 15 ml de hidróxido de sodio al 5% en agua y se calienta a 100°C durante 20 minutos, se enfría, se filtra y se lleva a volumen. Se acidifica con ácido clorhídrico concentrado y se agita con 5 ml de benceno. Se deja decantar, se toman 2,5 ml de la fase bencénica, se pasa a otro tubo, se agita con 0,5 ml de sol. Acuosa de hidróxido de sodio al 5%. Se considera positiva la reacción si la fase acuosa toma color rojo. Se compara el color con el de una solución alcalina de 1-8-dihidroxi-antraquinona.

Reacción de Kedde

Se usa una microgota de la solución en papel de filtro, se deja secar y se agrega reactivo de Kedde. Se deja 5 minutos y se lee. La reacción en tubo se hace agregando a 0,2 ml de la solución etanólica 0,1 ml de reactivo de Kedde. Se efectúa un ensayo en blanco reemplazando el reactivo de Kedde por una solución de hidróxido de potasio 0,5 N. Se considera positiva la reacción si aparece coloración purpúrea o violeta. Se compara con el color producido en las mismas condiciones por diferentes soluciones de digitoxina en etanol.

Reacciones para alcaloides

Reacción de Mayer

A una fracción de 0,2 ml se le agrega el reactivo, iodomercuriato de potasio. Se considerará positiva la presencia de alcaloides cuando se observe precipitado

Reacción de Dragendorff

Igual a la anterior agregando iodobismutito de potasio, se considerará positiva la presencia de alcaloides cuando se observe precipitado

Reacción de Haggen

Igual agregando ácido pícrico saturado, se considerará positiva la presencia de alcaloides cuando se observe precipitado al agregar el reactivo,

Reacción de Bertrand

Se agrega el reactivo silico túngstico, se considerará positiva la presencia de alcaloides cuando se observe precipitado

Se compara el color con el producido en las mismas condiciones por diferentes soluciones de clorhidrato de quinina en agua.

Reacción de Rosenheim

Se agrega la mitad del volumen de ácido clorhídrico concentrado, se mezcla, se calienta durante 10 minutos a 100°C y luego se enfría, a la fracción alcohólica se le agrega 2 ml de agua. Se agrega 0,4 ml de alcohol amílico, se agita y se deja decantar para observar el color en la fase amílica. Se considerará positiva si aparece color que va desde el carmesí oscuro hasta el rosado débil.

Reacción de Guignard

Directamente sobre la droga en polvo, se coloca 0,5 g de droga seca recién pulverizada en un tubo de fondo chato, se humecta con cantidad suficiente de agua, se agrega una gota de cloroformo y se mezcla. Se tapa el tubo con un disco de papel picróside de tamaño adecuado, sostenido por un portaobjeto. Se calienta a 35°C

durante 3 h y se observa el color desarrollado. Se considera positiva la reacción cuando el color es rojo.

Prueba de la espuma

Se coloca 1 ml de la solución problema en un tubo de ensayo, se tapa y se agita fuertemente durante 15 segundos. Se lee a los 15 minutos la altura de la espuma, se considera negativa la reacción si la altura es menor a los 5 mm y muy positiva si supera los 15 mm.

Bioensayos

Test de la carragenina para evaluar actividad antiinflamatoria

Se utilizará el método descrito por Winter et al. (1962) con modificaciones. Se utilizarán grupos de 5 ratones cada uno con un ayuno de 16 h previo al experimento y con agua *ad libitum*. Se repetirán tantos ensayos como número de extractos se evalúen. La inducción del edema se provocará con 0,1 ml de una solución al 2 % de carragenina en solución fisiológica (0,9 % de NaCl p/v), inyectada subcutáneamente en el miembro posterior debajo de la aponeurosis plantar. Los extractos en estudio, incluyendo indometacina como Testigo, se administrarán por vía oral en una suspensión de carboximetilcelulosa al 0,1% y Tween 80 al 0,05 % una hora antes de la inyección de carragenina. El grupo control recibirá el vehículo solamente.

La inflamación se cuantificará midiendo el grosor de la almohadilla plantar, utilizando un calibre inmediatamente antes de la inyección de carragenina y a las 3, 5, 7 y 9 h posteriores. La diferencia entre el valor inicial y las distintas mediciones se considera como el grado de inflamación alcanzada (Δ). El efecto antiinflamatorio de los extractos se expresará en términos de porcentaje de reducción del edema, calculado por medio de la fórmula $[(\Delta C - \Delta T) / \Delta C] \times 100$, siendo ΔC la media del grupo control y ΔT la media del grupo tratado.

Las diferencias entre los grupos tratado y testigo a las 3, 5, 7 y 9 horas postratamiento se analizarán por medio del Test "t" de Student (Snedecor y Cochran, 1967).

Test de las contorsiones para evaluar actividad analgésica

Se realizará el método descrito por Koster et al. (1959), donde a un grupo de ratones se les administrará por vía intraperitoneal distintos extractos de la planta (Tratados) y el excipiente (Control), 30 minutos después por la misma vía serán administrados con ácido acético al 1 % en una dosis única de 0,2 ml por animal. Se utilizará ASA como testigo. Entre 5 y 10 minutos después se observará y se registrará el número de contorsiones que manifiesten los ratones. Se expresarán los resultados como porcentaje de inhibición en relación a los controles el cuál se calculará por medio de la fórmula $[(\Delta C - \Delta T) / \Delta C] \times 100$, siendo ΔC la media del grupo control y ΔT la media del grupo tratado.

6.3. CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS

Los estudios previos realizados en *Salpichroa organifolia* permitieron determinar que el extracto hidroalcohólico tiene actividad antiinflamatoria y analgésica. También fue posible demostrar que extractos purificados a partir del hidroalcohólico poseen actividad similar a AINEs utilizados en medicina veterinaria pero sin producir los efectos secundarios sobre la mucosa gástrica. Esta información resulta de interés ya que los principios activos que poseería esta planta podrían ser utilizados por la industria farmacéutica para elaborar antiinflamatorios y analgésicos que no interfieran con la síntesis de prostaglandinas. Pero para poder determinar el valor farmacéutico de estos compuestos deben ser aislados e identificados. Los estudios fitoquímicos guiados por bioensayos que se realizarán en este proyecto aportarán información básica para orientar a los investigadores en la búsqueda y elucidación de las estructuras químicas responsables de la actividad farmacológica.

Además, la puesta a punto de toda la batería de reacciones químicas empleadas en el desarrollo de este proyecto podrá ser utilizada en otros extractos con actividad farmacológica promisorias que se encuentran almacenados en el Banco de Extractos Vegetales del Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos de la FCV, UNLPam.

6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

Año 2009

<u>Objetivos</u>	<u>Acciones</u>	<u>Metodología que se utilizará</u>	<u>Cronograma de realización</u>												
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
Se recolectará y procesará el material vegetal para llevar a cabo la investigación	Recolección de la planta en las distintas épocas.	Secado en estufa con aire	+				+					+			+
	Secado y almacenado de la materia vegetal														
Se organizará y conseguirá los reactivos necesarios para llevar a cabo el perfil fitoquímico	Cotización y compra de los reactivos	Almacenamiento en lugares adecuados e inventario de los productos			+	+	+	+							
	Elaboración de los extractos y puesta a punto de las distintas técnicas utilizando testigos positivos	Realización de los protocolos detallados en las reacciones de caracterización								+	+	+	+	+	+

Año 2010

Objetivos	Acciones	Metodología que se utilizará	Cronograma de realización														
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D			
Se recolectará y procesará el material vegetal para llevar a cabo la investigación	Recolección de la planta en las distintas épocas.	Secado en estufa con aire y almacenamiento	+					+					+				+
	Secado y almacenado de la materia vegetal																
Se organizará y conseguirá los reactivos necesarios para llevar a cabo el perfil fitoquímico	Elaboración de los extractos. Actualizar el Drogiero. Reponer material de vidrio	Almacenamiento en lugares adecuados, inventariar los productos y el material de vidrio			+	+	+	+									
	Realizar pruebas colorimétricas y de precipitación	Realización de los protocolos detallados en los extractos de las muestras tomadas en distintas épocas del año											+	+	+	+	+

Año 2011

Objetivos	Acciones	Metodología que se utilizará	Cronograma de realización															
			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D				
Se realizarán los bioensayos con las fracciones con compuestos químicos de interés	Realizar el protocolo para correlacionar el compuesto químico con la actividad farmacológica	Test de la carragenina y test de las contorsiones por ácido acético			+	+	+	+										
	Actualizar el Drogiero. Reponer material de vidrio	Almacenamiento en lugares adecuados, inventariar los productos y el material de vidrio			+	+	+	+										
Se analizarán los datos obtenidos en los extractos de SALO en distintas etapas del año para establecer un perfil fitoquímico estacional	Analizar los datos	Gráficos y curvas para comparar la presencia de compuestos químicos en distintas épocas.											+	+	+	+	+	+

7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO

7.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:

El Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos de la FCV, UNLPam posee los equipamientos y comodidades necesarias para el desarrollo del proyecto.

El Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam proveerá los ratones para los bioensayos.

Las caracterizaciones de grupos químicos se realizarán en el CIDEF y se contará con la colaboración del grupo de investigación de Farmacognosia, de la Universidad Nacional del Sur.

Los bioensayos serán llevados a cabo en el Laboratorio del CIDEF

7.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD

- 1 manta para evaporar en soxhlet
- 1 pHmetro digital con sensor para tubo de ensayo
- 1 microondas

7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN

El CIDEF posee los elementos necesarios para desarrollar los estudios fitoquímicos previstos, sin embargo hay equipamiento que quedó obsoleto y debe ser reemplazado.

El laboratorio del CIDEF no tiene una manta térmica que permite mantener los solventes a temperatura constante, dicho elemento fue reemplazado hasta ahora por un calentador eléctrico con el inconveniente de la alta inflamabilidad de los elementos utilizados, siendo necesario aumentar la seguridad en el laboratorio en forma perentoria.

El laboratorio del CIDEF no cuenta con peachímetro digital para realizar estas determinaciones. Considerando las características físico-químicas de los extractos deberá adquirirse un equipo similar al utilizado para medir pH en alimentos.

El laboratorio del CIDEF no tiene un horno microondas y se justifica su adquisición para la esterilización de material plástico que de esta manera podrá ser reutilizado en las investigaciones fitoquímicas.

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN:

7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual)

7.5.1. PRESUPUESTO ESTIMADO POR AÑO PARA LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO

Año 2009

Equipamiento e Infraestructura.....	\$ 2.500
Bienes de Consumo.....	\$ 1.600
Bibliografía.....	\$ 400
Viajes.....	\$ 500
Personal de Apoyo.....	\$ -
Otros (especifique)	\$ -
TOTAL.....	\$ 5.000

Año 2010

Equipamiento e Infraestructura.....	\$ 2.500
Bienes de Consumo.....	\$ 2.800
Bibliografía.....	\$ 700
Viajes.....	\$ 1.500
Personal de Apoyo.....	\$ -
Otros (especifique)	\$ -
TOTAL.....	\$ 7.500

Año 2011

Equipamiento e Infraestructura.....	\$ 1.000
Bienes de Consumo.....	\$ 1.000
Bibliografía.....	\$ 500
Viajes.....	\$ 1.500
Personal de Apoyo.....	\$ -
Otros (especifique)	\$ -
TOTAL.....	\$ 4.000

7.5.2. PRESUPUESTO ESTIMADO PARA LA EJECUCIÓN TOTAL DEL PROYECTO

Año 2009 - 2011

Equipamiento e Infraestructura.....	\$ 6.000
Bienes de Consumo.....	\$ 5.400
Bibliografía.....	\$ 1.600
Viajes.....	\$ 3.500
Personal de Apoyo.....	\$ -
Otros (especifique)	\$ -
TOTAL.....	\$ 16.500

*** El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta las normas y criterios que el mismo determine.**

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, Jorge R., (1998). Tratado de Fitomedicina. Bases clínicas y farmacológicas. ISIS Ediciones SRL. Buenos Aires, Argentina
- Boeris, M. A., Toso, R. E., Skliar, M. I.. (2004) Actividad Antiinflamatoria de *Salpichroa origanifolia*. Acta Farmac. Bonaerense 23 (2), 138-141 ISSN 0326 2383
- Boeris, M.A. (2007). Purificación del extracto hidroalcohólico de *Salpichroa origanifolia*. Ciencia Veterinaria Vol. 9, 70 -74 ISSN 1515- 1883
- Burton, G. y Oberti, J., (2000). Withanolídeos en Solanaceae. Kurtiziana, 28: 81 -93.
- Del Castillo, V., Martín Herrera, D, Abdala Kuri, S., (1999) Bases analíticas del control de identidad y calidad de drogas. EN: Farmacognosia General. Villar del Fresno, A. Editor. Ed. Síntesis S.A., Madrid, España, pp. 59 - 70.
- Diéguez, R., Rivas, Y., Prieto-González, S., Garrido, G., Molina-Torres, J., (2004). Potencialidad del género *Zanthoxylum* como fuente de agentes con actividad biológica. Acta Farm. Bonaerense 23: 243-251
- Domínguez, X. A., (1979). Métodos de investigación Fitoquímica. Ed. Limusa, México D.F., México, pp. 81 -90.
- Koster, R., Anderson, M., De Beer, E.J. (1959). Acetic acid for analgesic screening. Federation Proceedings, 18: 412 -416.
- Kuklinski, C., (2000). Drogas analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. En: Farmacognosia, Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Ediciones Omega, Barcelona, pp. 219 -222.
- Lock de Ugaz, O., (1994). Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial, Lima, Perú. Pp 11.
- Lock de Ugaz, O., (1994). Terpenoides y esteroides. EN: Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial, Lima, Perú. Pp 23 - 91.
- Lock de Ugaz, O., (1994). Alcaloides. EN: Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial, Lima, Perú. Pp 211 - 238.
- Marzocca, A., (1997). Vademécum de Malezas Medicinales de la Argentina, Indígenas y exóticas. Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, Argentina. Pp 151.
- Pino-Rodríguez, S., Prieto-González, S., Pérez-Rodríguez, M., Molina Torres, J., (2004). Género *Erythrina*: fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica. Acta Farm. Bonaerense 23: 252-258
- Rondina, R. y Coussio, J., (1969). Estudio fitoquímico de plantas medicinales argentinas. Revista de Investigaciones Agropecuarias, INTA, Buenos Aires, Argentina. Serie 2, Biología y Producción Vegetal, Vol VI, 351- 366.

Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G., (1962). Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. Proceedings of Society of Experimental Biology and Medicine, 111: 544-547.