

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS
ETANÓLICO, HEXÁNICO, CLOROFÓRMICO, ACETATO DE ETILO Y
ACUOSO DE LAS HOJAS DEL ORÉGANO (*Lippia graveolens* H.B.K.)
COMO DIURÉTICO (FASE II).

JOVITA AIDE MORALES MEDINA

QUÍMICA FARMACÉUTICA

Guatemala, Octubre de 2004

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS
ETANÓLICO, HEXÁNICO, CLOROFÓRMICO, ACETATO DE ETILO Y
ACUOSO DE LAS HOJAS DEL ORÉGANO (*Lippia graveolens* H.B.K.)
COMO DIURÉTICO (FASE II).

Informe Final de Tesis

Presentado por
JOVITA AIDE MORALES MEDINA

Para optar al título de
QUÍMICA FARMACÉUTICA

Guatemala, Octubre de 2004

JUNTA DIRECTIVA

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Lic. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Roberto José Garnica Marroquín	Vocal IV
Br. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal V

DEDICATORIA

A DIOS Por darme el Don de la Vida y brindarme de tantas bendiciones.

A MIS PADRES Leopoldo Morales y Albertina Medina, por el amor, apoyo incondicional y confianza brindada durante toda mi vida.

A MIS HERMANOS Sergio y Leopoldo, por ser mis pilares y motivación en todo momento.

A MIS SOBRINOS Alexito, Alejandrita, Andresito, Ricardito y Adrianita por ser la luz de mis días, al llenarme de sonrisas y alegría.

A MI FAMILIA Por su cariño.

A OSCAR Por todo el amor y apoyo brindado.

A LAS FAMILIAS Villatoro González, Sacahuí Reyes, Suárez Rímola y González Rosales, por todo su aprecio y amistad.

A MIS AMIGOS Y AMIGAS Por todos los momentos de alegrías y tristezas que hemos compartido.

A MIS EX-ALUMNOS Por todo lo compartido y esperando que esto les sirva de motivación.

A COBÁN Por ser la tierra que me vio crecer.

A MI PATRIA GUATEMALA, A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA Y A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, Dra. Amarillis Saravia, por brindarme su confianza, apoyo, conocimientos y amistad.

A mi revisora, Licda. Raquel Pérez, por sus consejos y su amistad.

A Cristian, Nancy, Ana Lucia, Oscar, Lilian y Nadia por la ayuda brindada durante el desarrollo de este estudio.

Al personal de LIPRONAT por el apoyo brindado durante la realización de esta investigación.

Al departamento de Biología General por su colaboración para la realización de este estudio.

A mis catedráticos durante mi preparación profesional, principalmente al claustro de la Escuela de Química Farmacéutica por sus conocimientos y consejos.

Al personal Docente y Administrativo de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, especialmente a las escuelas de Química Farmacéutica y Biología, por su amistad y aprecio..

A mis compañeros y amigos de trabajo, por su apoyo y animo.

INDICE

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	
3.1 Orégano	4
3.2 Estudios Farmacológicos	7
3.3 Otros estudios relacionados	8
3.4 Extracción de Materias Primas	10
3.5 Extracción por Percolación	12
4. Justificación	13
5. Objetivos	15
6. Hipótesis	16
7. Materiales y Métodos	17
8. Resultados	31
9. Discusión de Resultados	45
10. Conclusiones	47
11. Recomendaciones	48
12. Referencias	49
13. Anexos	
13.1 Análisis Fitoquímico de los Extractos etanólico, hexánico, clorofórmico y acetato de etilo	53
13.2 Clasificación Botánica	61
13.3 Esquema de <i>Lippia graveolens</i>	61
13.4 Mercado Mundial del Orégano	62
13.5 Furosemida	63

1. RESUMEN

Guatemala posee una gran variedad de plantas, que milenariamente han sido utilizadas por la población para tratar la mayoría de las enfermedades. Actualmente se ha incentivado la producción de medicamentos que emplean como materia prima plantas regionales, y gracias a las investigaciones dedicadas a comprobar los efectos farmacológicos, los mejores métodos de extracción y a la identificación de los principios activos, se ha disminuido en gran manera la incidencia de distintas enfermedades dentro de la población.

Por tal motivo el Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, apoya dichas investigaciones al realizar estudios Farmacológicos; en este caso se realizó un estudio de Fase II de las propiedades diuréticas de *Lippia graveolens* (orégano), el cual se basó en un estudio anterior, en el cual se demostró su actividad diurética significativa de la infusión a dosis de 750mg/kg y 1000mg/kg.

Con el propósito de identificar los principios activos responsables de dicha actividad, se utilizaron solventes de diferente polaridad para separar los principios activos, obteniendo los extractos etanólico, hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y acuoso. El extracto etanólico se preparó por medio de la percolación de material vegetal y los otros extractos se obtuvieron por medio de particiones líquido-líquido.

Los extractos fueron evaluados a través del método para actividad diurética de Naik y colaboradores, modificado por Saravia, A. Se utilizaron ratas albinas, en grupos de 3 ratas cada uno, durante un período de experimentación de 5 días. Se realizaron 4 tratamientos por ensayo, de manera que dos de éstos fueron el fármaco de referencia (Furosemida) y el control, y los otros dos fueron un extracto a las dos dosis experimentales (25mg/kg y 100mg/kg).

El análisis estadístico de los resultados obtenidos, se realizó calculando el área bajo la curva diuresis versus tiempo como variable de respuesta, análisis de varianza (ANDEVA) de una vía

y al establecer diferencia entre los tratamientos, se realizó la prueba de Dunnett, para evaluar el efecto diurético frente al control, con un nivel de significancia de α de 0.05.

El análisis de la actividad diurética de los extractos demostró que ninguno de los extractos posee actividad diurética significativa en las dosis experimentadas. Para descartar la idea de una diuresis significativa a mayores dosis, se realizó un ensayo a dosis de 150mg/kg y 200mg/kg del extracto hexánico (el cual demostró mayor diuresis en comparación con el control), con 3 réplicas de cada grupo. Al analizar los resultados de este ensayo, se determinó que no se tiene actividad diurética significativa a ninguna de las dosis experimentadas (25mg/kg –200mg/kg).

Los resultados indican que la actividad diurética demostrada en la infusión de *Lippia graveolens*, se debe al sinergismo de todos los compuestos que contiene la planta, es decir que se da cuando la planta está completa sin ninguna separación de sus componentes por la polaridad de los mismos; además el análisis fitoquímico demostró la ausencia de aceites esenciales, a los cuales le atribuyen la mayoría de propiedades farmacológicas de la *Lippia graveolens* (Orégano).

2. INTRODUCCIÓN

En Guatemala existe una gran variedad de plantas que son utilizadas por la población para tratar la mayoría de las enfermedades, ya que por el bajo costo y la facilidad de obtención de ellas en relación con algunas medicinas, así como el uso tradicional muy arraigado en ciertos grupos, se ha fomentado un amplio uso de éstas (12.13).

Actualmente se ha incentivado la producción de medicamentos que emplean como materia prima plantas regionales, sobre todo por las empresas dedicadas a la producción de plantas medicinales y gracias a las investigaciones dedicadas a comprobar los efectos farmacológicos, los mejores métodos de extracción y a la identificación de los principios activos; disminuyendo en gran manera la incidencia de distintas enfermedades dentro de la población (12.13).

Con el propósito de colaborar con la producción de medicamentos destinados a combatir las enfermedades que afectan a nuestra población, se pretende continuar con el estudio farmacológico de primera fase realizado al orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.), en el que se demostró actividad diurética significativa, y en este estudio se pretendió determinar qué solvente extrae el mayor porcentaje de principios activos causantes de la actividad diurética del orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.) de acuerdo a la polaridad de los componentes, además de caracterizar los principios activos y la Dosis Letal Media (DL_{50}).

La investigación farmacológica consistió en el ensayo de la actividad diurética por medio del método Naik y col, modificado por Saravia, A., utilizando los extractos etanólico, hexánico, acetato de etilo, clorofórmico y acuoso. Luego se realizó la investigación fitoquímica, utilizando ensayos macro, semimicro y cromatografía de capa fina para la caracterización de metabolitos.

3. ANTEDECENTES

3.1 *Lippia graveolens* H.B.K. (Orégano)

3.1.1 Familia:

Verbenácea

3.1.2 Sinónimos:

Goniostachyum graveolens small; *Lantana originoides*; *Lippia amentacea*; *Lippia berlandeirei*; *Lippia tomentosa*; *Lippia bolandieri*; *Lantana graveolens* (12.15; 12.21).

3.1.3 Nombres comunes:

Orégano, orégano mexicano, orégano de cerro, orégano del monte, orégano de la tierra, mejorana, salvia, Hierba dulce, Xaak-ché, Xakilché (12.2; 12.6; 12.21).

3.1.4 Distribución Geográfica

California, Sur de Texas y Centroamérica (12.15; 12.21).

3.1.5 Hábitat

Lippia graveolens H.B.K. se encuentra en bosques secos y montes espinosos subtropicales, en pendientes pedregosas, en partes planas, húmedas o secas, a elevaciones bajas, de aproximadamente 300 a 400 msnm. En Guatemala es reportado en los departamentos de El Progreso, Zacapa y el Petén (12.2; 12.8; 12.21).

3.1.6 Descripción Botánica:

Planta arbústica delgada que puede llegar a medir hasta 2m de alto, ramas con pubescencia cortante pilosa. Están provistas de tricomas cortos. Hojas en peciolo 5-10mm de largo, oblongas e elípticas de 2-4cm de largo, obtusas o redondas en el ápice, subcordadas a la base, densamente pilosas. La hoja en el haz (cara superior) está provista de una cubierta densa de pelos suaves, y en el envés (cara inferior) hay muchas glándulas y muchos pelos. Los márgenes de las hojas son finamente cerradas. Las inflorescencias, espigas subglobosas, están en las axilas de las hojas. Las flores pequeñas son blancas, subglobosas a oblongas de 4-12mm de largo, brácteas ovado-lanceoladas, agudas; cáliz 1-2mm de largo, glandular; corola blanca, 3-6mm de largo (12.2; 12.7; 12.8; 12.11; 12.21).

3.1.7 Usos Medicinales

La decocción o infusión de hojas, se usa para tratar anemia, afecciones gastrointestinales y respiratorias, hidropesía, ictericia, amenorrea, dismenorrea y reumatismo. La decocción en leche se usa para tratar asma y bronquitis; un jarabe de las hojas secas se usa para tratar diabetes, disentería, catarro y resfríos.

Por sus propiedades desinfectantes la decocción se utiliza tópicamente para quemaduras, cicatrización de heridas, llagas e inflamaciones de la garganta; en baños se usa para fortalecer niños debilitados, combatir la gripe y para aliviar el prurito y la sarna; en cataplasma para madurar abscesos, calmar neuralgias y aliviar induraciones, cáncer y tumores; en fricciones y baños se usa como calmante. La planta fresca macerada en aceite se aplica a los dolores reumáticos.

Se le atribuye propiedad antitusiva, antidiarreica, broncodilatadora, antioxidante, antiséptica, aromática, calmante, carminativa, cicatrizante, desinflamante, diaforética, digestiva, diurética, emenagoga, espasmolítica, estimulante, expectorante, pectoral, sudorífica y tónica (12.2; 12.7; 12.8).

3.1.8 Composición química

Las hojas de *Lippia graveolens* H.B.K. contienen: aceite esencial (1.8%), glicósidos saponínicos, flavononas (pinocembrina, naringenina), lapachenol, icterogenina, taninos y triterpenos, celulosa, pigmento y elementos minerales. La corteza y raíz contienen glicósidos saponínicos, aceite esencial y taninos (12.2; 12.15).

El contenido de carvacrol y timol del aceite esencial varía considerablemente: de 40.1-60.6% de timol y de 3.1-21.2% de carvacrol, el rendimiento del aceite depende de la estación y las condiciones climáticas (12.5; 12.9).

Diferentes autores han reportado los siguientes compuestos en el aceite esencial de orégano: alcohol amílico, α -Pinoeno, dipenteno, p-cimeno, acetato de bornilo, timol, carvacrol, timoquinona y sesquiterpenos (α -humuleno, B-caryophylleno, B-bisaboleno). Las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial son: gravedad específica a 15°C de 0.9337 a 0.955; rotación óptica inactiva a 1°; índice de refracción a 20°C de 1.5024 a 1.5080; contenido de fenoles de 62.0 a 71%; soluble en 2.5 a 3 volúmenes de alcohol al 70%; color amarillo-rojizo, densidad 0.890-0.922; índice de refracción 1.479-1.498 (12.2; 12.15; 12.22).

3.1.9 Toxicología

Los extractos acuoso y etanólico de hojas de *Lippia graveolens* (500ppm) presentan cierta toxicidad dosis-dependiente contra peces del género *Mollinesia*. Su administración durante el embarazo está contraindicado, ya que puede producir aborto. El lapachenol tiene actividad carcinogénica y podría explicar cierta actividad antifertilidad atribuida. La DL del carvacrol por vía oral en conejos es 100mg/kg (12.2).

3.1.10 Indicaciones Terapéuticas

Por su acción antiséptica, digestiva y expectorante está indicado su uso por vía oral en el tratamiento de inapetencia, indigestión lenta, tos, faringitis, sinusitis, bronquitis y amenorrea. Se recomienda administrar tres veces al día en dosis de 2-4g en infusión, 1-3ml de extracto fluido, 4-6 gotas de esencia, 1-2 cápsulas de 50mg, 0.1-0.4g en supositorios. Tópicamente se aplican inhalaciones húmedas y aerosoles para tratar afecciones respiratorias. Por sus propiedades antisépticas y cicatrizantes la infusión y esencia en linimento y pomadas están indicadas para tratar heridas, tinea y dolores reumáticos; el cataplasma se aplica en los abscesos varias veces al día (12.2).

3.1.11 Agrotecnología y Rendimiento

Se puede reproducir por semilla o estaca de madera suave. Cultivada crece también en los lugares frescos. Presenta alta resistencia a la sequía. En cultivo experimental, fue sembrada en hileras a una distancia de 1m y la misma entre planta y planta. Puede tener problemas con ataque de bacterias y hongos, pero no con insectos. El rendimiento esperado es de 1,000kg por hectárea (12.13).

3.2 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS

En 1999 se realizó una evaluación farmacológica de la acción diurética de la infusión acuosa al 10% de la planta completa de *Lippia graveolens* (orégano), en el cual se utilizaron ratas hembras albinas entre 200g y 300g de peso, se utilizaron 12 ratas divididos en 4 grupos, al primer grupo se le administró furosemida a una dosis de 25mg/kg de peso como fármaco de referencia, al segundo se le administró agua como control, al tercero la infusión de orégano a 750mg/kg de peso y al cuarto grupo la infusión a dosis de 1000mg/kg de peso (12.10).

Los valores promedio de diuresis del primer grupo (grupo referencia) fue de 9.83ml, del grupo control de 4.87ml, del tercer grupo (infusión a dosis 750mg/kg de peso) 5.97ml y del cuarto grupo (infusión a dosis 1000mg/kg de peso) 7.00ml. Se determinó que la diuresis provocada por la infusión es dependiente de la dosis administrada, y que la infusión de *Lippia graveolens* posee un efecto diurético significativo (12.10).

Estudios antibacterianos demuestran que la tintura de hojas de *Lippia graveolens* es activa contra *E. Coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*, pero inactiva contra *H. influenzae*; la infusión de hojas demostró actividad contra los mismos microorganismos. Estudios antifúngicos demuestran que los extractos con diclorometano y etanol son activos contra *C. albicans*, *A. flavus*, *E. floccosum*, *M gypseum* y *T. rubrum*, pero inactivos contra *C. neogormans*. La CIM del extracto diclorometánico contra bacterias es 10mg/ml y del etanol es 1.75mg/ml; la CIM de la actividad contra *M gypseum* es de 2.5mg/ml (12.2).

3.3 OTROS ESTUDIOS RELACIONADOS

En un proyecto de investigación en Guatemala, se colectaron plantas de *Lippia graveolens* H.B.K. en diferentes lugares, con diferentes tipos de suelos, climas y altitudes, como en Baja Verapaz a 1425 msnm, Chiquimula a 700 msnm, El Progreso a 440 msnm y Zacapa a 200-300 msnm. De estas plantas guatemaltecas analizadas, se identificaron un total de 54 diferentes sustancias. Las poblaciones de la región de Zacapa tenían el contenido más alto de aceite esencial: 3.24% y 3.56% (12.16; 12.22).

En *Lippia graveolens* H.B.K. hay una marcada diferencia del contenido de aceite esencial entre tallos y hojas. Las hojas secas presentaron un contenido cuarenta veces mayor que los tallos. Pero también hay mucha diferencia en la composición del aceite: en los tallos tenía más sesquiterpenos, pero al mismo tiempo disminuyó el número de

monoterpenos. El contenido del componente de sabor, carvacrol, fue igual en hojas y tallos, mientras el contenido de timol era muy reducido en los tallos (12.21; 12.22).

En un estudio realizado en Guatemala, para establecer si existen diferencias entre los componentes mayoritarios presentes en los aceites esenciales de la especie *Lippia graveolens* H.B.K. en 9 regiones del país al igual que determinar los componentes mayoritarios en el aceite esencial; se concluyó que los mayores porcentajes de aceite esencial correspondían a las regiones de Guatemala (Facultad de Agronomía), El Progreso (Palo Amontonado) y Suchitepéquez (Finca San José); así mismo que los componentes mayoritarios identificados en todas las regiones del país fueron: p-cimol, 3-octanol y 1,8-cineol, mientras los demás componentes detectados son ocasionales: α -terpinoleno, (+)-limoneno, carbacrol, citronelol, linalol, anetol, geraniol y α -pineno (12.22).

Un estudio realizado con dos especies de *Lippia sp* (*Lippia alba* y *Lippia graveolens*) recolectadas en Guatemala, para obtener el aceite esencial por hidrodestilación, se determinó que el contenido en *Lippia graveolens* es de 0.26% p/v. Los componentes de éste fueron timol (31.6%) y sesquiterpenos. La fracción de sesquiterpenos estaba compuesta de Cariophyleno (4.6%) y óxido de cariophyleno (4.8%) (12.24).

En México se realizó un estudio en el que se demostró a través de ensayos científicos que el extracto hexánico de la *Lippia graveolens* H.B.K. muestra actividad antibacterial contra bacterias gram positivo y gram negativo (12.25).

3.4 EXTRACCIÓN DE MATERIAS PRIMAS VEGETALES

El primer paso para la extracción de materias primas vegetales es la selección del solvente dependiendo del propósito al que se destine. Se puede obtener un extracto que contenga la mayor parte de los constituyentes químicos de la planta para lo cual se usa un solvente de naturaleza general, de alta polaridad como el etanol o el metanol. Por otra parte se pueden extraer los constituyentes químicos con determinadas características utilizando un solvente más selectivo, de menor polaridad como por ejemplo el hexano que extrae sólo compuestos apolares (12.19).

Los solventes más usados en las industrias de productos fitoterapéuticos son el agua, el etanol, la glicerina, propilenglicol y mezclas de estos líquidos. En la industria de aislamiento de productos naturales puros, se utilizan hidrocarburos clorados, alcoholes, ésteres, éteres, cetonas y aceites (12.19).

En el proceso de elección de un solvente determinado deben considerarse aspectos como la selectividad, facilidad de manipulación, precio, seguridad ambiental y sobre todo la toxicidad del solvente. En el caso del aislamiento de productos naturales puros, pueden usarse solventes orgánicos o mezclas azeotrópicas (12.19).

Las variables que interfieren en el proceso de extracción, independientemente de la escala de producción o del tipo de producto final son: estado de división de la droga, agitación, temperatura, pH, naturaleza del solvente y el tiempo de extracción (12.19).

3.4.1 Estado de división de la droga:

Cuanto menor sea el tamaño de partícula mayor será la eficiencia del proceso debido a que existe mayor área de contacto entre la planta y el solvente. Sin embargo, partículas muy finas dificultan el proceso de percolación, pues se presentan procesos de compactación y formación de falsas vías (12.19).

3.4.2 Agitación.

Hace que nuevas cantidades de solvente, pobre en sustancias extraíbles, entren en contacto con el sólido y alcancen un nuevo punto de equilibrio de saturación (12.19).

3.4.3 Temperatura.

El aumento de la temperatura hace más fácil la disolución de sustancias extraíbles al contribuir al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación. El inconveniente está en que el aumento de la temperatura también causa la pérdida de sustancias volátiles, como los aceites esenciales (12.19).

3.4.4 pH:

Éste influye en la solubilidad de distintos compuestos debido a la posibilidad de formación de sales (12.19).

3.4.5 Naturaleza del solvente:

Entre los solventes generales se utilizan alcoholes de hasta 3 carbonos o mezclas de éstos con agua. Estos solventes logran extraer la mayoría de sustancias naturales de interés como alcaloides, flavonoides, glicósidos cardiotónicos y terpenos. Debido a su poder extractivo, estos solventes son los indicados para los casos en que los constituyentes activos de la planta no son bien conocidos, siendo necesario agotar completamente la droga. Cuando no existen estudios específicos, se recomienda utilizar una mezcla de alcohol: agua 7:3 ó 8:2 para partes leñosas, raíces y semillas; y una proporción 1:1 para las partes verdes, ya que esto evita la extracción de clorofila, sustancias polimerizadas y resinoides, que generalmente, no presentan actividad terapéutica (12.19).

3.4.6 Tiempo de extracción.

Éste debe ser suficiente para que permita la extracción de los compuestos de interés; pero no excesivo para evitar gastos en consumo de energía y de mano de obra no necesaria (12.19).

3.5 EXTRACCIÓN POR PERCOLACIÓN.

Este proceso consiste en hacer pasar el solvente a través de la droga, hasta su extracción exhaustiva completa. La percolación simple comprende una extracción exhaustiva con el solvente siempre renovado. En pequeña escala se utilizan aparatos denominados percoladores, de cuerpo cilíndrico o cónico, provistos de un grifo en la parte inferior para regular el flujo de solvente. La percolación comprende una etapa inicial de humedecimiento de la droga, fuera del percolador, para facilitar el paso del solvente y evitar la formación de falsas vías (12.19).

La percolación simple presenta la desventaja del alto consumo de solvente. Por esto, en condiciones industriales, es preferible usar la técnica de repercolación. En ésta, se hace recircular el mismo solvente a través de la droga por intermedio de bombas. Este procedimiento aumenta el tiempo de contacto de la droga con el solvente y aumenta la eficiencia del proceso (12.19).

4. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, en Guatemala se ha incrementado la pobreza, lo que ha perjudicado principalmente la salud, sobre todo por el problema de la desigualdad en la atención a los diferentes estratos de la población. Los servicios de salud disminuyen en relación con el nivel de pobreza y la distancia de los centros urbanos. Muchas de las enfermedades que afectan a la población son previsibles y curables, en la medida que la población cuente con los recursos para acceder a medicamentos.

Una alternativa para proporcionar medicamentos a bajos precios es la producción de medicamentos que utilicen como materia prima plantas nativas que se han utilizado desde nuestros ancestros con gran eficacia.

Hace algunos años las plantas eran las principales materias primas de los medicamentos, pero por la dificultad de su obtención y la poca uniformidad de su calidad, fueron desplazadas por las sustancias sintéticas, las cuales no presentan estos problemas aunque aumentan el costo de los medicamentos.

No obstante, existen empresas dedicadas a la producción de plantas medicinales y gracias a las investigaciones dedicadas a comprobar los efectos farmacológicos, los mejores métodos de extracción y a la identificación de los principios activos, se ha incentivado la producción de medicamentos que emplean como materia prima plantas regionales, disminuyendo en gran manera la incidencia de distintas enfermedades dentro de la población.

Actualmente se han realizado varias investigaciones para comprobar la actividad terapéutica que se les atribuye a las plantas, tal es el caso del Orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.), el cual en un estudio farmacológico de primera fase, se comprobó su actividad diurética significativa.

Con el propósito de colaborar con la producción de medicamentos destinados a combatir las enfermedades que afectan a nuestra población, se pretende determinar qué solvente extrae el mayor porcentaje de principios activos causantes de la actividad diurética del orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.) de acuerdo a la polaridad de los componentes, además de caracterizar los principios activos de éste y la Dosis Letal Media (DL₅₀).

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GENERALES

- 5.1.1 Contribuir al estudio farmacológico y fitoquímico de las plantas nativas de Guatemala.
- 5.1.2 Proporcionar información que beneficie la producción de medicamentos a base de plantas medicinales con actividad diurética.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 5.2.1 Evaluar la actividad diurética de los extractos de hojas de *Lippia graveolens* H.B.K.(orégano).
- 5.2.2 Determinar el extracto de *Lippia graveolens* H.B.K. (orégano) que posee mayor actividad diurética.
- 5.2.3 Identificar los principios activos que posee la *Lippia graveolens* H.B.K. (orégano) a través de un estudio fitoquímico.
- 5.2.4 Determinar la dosis letal media (DL₅₀) del extracto de *Lippia graveolens* H.B.K.(orégano) que presentó mayor actividad diurética.

6. HIPÓTESIS

Al menos uno de los extractos obtenidos a partir de las hojas de *Lippia graveolens* H.B.K. (orégano) posee actividad diurética significativa, demostrable en un modelo animal.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 UNIVERSO DEL TRABAJO

Extractos de etanol, hexano, cloroformo, acetato de etilo y acuoso obtenidos de las hojas de *Lippia graveolens* H.B.K. (orégano).

7.2 MEDIOS

7.2.1 Recursos Humanos

- Autora del Trabajo: Jovita Aide Morales Medina.
- Asesora: Dra. Amarillis Saravia.

7.2.2 Recursos Materiales

- Planta: 300g de hojas de *Lippia graveolens* H.B.K.(orégano).
- Tamiz No. 5
- Solventes: etanol, hexano, cloroformo, acetato de etilo y agua.
- Rotavapor marca Buchi RE 111
- Balanza analítica
- Percolador
- Ratas y ratones albinos, adultos de un mismo sexo.
- Fármaco de referencia: furosemida.
- Jaulas metabólicas, tipo Fischer.
- Material y equipo de laboratorio (cristalería, estufa, etc.)

7.3 PROCEDIMIENTO

7.3.1 Revisión bibliográfica.

7.3.2 Recolección de las hojas de *Lippia graveolens* H.B.K. (orégano) en Samayac, Suchitepéquez.

7.3.3 Identificación de la planta.

7.3.4 Herborización de las hojas de *Lippia graveolens* H.B.K. (orégano).

7.3.5 Tamizado de las hojas de *Lippia graveolens* H.B.K. (orégano), utilizando un tamiz No.5.

7.3.6 Preparación de los extractos:

a. Obtención del extracto etanólico: En un percolador de 2000ml adaptado, se extrajo el material vegetal seco de hojas con 1500ml de etanol por medio de percolación a temperatura ambiente y durante varios días se repitió este procedimiento. Se procedió a filtrar el extracto obtenido y se reconcentró en rotavapor a temperatura controlada menor de 45°C y a presión reducida. Finalmente se llevó a sequedad en una desecadora con sílica gel (12.1).

b. Obtención del extracto hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y acuoso: se disolvió lo obtenido del extracto etanólico en etanol al 70% al cual se le realizó una partición líquido-líquido con disolventes de distinta polaridad: hexano, cloroformo, acetato de etilo y agua. Los disolventes se eliminaron por concentración con rotavapor (12.1).

7.3.7 Formulación de los extractos

Cantidades conocidas de los extractos se formulan con TWEEN 80, para el caso de los extractos insolubles en agua; y de agua para el caso contrario, a manera de aproximadamente 0.5 a 1 ml de suspensión o solución por vía oral a cada rata (12.1).

7.3.8 Ensayo de la actividad diurética.

Se utilizó el método de Naik y col, modificado por Saravia, A. Se utilizaron 12 ratas albinas, del mismo sexo, divididas en grupos de 3 ratas cada uno, y en ayuno de 24 hrs con un rango de peso entre 160-200g, durante un período de experimentación de 5 días (12.14).

Se realizaron 4 tratamientos por ensayo, de manera que dos de estos fueron el fármaco de referencia y el control, y los otros dos fueron dosis diferentes de un mismo extracto, se obtuvieron 6 replicas por tratamiento (12.14).

Al grupo de ratas control se les administró una solución acuosa de TWEEN. Al grupo del fármaco de referencia se les administró furosemida a una dosis de 25mg/kg de peso, y a los grupos experimentales se les administró las formulaciones de los extractos etanólico, hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y acuoso, en dosis calculadas mediante una progresión geométrica (12.14).

La administración de los diferentes extractos se realizó por vía oral con una sonda orogástrica. Posteriormente se colocaron las ratas en jaulas metabólicas individuales para su observación. El volumen de orina se midió cada día, primero en condiciones normales, después a las 2, 4 y 6 hrs de administrados los diferentes extractos de la planta, la sustancia de referencia y un vehículo acuoso que se uso como control (12.14).

7.3.9 Ensayo toxicológico

Método de Spearman y Karber.

Se determina la DL_{50} al extracto que presente un efecto diurético significativo comparado con el fármaco de referencia. El ensayo preliminar se trabaja con 5 lotes de 5 ratones albinos, con un peso aproximado de 20 gramos procedentes de una misma camada. La alimentación es idéntica para todos los sujetos experimentales (12.3; 12.17; 12.20).

La sustancia a ensayar se administra por vía oral y la dosis se aumenta en progresión geométrica, se evalúan dosis diferentes, siendo estas: 250, 350 y 450 mg/kg de peso, observándose el comportamiento de los ratones y número de animales muertos. La muerte puede manifestarse a las 1, 2, 4, 6, 24, 48 horas y un máximo de 8 días o bien morir instantáneamente o pocos minutos después de administrar la dosis. El extracto a ensayar se administra por vía oral, la mortalidad se anota 8 días después del ensayo. A dosis altas, la muerte aparece en algunos minutos, a veces instantáneamente. Los signos precursores de muerte pueden ser temblores, sialorrea, sudores, espasmos respiratorios, convulsiones, etc (12.3; 12.17; 12.20).

Cálculos: se aplica la fórmula de Karber y Behrenus:

$$DL_{50} = Df - \frac{(a) \times (b)}{(n)}$$

Df = Primera dosis que mata todos los animales

a = suma de muertes de 2 lotes consecutivos/2

b = Diferencia entre 2 dosis consecutivas.

n = número de animales por lote

Los resultados para la dosis letal 50 son dados en miligramos o gramos por kg de peso.

$$DL_{50} = X \text{ mg/kg}$$

$$DL_{50} = X \text{ g/kg}$$

(12.3; 12.17; 12.20)

7.3.10 Caracterización Fitoquímica.

Se realizaron ensayos macro y semimicro en los que se evaluó la formación de precipitados y complejos coloreados. Se utilizaron técnicas de cromatografía en capa fina (CCF) convencionales para la caracterización fitoquímica.

7.3.10.1 Investigación de Alcaloides.

a. Ensayos macro y semimicro:

Pesar 0.001g del extracto. Agregar 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10% (p/v), luego añadir 25ml de metanol a 60° C. Filtrar con papel Whatman No.1 y acidificar el filtrado con ácido clorhídrico 2N. La solución resultante dividirla en 4 tubos y evaluar de la siguiente manera:

- Tubo 1: Agregar 5 gotas del reactivo de Mayer's.
- Tubo 2: Agregar 5 gotas del reactivo de Dragendorff.
- Tubo 3: Agregar 5 gotas del reactivo de Wagner.
- Tubo 4: Testigo.

Usar como estándar soluciones al 1% de atropina y papaverina. Observar durante 2 horas la existencia de precipitados, turbidez o precipitación de complejos en los tubos (12.12; 12.18).

b. Cromatografía en Capa Fina:

Pesar 0.01g del extracto, agregar 1 ml de hidróxido de amonio al 10% (p/v) y extraer con 5ml de metanol. Aplicar en una placa de sílica gel 60F₂₅₄, utilizando como estándar una solución de atropina y papaverina al 1% en metanol (10 microlitros).

Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo-dietilamina (70:20:10).

Detección:

- Sin tratamiento químico:
 - UV-254nm: Algunos alcaloides como purinas y brucinas muestran fluorescencia.

- UV-365nm: Algunos alcaloides muestran fluorescencia azul o amarilla.
- Con Tratamiento químico:
Reactivo de Dragendorff. En visible se observan manchas café o anaranjadas, estos colores son inestables. Para remarcar se puede rociar luego del reactivo dragendorff una solución al 5% de nitrato de sodio o ácido sulfúrico al 5% (12.23).

7.3.10.2 *Investigación de Flavonoides y Antocianinas*

a. Ensayos macro y semimicro:

Extraer 0.01g del extracto con 10ml de etanol o metanol al 80%. Triturar con 15ml de éter de petróleo hasta que la extracción sea incolora. Disolver el residuo en 30ml de metanol al 80%, filtrar y dividir en 5 tubos:

- Tubo 1: Agregar HCl 2N en n-propanol, dejar en reposo de 15 a 30 minutos. Color rojo-violeta, da positivo.
- Tubo 2: Agregar 3 a 5 gotas de FeCl₃ al 10% (p/v). Azul-verde, catequinas.
- Tubo 3: Agregar 0.5ml de HCl concentrado y calentar en baño María por 5 minutos. Prueba para leucoantocianinas de rojo a violeta.
- Tubo 4: Agregar magnesio metálico y 0.5ml de HCl concentrado. Flavonas: anaranjado-rojo, flavonoles: carmesí-magenta, heterósidos agliconas: verde-azul.
- Tubo 5: Testigo.

Evaluar reacciones, cambios de color o formación de precipitados comparados con el testigo (12.12; 12.18).

b. Cromatografía en capa fina para detección de Flavonoides:

Mezclar 0.01g del extracto con 10ml de metanol. Aplicar sobre las cromatoplasmas de sílica gel 60F₂₅₄. Como estándar emplear solución de flavonoides al 0.05% en metanol (10 microlitros).

Fase Móvil: Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua (100:11:11:27).

Detección:

- Sin tratamiento Químico:
 - UV-254nm: Todos los flavonoides fluorescen, se ven como zonas azules oscuras sobre amarillo.
 - UV-365nm: Dependiendo del tipo de estructuras, los flavonoides fluorescen amarillo, azul o verde.
- Con tratamiento Químico:

Reactivo de Productos Naturales (NP/PEG). Solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina (NP), solución etanólica al 5% de polietilenglicol (PEG), (10:8). Intensa fluorescencia es producida inmediatamente después de 15 minutos en UV-365nm. La fluorescencia depende de la estructura:

 - Flavonoles:
 - Glicósidos de quercetina y miricetina: anaranjados.
 - Glicosidos de kanferol e isorametina: amarillo-verde.
 - Flavonas:
 - Glicosidos de luteolina: anaranjado
 - Glicosidos de apigenina: amarillo-verde (12.23).

c. Cromatografía en capa fina para detectar Antocianinas:

Pesar 0.01g del extracto, mezclar con 10ml de metanol. Aplicar sobre las cromatoplasmas de sílica gel 60F₂₅₄. Como estándar emplear solución de azul de metileno (5mg/10ml de metanol) y rojo sudán/amarillo naflor (5mg naflor/5ml metanol y 5mg sudán /5ml cloroformo).

Fase Móvil: n-butanol, ácido acético glacial, agua (40:10:20)

Detección:

- Sin Tratamiento Químico: rojo o azul-violeta en visible y UV-365nm.
- Con Tratamiento Químico: Visible azul-violeta, y rojo-violeta a UV-365nm.

Anisaldehído-ácido sulfúrico. Luego de rociar, calentar de 5 a 10 minutos la cromatoplaca (12.23).

7.3.10.3 Investigación de Antraquinonas

a. Prueba de Borntrager:

Pesar 0.01g del extracto y disolver en 10 ml de etanol al 80%. Extraer con 10 ml de benceno. A la fase bencénica añadir 5ml de solución de test de amonio y agitar. Observar cambios de color en la fase alcalina (color rojo, rosado: positivo) (12.12; 12.18).

b. Cromatografía en capa fina:

Pesar 0.01g del extracto y disolver en 5 ml de metanol. Aplicar 10 microlitros en la cromatoplaca de sílica gel 60 F₂₅₄. Como estándar se utiliza una solución al 0.1% en metanol de antraquinonas (10 microlitros).

Fase Móvil: acetato de etilo-metanol-agua. (100:17:13)

Detección:

- Sin Tratamiento Químico:

En UV-365nm se observan los derivados de antraquinonas con colores como amarillo, rojo y café fluorescente.

- Con Tratamiento Químico:

Solución etanólica de hidróxido de potasio al 5% o 10%.

Antraquinonas: zonas rojas en visible y fluorescencia roja en UV 365nm.

Antronas y antralonas: zonas amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV 365nm (12.23)

7.3.10.4 Investigación de Cumarinas:

a. Ensayos macro y semimicro:

Pesar 0.001g del extracto disolver en 10ml de metanol, agregar 1ml de agua destilada hirviendo. Con un capilar aplicar dos manchas en papel filtro.

A una mancha agregar 1 gota de KOH 0.5N. Observar bajo luz UV a 365nm (fluorescencia azul o verde: positivo) (12.12; 12.18).

b. Cromatografía en Capa Fina:

A 0.01g del extracto adicionar 10ml de metanol. Aplicar 20 microlitros en una cromatoplaaca de sílica gel 60 F₂₅₄. Como estándar se utiliza canela en metanol al 1%.

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7).

Detección:

• Sin Tratamiento Químico:

- UV-254nm: Todas las cumarinas muestran fluorescencia.
- UV-365nm: Todas las cumarinas simples muestran una fluorescencia intensa azul o azul-verde. Las furanocumarinas algunas veces muestran fluorescencia amarilla, café o azul.

• Con Tratamiento Químico:

Solución etanólica de KOH al 5% o 10%. Fluorescencia azul o verde en UV 365nm. Las cumarinas no sustituidas muestran fluorescencia amarillo-verde en UV-365nm (12.23).

7.3.10.5 Investigación de Cardenólidos y Bufadienólicos.

a. Presencia de lactonas insaturadas:

Pesar 0.003g del extracto y disolver en 10ml de etanol al 80%. Colocar tres manchas del extracto (0.1, 0.2 y 0.3 ml) sobre un papel filtro. Secar y agregar unas gotas del reactivo de Kedde. Secar el papel filtro y observar cambio de color (mancha o anillo púrpura: positivo). Usar como estándar un extracto de *Digitalis purpurea* en metanol al 80% (12.12; 12.18).

b. Presencia de azúcares 2-desoxigenadas:

Evaporar 10ml del extracto etanólico o metanólico, eliminar los pigmentos coloreados con éter de petróleo. Secar el residuo y agregar 3ml

del reactivo de S  ller-Killiani. Pasar a un tubo, mezclar y resbalar 1-2ml de ácido sulfúrico concentrado en la pared del tubo. Observar la formación de un anillo en la interfase (anillo púrpura: positivo) (12.12; 12.18).

c. Cromatografía de capa fina:

A 0.01g del extracto agregar 20ml de etanol al 50%. Aplicar 30-50 microlitros en la cromatoplaaca de sílica gel 60 F₂₅₄. Utilizar como estándar digoxina 5mg/2ml de metanol (20 microlitros).

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10).

Detección:

• Sin Tratamiento Químico:

- UV-254nm: Los cardenólidos producen fluorescencia, pero muchas zonas fluorescentes son producidas por bufadienolidos.
- UV-365nm: Los glicósidos carden  licos no fluorescen en esta longitud de onda.

• Con Tratamiento Químico:

Cloruro de antimonio (SbCl₃). Luego de rociar se calienta a 100   C por 6 minutos y se observa inmediatamente en UV-365nm. En visible se observan zonas violeta o café. De acuerdo a la fluorescencia que se presente en UV-365nm se detectan:

- Derivados de strophantidina: anaranjado, café pálido o amarillo-verde.
- Glicósidos Digitálicos: azul oscuro, café oscuro o azul claro.
- Glicósidos olender: azul claro.
- Bufadienolidos: amarillo-café, verde pálido o amarillo (12.23).

7.3.10.6 Investigación de Saponinas.

a. Prueba de Espuma:

- Tubo 1: 0.001g del extracto.
- Tubo 2: 2ml del control de saponinas (0.5%)

- Tubo 3: 2 ml de agua.

A cada tubo se le adiciona 10ml de agua destilada. Calentar en baño de María (60°C) durante 30 minutos. Enfriar, tapar los tubos, agitar vigorosamente 30 a 40 segundos. Dejar reposar los tubos durante 30 minutos. Observar la formación de capa de espuma. Si una capa de espuma mayor a 3cm persiste en la superficie líquida después de 30 minutos se presume la presencia de saponinas (12.12; 12.18).

b. Cromatografía en Capa Fina:

Pesar 0.01g del extracto y disolver en 10ml de metanol. Evaporar a 5ml y proceder a aplicar de 2-40 microlitros en una cromatoplaque de sílica gel 60 F₂₅₄. Se utiliza como estándar saponinas al 0.1% en metanol (10 microlitros).

Fase Móvil: cloroformo-metanol-agua (64:50:10).

Detección:

- Sin Tratamiento Químico:

Con excepción del ácido glicirrético, las saponinas no son detectadas por la exposición a UV-254nm o UV-365nm.

- Con Tratamiento Químico:

Vainillina- ácido sulfúrico. La placa se rocía con 10ml de ácido sulfúrico al 5% e inmediatamente con 5-10ml de vainillina en etanol al 1%. Luego se calienta a 110° C por 5-10min. Se observa en visible y las saponinas se muestran azules o azul-violeta, algunas veces se observan amarillas (12.23).

7.3.10.7 Investigación de Principios Amargos:

a. Cromatografía en Capa Fina: Pesar 0.01g del extracto y disolverlo en 10ml de metanol. Aplicar en cromatoplaque de sílica gel 60 F₂₅₄.

Estándar: artemisina al 1% en metanol (20 microlitros).

Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua. (77:15:8)

Detección:

- Sin Tratamiento Químico:
 - UV-254nm: Substancias con doble conjugación muestran fluorescencia.
 - UV-365nm: algunas muestran fluorescencia inespecífica.
- Con Tratamiento Químico:

Vainillina-ácido sulfúrico. Observar después de calentar a 100° C por 10 minutos. La placa se observa en visible:

 - Neohesperirina, naringina, harpagoside: rojo-violeta.
 - Gentiopicroside, swertiamarina: café-rojo
 - Condurangina: azul-verde.
 - Foliamentina, mentiafolina, quasina: azul
 - Marrubina, absintina, cnicina: azul (12.23).

7.3.10.8 Investigación de Taninos.

a.Ensayos macro y semimicro:

Pesar 0.001g del extracto, disolver en 30ml de etanol o metanol al 80%. Añadir 25ml de agua caliente, agitar con varilla y dejar enfriar. Agregar 1ml de solución de NaCl al 10% y filtrar. Adicionar 3ml del filtrado a 4 tubos de ensayo:

- Tubo 1: testigo
- Tubo 2: agregar 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1% (p/v)
- Tubo 3. Agregar 4 a 5 gotas de gelatina sal (1% de gelatina y NaCl al 10%)
- Tubo 4: agregar 3 a 4 gotas de solución de FeCl₃ al 10% (p/v).

Observar la formación de precipitado o cambio de coloración.

Con FeCl₃: grisáceo-negro: catecol, negro-azulado: piragalol (12.12; 12.18).

7.3.10.9 *Investigación de Glicósidos Cianogénicos*

a. Prueba de Guignard:

Colocar 0.005g del extracto en un erlenmeyer de 125ml y humedecer con agua, adicionar 1ml de cloroformo. Aparte, introducir una tira de papel Whatman No.1 en picrato de sodio (recién preparado) y posteriormente secar: la tira de papel húmedo insertarla en el erlenmeyer que contiene el material vegetal evitando que toque las paredes y dejar a una distancia de 1cm de la muestra. Doblar el papel y tapar el erlenmeyer con un corcho. Calentar en baño de María a 37°C durante 3 horas o más. Observar cualquier cambio de color en el papel (de color amarillo a rojo o rojo-café) (12.12; 12.18).

7.3.10.10 *Investigación de Aceites Volátiles.*

a. Cromatografía en Capa Fina: pesar 0.01g del extracto y diluir en 1ml de tolueno. Aplicar de 20 a 50 microlitros en cromatoplaque de sílica gel 60 F₂₅₄.

Estándar: eugenol, mentol, timol, citral, diluido 1:30 en tolueno.

Fase móvil: tolueno-acetato de etilo (93:7)

Detección:

- Sin Tratamiento Químico:

- UV-254nm: Todos los componentes que poseen dos doble conjugación aparecen como zonas oscuras y luego fluorescen a verde claro.
- UV-365nm: Algunos presentan fluorescencia azul, como metil antranilato.

- Con Tratamiento Químico:

Anisaldehído-ácido sulfúrico. La placa se rocía con 10ml y se calienta a 100° C por 5-10 minutos. En visible, los componentes de aceites esenciales muestran zonas azul, verde rojo y café. Algunos componentes fluorescen en UV-365nm (12.23).

7.3.11 Diseño experimental.

El diseño que se utiliza es totalmente al azar con cuatro tratamientos: control, medicamento de referencia, extracto con dosis de 25mg/kg y extracto con dosis de 100mg/kg. Cada tratamiento es por extracto y utilizando 6 replicas (3 replicas por semana). Asumiendo $\alpha = 0.05$ y $\beta = 0.20$ y un límite de error igual a dos desviaciones estándar. Cada semana de tratamiento se medirá con diferente lote de ratas (12.3; 12.17).

7.3.11.1 La variable de respuesta medida es el área bajo la curva de diuresis versus tiempo, para cada grupo de tratamiento, calculada por los días de experimentación.

7.3.11.2 Se hace un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía, para evaluar las siguientes hipótesis de prueba:

- a. H_0 : Todos los tratamientos tienen la misma actividad diurética.
- b. H_a : Al menos uno de los tratamientos tiene una actividad diurética diferente.

Al rechazarse H_0 se hace la prueba de Dunnett para comparar el fármaco de referencia y los extractos de la planta frente al control.

(12.3; 12.17)

8 RESULTADOS

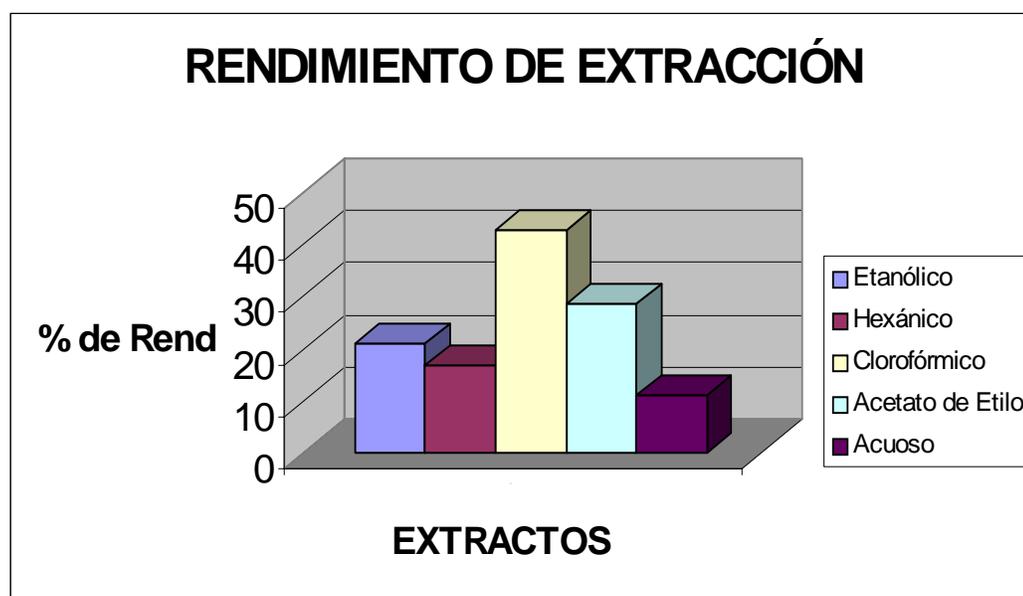
8.1 RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN:

Se partió de 300 g de material seco de *Lippia graveolens* (orégano), luego se tomaron 21.1g del extracto etanólico para realizar el fraccionamiento y obtener así el extracto hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y acuoso.

Tabla 1. Rendimiento de Extracción

Extracto	Peso inicial de Muestra	Peso de Extracto obtenido	Porcentaje de Rendimiento
Etanólico	300 g de planta	60.32 g	20.10%
Hexánico	21.1 g de extracto etanólico	3.56 g	16.87 %
Clorofórmico	21.1 g de extracto etanólico	9.06 g	42.93 %
Acetato de Etilo	21.1 g de extracto etanólico	6.05 g	28.67 %
Acuoso	21.1 g de extracto etanólico	2.33 g	11.09 %

Gráfica 1. Rendimiento de Extracción



8.2 EXTRACTO ETANÓLICO

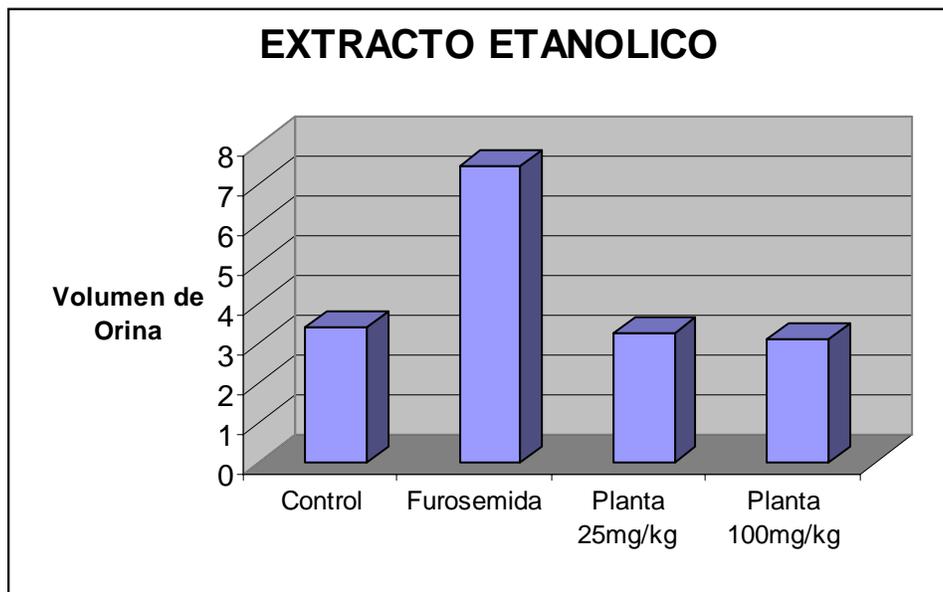
8.2.1 Resultados.

Tabla 2. Resultados de Ensayo Farmacológico del Extracto Etanólico

GRUPOS	DÍA 1			DÍA 2			DÍA 3			DÍA 4			DÍA 5			<i>Media</i>
	2hr	4hr	6hr													
Control	3	3	4	3	4	5	2	3	4	1	2	2	1	2	4	3.38
	0	0	4	3	3	4	0	3	3	1	4	4	1	2	2	
	0	0	4	0	2	2	0	2	2	1	3	3	2	2	4	
	0	1	1	2	2	4	2	3	4	1	2	2	0	1	3	
	1	2	2	3	3	6	1	2	2	2	4	8	2	3	6	
	0	2	3	1	1	2	1	2	2	1	2	4	0	1	2	
<i>Media</i>			3			3.8			2.8			3.8			3.5	
Furosemina 25mg/kg	8	8	9	6	6	8	5	10	10	6	8	8	8	10	12	7.42*
	4	4	4	8	8	10	8	10	10	8	9	9	3	6	6	
	2	4	6	6	9	11	4	5	7	6	8	10	10	11	13	
	1	2	2	3	4	6	2	2	4	2	6	8	2	3	5	
	4	4	4	7	8	10	3	4	4	4	6	8	3	5	7	
	2	3	4	5	5	5	10	10	10	2	5	6	4	5	7	
<i>Media</i>			4.8			8.3			7.5			8.2			8.3	
Extracto 25mg/kg	0	2	2	0	1	2	1	3	3	1	2	3	0	2	2	3.26
	3	3	3	4	4	5	0	2	2	0	2	2	2	4	6	
	2	2	4	0	2	2	2	2	3	1	2	2	1	2	2	
	1	2	3	1	3	5	2	3	4	1	2	3	0	2	4	
	0	1	2	0	2	4	3	6	7	2	2	3	0	1	4	
	1	1	2	2	2	4	1	2	2	1	1	3	1	2	4	
<i>Media</i>			2.7			3.7			3.5			2.7			3.7	
Extracto 100mg/kg	0	3	4	0	2	2	2	2	3	2	4	5	1	3	3	3.12
	0	4	4	2	3	5	2	3	6	1	2	4	1	2	4	
	0	3	3	0	2	2	0	2	2	1	1	2	0	2	2	
	0	2	2	2	2	3	0	2	3	1	2	4	2	2	3	
	0	0	0	2	2	2	2	2	2	1	3	4	2	3	4	
	1	2	2	1	2	3	2	2	4	1	3	4	0	1	3	
<i>Media</i>			2.5			2.8			3.3			3.8			3.2	

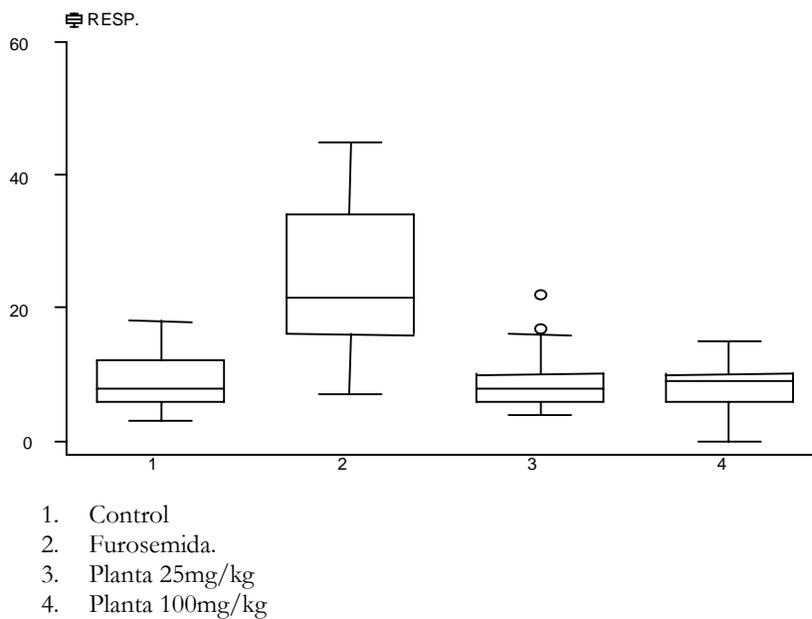
* Valor P menor a 0.05

Gráfica 2. Resultados del Ensayo Farmacológico del Extracto Etanólico



8.2.2 Comparación de los Tratamientos.

Gráfica 3. Comparación de Tratamientos del Extracto Etanólico



8.3 EXTRACTO HEXÁNICO

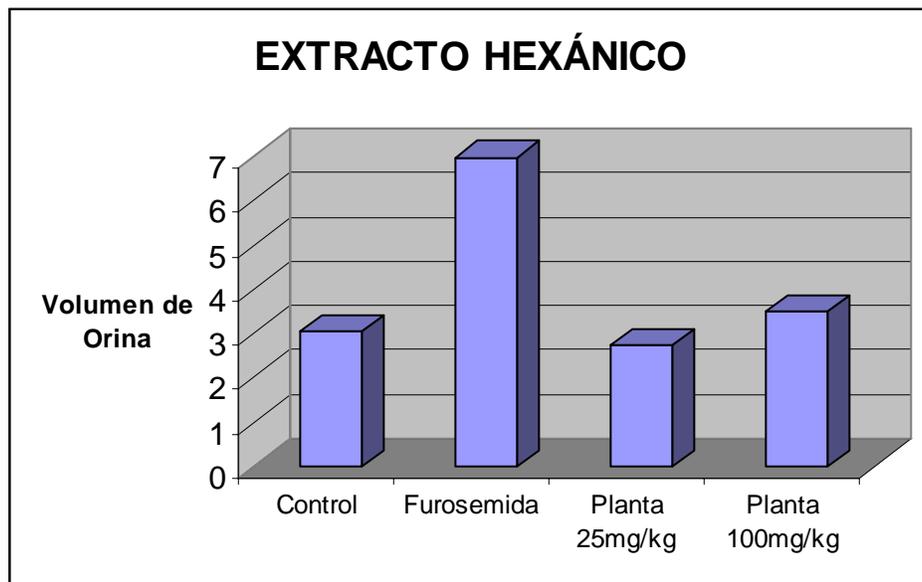
8.3.1 Resultados

Tabla 3. Resultados de Ensayo Farmacológico del Extracto Hexánico

GRUPO	DÍA 1			DÍA 2			DÍA 3			DÍA 4			DÍA 5			Media
	2hr	4hr	6hr													
Control	0	2	2	2	2	3	2	2	4	2	2	2	2	2	2	
	0	1	1	2	2	3	2	2	4	1	2	3	1	2	2	
	0	0	1	2	2	3	2	2	4	1	2	2	0	1	2	
	0	0	3	4	4	6	1	2	2	2	2	5	1	4	4	
	0	2	4	3	3	5	2	4	6	3	3	4	1	2	4	
	0	2	2	1	1	4	0	1	3	3	3	4	0	2	2	
Media			2.2			4			3.8			3.3			2.7	3.06
Furosemida 25mg/kg	2	2	3	8	10	10	5	6	6	4	6	6	6	7	8	
	1	2	2	5	6	7	4	4	5	5	6	6	6	7	9	
	1	2	3	6	6	8	5	5	7	5	6	7	3	4	6	
	4	6	7	7	9	10	2	6	8	6	7	8	4	7	8	
	4	4	6	3	3	5	4	10	10	8	9	11	6	10	12	
	2	2	3	6	8	10	3	6	7	3	4	5	2	4	6	
Media			4			8.3			7.2			7.2			8.2	6.98*
Extracto 25mg/kg	0	2	2	1	1	3	1	2	2	1	2	2	2	2	3	
	0	2	2	1	2	3	1	2	2	0	2	2	2	2	2	
	0	2	2	2	2	3	1	2	2	1	2	2	1	2	2	
	0	0	2	1	2	4	2	4	6	1	3	5	2	2	4	
	0	0	0	0	3	3	0	0	3	2	2	4	1	2	2	
	0	0	2	0	3	4	1	4	4	3	3	3	1	2	2	
Media			1.7			3.3			3.2			3			2.5	2.74
Extracto 100mg/kg	0	2	2	2	2	3	2	3	6	2	4	4	2	3	4	
	0	0	2	1	2	3	1	2	2	1	2	4	2	2	3	
	0	0	2	1	2	3	2	2	4	1	3	4	2	3	4	
	0	1	2	2	2	5	0	1	2	4	4	4	0	2	3	
	0	2	3	2	2	5	1	2	4	2	2	4	2	2	4	
	1	2	2	2	3	4	1	3	4	2	4	4	1	2	4	
Media			2.2			3.8			3.7			4			3.7	3.84

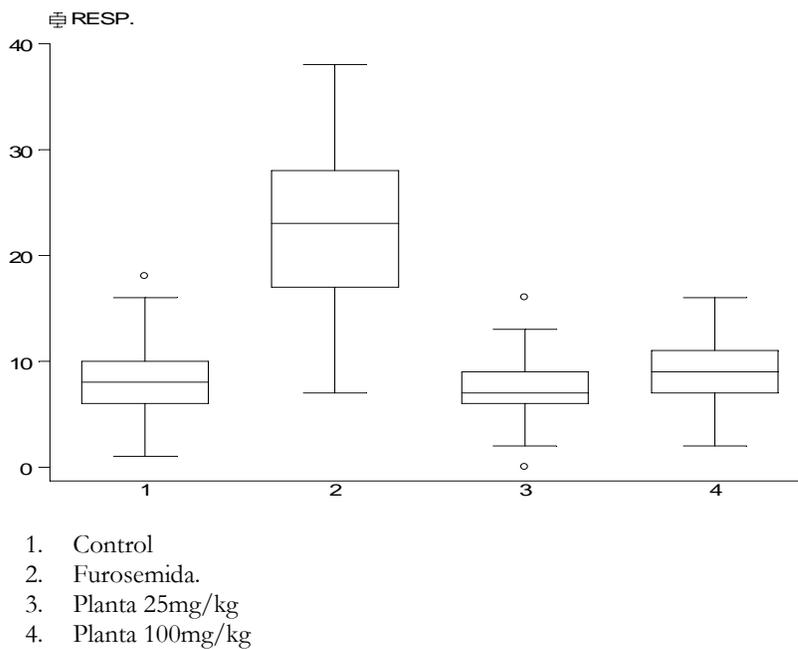
* Valor P menor a 0.05

Gráfica 4. Resultados del Ensayo Farmacológico del Extracto Hexánico



8.3.2 Comparación de los Tratamientos

Gráfica 5. Comparación de Tratamientos del Extracto Hexánico



8.4 EXTRACTO CLOROFÓRMICO

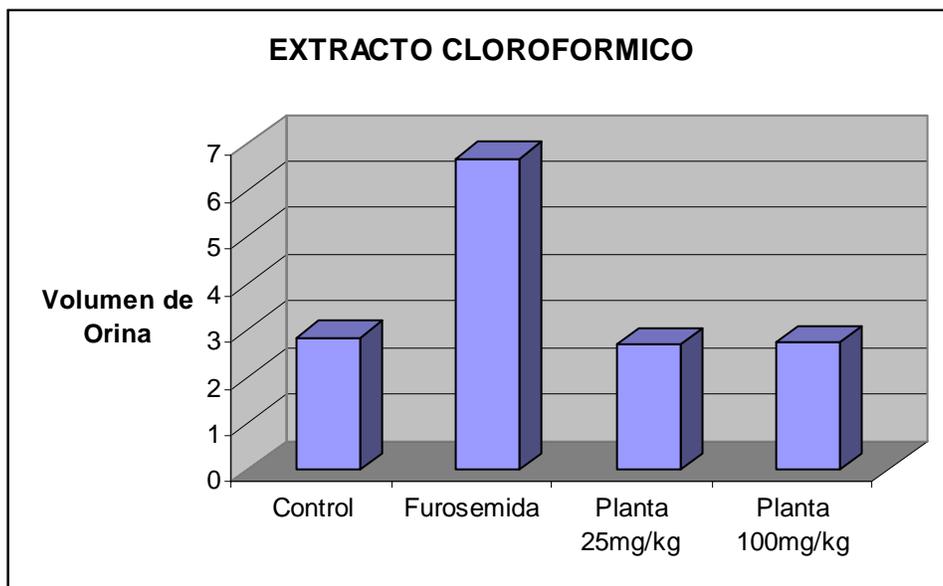
8.4.1 Resultados

Tabla 4. Resultados de Ensayo Farmacológico del Extracto Clorofórmico

GRUPO	DÍA 1			DÍA 2			DÍA 3			DÍA 4			DÍA 5			Media
	2hr	4hr	6hr													
Control	0	1	1	1	2	3	0	0	0	2	2	3	2	2	4	2.84
	0	1	2	1	3	4	2	3	4	1	2	4	2	3	3	
	0	1	2	1	2	4	1	2	2	1	2	3	1	2	4	
	0	2	2	3	3	4	0	2	2	2	3	3	0	2	4	
	0	0	2	2	3	4	2	4	4	0	1	4	2	3	3	
	0	0	2	0	2	2	1	2	2	1	2	3	1	2	2	
<i>Media</i>			1.8			3.5			2.3			3.3			3.3	
Furosemida 25mg/kg	3	3	3	3	4	5	2	3	4	3	4	4	2	4	5	6.68*
	6	8	10	6	7	8	5	6	7	2	4	5	6	8	11	
	2	6	7	3	5	6	5	6	6	5	7	8	4	6	6	
	2	3	4	4	6	6	4	6	7	4	6	6	4	8	8	
	2	4	5	8	9	10	6	8	8	3	5	6	2	6	6	
	1	2	4	7	8	9	5	8	8	5	8	8	6	10	10	
<i>Media</i>			5.5			7.3			6.7			6.2			7.7	
Extracto 25mg/kg	1	1	1	1	2	3	1	2	3	0	2	2	2	2	3	2.68
	1	1	1	1	2	3	2	4	5	2	2	3	1	3	3	
	0	1	1	1	2	3	1	2	2	1	1	2	1	2	2	
	2	2	3	2	4	4	1	2	3	1	2	2	1	2	2	
	1	1	2	1	3	4	0	2	2	0	1	2	2	2	2	
	2	2	2	2	4	5	2	3	4	2	3	4	1	2	2	
<i>Media</i>			1.7			3.7			3.2			2.5			2.3	
Extracto 100mg/kg	0	2	2	0	2	4	2	2	4	0	2	2	2	2	4	2.72
	0	1	2	1	2	3	1	2	2	0	2	2	2	2	2	
	0	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	2	1	1	4	
	1	1	1	2	4	4	1	2	2	2	3	3	1	2	3	
	2	2	2	2	3	3	2	3	4	0	1	1	2	3	4	
	0	1	2	2	2	3	2	4	4	1	2	4	1	2	3	
<i>Media</i>			1.8			3.2			3			2.3			3.3	

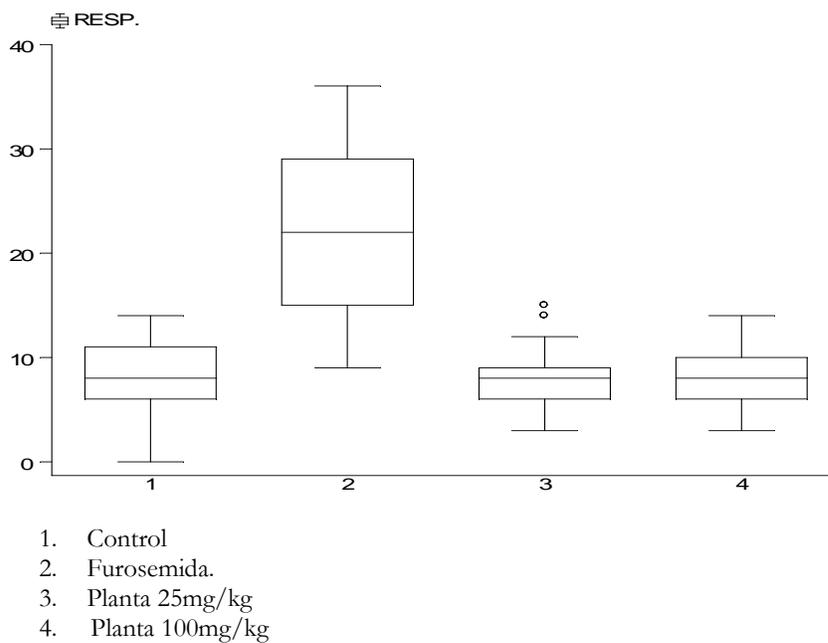
* Valor P menor a 0.05

Gráfica 6. Resultados del Ensayo Farmacológico del Extracto Clorofórmico



8.4.2 Comparación de los Tratamientos

Gráfica 7. Comparación de Tratamientos del Extracto Clorofórmico



8.5 EXTRACTO ACETATO DE ETILO

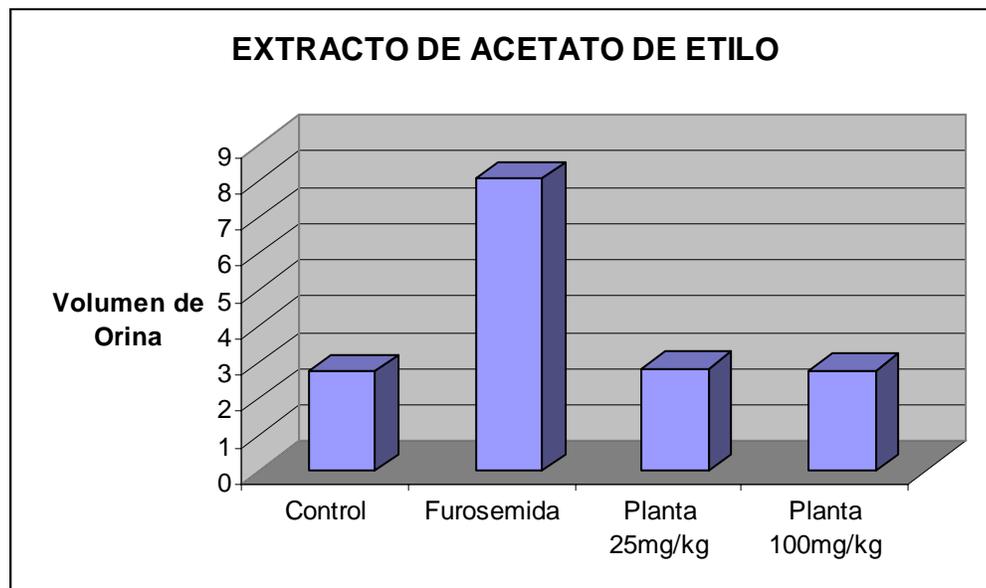
8.5.1 Resultados

Tabla 5. Resultados de Ensayo Farmacológico del Extracto Acetato de Etilo

GRUPO	DÍA 1			DÍA 2			DÍA 3			DÍA 4			DÍA 5			Media
	2hr	4hr	6hr													
Control	0	1	1	2	3	3	2	2	4	2	2	4	1	1	3	2.74
	0	0	2	0	0	4	0	3	3	3	3	3	0	0	0	
	0	1	3	2	3	4	2	3	4	2	2	4	1	3	3	
	1	1	2	2	2	3	1	2	3	1	2	3	2	3	3	
	0	0	0	2	2	3	1	2	2	1	1	3	0	0	2	
	1	2	2	2	2	2	0	2	2	2	3	4	2	3	3	
<i>Media</i>			1.7			3.2			3			3.5			2.3	
Furosemida 25mg/kg	6	6	8	4	6	6	2	3	3	4	0	4	6	8	8	8.06*
	4	6	6	8	12	12	4	6	8	5	6	6	4	4	6	
	0	0	0	10	12	12	6	8	8	7	8	9	10	10	11	
	2	3	4	5	6	7	6	6	6	6	6	8	4	6	8	
	2	3	3	6	6	7	9	9	9	8	9	10	6	8	10	
	10	12	12	11	13	14	10	12	12	9	10	12	8	10	12	
<i>Media</i>			5.5			9.7			7.7			8.2			9.2	
Extracto 25mg/kg	0	2	2	2	4	4	1	2	2	2	2	3	1	2	2	2.84
	1	2	3	2	3	4	1	2	2	2	2	4	1	3	4	
	0	1	2	0	1	2	2	2	4	2	3	4	1	1	2	
	1	1	2	2	4	4	3	3	4	2	2	3	1	2	3	
	0	0	2	1	2	3	1	1	2	1	2	2	1	2	2	
	0	2	2	0	2	4	1	2	2	1	1	2	2	2	4	
<i>Media</i>			2.2			3.5			2.7			3			2.8	
Extracto 100mg/kg	1	1	2	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2.76
	0	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	3	1	1	2	
	1	1	2	2	3	4	2	3	3	2	2	4	1	3	3	
	0	0	2	2	3	6	2	2	3	3	3	4	1	1	2	
	2	2	3	1	3	3	4	4	4	2	3	4	1	3	4	
	0	0	2	1	1	3	2	2	3	0	1	2	1	2	3	
<i>Media</i>			2			3.3			2.8			3			2.7	

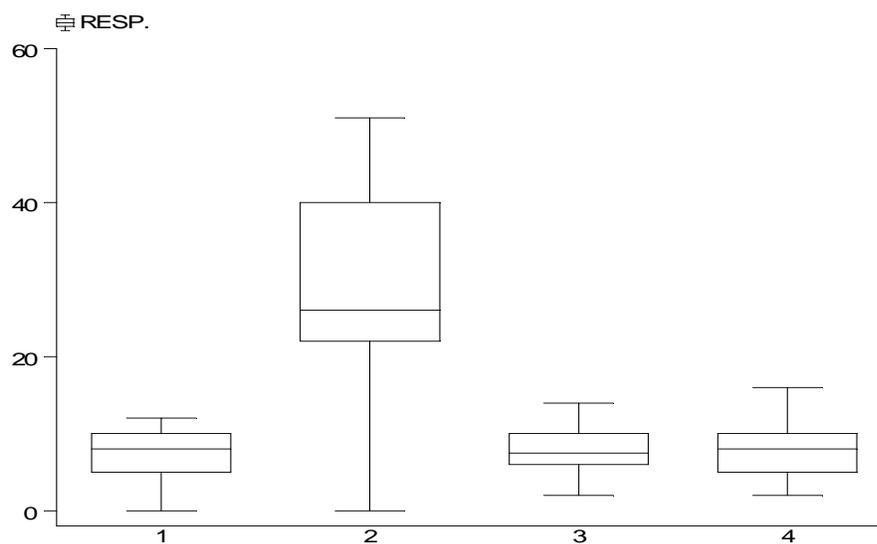
* Valor P menor a 0.05

Gráfica 8. Resultados del Ensayo Farmacológico del Extracto Acetato de Etilo



8.5.2 Comparación de los Tratamientos

Gráfica 9. Comparación de Tratamientos del Extracto Acetato de Etilo



1. Control
2. Furosemida.
3. Planta 25mg/kg
4. Planta 100mg/kg

8.6 EXTRACTO ACUOSO

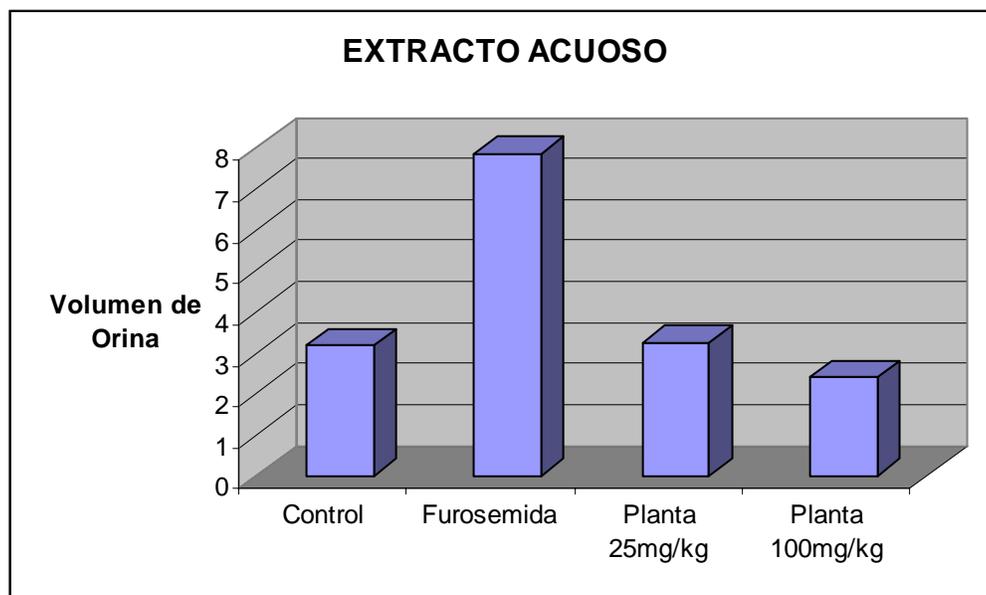
8.6.1 Resultados

Tabla 6. Resultados de Ensayo Farmacológico del Extracto Acuoso

GRUPO	DÍA 1			DÍA 2			DÍA 3			DÍA 4			DÍA 5			Media
	2hr	4hr	6hr													
Control	2	2	4	2	2	3	1	3	4	2	2	2	2	2	4	3.18
	1	1	2	2	2	3	0	0	2	2	2	3	1	2	3	
	0	1	3	3	3	4	1	1	2	2	3	4	2	3	3	
	1	2	2	2	4	5	2	4	5	1	2	4	2	2	4	
	0	1	2	0	0	0	1	2	4	2	4	4	0	2	2	
	0	0	3	2	4	4	0	1	1	2	4	4	2	4	5	
<i>Media</i>			2.7			3.2			3			3.5			3.5	
Furosemida 25mg/kg	6	8	10	4	6	8	4	6	9	4	6	9	4	7	7	7.82*
	3	7	8	9	10	10	3	3	4	10	14	14	8	13	14	
	4	5	6	8	9	10	6	8	10	6	8	10	6	9	10	
	1	2	2	6	7	9	6	9	10	2	4	6	6	9	9	
	2	3	3	4	5	7	4	7	9	2	4	4	4	5	6	
	1	2	2	4	6	7	5	7	10	1	3	5	4	5	6	
<i>Media</i>			5.2			8.5			8.7			8			8.7	
Extracto 25mg/kg	2	3	3	2	2	3	1	2	4	0	0	2	2	3	5	3.26
	2	2	4	2	2	4	2	2	3	2	3	4	2	3	3	
	2	2	3	2	3	5	2	2	3	2	4	4	2	4	4	
	0	1	2	1	3	3	2	2	5	1	2	2	1	2	2	
	1	2	3	2	3	4	2	4	4	3	4	5	2	3	5	
	1	2	2	1	2	3	0	1	1	0	1	2	0	1	1	
<i>Media</i>			2.8			3.7			3.3			3.2			3.3	
Extracto 100mg/kg	0	0	2	2	2	3	2	3	3	2	3	3	0	0	1	2.4
	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	
	2	2	2	0	0	1	0	2	3	2	2	2	2	2	2	
	0	0	2	2	3	4	2	4	4	1	2	2	2	2	3	
	1	2	2	0	2	2	2	4	4	0	0	0	0	2	2	
	1	2	2	2	4	4	1	2	3	0	2	2	1	2	3	
<i>Media</i>			2			2.7			3.2			1.8			2.3	

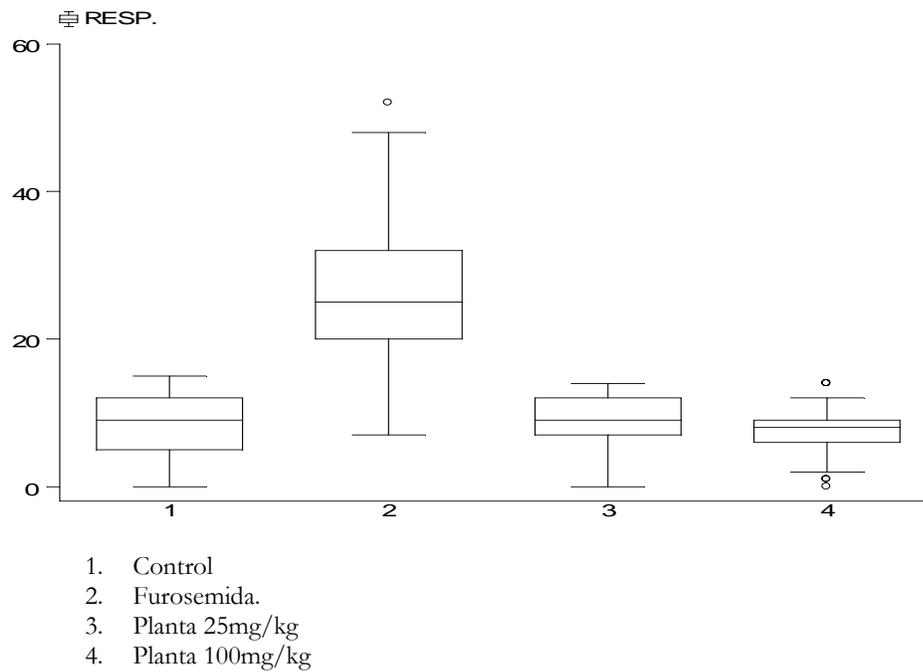
* Valor P menor a 0.05

Gráfica 10. Resultados del Ensayo Farmacológico del Extracto Acuoso



8.6.2 Comparación de los Tratamientos

Gráfica 11. Comparación de Tratamientos del Extracto Acuoso



8.7 EXTRACTO HEXÁNICO A DOSIS MAYORES

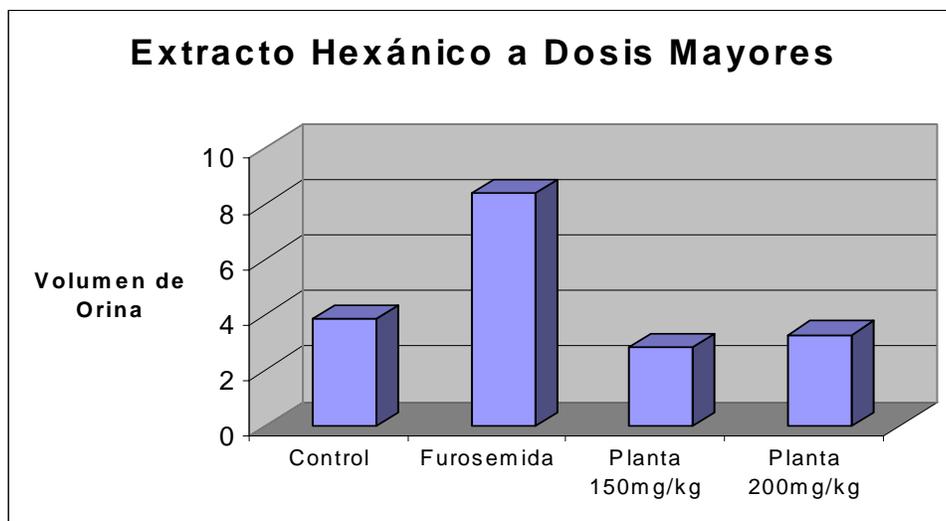
8.7.1 Resultados

Tabla 7. Resultados de Ensayo Farmacológico del Extracto Hexánico a Dosis Mayores

GRUPO	DÍA 1			DÍA 2			DÍA 3			DÍA 4			DÍA 5			Media
	2hr	4hr	6hr													
Control	0	1	4	2	3	3	1	2	2	1	1	4	1	1	4	3.84
	2	3	3	1	3	3	0	2	2	0	1	2	2	3	4	
	4	5	6	2	6	6	1	4	4	1	2	7	1	3	4	
<i>Media</i>			4.3			4			2.6			4.3			4.0	
Furosemida 25mg/kg	2	3	5	6	10	11	5	9	10	4	5	8	7	10	11	8.38*
	7	9	10	7	11	11	4	6	8	5	5	8	4	5	6	
	6	8	8	4	6	8	6	6	7	4	4	8	4	6	7	
<i>Media</i>			7.6			10			8.3			8.0			8.0	
Extracto 150mg/kg	2	2	4	1	3	3	1	3	4	0	2	4	1	2	3	2.84
	2	2	4	1	1	1	1	2	2	0	2	5	1	2	2	
	0	1	2	0	2	2	0	1	2	0	2	3	0	1	2	
<i>Media</i>			3.3			2			2.6			4.0			2.3	
Extracto 200mg/kg	2	2	3	1	3	4	0	2	3	1	2	4	0	0	2	3.28
	2	2	4	1	2	3	0	1	2	1	2	3	1	3	4	
	1	1	2	1	3	4	1	2	3	1	2	4	2	4	5	
<i>Media</i>			3			3.6			2.6			3.6			3.6	

* Valor P menor a 0.05

Gráfica 12. Resultados del Ensayo Farmacológico del Extracto Hexánico a Dosis Mayores



8.8 CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA

8.8.1 EXTRACTO ETANOLICO

Tabla 8. Resultados de la Caracterización Fitoquímica del Extracto Etanólico

Compuesto	Ensayo Macro y Semimicro	Cromatografía de Capa Fina					
		Sin Tratamiento			Con Tratamiento		
		Visible	254nm	365 nm	Visible	254 nm	365 nm
Alcaloides	Negativo		Negativo	Positivo	Negativo		
Cumarinas	Negativo	Negativo		Negativo			Negativo
Taninos	Negativo						
Saponinas	Negativo						Negativo
Antraquinonas	Negativo			Positivo	Negativo		Positivo
Glicósidos	Negativo						
Cardenólidos	Negativo		Negativo	Negativo			Positivo
Flavonoides	Negativo		Negativo	Positivo			Positivo
Antocianinas		Negativo		Positivo	Negativo		Negativo
Principios Amargos			Negativo	Positivo	Positivo		
Aceites esenciales			Negativo	Negativo	Negativo		

8.8.2 EXTRACTO HEXÁNICO

Tabla 9. Resultados de la Caracterización Fitoquímica del Extracto Hexánico

Compuesto	Ensayo Macro y Semimicro	Cromatografía de Capa Fina					
		Sin Tratamiento			Con Tratamiento		
		Visible	254nm	365 nm	Visible	254 nm	365 nm
Alcaloides	Negativo		Negativo	Positivo	Negativo		
Cumarinas	Negativo	Negativo		Negativo			Negativo
Taninos	Negativo						
Saponinas	Negativo						Negativo
Antraquinonas	Negativo			Positivo	Negativo		Positivo
Glicósidos	Negativo						
Cardenólidos	Negativo		Negativo	Negativo			Positivo
Flavonoides	Negativo		Negativo	Negativo			Negativo
Antocianinas		Negativo		Positivo	Negativo		Negativo
Principios Amargos			Negativo	Positivo	Positivo		
Aceites esenciales			Negativo	Negativo	Negativo		

8.8.3 EXTRACTO CLOROFÓRMICO

Tabla 10. Resultados de Caracterización Fitoquímica del Extracto Clorofórmico

Compuesto	Ensayo Macro y Semimicro	Cromatografía de Capa Fina					
		Sin Tratamiento			Con Tratamiento		
		Visible	254nm	365 nm	Visible	254 nm	365 nm
Alcaloides	Negativo		Negativo	Positivo	Negativo		
Cumarinas	Positivo	Negativo		Negativo			Negativo
Taninos	Negativo						
Saponinas	Negativo						Negativo
Antraquinonas	Negativo			Positivo	Negativo		Positivo
Glicósidos	Negativo						
Cardenólidos	Negativo		Negativo	Negativo			Positivo
Flavonoides	Negativo		Negativo	Positivo			Positivo
Antocianinas		Negativo		Positivo	Negativo		Negativo
Principios Amargos			Negativo	Positivo	Positivo		
Aceites esenciales			Negativo	Negativo	Negativo		

8.8.4 EXTRACTO ACETATO DE ETILO

Tabla 11. Resultados de la Caracterización Fitoquímica del Extracto Acetato de Etilo

Compuesto	Ensayo Macro y Semimicro	Cromatografía de Capa Fina					
		Sin Tratamiento			Con Tratamiento		
		Visible	254nm	365 nm	Visible	254 nm	365 nm
Alcaloides	Negativo		Negativo	Positivo	Negativo		
Cumarinas	Positivo	Negativo		Negativo			Negativo
Taninos	Negativo						
Saponinas	Negativo						Negativo
Antraquinonas	Negativo			Positivo	Negativo		Positivo
Glicósidos	Negativo						
Cardenólidos	Negativo		Negativo	Negativo			Positivo
Flavonoides	Negativo		Negativo	Positivo			Positivo
Antocianinas		Negativo		Negativo	Negativo		Negativo
Principios Amargos			Negativo	Positivo	Positivo		
Aceites esenciales			Negativo	Negativo	Negativo		

Nota: Ver en anexos más detalles de Caracterización Fitoquímica.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos en el rendimiento de extracción, se observó que el extracto clorofórmico es el que posee un mayor porcentaje de rendimiento (42.93%), esto concuerda con otros estudios realizados sobre el porcentaje de rendimiento de los diferentes extractos. El extracto acuoso es el de menor porcentaje (11.09%).

Los resultados del ensayo farmacológico obtenidos del extracto etanólico indican que éste no tiene actividad diurética significativa en ninguna de las dosis experimentadas (25mg/kg y 100mg/kg), ya que el valor P no es menor a 0.5. Ambas dosis experimentales del extracto dieron un resultado menor al control (agua), por lo que se comprueba que no tiene actividad diurética a dosis menores de 100mg/kg.

El extracto hexánico no mostró actividad diurética significativa en ninguna de las dos dosis utilizadas en el ensayo farmacológico (25mg/kg y 100mg/kg), ya que ninguna de ellas demostró un valor P menor a 0.5, ni se equiparó o mejoró la diuresis provocada por el fármaco de referencia (furosemida), pero la dosis de 100mg/kg evidenció un volumen urinario mayor que el control.

El extracto clorofórmico no evidenció actividad diurética significativa en ninguna de las dos dosis ensayadas (25mg/kg y 100mg/kg) debido a que el valor P obtenido es mayor a 0.5, la diuresis presentada por el extracto es menor al control, con lo que se determina que dicho extracto no posee actividad diurética.

El extracto de Acetato de Etilo no mostró actividad diurética significativa en ninguna de las dosis ensayadas (25mg/kg y 100mg/kg) debido a que el valor P es mayor a 0.5, aunque la diuresis presentada por el extracto en sus dos dosis fue un poco mayor que el control.

El extracto acuoso no posee actividad diurética significativa en ninguna de las dos dosis ensayadas (25mg/kg y 100mg/kg) ya que el valor P fue mayor a 0.5, pero una de las dosis (25mg/kg) presentó una diuresis un poco mayor que el control.

Analizando la diuresis de todos los extractos en las dosis ensayadas, en comparación con el control en cada caso, se determinó una mayor diuresis de la dosis de 100mg/kg del extracto hexánico, aunque ésta no fue significativa; por lo que para descartar la idea de una diuresis significativa a mayores dosis, se realizó un ensayo a dosis de 150mg/kg y 200mg/kg del extracto hexánico, con 3 replicas de cada grupo. Al analizar los resultados de este ensayo, se determinó que no se tiene actividad diurética significativa a ninguna de las dosis experimentadas (25mg/kg –200mg/kg).

En estudios anteriores se demostró actividad diurética en la evaluación farmacológica de la infusión de *Lippia graveolens*, por lo cual si en este ensayo de Fase II no se demostró actividad diurética significativa, se puede inferir que esta actividad se da solamente por el sinergismo de todos los compuestos que contiene la planta, es decir que se da cuando la planta está completa sin ninguna separación de sus componentes por la polaridad de los mismos.

Otro aspecto muy importante es la ausencia de los aceites esenciales en los extractos, basándose en el análisis fitoquímico que se realizó a cada uno de ellos, ya que a estos aceites se le atribuyen la mayoría de propiedades farmacológicas de la *Lippia graveolens*, podría suponerse que la actividad diurética también sea producida por ellos.

La toxicidad no fue evaluada porque ninguno de los extractos demostró actividad diurética significativa, siendo esta innecesaria.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 En ningún extracto de *Lippia graveolens* H.B.K. (Orégano) se evidenció actividad diurética significativa.
- 10.2 El extracto hexánico de *Lippia graveolens* H.B.K. (Orégano) a una dosis de 100mg/kg presentó mayor volumen urinario excretado en comparación de los otros extractos y el control.
- 10.3 El extracto hexánico de *Lippia graveolens* H.B.K. (Orégano) a dosis mayores (150mg/kg y 200mg/kg) no presentó actividad diurética significativa.
- 10.4 Se comprueba que la actividad diurética de *Lippia graveolens* H.B.K. (Orégano) se presenta en la planta completa.
- 10.5 El extracto clorofórmico de *Lippia graveolens* H.B.K. (Orégano) presentó mayor porcentaje de rendimiento (47.7%).

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Utilizar la *Lippia graveolens* H.B.K. (Orégano), en infusión como diurético.
- 11.2 Continuar con Ensayos Farmacológicos de Fase II de plantas medicinales nativas, ya que con esto se contribuye al aprovechamiento de los recursos naturales y sobre todo con la salud de la población.

12. REFERENCIAS

- 12.1 BARRIOS, R. BERGER, I., CÁCERES, A. 2001. Fraccionamiento bioguiado y tamizaje fitoquímico del extracto etanólico con actividad antibacteriana de *Vaccinium poasanum* Donn. Sm. Tesis ad gradum Químico Biológico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 12.2 CACERES, A. 1996. Plantas de uso Medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria de San Carlos de Guatemala. Pags 349-351.
- 12.3 DAVILA, J. REYES, M. 1997. Estudio farmacológico de los extractos hexánico, clorofórmico, cloroformo-metanólico, metanólico y acuoso de *Bixa orellana* L (Achiote) como diuréticos (Estudio Farmacológico Fase II) Tesis ad gradum Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 12.4 DOMINGUEZ X.A., et al. 1989. Chemical Constituents of *Lippia graveolens* H.B.K., Plant Med. 55. Pags 208-209.
- 12.5 GUENTHER, E. Ph. D. 1949. Individual Essential Oils of the Plant Families Rutacea and Labiateae. Van Nostrand Company, Inc. New York. Volume Three. Pags 535-540.
- 12.6 GUPTA, MAHABIR. 1975. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Santa Fe de Bogota. DC. Colombia.
- 12.7 HOUSE, P. et al. 1995. Plantas Medicinales Comunes en Honduras. Honduras. Litografía López, S. de R.L. 555pp.

- 12.8 HOUSE, P. LAGOS-WITTE, S. 1989. Manual Popular de 50 plantas Medicinales de Honduras. Honduras. 134pp.
- 12.9 LAWRENCE, B. 1984. The Botanical and Chemical Aspects of Orégano. Perf.Flavor 9(5): Pags 41-51.
- 12.10 LÓPEZ, C. REYES, M. 1999. Evaluación Farmacológica de la Acción diurética de las Infusiones de las plantas *Lippia graveolens* (orégano), *Ruta chapalensis* (ruda) y *Brassica oleracea* (repollo). Tesis ad gradum Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 12.11 MAFFIOLI, A, OCAMPO, R. 1987. El Uso de algunas plantas medicinales en Costa Rica. Trejos Hnos. San José Costa Rica. 60pp.
- 12.12 MEDINILLA, B. 1993. Manual de laboratorio de fitoquímica. Guatemala Universidad de San Carlos de Guatemala. Manual, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 29pp.
- 12.13 NACIONES UNIDAS. 1993. Centroamerica: La producción de Medicamentos Fitoterapeuticos y de Materias primas agrícolas para la Industria Farmacéutica. Comisión económica para América Latina y el Caribe- CEPAL. 93-7-102. 150pp.
- 12.14 NAIK, VR. AGSKIKAR, NV. ABRAHAM, GJ. 1981. Cucumis trigonus Roxb. II Diuretic Activity. J. Ethnopharmacol. Pags 15-19.
- 12.15 PASCUAL, M. et al. 2001. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology.: a review. Jornal of Ethnopharmacology. USA. 76(2001);pags 201-214.
- 12.16 RYU, H. 1979. Gas Chromatography Characterization of Origanum and other selected Spices of the Labiatae family. J. Food Sci. 44;pags 1373-1378.

- 12.17 SANCHEZ, V. REYES, M. 1997. Estudio farmacológico de los extractos hexánico, clorofórmico, cloroformo-metanólico, metanólico y acuoso de *Hibiscus sabdariffa* (Rosa de Jamaica) como diuréticos (Estudio Farmacológico Fase II) Tesis ad gradum Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 12.18 SANTA CRUZ, L. 1986. Manual de Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Ciencias Químicas Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 53pp
- 12.19 SHARAPIN, N. et al. 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Publicación del Convenio Andrés Bello, CAB, y el Programa Iberoamericano de Ciencia y tecnología para el Desarrollo, CYTED. Colombia. 247pp.
- 12.20 SPEARMAN, G. KARBER, DJ. 1952. Finner statical method in Biological assay. London: CH. Griffin and Co. 524pp.
- 12.21 STANDLEY Pc & WILLIAMS, L. 1970. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany. Vol 24 Part IX, No. 1,2 Museum of Natural History. Chicago. USA.
- 12.22 VELASQUEZ, M. BENAVIDES, R. 2003. Determinación de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Lippia graveolens* H.B.K. (orégano) por cromatografía de gases. Tesis ad gradum Químico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 12.23 WAGNER, H. et al. 1984. Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography atlas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- 12.24 www.3.interscience.wiley.com/cgi.bin/home?CRETRY=1

- 12.25 www.elsevier.com/locate/jethpharm. HERNANDEZ. T. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México) Volumen 88, 2-3. Octubre 2003. Pags 181-188.

13. ANEXOS

13.1 ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, HEXÁNICO, CLOROFÓRMICO Y ACETATO DE ETILO DE *Lippia graveolens* H.B.K. (ORÉGANO)

13.1.1 ALCALOIDES

a. Ensayo Macro y Semimicro

Ensayos	Control	Etanólico	Hexánico	Clorofórmico	Acetato de etilo
Mayer	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Dragendorf	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Wagner	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Positivo (+): Precipitados, turbidez o complejos.

Negativo (-): No se evidencio precipitado, turbidez o complejo.

b. Cromatografía de Capa Fina

Con Tratamiento

Muestra	254 nm	365nm
Extracto Etanólico	(-)	Fluorescencia amarilla (+)
Extracto Hexánico	(-)	Fluorescencia amarilla (+)
Extracto Clorofórmico	(-)	Fluorescencia amarilla (+)
Extracto Acetato de Etilo	(-)	Fluorescencia amarilla (+)
Atropina	(-)	Fluorescencia amarilla (+)
Papaverina	(-)	Fluorescencia amarilla (+)

Positivo (+): 254nm: fluorescencia

365nm: fluorescencia azul o amarilla.

Negativo (-): No se evidencio fluorescencia.

Sin Tratamiento

Muestra	Visible
Extracto Etanólico	(-)
Extracto Hexánico	(-)
Extracto Clorofórmico	(-)
Extracto Acetato de Etilo	(-)
Atropina	Fluorescencia naranja (+)
Papaverina	Fluorescencia naranja (+)

Positivo (+): Visible: fluorescencia naranja o café.

Negativo (-): No se evidencio fluorescencia.

13.1.2 CUMARINAS

a. Ensayo Macro y Semimicro

Extracto	Fluorescencia a 365nm
Etanólico	(-)
Hexánico	(-)
Clorofórmico	Fluorescencia verde claro (+)
Acetato de Etilo	Fluorescencia verde claro (+)

Positivo (+): Fluorescencia azul o verde.

Negativo (-): No se evidencio fluorescencia

b. Cromatografía de Capa Fina

Sin Tratamiento

Muestra	Visible	365nm
Extracto Etanólico	(-)	(-)
Extracto Hexánico	(-)	(-)
Extracto Clorofórmico	(-)	(-)
Extracto Acetato de Etilo	(-)	(-)
Cumarina	(-)	(-)
Ácido p-cumarínico	(-)	(-)

Positivo (+): 254nm: fluorescencia

365nm: fluorescencia intensa azul o azul-verde

Negativo (-): No se evidencio fluorescencia.

Con Tratamiento:

Muestra	365nm
Extracto Etanólico	(-)
Extracto Hexánico	(-)
Extracto Clorofórmico	(-)
Extracto Acetato de Etilo	(-)
Cumarina	Fluorescencia verde (+)
Ácido p-cumarínico	(-)

Positivo (+): 365nm: fluorescencia azul, verde o amarillo-verde.

Negativo (-): No se evidencio fluorescencia.

13.1.3 TANINOS

a. Ensayo Macro y Semimicro

Extracto	Testigo	Gelatina 1%	Gelatina-Sal	FeCl ₃ 10%
Etanólico	Anaranjado	(-)	(-)	Café (-)
Hexánico	Amarillo verdoso	(-)	(-)	(-)
Clorofórmico	Anaranjado	(-)	(-)	Café (-)
Acetato de Etilo	Anaranjado	(-)	(-)	Café (-)

Positivo (+): Precipitado o cambio de color.

Con FeCl₃ grisáceo-negro o negro-azulado.

Negativo (-): No se evidencio precipitado o cambio de color.

13.1.4 SAPONINAS

a. Ensayo Macro y Semimicro

Extracto	Resultado
Etanólico	0.2 cm de espuma (-)
Hexánico	(-)
Clorofórmico	(-)
Acetato de Etilo	0.2 cm de espuma (-)

Positivo (+): 3.0 cm de espuma.

Negativo (-): No se evidencio espuma

b. Cromatografía de Capa Fina

Con Tratamiento:

Muestra	365nm
Extracto Etanólico	(-)
Extracto Hexánico	(-)
Extracto Clorofórmico	(-)
Extracto Acetato de Etilo	(-)
Saponina	(-)
Colesterol	(-)

Positivo (+): Visible: coloración azul, azul-violeta, amarilla.

Negativo (-): No se evidencio esta coloración.

13.1.5 ANTRAQUINONAS

a. Ensayo Macro y Semimicro

Extracto	Resultado
Etanólico	Amarillo (-)
Hexánico	Amarillo (-)
Clorofórmico	Amarillo (-)
Acetato de Etilo	Amarillo (-)

Positivo (+): Coloración rojo o rosado.

Negativo (-): No se evidencio coloración roja o rosada.

b. Cromatografía de Capa Fina

Sin Tratamiento:

Muestra	365nm
Extracto Etanólico	Fluorescencia rojo y amarillo (+)
Extracto Hexánico	Fluorescencia rojo (+)
Extracto Clorofórmico	Fluorescencia amarillo y rojo (+)
Extracto Acetato de Etilo	Fluorescencia amarillo (+)
Antrona	Fluorescencia amarillo (+)

Positivo (+): 365nm: fluorescencia amarillo, rojo y café

Negativo (-): No se evidencio fluorescencia.

Con Tratamiento

Muestra	Visible	365nm
Extracto Etanólico	(-)	Fluorescencia roja (+)
Extracto Hexánico	(-)	Fluorescencia roja (+)
Extracto Clorofórmico	(-)	Fluorescencia roja (+)
Extracto Acetato de Etilo	(-)	(-)
Antrona	Fluorescencia Amarilla	(-)

Positivo (+): Visible: fluorescencia roja o amarilla

365nm: fluorescencia roja o amarilla

Negativo (-): No se evidencio fluorescencia.

13.1.6 GLICÓSIDOS CIANOGENICOS

a. Ensayo Macro y Semimicro

Extracto	Resultado
Etanólico	(-)
Hexánico	(-)
Clorofórmico	(-)
Acetato de Etilo	(-)

Positivo (+): Cambio de color a amarillo, rojo o rojo-café.

Negativo (-): No se evidencio cambio de color.

13.1.7 CARDENÓLIDOS Y BUFADIENÓLIDOS

a. Ensayo Macro y Semimicro

Extracto	Resultado
Etanólico	(-)
Hexánico	(-)
Clorofórmico	(-)
Acetato de Etilo	(-)

Positivo (+): Formación de anillo púrpura.

Negativo (-): No se evidencio formación de anillo púrpura.

b. Cromatografía de Capa Fina

Sin Tratamiento

Muestra	254 nm	365nm
Extracto Etanólico	(-)	(-)
Extracto Hexánico	(-)	(-)
Extracto Clorofórmico	(-)	(-)
Extracto Acetato de Etilo	(-)	(-)
Digoxina	(-)	(-)

Positivo (+): 254nm: fluorescencia

365nm: sin fluorescencia

Negativo (-): No se evidencio fluorescencia en 254nm y se muestra fluorescencia en 365nm..

Con Tratamiento

Muestra	365nm
Extracto Etanólico	Fluorescencia anaranjado, amarillo y café (+)
Extracto Hexánico	Fluorescencia amarillo, café (+)
Extracto Clorofórmico	Fluorescencia anaranjado, café (+)
Extracto Acetato de Etilo	Fluorescencia anaranjado, café (+)
Digoxina	Fluorescencia anaranjado (+)

Positivo (+): 365nm: fluorescencia naranja, café, amarillo-verde, azul, amarillo-café, verde, amarillo

Negativo (-): No se evidencio fluorescencia en 365nm..

13.1.8 FLAVONOIDES

a. Ensayo Macro y Semimicro

Extracto	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
Control	Amarillo	Amarillo pálido	Amarillo	Amarillo pálido
Etanólico	Amarillo (-)	Naranja (-)	Verde (-)	Verde (+)
Hexánico	Verde (-)	Naranja (-)	Verde (-)	Verde (+)
Clorofórmico	Amarillo (-)	Café (-)	Amarillo (-)	Naranja (+)
Acetato de Etilo	Amarillo (-)	Café (-)	Amarillo (-)	Amarillo (-)

Positivo (+): Tubo 1: rojo-violeta.

Tubo 2: azul-verde

Tubo 3: rojo-violeta

Tubo 4: cambios de color o precipitado

Negativo (-): No se evidencio la coloración esperada, cambio de color o precipitado.

b. Cromatografía de Capa Fina

Sin Tratamiento:

Muestra	254nm	365nm
Extracto Etanólico	(-)	Fluorescencia amarilla (+)
Extracto Hexánico	(-)	(-)
Extracto Clorofórmico	(-)	Fluorescencia amarilla (+)
Extracto Acetato de Etilo	(-)	Fluorescencia amarilla (+)
Rutina	(-)	(-)
Naringenina	(-)	(-)
Quercetina	(-)	Fluorescencia verde (+)
Ácido Clorogénico	(-)	Fluorescencia amarillo (+)

Positivo (+): 254nm: fluorescencia azul oscuro sobre amarillo

365nm: fluorescencia azul, amarillo o verde

Negativo (-): No se evidencio fluorescencia.

Con Tratamiento:

Muestra	365nm
Extracto Etanólico	Fluorescencia anaranjada (+)
Extracto Hexánico	(-)
Extracto Clorofórmico	Fluorescencia anaranjada (+)
Extracto Acetato de Etilo	Fluorescencia anaranjada (+)
Rutina	Fluorescencia anaranjada (+)
Naringenina	(-)
Quercetina	Fluorescencia anaranjada (+)
Ácido Clorogénico	(-)

Positivo (+): 365nm: fluorescencia anaranjado, amarillo-verde.

Negativo (-): No se evidencio fluorescencia.

13.1.9 ANTOCIANINAS

a. Cromatografía de Capa Fina

Sin Tratamiento:

Muestra	Visible	365nm
Extracto Etanólico	(-)	Rojo (+)
Extracto Hexánico	(-)	Rojo (+)
Extracto Clorofórmico	(-)	Rojo (+)
Extracto Acetato de Etilo	(-)	(-)
Rojo Sudán	Rojo (+)	Azul-violeta (+)
Azul de Metileno	Azul-violeta (+)	Azul-violeta (+)

Positivo (+): Visible y 365nm: rojo o azul-violeta

Negativo (-): No se evidencio coloración rojo o azul-violeta.

Con Tratamiento:

Muestra	Visible	365nm
Extracto Etanólico	(-)	(-)
Extracto Hexánico	(-)	(-)
Extracto Clorofórmico	(-)	(-)
Extracto Acetato de Etilo	(-)	(-)
Rojo Sudán	(-)	Rojo-violeta (+)
Azul de Metileno	Azul-violeta (+)	(-)

Positivo (+): Visible: azul-violeta

365nm: rojo-violeta

Negativo (-): No se evidencio coloración azul-violeta en visible y rojo-violeta en 365nm.

13.1.10 PRINCIPIOS AMARGOS

a. Cromatografía de Capa Fina

Sin Tratamiento:

Muestra	254 nm	365nm
Extracto Etanólico	(-)	Fluorescencia amarilla, roja (+)
Extracto Hexánico	(-)	Fluorescencia roja (+)
Extracto Clorofórmico	(-)	Fluorescencia verde, roja, amarilla. (+)
Extracto Acetato de Etilo	(-)	Fluorescencia verde y amarilla (+)

Positivo (+): 254nm: fluorescencia

365nm: fluorescencia

Negativo (-): No se evidencio fluorescencia.

Con Tratamiento:

Muestra	Visible
Extracto Etanólico	Fluorescencia rojo-café, azul (+)
Extracto Hexánico	Fluorescencia azul, azul-verde (+)
Extracto Clorofórmico	Fluorescencia café-rojo, azul, azul-verde (+)
Extracto Acetato de Etilo	Fluorescencia café-rojo, azul (+)

Positivo (+): Visible: rojo-violeta, café-rojo, azul-verde, azul.

Negativo (-): No se evidencio fluorescencia en estos colores.

13.1.11 ACEITES ESENCIALES**a. Cromatografía de Capa Fina****Sin Tratamiento:**

Muestra	254 nm	365nm
Extracto Etanólico	(-)	(-)
Extracto Hexánico	(-)	(-)
Extracto Clorofórmico	(-)	(-)
Extracto Acetato de Etilo	(-)	(-)
Eugenol	(-)	(-)

Positivo (+): 254nm: fluorescencia verde claro

365nm: fluorescencia azul

Negativo (-): No se evidencio fluorescencia verde o azul.

Con Tratamiento:

Muestra	Visible
Extracto Etanólico	Fluorescencia verde (-)
Extracto Hexánico	Fluorescencia verde (-)
Extracto Clorofórmico	(-)
Extracto Acetato de Etilo	Fluorescencia verde (-)
Eugenol	Fluorescencia azul (+)

Positivo (+): Visible: fluorescencia azul, verde-rojo o café.

Negativo (-): No se evidencio fluorescencia azul, verde-rojo, café.

13.2 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE *Lippia graveolens* (Orégano)

Familia: Verbenaceae
Orden 3: Lamiales
Subclase IV: Asteridae
Clase: Magnoliopsida
División: Magnoliophyta

13.3 ESQUEMA DE *Lippia graveolens* H.B.K. (Orégano)

13.4 MERCADO MUNDIAL DEL ORÉGANO

En el ámbito mundial la *Lippia graveolens* H.B.K. es un cultivo muypreciado para los Estados Unidos, los países de mayor exportación son: México, Turquía, Grecia, Israel y Marruecos. En 5 años el consumo total ha sido de 6,000 toneladas.

<i>País</i>	<i>Año</i>				
	<i>1991</i>	<i>1992</i>	<i>1993</i>	<i>1994</i>	<i>1995</i>
México	2186	1558	2080	2009	2100
Turquía	2731	2411	2717	3588	3392
Grecia	440	272	321	401	139
Israel	267	192	144	347	168
Marruecos	171	32	72	100	140
Misceláneos	340	204	595	350	156

Fuente: International Plant Genetic Resouces Institute (Proceedings of IGRI, international Workshop on Orégano), CIHEAM, Valenzano (Bari), Italy, 8-12 May 1996. Pag 145)

13.5 FUROSEMIDA

a. Generalidades:

Es un diurético de techo alto o diurético de asa, derivado del ácido antranílico. Tiene acción característica sobre la función tubular renal.

b. Acción diurética:

Inhibe selectivamente la resorción de NaCl en la rama ascendente gruesa del asa de Henle. Debido a la gran capacidad de absorción de NaCl de este segmento y al hecho de que la diuresis no es limitada por el desarrollo de acidosis, como sucede con los inhibidores de la anhidrasa carbónica, este fármaco pertenece al grupo de los agentes diuréticos más eficaces disponibles.

Inhibe el sistema de transporte acoplado $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ en la membrana luminal ascendente gruesa del asa de Henle. Al inhibir este transportador, los diuréticos del asa reducen la resorción de NaCl y también disminuyen el potencial positivo normal de la luz que deriva de la recirculación de K^+ , este potencial eléctrico normalmente impulsa la resorción de cationes divalentes en el asa.

c. Indicaciones:

Las indicaciones más importantes para el uso de furosemida incluyen edema pulmonar agudo, otros padecimientos edematosos e hipercalcemia aguda. Entre otras indicaciones se incluyen: hiperpotasemia, insuficiencia renal aguda, sobredosis de aniones.

d. Contraindicaciones:

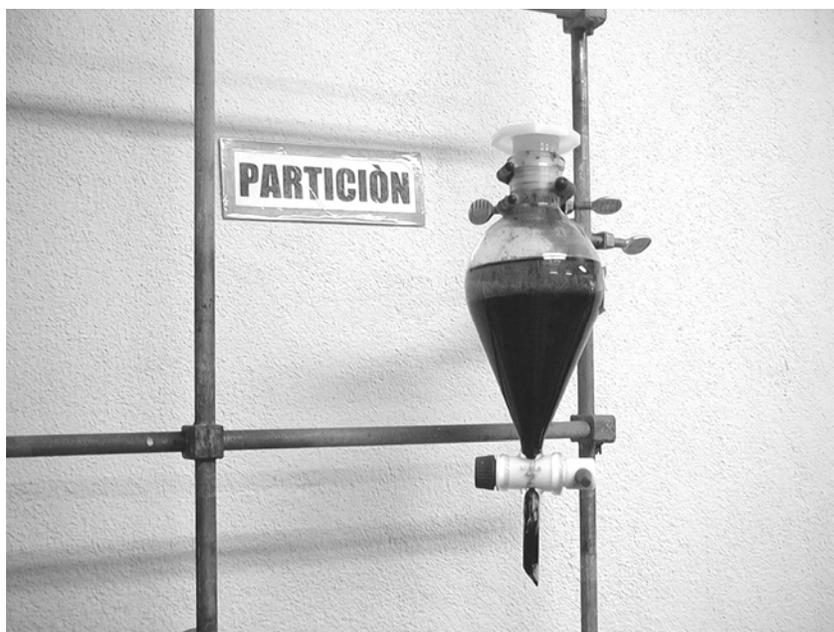
El uso excesivo de cualquier diurético es peligroso en cirrosis hepática, insuficiencia renal marginal o insuficiencia cardíaca congestiva.

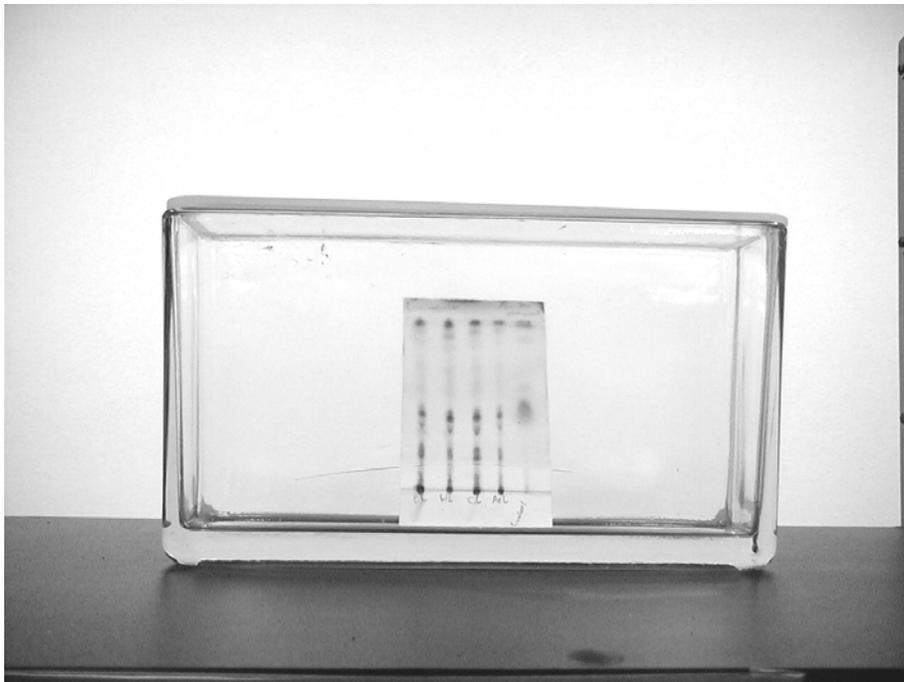
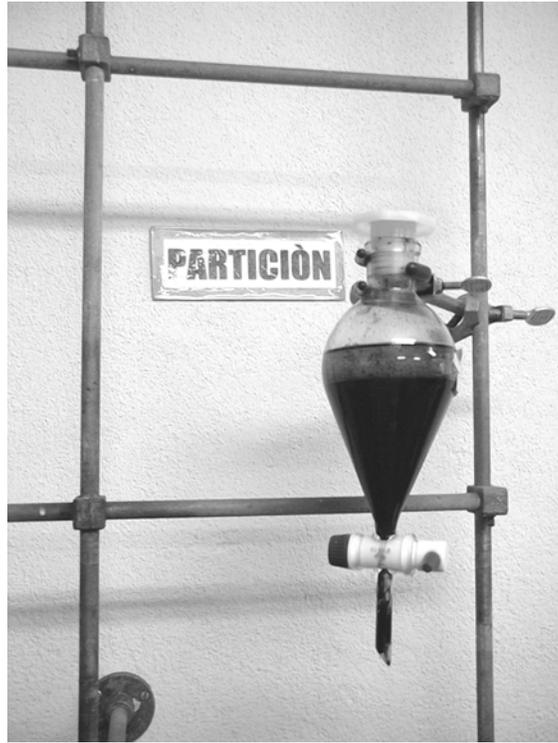
Fuente: KATZUNG, B. 1999. Farmacología básica y clínica. 7ª edición. Editorial Manual Moderno. México. Pag. 295-297. 1310pp.

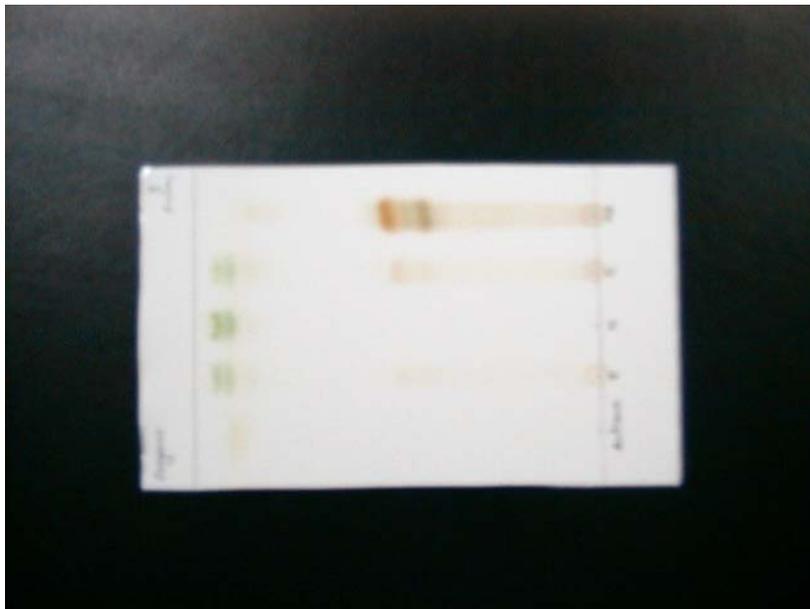
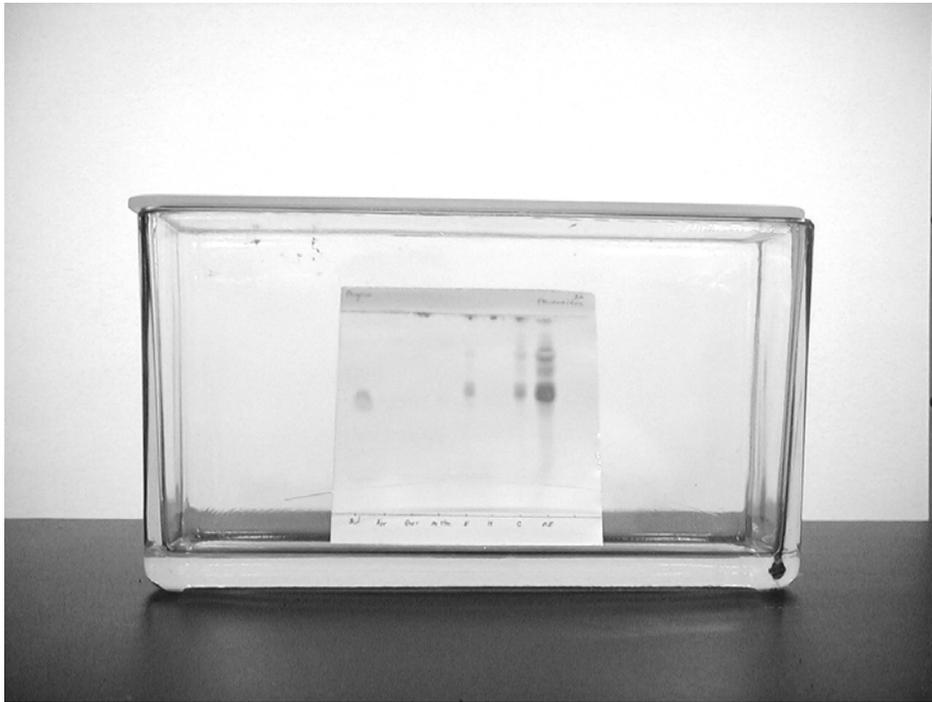














JOVITA AIDE MORALES MEDINA
AUTORA

DRA. AMARILLIS SARAVIA
ASESORA

LICDA. LILLIAN IRVING ANTILLON M.A.
DIRECTORA

M. SC. GERARDO ARROYO
DECANO