

Estudio fitoquímico del extracto de acetato de etilo y ensayos farmacológicos del extracto acuoso de hojas de *Wigandia caracasana* Kunth (Hydrophyllaceae)

Phytochemical Study of Ethyl Acetate Extract and Pharmacological Assay of *Wigandia caracasana* Kunth (Hydrophyllaceae) Leaves Aqueous Extract

BETH DÍAZ¹, ALÍRICA I SUÁREZ¹, STEPHEN TILLET², MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN³, GAZZEN EZZI³, KATIUSKA SARAVIA¹, ELSA CAMACHO E^{3,4} y ANITA ISRAEL⁴

Resumen

De un estudio fitoquímico y farmacológico de las hojas de *Wigandia caracasana* Kunth, se reporta el aislamiento de cinco compuestos del extracto de acetato de etilo, caracterizados mediante las técnicas de espectroscopia de RMN-¹H y RMN-¹³C de una y dos dimensiones y espectrometría de masas. Dos de los compuestos son reportados por primera vez para la especie y para el género: n-butyl-4-metoxifeniléster (1) y wigancaracasanol (2). Adicionalmente, se aislaron los flavonoides: quercetina-3-O-glucósido (3), kaemferol-3-O-glucósido (4) y el 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxikaemferol (5). Se demuestra la toxicidad aguda (DT₅₀: 57 mg/Kg) del extracto acuoso de las hojas de *W. caracasana* en ratones, así como el efecto colinérgico, histaminérgico y nicotínico sobre el íleon aislado de cobayo. Igualmente el extracto bloqueó la respuesta hipertensora inducida por la inmovilización forzada.

Palabras clave: *Wigandia caracasana*, toxicidad aguda, flavonoides.

Abstract

From a phytochemical and pharmacological study of extracts *Wigandia caracasana* Kunth leaves, we report the isolation of five compounds from the ethyl acetate extract, which were characterized by spectroscopic techniques ¹H-NMR, ¹³C-NMR of one and two dimensions and mass spectrometry. Two of the compounds are reported for first time for the species and for the genus: n-butyl-4-metoxifeniléster (1) and wigancaracasanol (2). Additionally, the flavonoids: quercetin-3-O-glucoside (3), kaemferol-3-O-glucoside (4) and 3,5-dihydroxy-7,4'-dimetoxikaemferol (5) were isolated. We report acute toxicity (DT₅₀ 57 mg/Kg) in mice of *W. caracasana* leaves aqueous extract. In addition we demonstrate that the contractile action of *W. caracasana* on isolated guinea pig ileum is mediated through muscarinic, nicotinic and histaminergic receptors. Finally, it is shown that *W. caracasana* inhibits the pressor response induced by forced immobilization.

Key words: *Wigandia caracasana*, acute toxicity, flavonoids.

Introducción

La familia Hydrophyllaceae consta de 18 géneros y 300 especies, las cuales crecen principalmente en las zonas templadas de América. En Venezuela existen sólo dos géneros: *Wigandia* e *Hydrolea*, siendo *W. caracasana* Kunth la única especie del género

presente en Venezuela (Constance y col., 1982). Las especies de la familia Hydrophyllaceae han sido estudiadas por sus propiedades alergénicas. Algunas de las plantas del género *Phacelia* (*P. crenulata* y *P. viscida*) contienen geranilhidroquinona, un indicador de alergenicidad (Reynolds y col., 1979). El género *Wigandia* Kunth ex HBK. comprende 6 especies ampliamente distribuidas en México, América Tropical hasta Perú y al este de las Indias Occidentales. Estudios realizados con ciertas especies han permitido el aislamiento de otros tipos de compuestos

¹ Unidad de Productos Naturales Facultad de Farmacia UCV.
² Herbario Víctor Manuel Ovalles. Facultad de Farmacia UCV.
³ Postgrado de Farmacología. Facultad de Farmacia UCV.
⁴ Laboratorio de Neuropéptidos.
Correspondencia: diazbeth53@yahoo.com

como flavonoides y terpenoides. Del extracto clorofórmico de las hojas de *Wigandia kunthii* Choisy se aislaron los flavonoides 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona y 5,4'-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona, así como los terpenoides farnesil- hidroquinona y wigandol (Gómez y col., 1980). *Wigandia urens* (Ruiz & Pav.) Kunth mostró ser rica en flavonoides y poseer actividad sobre los receptores de la proteína quemokina CCR5. El estudio biodirigido del extracto de CH₂Cl₂: MeOH de los vástagos de esta planta permitió el aislamiento de dos nuevos compuestos tipo pirano: 2,3-dihidroxi-4-metoxi-6,6,9-trimetil-6H-dibenzo(b,d)pirano y 8-metoxi-2-metil-2-(4'-metil-3'-pentenil)-2H-1-benzopirano-6-ol junto con el ácido-4-metoxi-3-(3'-metil-2-butenil)benzoico. La actividad del ensayo en CCR5 mostró valores de IC₅₀ entre 33,46 y 26,00 μM (Cao y col., 2003).

Se han realizado estudios de *W. caracasana* Kunth con la finalidad de determinar si posee actividad alérgica. En un estudio de las glándulas de esta planta se reportó 6 compuestos, a saber: las benzoquinonas: quinona **A**, quinona **B**; farnesilhidroquinona, wigandol; metilwigandol y geranilhidroquinona. En el mismo se encontró que solo la quinona **A**, la farnesilhidroquinona y el wigandol eran fuertes causantes de dermatitis alérgica por contacto (DAC) (Reynolds y col., 1981). En vista de estos antecedentes, se planteó la necesidad de analizar las hojas de *W. caracasana* a fin de determinar la presencia de metabolitos alérgicos reportados para la misma especie de otras latitudes y para otras especies del género y de la familia, así como realizar una discriminación farmacológica para determinar si la planta posee algún tipo de actividad biológica útil terapéuticamente.

Materiales y métodos

ESTUDIOS QUÍMICOS

Cien gramos (100 g) de las hojas secas y molidas de *W. caracasana* fueron sometidas a extracción continua en soxhlet con etanol. Una vez evaporado el solvente a presión reducida, el material se disolvió en metanol/agua 1:1 y se realizaron particiones utilizando solventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano y acetato de etilo, para obtener las diferentes fracciones orgánicas. La evaporación de los solventes a presión reducida dio como resultado 0,65, 1,51 y 3,76 g de las fracciones orgánicas, respectivamente. Se analizó la fracción de acetato de etilo por contener mayor número de compuestos y por ser el de mayor peso. La fracción de acetato de etilo, 1,5 g, se separó mediante la técnica de cromatografía de columna utilizando 60 g de sílica gel como adsorbente y guiado por la técnica de cromatografía de capa fina

(CCF) en sílica gel. Se recolectaron 300 fracciones de 25 ml cada una, 15 fracciones eluidas con CH₂Cl₂, 35 con CH₂Cl₂/AcOEt 10%, 40 con CH₂Cl₂/AcOEt 20%, 50 con CH₂Cl₂/AcOEt 50%, 50 con CH₂Cl₂/AcOEt 70%, 70 con AcOEt 100% y 40 con AcOEt/MeOH 10%. Las fracciones fueron combinadas en grupos de acuerdo a los resultados de la CCF. El estudio de las fracciones obtenidas dio como resultado el aislamiento de cinco (5) compuestos: el n-butil-4-metoxifenil éster (**1**) (Alper y col., 1970, (AIST: SDBS ¹³C N° 1785CDS-05-001), obtenido de las fracciones 23-29 (10 mg) un difeniléster derivado del ácido rosmarínico denominado wigancaracasanol (**2**) (Iqbal, 2004; Kelly y col, 1976; Mitra y col., 2005; Amani, 2000 y Ren-Wang y col., 2005) de las fracciones 59-62 (20 mg) y los flavonoides: quercetina-3-O-glucósido (**3**) (Agrawal, 1989) de las fracciones 200-209 (8 mg), el kaemferol (**4**) y el 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxikaemferol (**5**) (Agrawal, 1989, Bong y col, 2006, Abdul, 1999 (<http://eprints.hec.gov.pk/720/1/561.htm>) de las fracciones 220-230 (15 mg). Las estructuras de los compuestos fueron propuestas a partir de los datos espectroscópicos de una y dos dimensiones, los de espectrometría de masas y la comparación con datos reportados en la literatura.

PROCEDIMIENTO GENERAL

El espectro IR se tomó en un espectrómetro SHIDMAZU 470. Los espectros de RMN se realizaron en un espectrómetro a 270 MHz con: acetona-d₆, piridina-d₆ y CDCl₃ como solventes y TMS como estándar interno. Los espectros de masa se realizaron en un espectrómetro de masas VARIAN Saturno 2000 y los análisis de cromatografía de columna se realizaron con sílica gel 60 de la casa Macherey y Nagel 516 Duren con tamaño de partícula 0,063 - 0,2 Mesh como adsorbente y guiado por la técnica de cromatografía de capa fina (CCF) en sílica gel 60 F₂₅₄ como adsorbente, soportada en aluminio (Merck).

DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE LOS COMPUESTOS

n-Butil-4-metoxifenil éster (1): aceite de color ámbar. **RMN-¹H** (CDCl₃), ¹H δppm: 7,89 (2H, d, *J* = 8,64 Hz, H-2', 6'); 6,82 (2H, d, *J* = 8,64 Hz, H-3', 5'); 3,83 (3H, s, CH₃O C-4'). **RMN-¹³C** (CDCl₃), ¹³C δppm: 171,2 (CO); 65,9 (C-1); 31,7 (C-2); 22,7 (C-3); 14,2 (C-4); 121,2 (C-1'); 132,5 (C-2', 6'); 115,4 (C3', 5'); 161,4 (4'); 51,9 (OCH₃, C-4'). **EM** de ionización química *m/z*: 208; 108(100%) y 152.

Wigancaracasanol (2): aceite color ámbar. **RMN-¹H** (acetona-d₆), ¹H δ ppm: anillofeniletíl: 6,67 (1H, dd, *J* = 8,15 y 1,73 Hz, H-6'); 6,77 (1H, d, *J* = 7,93 Hz, H-5'); 8,86 (1H, d, *J* = 1,73 Hz, H-2'); 5,24

(1H, m, $J = 4,1$ y $8,0$ Hz, H-8') y 3,10 (m, 1H, $J = 4,1$ y $8,0$ Hz, H-7'). Anillo feniletilen acrilato: 6,27 (1H, d, $J = 15,82$ Hz, H- α); 6,87 (1H, d, $J = 7,91$ Hz, H-5); 7,06 (1H, dd, $J = 8,15$ y $1,73$ Hz, H-6); 7,17 (1H, d, $J = 1,73$ Hz, H-2); 7,60 (1H, d, $J = 15,82$ Hz, H- β). **RMN-¹³C** (acetona-d₆), ¹³C δ ppm: anillo feniletil: 36,8 (C-7'), 73,2 (C-8'), 128,4 (C-1'), 116,6 (C-2'), 143,9 (C-3'), 145,5 (C-4'), 115,4 (C-5'), 120,9 (C-6'). Anillo feniletilén acrilato: 146,1 (C-7), 113,9 (C-8), 166,5 (C-9), 126,6 (C-1), 114,4 (C-2), 144,9 (C-3), 148,3 (C-4), 115,7 (C-5), 122,2 (C-6). **EM:** m/z: (electrospray en modo positivo y modo negativo): 358,93 (M-1) y 360,96 (M+1) y los fragmentos: 342,96; 196,94; 178,95 y 162,94 (100 %). **IR:** (KBr, cm⁻¹): 1742; 1729; 1716; 1700 y 1684.

Quercetina -3-O-glucósido (3): sólido de color amarillo. **RMN-¹H** (acetona-d₆), ¹H δ ppm: 12,76 (1H, s, C-5); 7,61 (1H, d, $J = 8,39$ Hz, H-6'); 6,87 (1H, d, $J = 8,39$ Hz, H-5'); 6,32 (1H, s, H-8); 6,30 (1H, s, H-6); 5,68 (1H, d, $J = 7,59$ Hz, H-1); 4,2 - 3,4 (m). **RMN-¹³C** (DMSO-d₆), ¹³C δ ppm: 178,3 (C-4); 157,0 (C-2); 162,2 (C-5); 99,3 (C-6); 165,4 (C-7); 94,0 (C-8); 157,3 (C-9); 104,6 (C-10); 120,1 (C-1'); 115,5 (C-2'); 146,2 (C-3'), 115,7 (C-5'); 123,3 (C-6'); glucosa: 104,9 (C-1); 72,9 (C-2); 74,9 (C-3); 69,3 (C-4); 77,2 (C-5); 61,4 (C-6).

Kaemferol-3-O-glucósido (4): aceite de color ámbar. **RMN-¹H** (acetona-d₆), ¹H δ ppm: 12,38 (1H, s, C-5); 8,12 (2H, d, $J = 8,91$ Hz, H-2', 6'); 6,95 (2H, d, $J = 8,91$ Hz, H-3', 5'); 6,49 (1H, s, H-8); 6,25 (1H, s, H-6); 5,25 (1H, d, $J = 7,70$ Hz, H-1); 4,2 - 3,4 (m). **RMN-¹³C** (DMSO-d₆), ¹³C δ ppm: 158,1 (C-2); 135,4 (C-3); 178,8 (C-4); 162,0 (C-5); 98,9 (C-6); 164,6 (C-7); 93,9 (C-8); 157,1 (C-9); 105,2 (C-10); 121,6 (C-1'); 131,3 (C-2'); 115,1 (C-3'); 160,3 (C-4'); 115,1 (C-5'); 131,3 (C-6'); glucosa: 103,9 (C-1), 74,6 (C-2); 77,0 (C-3); 70,3 (C-4); 77,2 (C-5); 61,8 (C-6).

Kaemferol -3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (5): aceite color amarillo. **RMN-¹H** (CDCl₃), ¹H δ ppm: 12,82 (1H, s, C-5); 6,52 (1H, s, H-6); 6,57 (1H, s, H-8); 7,79 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-2', 6'); 6,95 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-3', 5'); 3,95 (3H, s, OCH₃, C-7), 3,91 (3H, s, OCH₃, C-4').

Estudios de actividad biológica

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO

Las hojas secas y molidas (100 g) se sometieron a decocción por 30 min con 500 ml de agua destilada y se filtro, una vez obtenido el filtrado se sometió a liofilización, obteniéndose (8,00 g; 8,0%).

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS TÓXICA 50 (DT50) DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *W. CARACASANA*

La DT₅₀ se determinó de acuerdo al método de Litchfield y Wilcoxon (1948). Se emplearon ratones (machos) de la cepa *Balb/C* con un peso de $19,16 \pm 0,23$ g distribuidos al azar en grupos de seis animales cada uno. Los ratones fueron suministrados por el Instituto Nacional de Higiene «Rafael Rangel», Caracas. Los animales tenían agua y alimento (Ratarina®) *ad libitum* hasta el momento del experimento. Un grupo control fue tratado con solución fisiológica (NaCl, 0,9%) - y a los grupos experimentales se les administraron las dosis de: 0,5, 1, 4, 8, 16, 32, 64, 128 y 256 mg/Kg del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *W. caracasana*. El extracto fue administrado por vía intraperitoneal, en un volumen requerido de 0,1 ml/10 g. Los animales fueron colocados en jaulas de observación y los efectos del extracto fueron observados a los 10, 30 y 60 min después del tratamiento. Se construyó una curva de tiempo-efecto para estimar el tiempo de efecto pico (TEP) del extracto, siendo éste el tiempo al cual la mayoría de los animales presentó un efecto tóxico en particular.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO DE LAS HOJAS DE *W. CARACASANA* SOBRE EL ILEON AISLADO DE COBAYO

Preparación del ileon de cobayo: El ileon de cobayo se obtuvo a partir del cobayo albino, hembra, con un peso de 170 g. sometido a ayuno por aproximadamente 12 h antes del experimento. Posterior al sacrificio del animal mediante la exposición por vía inhalatoria a éter etílico, se realizó la extracción del ileon tal como lo describe Perry (1968). Tras la exposición del ileon mediante una incisión longitudinal en el abdomen, éste fue removido y cortado en secciones de aproximadamente 2 cm de longitud y colocado en solución fisiológica (NaCl 0,9%). Posteriormente fue limpiado de los restos del tejido que lo rodeaba, manteniéndolo en solución de Tyrode (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,2 g CaCl₂; 0,1 g MgCl₂; 1 g NaHCO₃; 0,05 g NaH₂PO₄; 1g Glucosa; y H₂O destilada), burbujeada con carbógeno (O₂ 95% y CO₂ 5%). Seguidamente, cada sección fue fijada por un extremo a un soporte de vidrio y por el otro extremo a un transductor de fuerza-desplazamiento (FT-03, Grass Instruments), y colocada en un baño para órgano aislado en solución de Tyrode burbujeada con carbógeno a pH 7,4 y a 37 °C. La preparación se dejó estabilizar durante 60 minutos, lavándola cada 10 minutos con solución de Tyrode. Al ileon se le aplicó una tensión basal de 1 g.

Fármacos: Extracto acuoso de *W. caracasana* (100 µg/ml, 1 mg/ml y 100 mg/ml); carbacol (cloruro de carbamilcolina, 0,01 µg/ml); nicotina (2 µg/ml); histamina (0,2 µg/ml); sulfato de atropina (0,01 µg/ml), bromuro de hexametonio (10 µg/ml) y cloruro de ciproheptadina (0,01 µg/ml).

Procedimiento: El experimento se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Turner (1965). Se ensayaron en primer lugar los agonistas carbacol, histamina y nicotina en ausencia del extracto, para obtener una respuesta control de cada agonista; en segundo lugar los agonistas fueron evaluados en presencia del extracto de *W. caracasana*, a la concentración a la cual se observó un efecto (100 mg/ml), y en tercer lugar se ensayó el extracto solo y en presencia de los antagonistas: atropina, ciproheptadina y hexametonio, respectivamente. Las respuestas fueron registradas en un polígrafo digital isotónico, Modelo 7400 (Grass Astro-Med, Inc., Mass.).

EFFECTOS DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO DE LAS HOJAS DE *W. CARACASANA* SOBRE LA RESPUESTA CADIOVASCULAR INDUCIDO POR LA INMOVILIZACIÓN FORZADA

Animales y procedimiento

Se emplearon ratas macho, de la cepa *Sprague-Dawley* de $224 \pm 8,87$ g de peso corporal, procedente del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene «Rafael Rangel», Caracas. Las ratas fueron mantenidas bajo condiciones controladas de luz y temperatura y con libre acceso al agua y a la Ratarina® *ad libitum*. Todos los métodos y protocolos fueron revisados y aprobados por la Comisión de Bioterio de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

El registro de los parámetros cardiovasculares, presión arterial sistólica y diastólica (PAS y PAD) y la frecuencia cardíaca (FC) expresada en latidos por minuto (l.p.m.) fueron realizados en ratas conscientes por un método no invasivo, durante tres días consecutivos, mediante el uso de un plestimógrafo digital de cola (LE 5000, LETICA Scientific Instruments).

El día del experimento se determinó la presión arterial y frecuencia cardíaca basal (basal-1) y seguidamente los animales fueron divididos en tres grupos: Control: animales que solo se les administró el vehículo por vía oral (intragástrica) o por vía intraperitoneal, según el caso (N=6), valsartán: animales que se les administró valsartan, a una dosis de 10 mg/kg por vía intragástrica (N=5) y extracto de *W. caracasana*: animales que recibieron 1/2 de la DT₅₀ del extracto de *W. caracasana* (N=3).

Una hora después se determinó la PAS, PAD, PAM y la FC (basal 2), luego se procedió a la aplicación del estrés. Para ello, las ratas fueron inmovilizadas en posición dorsal, fijando sus extremidades a una base metálica plana, y manteniendo inmóvil la cabeza con cinta adhesiva. El estrés fue inducido entre las 9:00 y las 11:00 horas, durante dos horas. Una vez finalizado este período se determinó inmediatamente los parámetros cardiovasculares (Kvetnansky y Mikulaj, 1970).

Los datos fueron expresados como la media \pm E.E.M de la presión arterial media (PAM), esta última calculada como la suma de la presión diastólica y un tercio de la presión diferencial. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Se consideró como significativo un valor $p < 0,05$.

Resultados y discusión

Del extracto de acetato de etilo de las hojas de *W. caracasana* se aislaron 5 compuestos mediante cromatografía de columna en sílica gel. Las estructuras de los compuestos fueron elucidadas por análisis de espectrometría de masas y mediante RMN-¹H y -¹³C. El espectro de masas del compuesto **1** (figura 1) dio un pico de relación m/z 208 correspondiente a una fórmula molecular C₁₂H₁₆O₃. En el espectro de RMN-¹³C se observan 12 señales de carbono. El experimento DEPT analizado con ¹³C indicó la presencia de 3 carbono cuaternario, uno tipo éster, 2 señales de carbonos aromáticos tipo metínicos, 3 metilenos, un metil y un metoxi. El espectro de RMN-¹H del compuesto **1** mostró dos dobletes centrados en 7,89 y 6,82 ppm ($J = 8,6$ Hz) que integran para dos protones cada uno. En 4,30 ppm un triplete asignado al CH₂ unido a un oxígeno, en 3,83 ppm una señal característica de grupo metoxi (CH₃O), señales metilénicas y metílica entre 2,17 y 1,20 ppm. Sobre la base de los datos espectroscópicos del compuesto **1** y la comparación de los valores con aquellos encontrados en la literatura para el n-butil-p-hidroxibenzoato (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) SDBS ¹³C NMR N° 1785CDS-05-001) y el 4-cloro-1-pentil-p-metoxibenzoato (Alper y col., 1970), se evidenció que el compuesto **1** se trata del n-butil-4-metoxifeniléster, siendo este el primer reporte del aislamiento del compuesto para la planta *W. caracasana*.

La espectrometría de masas electrospray del compuesto **2** (figura 2) en modo negativo reveló un ion molecular m/z 358,93 (M - 1) y en modo positivo un ion molecular 360,96 (M+1) correspondiente a una fórmula molecular C₁₈H₁₆O₈. El espectro de IR(KBr, cm⁻¹) mostró bandas en 1742 y 1729 carac-

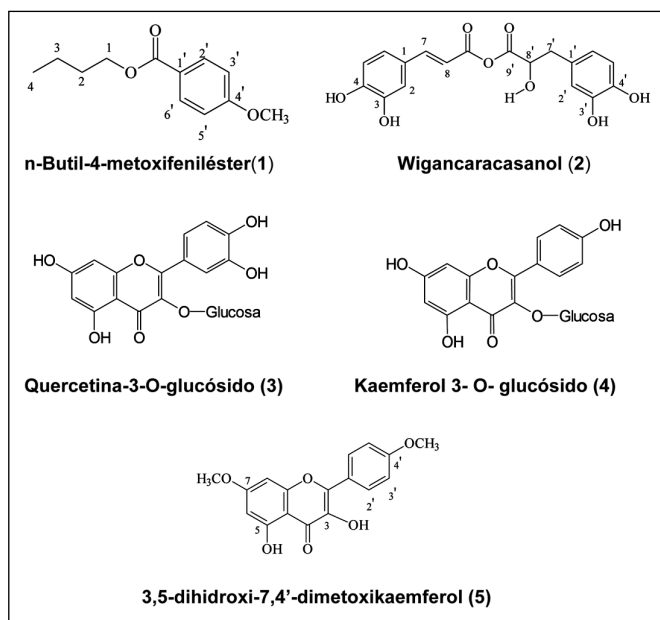


Figura 1. Compuestos aislados del extracto de acetato de etilo de las hojas de *W. caracasana* Kunth

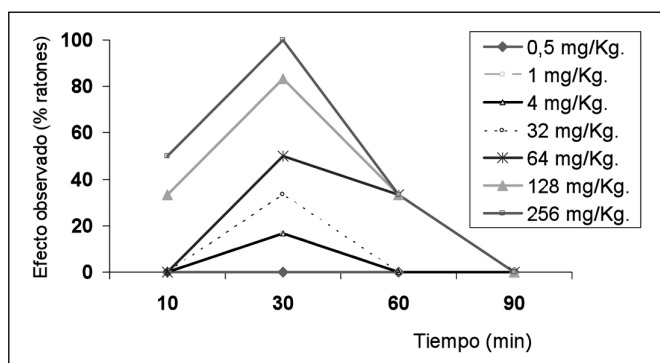


Figura 2. Tiempo de efecto pico inducido por el extracto acuoso de *W. caracasana* para el síndrome de contorsión. Se administraron dosis de 0,5, 1, 4, 32, 64, 128 y 256 mg/Kg peso a cada grupo. Se observa que a los 30 min. la mayoría de los grupos presentó el síndrome de contorsión como efecto tóxico agudo.

terísticas de carbonilo tipo éster, y en 1716, 1700 y 1684 señales de dobles enlaces. El espectro de RMN-¹H- mostró cuatro dobletes centrados en- 7,57 y 6,31 ppm ($J = 15,8$ Hz c/u), 7,17 ppm ($J = 1,7$ Hz) y 6,86 ppm ($J = 7,9$ Hz) y un doblete de dobletes en 7,02 ppm ($J = 1,7$ y 8,2 Hz), dos dobletes en 6,86 ppm ($J = 1,7$ Hz) y 6,76 ppm ($J = 7,9$ Hz) ppm y adicionalmente otro doblete de dobletes en 6,68 ppm ($J = 1,7$ y 7,9 Hz). Estos grupos de señales sugirieron que el compuesto **2** posee dos anillos aromáticos con patrón de sustitución tipo AMX, dos multipletes centrados en 5,24 y 3,10 ppm con $J = 4,1$ y 8,0 Hz, respectivamente. El espectro de RMN ¹³C reveló la presencia de 17 señales. El experimento DEPT indicó que 8 señales son metínicas tipo aromáticas y olefínicas entre 146,1 – 113,9 ppm, una señal metínica en 73,2 ppm y una metilénica en 36,7 ppm y 6 señales de átomos de carbono cuaternario y una se-

ñal de carbono carbonílico tipo éster en 166,5 ppm de doble intensidad. En el espectro de correlación HETCOR se observan las correlaciones de la señal en 36,7 ppm con el multiplete en 3,10 ppm, la señal en 73,2 ppm se correlaciona con el multiplete en 5,22 ppm. En el experimento FLOCK se observan las correlaciones: C-1[®] H-8, C-1[®] H-5, C-1[®] H-6, C-1[®] H-7, C-2[®] H-7, C-2[®] H-6, C-6[®] H-2, C-6[®] H-7; C-1'[®] H-5', C-2'[®] H-6', C-6'[®] H-5', C-7'[®] H-8', C-7'[®] H-2', C-7'[®] H-6'. C-1'[®] H-7'. Con todos estos datos se pudo concluir que el compuesto **2** está constituido por seis (6) carbonos aromáticos tipo metínicos (CH), dos (2) carbonos olefínicos tipo (CH), dos (2) carbonos carbonílicos tipo (COOR), seis (6) carbonos cuaternarios, un (1) carbono metínico (CH) y un (1) carbono tipo metileno (CH₂). Los datos obtenidos del FLOCK y la espectrometría de masas fueron importantes para la asignación de la unión de las dos unidades que constituyen el compuesto **2**. La asignación de los valores de las señales observadas en los espectros se llevó a cabo por comparación con datos reportados de compuestos muy similares: el ácido rosmarínico (constituido por una unidad de ácido cafeico y una unidad de ácido dihidroxifeniláctico), el cual ha sido aislado de plantas de diferentes familias, géneros y especies (Kelley y col., 1975; Mitra y col., 2005), teucrol (derivado descarboxi del ácido rosmarínico) aislado por primera vez de *Teucrium pilosum* (Amani y col., 2000), el ácido salviánico (considerado como una hidratación del ácido rosmarínico) aislado de *Salvia miltiorrhiza* (Ren-Wang Jiang y col, 2005) y el anhídrido caféico (constituido por dos unidades de ácido caféico) aislado de *Ehretia obtusifolia* (Iqbal Kiran, 2004). Sobre la base de los datos obtenidos y la comparación con los datos reportados se sugirió que el compuesto **2** podría tratarse de un derivado del ácido rosmarínico denominado wigancaracasanol **2**. Este es el primer reporte del aislamiento de wigancaracasanol de la planta *W. caracasana*, del género y la familia.

Los espectros RMN-¹H de los compuestos **3**, **4** y **5** (figura 1) mostraron señales características de flavonoides en 12,76; 12,39 y 12,73 ppm para el grupo hidroxilo de la posición 5, respectivamente. Los compuestos fueron caracterizados por sus datos de RMN-¹H y ¹³C reportados en la literatura. El espectro de protones del compuesto **3**. En 8,12 ppm se observa una señal para el protón de la posición 2', dos dobletes en 7,71 y 6,87 ppm ($J = 8,4$ Hz, H-5' y H-6'), dos singletes en 6,32 y 6,30 ppm (H-8 y H-6); en 5,68 ppm un doblete característico de un protón anomérico y entre 5,66 a 3,89 ppm señales de tipo metilénicas fueron observadas. El espectro de RMN-¹³C reveló una señal en 178,3 ppm característica del grupo carbonilo cetónico a,b insaturado de flavonoides;

tres señales en 123,3, 115,7 y 115,3 ppm (C-6', C-2', y C-5') del anillo B, respectivamente. Las señales en 94,0 y 99,3 ppm corresponden a C-8 y C-6 del anillo A. Entre 77,2 y 61,4 ppm se observaron 5 señales características de una glucosa, una de ellas correspondiente a un carbono metileno en 61,4 ppm. Estos resultados sugieren que el compuesto **3** es un flavonoide y fue identificado por comparación con valores reportados en la literatura como quercetina-3-O-glucósido (Agrawal, 1989).

El espectro de RMN-¹H del compuesto **4** mostró señales semejantes al compuesto **3**, ya señalado anteriormente, y dos dobletes en 8,11 y 6,95 ppm ($J = 8,9$ Hz, H-2', H-6' y H-3', H-5'). Este patrón de sustitución sugiere un sistema aromático AA'BB'. Dos singletes aparecen en 6,49 y 6,25 ppm H-8 y H-6, y en 5,26 ppm la señal característica del protón anomérico de glucósidos. El espectro de RMN-¹³C, reveló la presencia de quince señales entre 178,8 y 93,9 ppm, dos de ellas en 131,3 y 115,1 ppm correspondientes a dos carbonos metínicos en las posiciones 2', 6' y 3', 5'. Adicionalmente, se observó señales de una molécula de glucosa en 77,2 y 61,9 ppm, siendo la señal en 61,9 ppm correspondiente al carbono tipo metileno. Al tratarse de un flavonoide se comparó los valores obtenidos con aquellos reportados en la literatura y se identificó el compuesto **4** como kaemferol 3-O-glucósido (Agrawal, 1989).

En el espectro de RMN-¹H del compuesto **5** se observan señales muy similares a las de los compuestos **3** y **4**, ya señalado arriba, dos dobletes en 7,79 y 6,95 ppm cada uno con constante de acoplamiento $J = 8,6$ Hz para los protones de las posiciones 2', 6' y 3', 5' y dos singletes en 6,57 y 6,52 ppm de los protones de las posiciones 8 y 6 del flavonoide. A diferencia de los compuestos **3** y **4**, el espectro de RMN-¹H del compuesto **5** reveló la presencia de dos señales en 3,95 y 3,91 ppm, características de los grupos metoxi. La identificación del compuesto **5** se llevó a cabo por el análisis espectroscópico y la comparación con datos reportados en la literatura para el compuesto sintético 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona obtenido a partir de kaemferol (Bong y col., 2006) y el natural 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (Abdul, 1999). Los resultados condujeron a identificar al compuesto **5** como 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona. Este es el primer reporte del aislamiento de este compuesto en la planta *W. caracasana*.

Actividad biológica

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS TÓXICA 50 (DT₅₀)

DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO

DE LAS HOJAS DE *W. CARACASANA*

La toxicidad observada en los grupos tratados con el extracto acuoso liofilizado de las hojas de

W. caracasana estuvo representada por el síndrome de contorsión y se observó a las dosis: 1, 4, 32, 64, 128 y 256 mg/Kg. El grupo que recibió la dosis de 0,5 mg/Kg no presentó ningún efecto tóxico, mientras que la dosis de 256 mg/Kg produjo el síndrome de contorsión en el 100% de los animales de ese grupo. Las dosis de 128, 64, 32, 4 y 1 mg/Kg, provocaron este efecto en el 83,3%, 50,0%, 33,3%, 16,6% y 16,6% de los animales, respectivamente (Figura 2). El tiempo de efecto pico (TEP) fue a los 30 minutos. La DT₅₀ calculada por el método de Litchfield y Wilcoxon fue de 57 mg/Kg (los límites fiduciaros estaban entre 110,83 y 30,35).

EFFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO DE LAS HOJAS DE *W. CARACASANA* SOBRE EL ÍLEON AISLADO DE COBAYO

Como se observa en la figura 3, la administración del extracto de *W. caracasana* (100 mg/ml) produjo una respuesta contráctil del íleon aislado de cobayo de 0,55 g. Por su parte, la adición de carbacol al íleon aislado de cobayo originó una respuesta contráctil de 0,65 g cuya magnitud fue similar a la obtenida por la *W. caracasana*. La administración de carbacol se incrementó significativamente cuando se administró previamente el extracto acuoso de *W. caracasana* llegando a valores de 1,08 g. Y finalmente la pre-incubación del íleo de cobayo con un bloqueante del receptor colinérgico como lo es la atropina inhibió completamente la respuesta contráctil inducida por la *W. caracasana*. Estos resultados sugieren que los componentes del extracto acuoso producen contracción a través de los receptores muscarínicos.

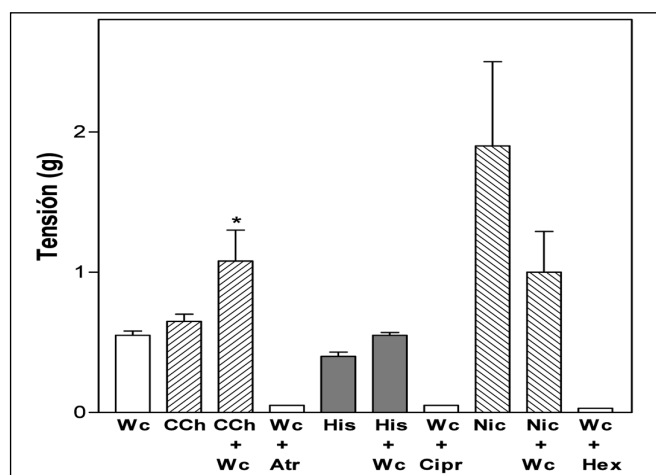


Figura 3. Efectos del carbacol, la histamina, la nicotina, sus respectivos antagonistas y el extracto acuoso de las hojas de *W. caracasana* sobre el íleon aislado de cobayo. Wc: extracto acuoso de las hojas de *W. caracasana* (100 mg/ml), CCh: carbacol (0,01 µg/ml); Atr: atropina (0,01 µg/ml); His: histamina (0,2 µg/ml); Cipr: ciproheptadina (0,01 µg/ml); Nic: nicotina (2 µg/ml); Hex: hexametonio (10 µg/ml) (* $p < 0,05$).

Ahora bien, la administración de histamina produjo contracción del íleon aislado de cobayo (0,4 g). La administración previa del extracto de las hojas de *W. caracasana*, originó una respuesta similar de la histamina cuando se compara con la respuesta a la histamina sola (0,55 g). La respuesta contráctil del extracto acuoso de *W. caracasana* fue bloqueada por la ciproheptadina, un antagonista histaminérgico. Esto sugiere que en la respuesta contráctil del extracto acuoso podría estar mediado a través de la estimulación de receptores histaminérgicos.

La respuesta contráctil del íleon de cobayo ante la nicotina resultó notablemente alta ($1,9 \pm 0,6$ g) en comparación a la producida por el carbacol ($0,65 \pm 0,05$ g), la histamina ($0,4 \pm 0$ g), y el extracto de *W. caracasana* ($0,43 \pm 0,16$ g). La misma fue bloqueada parcialmente por el extracto acuoso liofilizado de las hojas de *W. caracasana*, pero dicho efecto no fue significativo.

La adición de hexametonio al tejido inhibió completamente la respuesta del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *W. caracasana*, lo que parece indicar que parte de las acciones contráctiles del extracto están mediadas a través de receptores nicotínicos.

Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos al evaluar el efecto del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *W. caracasana* en experimentos *in vitro* sobre el íleon de cobayo permite sugerir un papel de los metabolitos presentes en el extracto como agonistas de los receptores muscarínicos, histamínicos y nicotínicos.

EFFECTOS DEL EXTRACTO ACUOSO LIOFILIZADO DE LAS HOJAS DE *W. CARACASANA* SOBRE LA RESPUESTA CARDIOVASCULAR INDUCIDO POR LA INMOVILIZACIÓN FORZADA

La figura 4 muestra los incrementos de la presión arterial media inducido por la Inmovilización forzada (IF) en animales control tratados con un bloqueante del receptor AT_1 , el valsartán, y con el extracto de *W. caracasana*. Como se observa, la IF incrementó significativamente la presión arterial media en valores de 52,71 mmHg. El pretratamiento con valsartán, no solo inhibió el incremento de la PAM inducido por la IF, sino que también desenmascaró un efecto vasodresor que se manifiesta con una reducción de la PAM de 17,18 mmHg, por debajo del valor basal. La *W. caracasana*, por su parte, redujo significativamente el incremento de la presión arterial inducido por la IF, siendo el incremento de la PAM de 19 mmHg, el cual fue 65% menor al observado en condiciones controles. Ninguno de los pre-tratamiento afectó significativamente la presión arterial media basal.

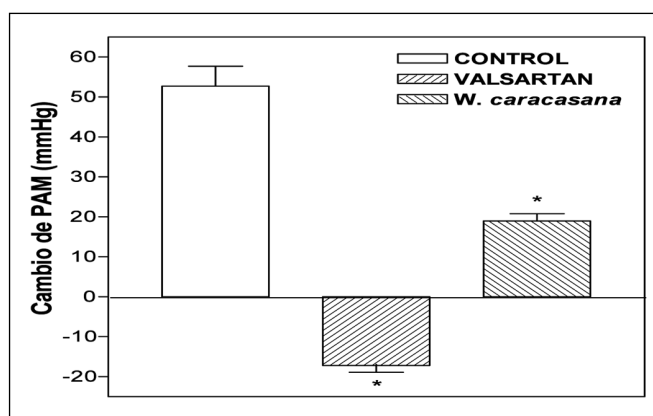


Figura 4. Efecto del extracto acuoso de *W. caracasana* y el valsartán sobre la respuesta presora inducida por la inmovilización forzada en ratas. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M de N= 6, 5 y 3 para cada grupo, respectivamente. * $p < 0,05$ con respecto a los grupos control y valsartán.

Conclusiones

Muchas de las especies de la familia Hydrophyllaceae son ricas en compuestos tipo alergénico (Reynolds y col., 1979), flavonoides y terpenoides (Gómez y col., 1980). En el estudio realizado con el extracto acetato de etilo de las hojas de la planta *W. caracasana* no se evidenció la presencia de metabolitos tipo alergénico. En el aislamiento de los metabolitos se encontró que los compuestos aislados de las hojas no se ha reportado ninguno que presente esa actividad. Se hace necesario ampliar la investigación y analizar otras fracciones orgánicas de las hojas de la planta donde pudiesen estar presentes ese tipo de compuestos. De los resultados de los ensayos farmacológicos se encontró que el extracto acuoso liofilizado de las hojas de la planta *W. caracasana* sobre el íleon de cobayo permitió atribuirle un papel agonista de los receptores muscarínicos, histamínicos y nicotínicos presentes en este tejido y el estudio del efecto del extracto de *W. caracasana* sobre la respuesta cardiovascular en estrés inducido por inmovilización forzada indica que el extracto es capaz de reducir la respuesta presora frente a un estímulo estresante como lo es la IF, sin afectar la presión basal, lo que sugiere que podría tener una aplicación en la reducción de los niveles incrementados de la presión arterial inducidos por estimulación del sistema nervioso simpático.

Agradecimientos

Agradecemos al Consejo de Desarrollo y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela por el financiamiento del Proyecto PI-06-30-5151-2007.

Referencias bibliográficas

- Abdul Khaliq Dardass. 1999. Spectroscopic and chemical studies on the chemical constituents of *Salvia triloba* and Related Plant Species. *Higher Education Commission Pakistan*, pp: 138-140. (<http://eprints.hec.gov.pk/720/1/561.htm>).
- Agrawal PK. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier Science Publishing B V, Amsterdam, Oxford, New York y Tokio, 1989. Cap 3 pp: 95-167.
- Alper H, Edward JT. 1970. Reactions of acids chlorides with ethers in the presence of iron pentacarbonyl. *Canadian J Chem*. 48(10):1623-1624.
- Amani MD, Mousllamy El, Hawas UW, Hussein AM. 2000. Teucrol, a descarboxyrosmarinic acid and its 4'-O-triglycoside, teucroside from *Teucrium pilosum*. *Phytochem* 55: 927-932.
- Bong GK, Hojung K, Jeong HK, Yoongho L, Joong-Hoon A. 2006. Synthesis of Ermanin, 5,7-Dihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone from kaempferol, 3,5,7,4'-Tetrahydroxyflavone with Two O-methyltransferases Expressed in *E. coli*. *Bull Korean Chem Soc* 27(3): 357-358.
- Cao S, Rossant C, Ng S, Buss AD, Butler MS. 2003. Phenolic derivatives from *Wigandia urens* with weak activity against the chemokine receptor CCR5. *Phytochem* 64: 987-990.
- Constance L, Austin D. 1982. Flora de Venezuela. Ediciones Fundación Educación Ambiental. V:VIII, tercera parte. pp. 7-11.
- Gómez F, Quijano L, Calderón JS, Rios T. 1980. Terpenoids isolated from *Wigandia kunthii*. *Phytochem* 19: 2202-2203.
- Iqbal K. 2004. Phytochemical Studies on *Duranta repens* Linn and *Ehretia obtusifolia* Hochst. PhD Thesis, University of Karachi, Karachi.
- Kelley CJ, Harruff RC, Carmack M. 1976. The polyphenolic acids of *Lithospermum ruderae*. II. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance of Lithospermic and Rosmarinic Acids *J Org Chem* 47 (3): 449-455.
- Kvetnansky R, Mikulaj L. 1970. Adrenal and urinary catecholamines in rah during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinol*. 87: 738-743.
- Litchfield JT, Wilcoxon F. 1948. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 96: 99-113.
- Mitra M, Mohammadreza S-A, Alireza G, Nasrolah GD, Seyyed SJ. 2005 Production of Rosmarinic Acid in *Echium amoenum* Fisch. and C. A. Mey. *Cell Cultures. Iranian J Pharma Res* 2: 111-115.
- Nacional Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) SDBS ¹³C NMR N° 1785CDS-05-001.
- Perry WLM. 1986. Experiments with intestinal smooth muscle. Tomado de: *Pharmacological Experiments on Isolated Preparations*. E & S LIVINGSTONE LTD, Edinburgh and London. Cap. 4, pp. 58-62.
- Ren-Wang Jiang, Kit-Man Lau, Po-Ming Hon, Thomas CW Mak, Kam-Sang Woo and Kwok-Pui Fung. 2005. Chemistry and Biological Activities of Caffeic Acid Derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. *Current Med Chem* 12: 237-246.
- Reynolds GW, Rodríguez E. 1979. Geranylhydroquinone: A Contact Allergen from Trichomes of *Phacelia crenulata*. *Phytochem* 18: 1567-1568.
- Reynolds GW, Rodríguez E. 1981. Prenylated Hydroquinones: Contact Allergens from Trichomes from of *Phacelia minor* and *P. parryi*. *Phytochem* 20: 1365-1366.
- Turner RA. 1965. General Methods. Tomado de: *Screening Methods in Pharmacology*. Academic Press, NY and London. Cap. 16, pp. 42-59.