

UNIVERSIDAD NACIONAL
"Campus Omar Dengo"
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE QUÍMICA

Desarrollo de un producto tópico de uso veterinario con propiedades analgésicas, a partir de capsaicina extraída de *Capsicum annum*.

Trabajo sometido a consideración del Tribunal Examinador de la Escuela de Química, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Química Industrial.

Fabio Araya Carvajal

TUTOR: MSc. Marco Calvo Pineda

ASESORES:

Dra. Beatriz Badilla Baltodano

Ing. Irelis Álvarez Díaz

Heredia
Noviembre 2007

“Este trabajo de graduación fue _____ por el Tribunal Examinador de la escuela de Química de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Química Industrial.

Miembros del Tribunal del trabajo final de graduación:

	<u>NOMBRE</u>	<u>FIRMA</u>
Decana (o)	_____	_____
Director (a) de la Escuela	_____	_____
Tutor	_____	_____
Asesor	_____	_____
Asesor	_____	_____
Proponente	_____	_____

RESUMEN

Una de las actividades agrícolas importantes a nivel mundial es la siembra del pimiento, el cual tiene características agronómicas muy importantes, tales como la buena adaptación al medio local, excelente conservación y gran resistencia a la sobre maduración del fruto, lo que lo convierte en uno de los productos de interés comercial en muchos de los países donde crece.

Este cultivo fue de las primeras especies vegetales encontradas en el continente americano por los españoles y tuvo una rápida expansión por Europa y África (Zapata., et al. 1992). En Costa Rica, también se cosecha y manufactura en varias regiones, principalmente en las Regiones Brunca, Chorotega y Pacífico Central. En los últimos años la siembra de especies picantes, también ha crecido en zonas como Guanacaste, el Valle Central, Limón y en la parte norte de Alajuela, dichos sembradíos abastecen el mercado nacional, en manufactura de conservas y condimentos, contribuyendo también con productos para la exportación (Bolaños., 1998).

A este cultivo se le ha dado una variedad de usos, el de mayor utilidad es la extracción de la oleorresina, sustancia de la cual se fabrica la paprika, un condimento importante en la industria alimentaria, también pueden conseguirse en el mercado conservas de chile o chileras, muy utilizados en la cocina cotidiana. Además los compuestos químicos que dan pungencia han sido de gran interés por parte de los investigadores por sus propiedades curativas, por lo que con los años se han extraído y caracterizado con fines terapéuticos.

En la industria farmacéutica se han identificado componentes importantes del pimiento como la capsaicina, un alcaloide que se encuentra en niveles muy altos en el fruto y es utilizada en la fabricación de medicamentos, debido a su propiedad terapéutica para disminuir el dolor, debido a acción selectiva sobre la liberación de la sustancia P, un neuropéptido ubicado en las terminales centrales y periféricas de las neuronas sensitivas nociceptivas que transmiten los impulsos dolorosos, teniendo como resultado una acción analgésica (Más y Ordovás., 2006).

En nuestro país se han desarrollado investigaciones dirigidas a mejorar el cultivo, pero es conveniente llegar mucho más allá, sacando provecho a las propiedades terapéuticas de dicho fruto. Es por ello, que en esta investigación se aprovecharon compuestos, como la capsaicina y dihidrocapsaicina de una de las variedades de *Capsicum annum* cosechados en el territorio nacional, los cuales fueron extraídos y purificados en gran parte de sus carotenos y grasas, para desarrollar una formulación tópica veterinaria con efecto analgésico evaluado por ensayos en vivo. Con este producto se espera contribuya a solucionar afecciones frecuentes en los animales, y que aportara a los productores de Chile la posibilidad de incursionar en un mercado, como el fármacos con activos naturales, y esta formulación se ofrece como opción diferente a un mercado veterinario poco explotado por los productos naturales.

ÍNDICE GENERAL

	Página
CAPÍTULO I	
1. Introducción	1
1.1. El chile	1
1.1.1. Condiciones de siembra	3
1.1.2. Composición química	3
1.1.3. Grado de picor	5
1.2. Capsaicina	5
1.2.1. Biosíntesis	6
1.2.2. Usos	8
1.3. El sistema nervioso	9
1.3.1. Las neuronas	9
1.3.2. Tipos de neuronas	10
1.3.3. Conducción de impulsos electroquímicos por los axones	11
1.4. El dolor en el sistema nervioso	15
1.5. La capsaicina y el dolor	16
1.5.1. Receptores vanilloides	16
CAPÍTULO II	
2. Sección experimental	20
2.1. Procesamiento del material vegetal.	20
2.2. Extracción del principio activo.	21
2.3. Identificación y purificación de alcaloides.	21
2.4. Formulación del producto final.	23

2.5. Evaluación de la acción analgésica de la crema.	23
2.6. Identificación de capsaicina.	26
CAPÍTULO III	
3. Resultados y Discusión	27
3.1. Procesamiento del material vegetal.	27
3.2. Extracción del principio activo.	27
3.3. Identificación y purificación de alcaloides.	27
3.4. Formulación del producto final.	38
3.5. Evaluación de la acción analgésica de la crema.	39
3.6. Identificación de capsaicina.	42
CAPÍTULO IV	
4.1. Conclusiones	45
4.2. Recomendaciones	47
CAPÍTULO V	
5. Bibliografía	48
CAPÍTULO VI	
6. Anexos	52

ÍNDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro 1.	Propiedades químicas y físicas de la capsaicina.	6
Cuadro 2.	Fracciones obtenidas en la cromatografía de columna	35
Cuadro 3.	Porcentajes de la formulación de la crema con capsaicina como principio activo.	38
Cuadro A.1.	Resultados del tiempo, en segundos, de reacción de las ratas en el ensayo <i>Tail flick</i> en los tres grupos de ratas.	53
Cuadro A.2.	Resultados del porcentaje de actividad analgésica del ensayo <i>Tail flick</i> en los tres grupos de ratas	54

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Estructuras químicas de los principales compuestos encontrados en el pimiento.	4
Figura 2.	Biosíntesis de la capsaicina.	7
Figura 3.	Estructura de una neurona.	10
Figura 4.	Tipos de neuronas.	11
Figura 5.	Esquema del Potencial de Acción.	13
Figura 6.	Esquema de la sinapsis entre dos neuronas.	15
Figura 7.	Espectros UV-Vis obtenidos para las oleorresinas de los diferentes extractos.	30
Figura 8.	Cromatogramas sobrepuestos de CL de cada uno de las oleorresinas obtenidas en la extracción con diferentes disolventes	32
Figura 9.	Cromatogramas CL de las fracciones mezcladas obtenidas en la columna cromatográfica	37
Figura 10.	Gráfica de la actividad de los diferentes tratamientos administrados a las ratas en el ensayo del <i>Tail flick</i>.	42
Figura 11.	Cromatogramas sobrepuestos de CL del reactivo de capsaicina y de la muestra utilizada en la formulación	44
Figura A1.	Cromatogramas de CL de las oleorresinas obtenidas en la extracción con diferentes disolventes: a. Etanol 95%, b. Isopropanol.	56
Figura A2.	Cromatogramas de CL de las oleorresinas obtenidas en la extracción con diferentes disolventes: a. diclorometano, b. hexano.	57
Figura A3.	Cromatogramas de CL Cromatograma de CL de la oleorresina comercial de <i>C. annum</i>.	58

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

		Página
Fotografía 1.	Chile panameño (<i>C. anumm</i>).	1
Fotografía 2.	Planta de chile panameño.	2
Fotografía 3.	Productos fabricados a partir de chile picante.	8
Fotografía 4.	Muestra seca, molida y tamizada. Equipo de extracción soxhlet.	20
Fotografía 5.	Pesada y clasificación de las ratas macho utilizadas en la prueba <i>Tail flick</i>.	24
Fotografía 6.	Fotografías del aparato Tail Flick Ugo Basile del laboratorio de fitofarmacología de la Escuela de Farmacia de la Universidad de Costa Rica.	25
Fotografía 7.	Cromatograma de capa fina para las oleorresinas obtenidas de la extracción, reveladas con el reactivo de Dragendroff.	28
Fotografía 8.	Placa de cromatografía de capa fina para la oleorresina obtenida de la extracción con isopropanol	33
Fotografía 9.	Columna cromatográfica y las fracciones obtenidas por cromatografía de columna de la oleorresina extraída con isopropanol.	34
Fotografía 10.	Cromatograma de capa fina de cada una de las fracciones obtenidas en la columna de separación cromatográfica.	34
Fotografía 11.	Fotografía de la crema envasada.	39
Fotografía 12.	Cromatograma de capa fina del reactivo de capsaicina y la oleorresina de la extracción con isopropanol	43

DEDICATORIA:

“A mis padres: Ángela y Fabio, por apoyarme en este logro que también es de ustedes...”

AGRADECIMIENTOS:

A Dios, por permitirme alcanzar la meta.

A mis padres, Ángela, Fabio, mis hermanos, Ale, Johanna, Diego, Iveteht, Sebas, Roy, Fabián y Emmanuel que siempre me brindaron su apoyo.

A Don Marco, la Dra. Beatriz y a Ire, por ser mi soporte y mi guía a lo largo del camino.

A la gente de Calox, Maricela, Carlos, Paula, Joha, Bety, Charles, Dra Pupo, Celina, Yuli, Lais, Ariel, Gaby F, Dra Zavaleta, y todos los que de una manera u otra colaboraron y estuvieron siempre dispuestos.

Al Laboratorio de Farmacología de la Universidad de Costa Rica, a Andrea, Laura y Randall. Al Laboratorio de ensayos biológicos; LeBI. A los laboratorios de Biodiversidad de la Escuela de Química de la UNA.

A todos los amigos y compañeros que estuvieron a mi lado, muchas gracias.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El chile

El pimiento, ají o chile es el fruto de las plantas del género *Capsicum*, familia de las *Solanaceae*. Las plantas difieren en la constitución botánica, la forma, el tamaño del fruto y sobre todo en el grado de picor de una especie a otra. Esta última es la principal razón para clasificarlos en dos clases: los chiles dulces y los chiles picantes, aunque la mayoría de los botánicos las separan en cinco especies: *Capsicum annum*, *C. frutescens*, *C. boccatum*, *C. chinense* y *C. pubescens* (Bolaños., 1998).

De las especies clasificadas por los expertos, las más significativas son la *C. annum*, (Fotografía 1) y la *C. frutescens*, debido a su mayor abundancia.



Fotografía 1. Chile panameño (*C. annum*).

El *C. annum* es una planta herbácea anual, Fotografía 2, cuyo tallo es de crecimiento limitado y erecto, puede variar de 0,5 a 1,5 m de altura, cuenta con un sistema radicular

pivotante. Puede llegar a tener hasta 120 cm de profundidad, con un gran número de raíces adventicias. Las hojas son lampiñas, enteras, ovares o lanceoladas con un pronunciado ápice y un pecíolo poco aparente o largo. Las flores tienen corola blanquecina, de inserción aparentemente axial (Zapata *et al.*, 1992).

El *C. frutesces* es un arbusto vivaz. Crece en países cálidos, su ciclo de vida puede variar de unos dos a unos tres años. Con una altura que va desde 0,8 m hasta 1 m, sus ramas son bifurcadas y no muy numerosas. Cuenta con flores de corolas agrupadas en dos o tres, en la axila de las hojas lanceoladas. Sus frutos son bayas de pequeño tamaño, de forma cónica alargada y poco carnosas, oblongas o rectas, pueden llegar a medir de 1 a 3 cm, de color rojo y sabor picante, son huecos en parte con un cáliz acrescente y pedúnculo delgado. Dentro del fruto se encuentran las semillas, estos son pequeños discos con un diámetro cercano a 0,3 mm (Maistre., 1969).



Fotografía 2. Planta de chile panameño.

Las especies de *C. annum* se cultivan principalmente en centroamérica y en México, las *C. frutesces* tienen su origen en América del Sur, en tierras bajas desde Brasil hasta

Centroamérica. Respecto a las demás especies, el *C. boccatum* tienen su origen en Bolivia desde donde se extendió hasta Perú, Argentina y Brasil, el *C. chinense* es también de origen Suramericano por la región este de los Andes y el *C. pubescens* se cultiva en regiones altas de Bolivia, México y América Central (Bolaños., 1998).

1.1.1. Condiciones de siembra

Debido a su clima templado, las regiones de centro y suramérica se da una gran diversidad de Solanáceas (*Solanaceae*). Existen alrededor de 147 géneros y unas 2930 especies. Muchas tienen gran importancia para el consumo humano, como lo son la papa, el tomate, el tabaco y los pimientos (Izco *et al.*, 2004).

El chile picante tiene un mejor desarrollo en condiciones cálidas, con suelos que cuentan con un buen drenaje. Se ha observado que dan mejores rendimientos en suelos con pH entre 6,0 y 6,8. La temperatura es un factor que influye mucho en la tasa de crecimiento, siendo las recomendadas para su producción entre los 18° y 24° C, con un mayor crecimiento en la planta y el fruto, y mejor calidad (Everhart *et al.*, 2002).

1.1.2. Composición química

Los componentes químicos del *Capsicum*, varían según las condiciones ecológicas en las que se desarrolló. La pared del fruto es la que ocupa mayor porcentaje en el cuerpo, y donde se encuentra más cantidad de agua y de compuestos.

El chile picante contiene una pequeña cantidad de aceites esenciales, que le dan su olor característico. Contiene además pigmentos, una serie de carotenoides, entre los que se

pueden mencionar: la capsantina, capsurubina, zeaxantina, criptoxantina, luteína y carotina, (Figura 1). Estos aportan el color rojizo a los frutos. Es además muy rico en vitamina C (ácido ascórbico), y en sus cenizas se han encontrado óxidos de potasio, de magnesio, de hierro, de calcio, de sodio y de silicio, pentóxido de fósforo, dióxido de azufre, cloro y cobre (Maistre., 1969)

A los alcaloides se les conoce como capsaicinoides; producen irritación al consumirlos, y son generados por una glándula del fruto en la placenta. El más importante es conocido como capsaicina, responsable del sabor pungente de la especie (Salazar y Silva., 2004).

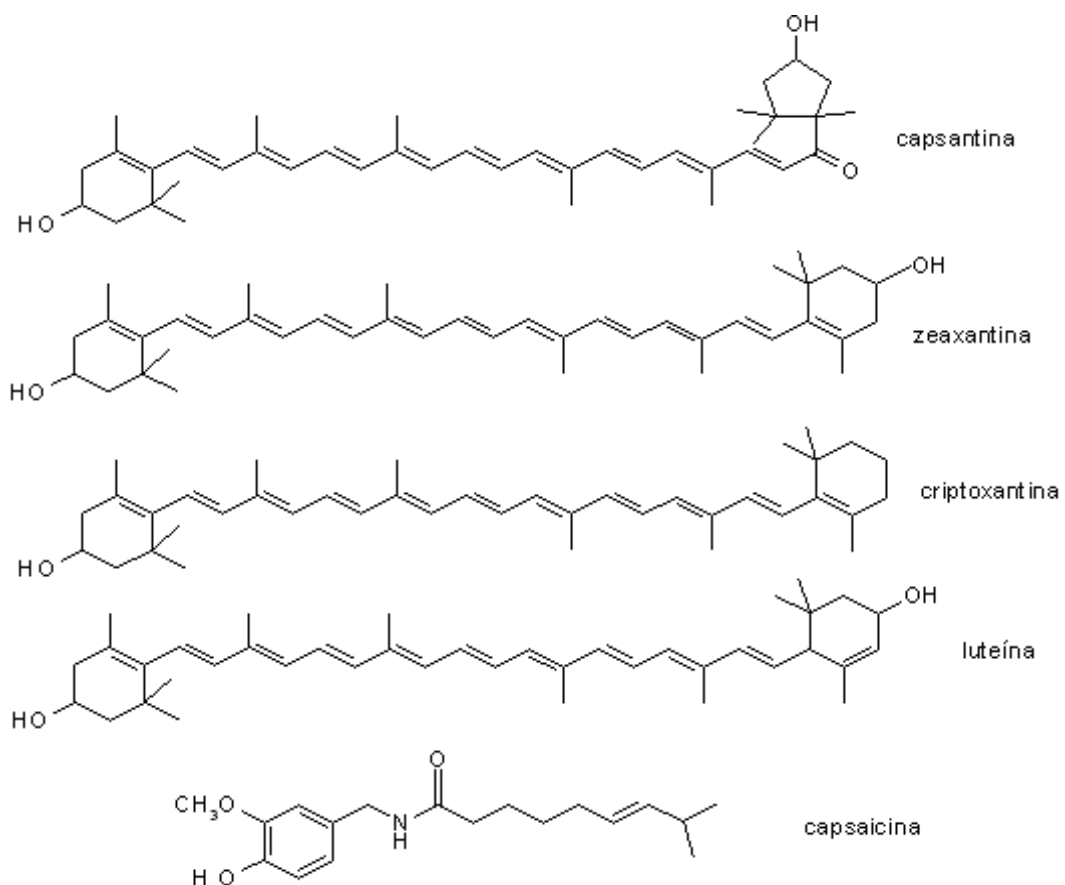


Figura 1. Estructuras químicas de los principales compuestos encontrados en el pimiento. Fuente: Buddavari *et al.*, 1989

1.1.3. Grado de picor

La sensación de picor que provocan los chiles picantes, se debe a los capsaicinoides presentes en el fruto. A inicios del siglo XX, Wilbur L. Scoville ideó una prueba para medir el grado de picor. En el ensayo se extrajo la capsaicina, alcaloide responsable de producir el sabor picante con etanol al 95%, y la mezcló con diferentes concentraciones de agua azucarada. Después, varias personas probaban el extracto para determinar la cantidad de agua que requerían para neutralizar la picazón en la lengua. El volumen necesario para cada concentración, fue asignado con una unidad conocida como el Scoville. Entre más picante fuera el chile, mayor era el valor. En el año 1980, se reemplazó este análisis por uno en cromatografía líquida de alta presión, sin embargo, las unidades conservaron su nombre original, y hoy en día se habla del grado de pungencia en Scoville. El chile picante que posee mayor cantidad es el habanero rojo caribeño, va desde 100,000 hasta 445,000 unidades de Scoville (Everhart *et al.*, 2002).

1.2. Capsaicina

Compuesto liposoluble que se produce principalmente en la placenta, las semillas, la pared y la cáscara del fruto (Bolaños., 1998). Tiene apariencia de polvo cristalino, inodoro y de sabor picante. Es un alcaloide soluble en etanol, cloroformo, benceno y en éter etílico, pero poco soluble en agua fría (Buddavari *et al.*, 1989). En el cuadro 1 se describen las propiedades físicas y químicas de la capsaicina.

Cuadro 1. Propiedades químicas y físicas de la capsaicina.

Fórmula química	$C_{18}H_{27}NO_3$
Nombre químico	N-((4-hidroxi-3-metoxifenil)metil)-8-metil-6-nonemida
Sinónimos	(<i>E</i>)-8-metil-N-vainillil-6-nonemida; <i>trans</i> -8-metil-N-vainillil-6-nonemida; (<i>E</i>)-capsaicina; capsaicina natural.
Número CAS	404-86-4
Masa Molecular	305.41 g/mol
Apariencia	Polvo cristalino color blanco
Punto de fusión	65° C
Punto de ebullición	210° C
Densidad	1.22g/mL (30 ° C)
Solubilidad	etanol, éter etílico, cloroformo y benceno

Fuente: Buddavari *et al.*, 1989 y www.saciencelab.com

1.2.1. Biosíntesis

La capsaicina se produce de manera natural en las diversas variedades de chile picante, tal como se describe en la Figura 2. Este alcaloide es una base nitrogenada vegetal con un anillo aromático. Derivado de la fenilalanina (1), a través del ácido ferrúlico (2) y la vanolina (3), aldehído que sufre una transaminación y da origen a la vanilamina (4). La parte ácida de la estructura de la capsaicina (6) se genera por la intervención del derivado del ácido malónico (6) (Dewick., 1999).

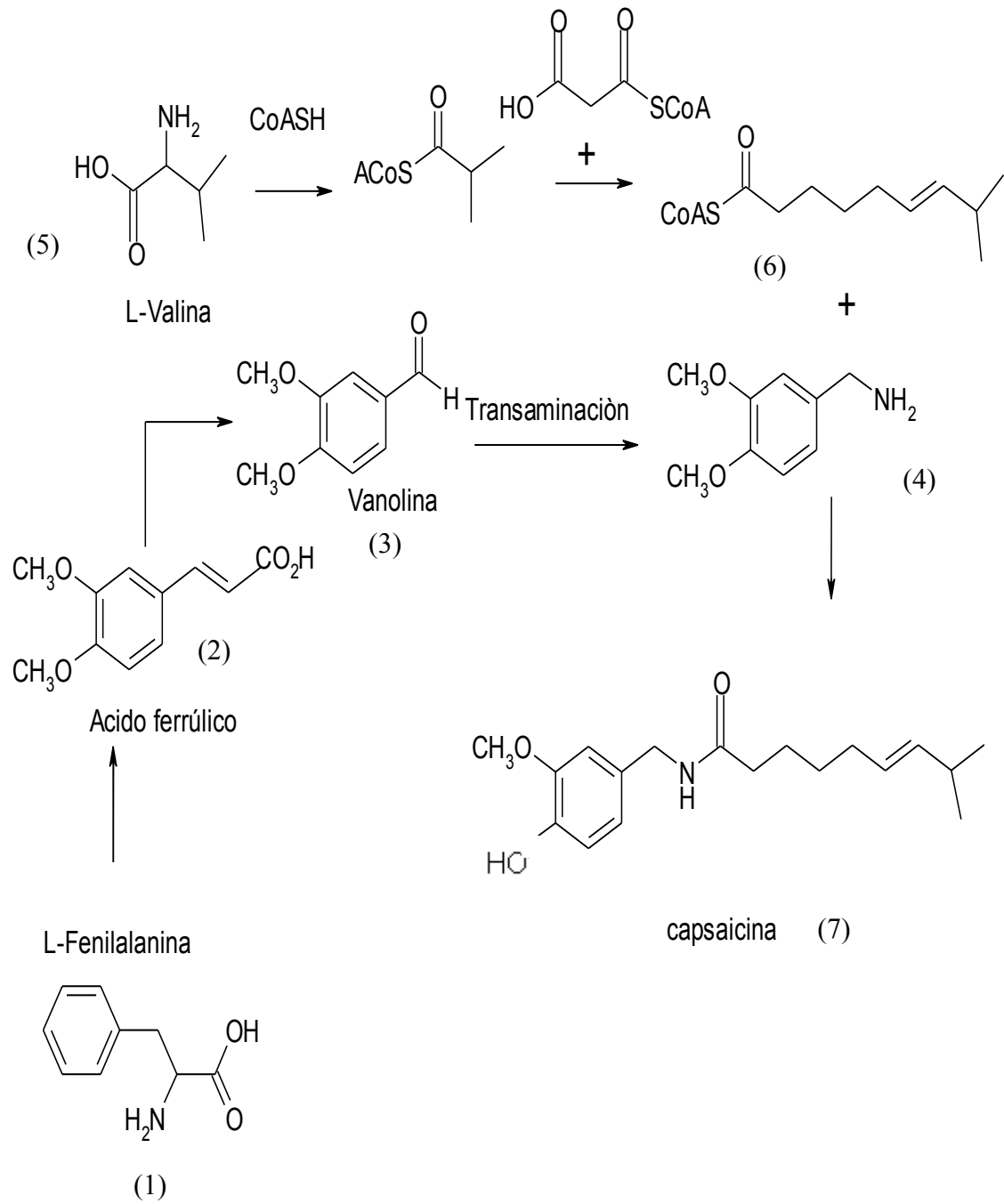


Figura 2. Biosíntesis de la capsaicina.
Fuente: Dewick., 1999.

1.2.2. Usos

La capsaicina se utiliza muy pocas veces como una sustancia pura, su presentación comercial es la oleorresina que se extrae del chile, la cual es una mezcla de capsaicina con carotenoides del pigmento, viscosa, de un color fuerte y de sabor picante. La cantidad presente de esta sustancia en las diversas especies de chile es muy variable. Se han hallado diferentes porcentajes dependiendo de la clase de chile, varían desde 0,2 a un 0,5%, pero existen reportes de hasta un 1% de capsaicina en las variedades más picantes (RETADAR, 1992).



Fotografía 3. Productos fabricados a base de chile picante.

Aparte de su ya conocida importancia en productos alimentarios, como por ejemplo salsas y condimentos como se muestran en la Fotografía 3, la capsaicina es también usada medicinalmente en cremas, para atender neuralgias causadas por infecciones y se ha extraído para otras preparaciones de uso tópico, en la elaboración de productos farmacéuticos y veterinarios. Se ha usado para el tratamiento de diferentes males, tales como la dispepsia, hemorroides, infecciones del intestino, contra parásitos, antidiarreico, como rubefaciente al aumentar la circulación sanguínea en las zonas en

que entra en contacto, antidisentérico y afrodisíaco, astringente y para la cicatrización. En la parte veterinaria se le ha usado para colorear las yemas de los huevos en gallinas y para estimularlas sexualmente (Nuez *et al.*, 1996).

1.3. El sistema nervioso

El sistema nervioso está constituido por células, tejidos y órganos que perciben y emiten una respuesta a los estímulos recibidos del interior y el exterior del organismo. Se divide en dos: el sistema nervioso central, constituido por el encéfalo y la espina dorsal, y el sistema nervioso periférico, el cual lo conforman los nervios. El sistema nervioso periférico percibe estimulaciones del medio. Mediante impulsos eléctricos y químicos, lleva la información al sistema nervioso central, donde se procesa y se transmite una respuesta inmediata, la cual se envía nuevamente a los nervios del sistema periférico y se genera una acción sobre el órgano estimulado o efector (Tresguerres., 2005).

1.3.1. Las neuronas

Los nervios están formados por células llamadas neuronas, que se encargan de dar respuesta a los estímulos térmicos, mecánicos y químicos. Estas células conducen impulsos electroquímicos y liberan reguladores químicos. Las neuronas están constituidas por tres partes fundamentales: el cuerpo celular, donde se encuentra el núcleo y las macromoléculas; las dendritas o ramificaciones finas del cuerpo celular que transmiten los impulsos nerviosos hasta el cuerpo celular, y el axón, transporta los impulsos eléctricos hasta otra neurona (Figura 3). Los axones del sistema nervioso periférico están recubiertos por una vaina conocida como la *vaina de Schwann*, además algunos axones se encuentran recubiertos por una vaina de mielina. Esta membrana

cubre secciones del axón, pero deja hendiduras conocidas como nódulos de Ranvier por donde se transmiten los impulsos nerviosos (Ira Fox., 2003).

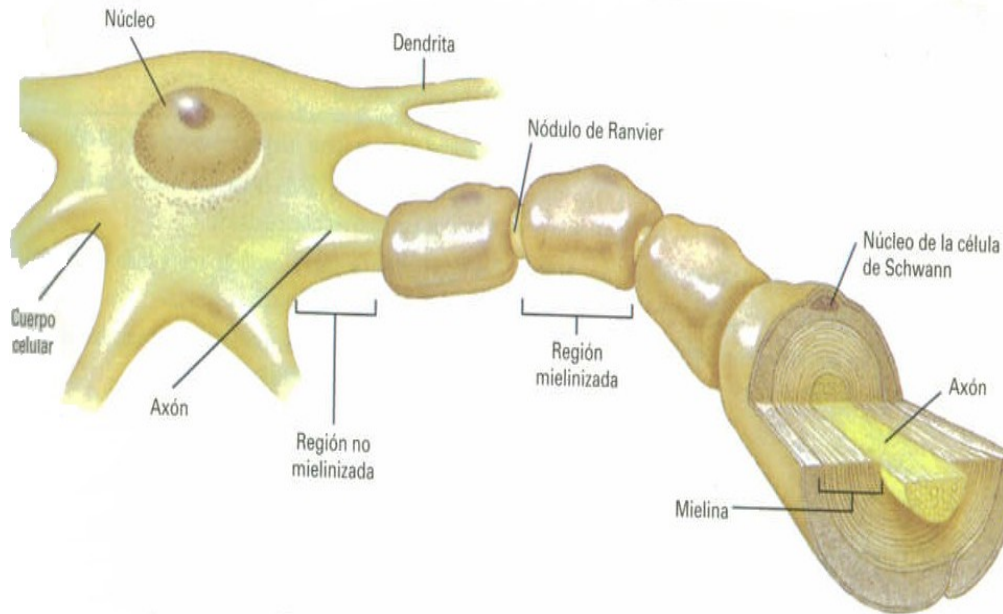


Figura 3. Estructura de una neurona. Fuente: Ira Fox, 2003

1.3.2. Tipos de neuronas

Existen tres tipos de neuronas: las neuronas sensitivas o aferentes, que conducen los impulsos desde los receptores sensitivos hasta el sistema nervioso central. Las neuronas motoras, o neuronas eferentes, que llevan los impulsos del sistema nervioso central hacia los órganos efectores, para que se genere una respuesta al estímulo recibido. Existen de dos clases: las motoras somáticas encargadas de respuestas en el control reflejo y voluntario de los músculos esqueléticos y las motoras autónomas, encontradas en los efectores involuntarios como las glándulas, el músculo cardíaco y el liso.

También se encuentran las interneuronas o de asociación, están encargadas de transmitir los impulsos eléctricos de una neurona aferente a una eferente (Drucker., 2005).

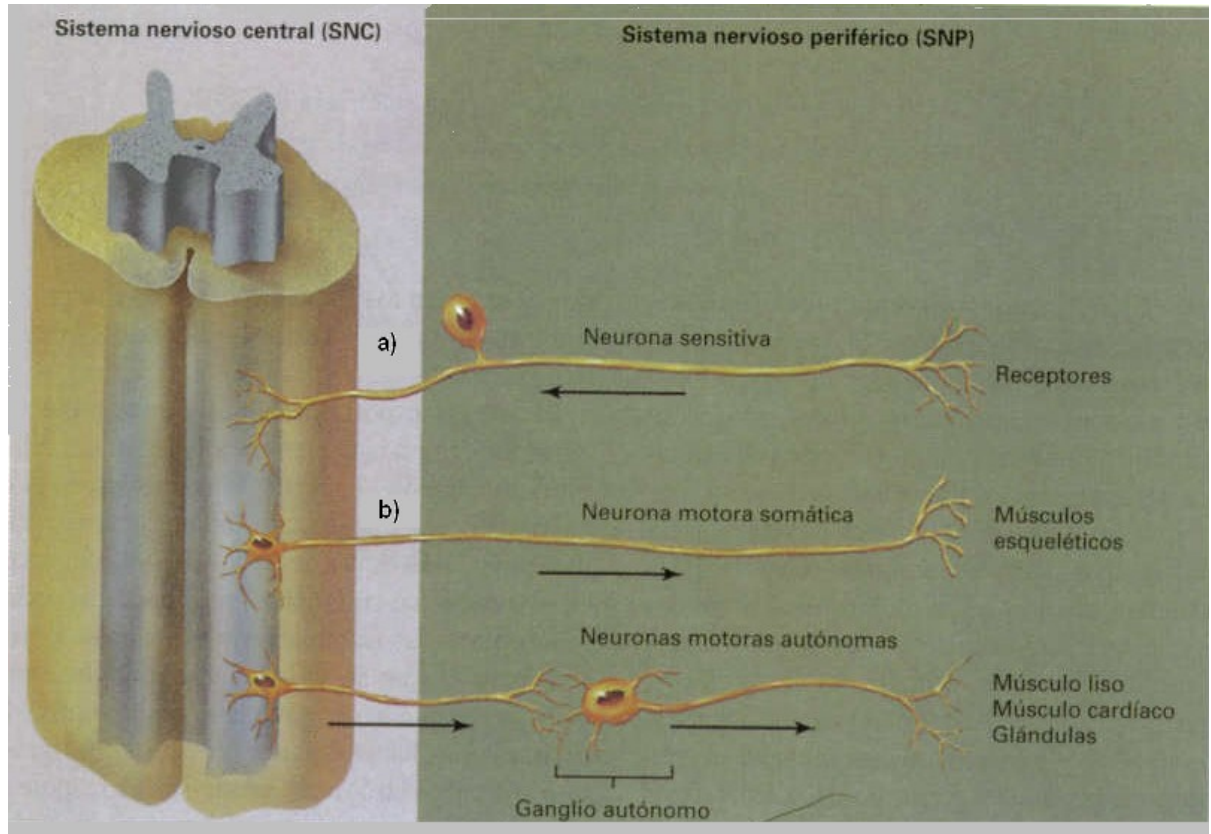


Figura 4. Tipos de neuronas. a) neuronas sensitivas. b) neuronas motoras.
Fuente: Ira Fox, 2003

1.3.3. Conducción de impulsos electroquímicos por los axones

Las células en el cuerpo tienen concentraciones iónicas distintas dentro y fuera de la membrana celular, dicha concentración genera una diferencia de potencial a través de la membrana conocida como potencial de membrana en reposo. En el exterior de las neuronas existe una alta concentración de iones sodio Na^+ , en comparación con el interior de la célula donde existen iones potasio K^+ en menor concentración, lo que provoca que el interior de la célula sea más negativo respecto al exterior, en condiciones normales. En la membrana de las células existen canales que permiten la entrada y la

salida de estos iones. Cuando las neuronas reciben un estímulo, los canales son activados dejan entrar y salir iones, provocando una alteración en el potencial de la membrana, generando permeabilidad y difusión de un ión, según el gradiente de concentración. Si el estímulo recibido permite la entrada de cargas positivas, provoca una despolarización, y si estas cargas positivas salen o cargas negativas entran a las células, se da el proceso de repolarización (Marieb., 1989).

Cuando un axón recibe un estímulo, los canales de Na^+ se abren y la membrana se hace más permeable al ión, entrando por difusión al interior de la célula. Esto provoca una despolarización, que hace al interior de la célula más positiva o menos negativa, esta despolarización activa a su vez nuevos canales de Na^+ , haciéndola más permeable. Así cada potencial de acción actúa como estímulo y produce un potencial de acción en la región adyacente de la membrana axonal, de esta manera un impulso eléctrico viaja a través de todo el axón hasta el botón terminal (Ira Fox., 2003).

Por otro lado, el incremento explosivo de la permeabilidad al Na^+ , provoca una inversión rápida de potencial de membrana, generando a la vez que se cierran los canales del ión sodio, y por un efecto retardado de la despolarización se abren canales para el ión potasio, expulsándolo hacia el exterior de la célula. Volviendo más negativo el interior en el proceso de repolarización. Esta difusión de iones a través de la membrana y las modificaciones que provocan en el potencial de la membrana se llama potencial de acción o impulso nervioso. Una vez que se completa el impulso nervioso las bombas de Na^+ / K^+ extraen el sodio sobrante que entró al interior del axón y

recuperan el potasio perdido, restableciendo el potencial de membrana en reposo (Marieb., 1989).

Las células que no poseen mielina, deben transmitir el impulso en cada fracción de micrómetro, retardando el impulso nervioso. Cuando la neurona posee mielina, ésta funciona como aislante y el impulso nervioso se transmite en los nódulos de Ranvier, provocando que el impulso nervioso se salte fracciones del axón y la transmisión del impulso nervioso llega más rápidamente a la neurona siguiente (Ira Fox., 2003).

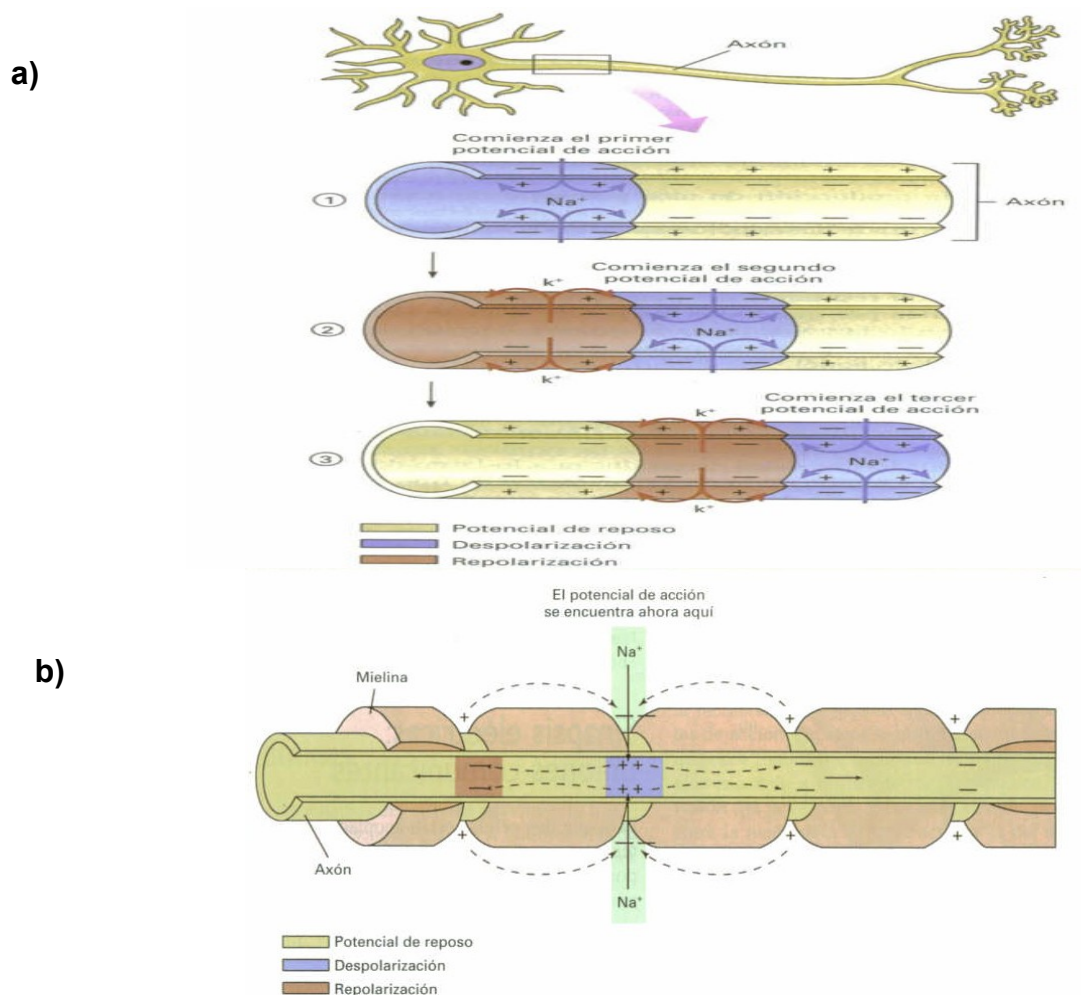


Figura 5. Esquema del Potencial de Acción, a) axón amielínico b) axón con mielina.
Fuente: Ira Fox, 2003

Cuando el impulso nervioso llega hasta el botón terminal del axón la transmisión hacia la neurona siguiente se da por medio de un transporte químico, en un área muy pequeña entre las células llamado hendidura sináptica, este proceso de transferencia es conocido como sinapsis. La sinapsis conecta funcionalmente una neurona con otra célula, sea esta segunda una neurona o una célula en el órgano efector. Este proceso se da en una sola dirección, desde el axón de la célula presináptica hasta la sección receptora de la célula postsináptica, por medio de la liberación de una sustancia química conocida como neurotransmisor (Marieb., 1989).

En las células presinápticas los neurotransmisores están envueltos por una vesícula, Estas viajan hasta la membrana del botón del axón donde se fijan por medio de enzimas, cuando se genera un potencial de acción se introducen al interior de la célula iones calcio (Ca^{2+}), que ayudan a fundir las vesículas con la membrana del axón permitiendo la liberación del neurotransmisor a la hendidura sináptica por exocitosis, donde es difundido hasta la membrana receptora postsináptica para unirse con las proteínas receptoras, que provocan que se abran nuevos canales iónicos y continúa la despolarización y repolarización en la neurona siguiente (Ira Fox., 2003).

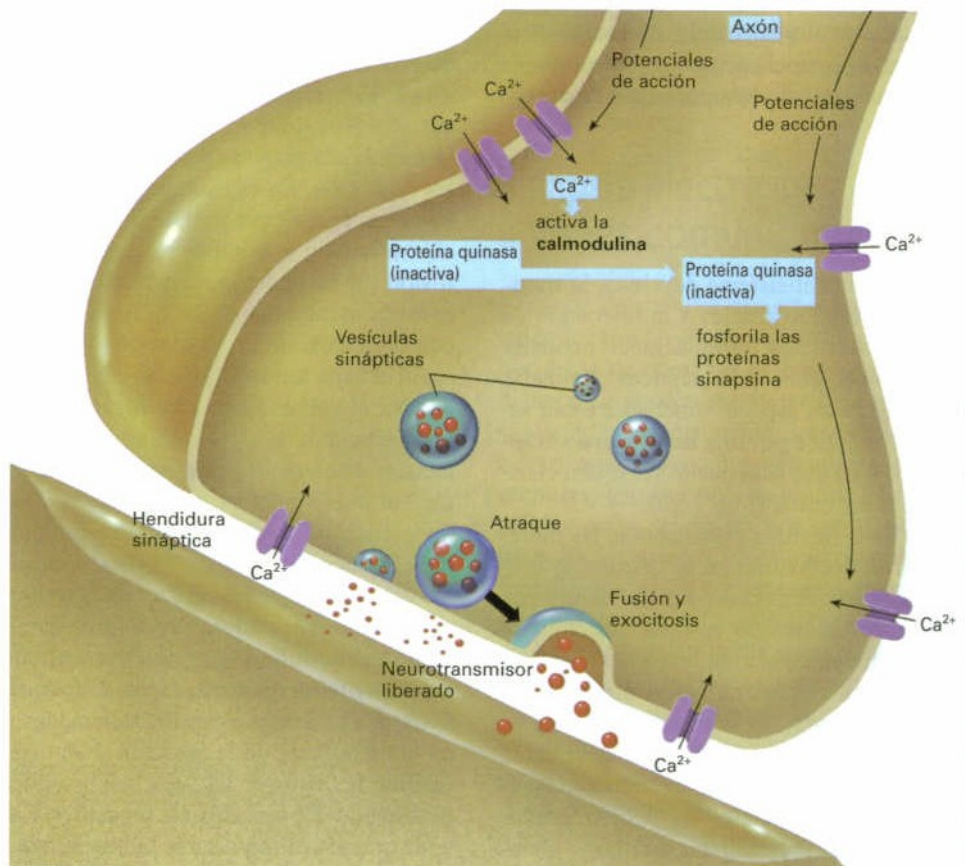


Figura 6. Esquema de la sinapsis entre dos neuronas. Fuente: Ira Fox., 2003

1.4. El dolor en el sistema nervioso

El dolor es una sensación desagradable sensorial y emocional, originada por la estimulación de receptores específicos llamados nociceptores, que puede ser causada por daños en los tejidos, como congelación, aplastamiento, cortaduras o quemaduras (Carranza *et al.*, 2007).

Cuando los nociceptores reciben un estímulo, activan los canales iónicos en los axones provocando la entrada de Na^+ y Ca^{2+} al interior de las neuronas, iniciando un potencial de acción que viajará hasta el botón axonal, donde se genera la sinapsis, liberándose un neurotransmisor específico denominado *sustancia P* (SP), un neuropéptido endógeno

responsable de la transmisión de impulsos dolorosos. La SP llegará al receptor de la neurona siguiente. Por medio de este proceso se lleva a cabo el impulso doloroso hasta el cerebro, donde se genera una respuesta ante el estímulo (Ira Fox., 2003).

1.5. La capsaicina y el dolor

La capsaicina se ha utilizado como analgésico local, en afecciones provocadas por lesiones en la piel. El efecto inicial de alivio es debido a su acción sobre los receptores del dolor en la piel, haciéndolos menos sensitivos. Cuando entra en contacto con la zona afectada de la piel, actúa en el sitio sináptico, causando agotamiento local de la SP, aumentando la salida de la misma a la hendidura sináptica, hasta acabar la cantidad disponible dentro de la neurona presináptica mermando el impulso doloroso (Goodman *et al.*, 1996).

1.5.1. Receptores vanilloides.

Los receptores vanilloides (RV) son un tipo de receptor, se encuentran en la transmembrana de varias células del organismo, tanto en el sistema nervioso como fuera de él. En las neuronas, estos receptores se encargan de transmitir información aferente de dolor y picazón al sistema nervioso central, por medio de liberación de una variedad de neuropéptidos proinflamatorios (Szallasi y Blumberg., 1999).

La sustancia P, es uno de esos neuropéptidos. Se encuentra ubicada en las terminales centrales y periféricas de las neuronas sensitivas nociceptivas que transmiten los impulsos dolorosos (Más y Ordovás., 2006).

La capsaicina funciona en el organismo como un agonista exógeno, llamado: “vanilloide”. Cuando se liga con los RV genera una acción inmediata, abriendo canales de la membrana y dejando entrar un flujo de iones Ca^{2+} . Esta entrada de iones provoca una despolarización dentro de la neurona, que actúan sobre las vesículas que contienen los nociceptores, estos se funden con la membrana plasmática, liberando por exocitosis sustancia P, somastotina y péptidos relacionados con calcitonina, entre otros. Esto provoca picazón y un efecto de hiperalgesia, o estimulación local de las fibras que producen el dolor haciéndolas más sensibles al mismo (Goodman *et al.*, 1996). Cuando se ha agotado la cantidad de transmisores de dolor, se da un efecto llamado: desensibilización donde las neuronas ya no responden a cambios subsecuentes en los canales vanilloides, o se resisten a estímulos exógenos, como calor o presión mecánica (Szallasi y Blumberg., 1999).

En la industria farmacéutica, se ha aprovechado esta propiedad terapéutica de la capsaicina sobre el sistema nervioso, para la fabricación de medicamentos que disminuyan el dolor (Más y Ordovás., 2006).

A nivel de veterinaria existen analgésicos sintéticos como: tartrato de butorfanol, sulfato de morfina, naproxén, lactato de pentazocina, clorhidrato de xilacina y dipirona, que se utilizan para animales domésticos como perros o gatos, también en ganado y cerdos (Fraser *et al.*, 1993). Sin embargo su procedencia artificial puede traer efectos secundarios para el organismo del animal, es por eso que puede utilizarse la propiedad analgésica de la capsaicina y su origen natural para la formulación de sedantes tópicos veterinarios. Con esta investigación se pretendía crear una opción para este mercado,

además de una alternativa a los productores de chile picante en el país como un principio activo natural en un producto medicinal.

Objetivo general

Desarrollar un producto de uso tópico veterinario con propiedades analgésicas, a partir de capsaicina extraída del *Capsicum annum*.

Objetivos específicos

1. Preparar el material oleorresinoso a partir del *C. annum*.
2. Obtener una mezcla de capsaicina y dihidrocapsaicina, libre de carotenos y la oleorresina extraída del chile picante.
3. Formular un producto veterinario de uso tópico.
4. Determinar el efecto analgésico del producto formulado por medio del modelo “tail flick” en ratas.

CAPÍTULO II

2. SECCIÓN EXPERIMENTAL

La elaboración de un producto farmacéutico a partir de un material vegetal del que se extrae su principio activo, requiere de una serie de operaciones que deben realizarse con establecimiento de metodologías apropiadas, para obtener un compuesto de mayor pureza y calidad.

2.1. Procesamiento del material vegetal.

La primera etapa del proyecto fue la recolección y procesamiento de la muestra de *C. anumm*. Esta especie fue elegida porque al empezar la investigación, era la de mejor cosecha para esa época del año. Se adquirieron 5 kg del fruto en la provincia de Cartago, en el mes de noviembre del 2006.

Los frutos enteros, incluyendo las semillas, se lavaron, y se cortaron en cuatro partes para facilitar el proceso de eliminación de agua, el cual se llevó a cabo en un horno con recirculación de aire, durante cinco días, a una temperatura máxima de 30° C.



Fotografía 4. a. Muestra seca, molida y tamizada. b. Equipo de extracción soxhlet.

2.2. Extracción del principio activo.

El material seco se molió, para disminuir el tamaño de la partícula. Posteriormente se tamizó por maya número 12 (Fotografía 4.a). La extracción de la muestra se realizó por medio de Soxhlet (Fotografía 4.b), en balones de 500 mL con disolventes de distintas polaridades, para determinar el de mejor eficiencia al extraer la capsaicina. Se colocaron muestras de cerca de 50 g en los balones; se trabajaron volúmenes de 250 mL de: etanol al 95%, isopropanol, diclorometano y hexano respectivamente. La extracción se realizó durante 6 h. Finalizado el proceso, se concentraron los diferentes extractos en un rotavapor al vacío, obteniéndose las oleorresinas extraídas con cada uno de los disolventes.

2.3. Identificación y purificación de alcaloides.

A las oleorresinas obtenidas, se les realizaron pruebas de cromatografía de capa fina para tratar de aislar las sustancias presentes. La fase estacionaria utilizada fue una placa de gel de sílice. Como fase móvil se probaron mezclas de distintas polaridades de disolventes. Se logró una separación adecuada con una mezcla de diclorometano : acetonitrilo en una proporción (95:5).

Para detectar alcaloides entre los componentes que se iban separando en la placa, se utilizó un revelador para sustancias nitrogenadas: el reactivo de Dragendorff, que marcaría las manchas rojas o naranjas como positivo en la prueba. Esto debido a la presencia de metales pesados, en el caso de este revelador, el bismuto reacciona en con los alcaloides de la oleorresina y forma precipitados color marrón (Domínguez., 1988).

También se realizaron barridos espectrofométricos a cada una de las oleorresinas en disolución metanólica, esperando observar un máximo de absorción cercano a 281 nm, longitud de onda específica para la capsaicina y la dihidrocapsaicina según el método analítico de la Farmacopea Americana USP30-NF25 (The United States Pharmacopeial Convention., 2007).

Adicionalmente se efectuaron pruebas por cromatografía líquida, CL, usando el método de análisis de la The United States Pharmacopeial (USP30-NF25). Para este método, se disolvieron cerca de 25 mg de la muestra en 25 mL de metanol, se filtró a través de un filtro de 45 μm y se inyectaron al equipo 20 μL de la muestra. La columna utilizada en el análisis fue una Waters Spherisorb® 5 μm 4,6 mm x 250 mm, mantenida a una temperatura de 30° C, con detector ultravioleta de arreglo de diodos a 281 nm, y un flujo de 1,5 mL/min. La fase móvil fue una mezcla 6:4 de ácido fosfórico diluido (1 en 1000) y acetonitrilo. A esta prueba también se sometió una oleorresina comercial como patrón de referencia.

Al terminar la identificación preliminar, se eligió a la oleorresina extraída con isopropanol para purificarla de la mayoría de grasas y colorantes. A dicha muestra se le realizaron diferentes pruebas en cromatografía de capa fina, para lograr separar los compuestos presentes en la muestra, en especial carotenos, que aportan la coloración marrón y la consistencia oleorresinosa.

Encontradas las condiciones satisfactorias en la cromatografía de capa fina, se escaló a cromatografía de columna. Para este fin se utilizó una columna de 60 cm de largo, con

un diámetro interno de 8 cm; rellena con 700 g de gel de sílice; con un tamaño de partícula de 60 µm. La fase móvil utilizada fue diclorometano : acetonitrilo (95:5). Con el desarrollo de la columna se recolectaron fracciones, a las cuales se aplicó cromatografía de capa fina para observar la separación de los diferentes componentes.

Las mezclas obtenidas se concentraron en rotavapor, para eliminar el disolvente. Se procedió posteriormente a un análisis cualitativo en CL, y determinar presencia de los alcaloides de interés, a partir de disoluciones de cerca de 1 mg/mL del extracto crudo. En el análisis se utilizaron las mismas condiciones que habían sido utilizadas en los extractos al inicio de la investigación, además se realizó el mismo análisis a una oleorresina de chile comercial *C. annum* como referencia de comparación.

2.4. Formulación del producto final.

Una vez identificadas las fracciones con capsaicina y dihidrocapsaicina, se formuló la crema, preparada a partir de la mezcla de dos fases, una oleosa y otra acuosa, obteniendo así el producto final, que fue envasado en tubos de aluminio.

2.5. Evaluación de la acción analgésica de la crema.

Posteriormente se evaluó la formulación en ratas de laboratorio. Este objetivo se consiguió mediante un protocolo para actividad analgésica, conocido como “*Tail Flick*”, en el cual las colas de las ratas eran tratadas con la crema formulada, un analgésico comercial y una solución salina, posteriormente eran sometidas a una irradiación de calor, determinando el tiempo que tardaban los sujetos a reaccionar al

estímulo. Las pruebas se llevaron a cabo en la Facultad de Farmacia de Universidad de Costa Rica, en el Laboratorio de Fitofarmacología INIFAR.

En esta prueba se usaron 24 ratas machos, con pesos entre los 180 y los 220 g, de cepa Sprage-Dawle obtenidas del Biotenio del Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEBi) donde se mantuvieron en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad, con el permiso del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA).

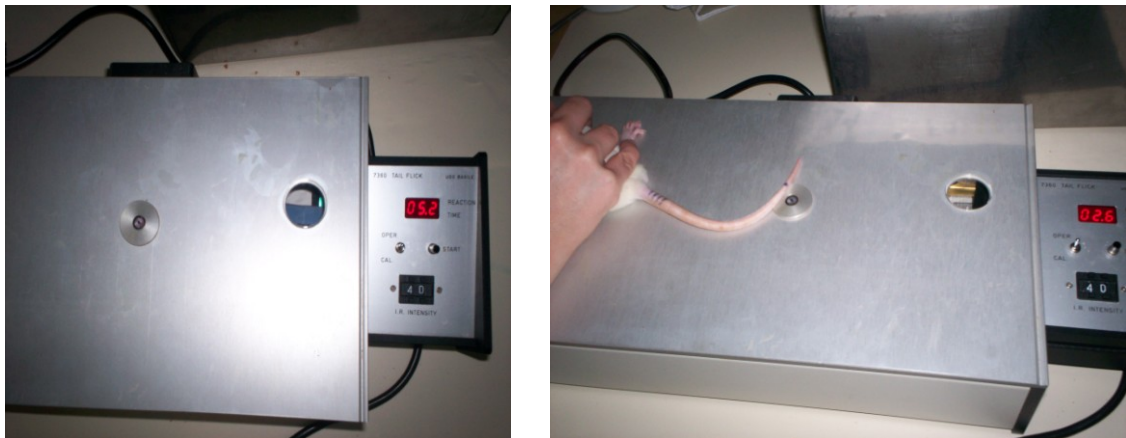


Fotografía 5. Pesada y clasificación de las ratas macho utilizadas en la prueba *Tail flick*.

Las ratas se dividieron en tres grupos de ocho, se pesaron (Fotografía 5) y se marcaron en el punto medio en el tercio distal de la cola. Un grupo se trató con solución salina de cloruro de sodio al 0,9% como blanco; otro grupo con diclofenaco sódico como control estándar, debido a sus propiedades comprobadas de analgesia, antipiréticas y antiinflamatorias (Goodman *et al.*, 1996). El diclofenaco utilizado fue Voltarén® emulgel; y el último grupo con la crema de capsaicina, determinando el tiempo de resistencia al calor en el aparato Tail Flick Ugo Basile 7360 (Fotografía 6), el cual irradió un foco calórico, registrando el tiempo de reacción al estímulo.

El aparato está adaptado con una celda fotoeléctrica, que apaga la lámpara y registra el tiempo mismo en que el animal retiró la cola. Mientras el aparato contabilizaba el tiempo que duraban en retirar la cola del foco, registraba el lapso de reacción al estímulo térmico. El resultado se relacionó con el efecto analgésico de la formulación considerando que se acaba cuando la rata está inquieta y mueve la cola (D'Amour y Smith., 1941).

El tiempo de reacción que tarda la rata en retirar la cola, se interpreta como la acción analgésica, usualmente se da entre 2 y 10 s. La prueba fue adaptada para el caso de medicamentos tópicos, ya que generalmente se aplica a los sujetos en forma intraperitoneal (Le Bars *et al.*, 2001)



Fotografía 6. Fotografías del aparato Tail Flick Ugo Basil del laboratorio de fitofarmacología de la Escuela de Farmacia de la Universidad de Costa Rica.

La primera medición, se realizó 10 min. antes de aplicar los respectivos tratamientos a cada uno de los sujetos. Posteriormente se administraron los diferentes medicamentos: solución salina al 0,9%, diclofenaco sódico y la formulación a base de capsaicina. Aplicado el medicamento, se procedió inmediatamente a determinar el tiempo de retiro

de la cola en el aparato y se anotaron los datos. Se repitió la determinación a los 30 min., a los 60 min. y a los 90 min.

Se procesaron los datos para construir una gráfica, en la que se pudiera comparar la actividad analgésica de la crema a base de capsaicina con la actividad del diclofenaco sódico, logrando así corroborar la efectividad del producto final.

2.6. Identificación de capsaicina.

Como una última identificación, se utilizó un reactivo de capsaicina para compararlo con la oleorresina extraída con isopropanol, ambos se corrieron por cromatografía de capa fina y se reveló con el reactivo de Dragendfroof.

Además al reactivo capsaicina y a la fracción obtenida en la columna utilizada para la formulación, se les realizó una identificación CL, según la método de análisis de la USP30-NF25. Esta prueba se llevó a cabo en las condiciones descritas anteriormente en la primera etapa de identificación de presencia de alcaloides.

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Procesamiento del material vegetal.

Luego de procesar y someter la muestra a un proceso de secado, se logró determinar un porcentaje de humedad cercano al 91% para los frutos enteros.

3.2. Extracción del principio activo.

Al concentrar cada uno de los extractos de los respectivos disolventes, se obtuvo una oleorresina oscura, color marrón y de apariencia espesa. Los rendimientos fueron de: 44% para la extracción con etanol al 95%; 59% con el isopropanol; 42% y 8% para el diclorometano y el hexano respectivamente. La oleorresina obtenida con etanol 95% e isopropanol, presentan un mayor rendimiento de extracción de oleorresina a partir del fruto seco.

3.3. Identificación y purificación de alcaloides.

En la imagen de la Fotografía 7, se observa la placa de cromatografía de capa fina en la que se corrieron las oleorresinas. Se desarrolló en una placa de gel de sílice como fase estacionaria y la fase móvil fue una mezcla de tolueno : acetato de etilo 70:30. Al rociar la placa con el reactivo de Dragendroff, aparecen unas manchas rojizas, que antes de rociar la placa no eran visibles, que indican presencia de compuestos nitrogenados en

cada una de las oleorresinas, entre las que podrían estar la capsaicina y la dihidrocapsaicina.



Fotografía 7. Cromatograma de capa fina para las oleorresinas obtenidas de la extracción, utilizando una placa de gel de sílice como fase estacionaria; como fase móvil tolueno : acetato de etilo (70:30), reveladas con el reactivo de Dragendroff.

Los espectros que se muestran en la Figura 7, con un barrido UV-Vis desde los 700 a los 200 nm, fueron los que resultaron de las oleorresinas de cada uno de los disolventes. Se esperaba un máximo de absorbancia cercano a 281 nm. Esta longitud de onda corresponde a la capsaicina. Se debe a sus grupos cromóforos: el anillo aromático, que absorbe a una longitud de onda cercana a 200 nm, no obstante presenta auxocromos, como los metoxilos y el grupo amino, cercanos al anillo que le dan resonancia a los electrones y generan un efecto batocrómico desplazando la longitud de onda hasta 281 nm. También se observan máximos de absorción en la parte visible para cada uno de los espectros, cerca de los 450 nm. Estos se deben a la presencia de carotenos de cadenas

insaturadas, que absorben la luz azul, por lo cual las oleorresinas presentan una coloración anaranjada (Pavia., 2001). En los espectros de las oleorresinas del extracto con etanol al 95% e isopropanol aparece un máximo cercano a 281 nm, indicando la presencia del alcaloide de interés.

Junto con los espectros ultravioleta, se obtuvieron cromatogramas por análisis en CL (Figura 8). Para esta prueba se utilizó como patrón de referencia, una oleorresina comercial de la India que contiene capsaicina. En los cromatogramas se observan dos picos, uno con un tiempo de retención relativo cercano a los 6 min. y otro cercano a los 7 min. Se tomó el supuesto que dichos picos podrían deberse a la capsaicina y la dihidrocapsaicina.

En los cromatogramas sobrepuestos de la Figura 8, se demarca con color negro la oleorresina de la India. Al comparar los cromatogramas de las oleorresinas de etanol al 95% color azul, isopropanol color verde claro, diclorometano color rosado y hexano color verde oscuro, se nota la presencia de ambos picos con diferentes intensidades, en todas las muestras. En la de etanol al 95% y en diclorometano son menos intensos. Además con la oleorresina de diclorometano, los tiempos de retención se corren a un tiempo mayor, por lo que se decidió descartar ambos disolventes para la purificación. En la oleorresina obtenida con isopropanol y hexano, se observa que los picos corresponden con los del cromatograma de la oleorresina patrón. La intensidad para estas oleorresinas es mayor que para el etanol y el diclorometano.

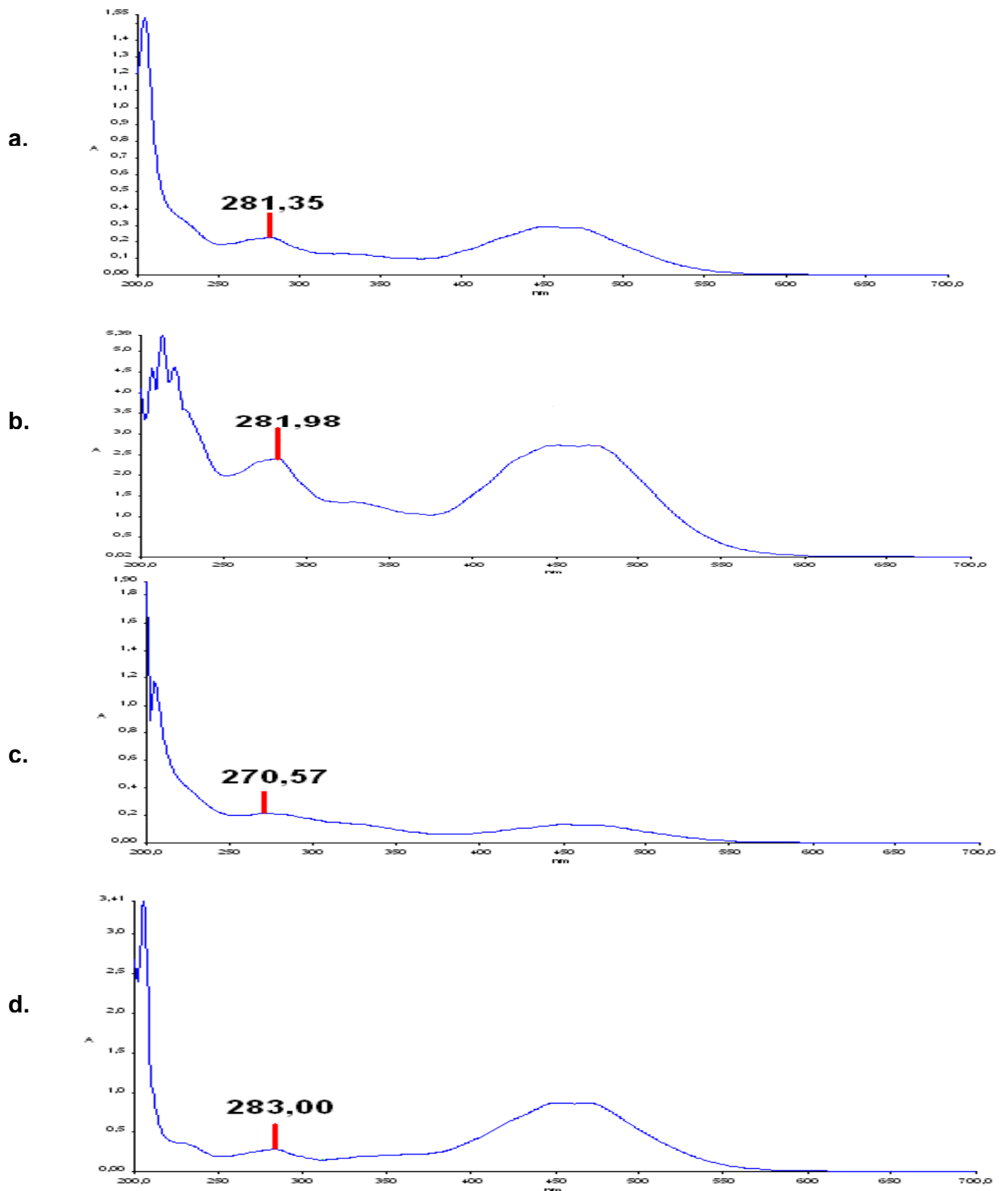


Figura 7. Espectros UV-Vis obtenidos para las oleorresinas de los diferentes extractos: a. Etanol 95%, b. Isopropanol, c. Diclorometano, d. Hexano.

Al preparar la oleorresina del hexano en metanol, no se disolvía completamente la muestra. Debido a la naturaleza no polar del disolvente, cabría la posibilidad que compuestos como carotenos y grasas naturales del fruto, arrastrados en la extracción, no se estarían disolviendo en el metanol que es polar. Su presencia representa mayor dificultad en la purificación de la muestra, por lo que se descartó la oleorresina de hexano para continuar con la purificación.

Con los resultados obtenidos, se decidió continuar trabajando la oleorresina de la extracción con isopropanol, con un alto porcentaje de rendimiento de extracción, además de presentar absorción a 281 nm y que su cromatograma era similar al de la oleorresina comercial.

A la oleorresina obtenida en la extracción con isopropanol, se le realizaron pruebas en cromatografía de capa fina para ver la disociación de componentes. Se encontró que una mezcla de diclorometano: acetonitrilo (95:5), daba una buena separación. La placa resultante se muestra en la Fotografía 8.

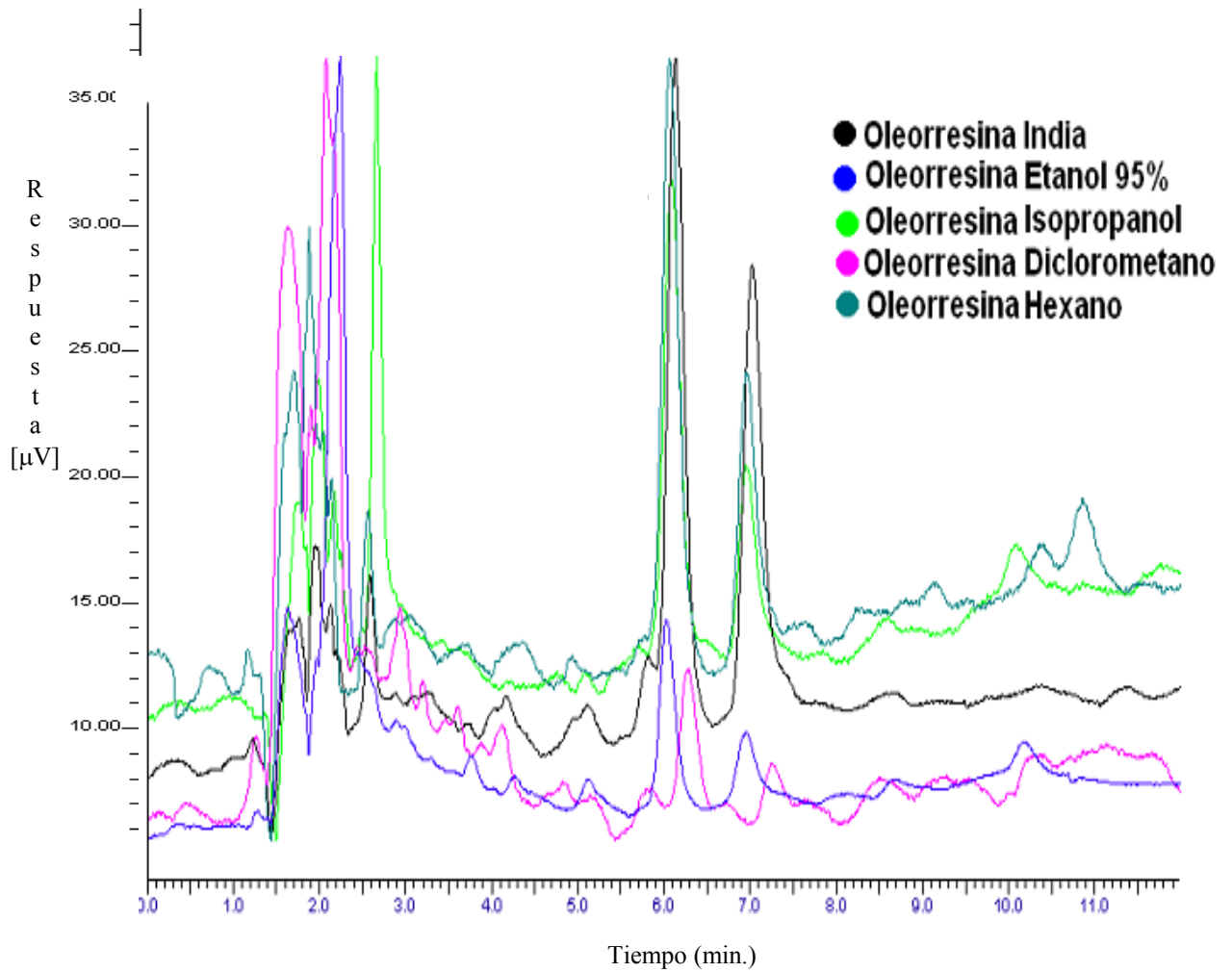
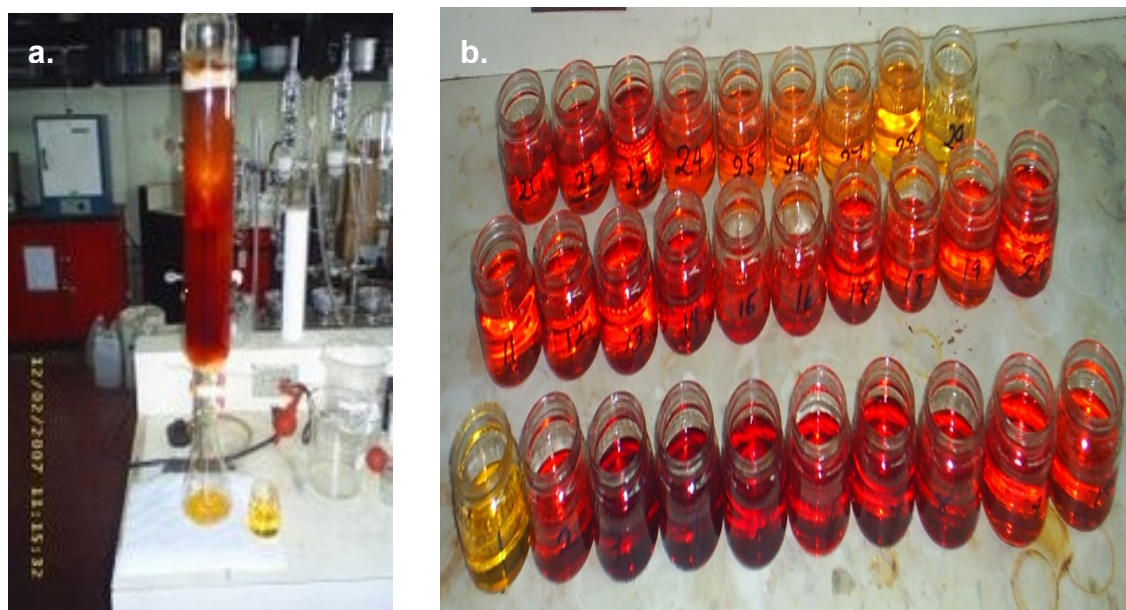


Figura 8. Cromatogramas sobrepuestos de CL de cromatogramas sobrepuestos del anexo de la figura A1, A2 y A3, columna Waters Spherisorb® 5 μm 4,6 mm x 250 mm, a 30° C, 281 nm, 1,5 mL/min. Fase móvil.: ácido fosfórico diluido (1 en 1000) y acetonitrilo 6:4.



Fotografía 8. Placa de cromatografía de capa fina para la oleorresina obtenida de la extracción con isopropanol, utilizando una placa de gel de sílice como fase estacionaria y diclorometano acetonitrilo (95:5) como fase móvil.

Al escalar a cromatografía de columna, se pudieron observar cinco anillos coloreados a lo largo de la columna. Las primeras fracciones recogidas presentaban colores marrones más oscuros, además no daban efecto de picor al paladar, el color rojizo se fue degradando conforme salían las demás fracciones, hasta que las últimas fueron amarillas, y algunas de las muestras recolectadas generaban sensación de picor. Al terminar de desarrollar la columna se recolectaron 29 fracciones, que se muestran en la Fotografía 9.



Fotografía 9. Columna cromatográfica (a.) y las fracciones obtenidas (b.) por cromatografía de columna de la oleorresina extraída con isopropanol, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y diclorometano acetonitrilo (95:5) como fase móvil.

Cada una de las fracciones fueron analizadas por cromatografía de capa fina, con una placa de gel de sílice y la misma fase móvil en que se desarrolló la columna. En la Fotografía 10 se muestra la placa obtenida.



Fotografía 10. Cromatograma de capa fina de cada una de las fracciones obtenidas en la columna de separación cromatográfica, utilizando una placa de gel de sílice como fase estacionaria y diclorometano acetonitrilo (95:5) como fase móvil.

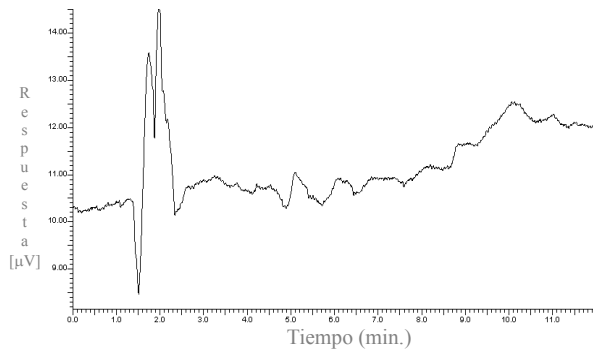
A partir de la separación de componentes en la placa, se decidió unir las fracciones según mostraran manchas a una distancia similar, lo que se interpretó como que presentaban componentes similares, obteniéndose así cinco mezclas como indica el siguiente cuadro:

Cuadro 2. Fracciones obtenidas en la cromatografía de columna

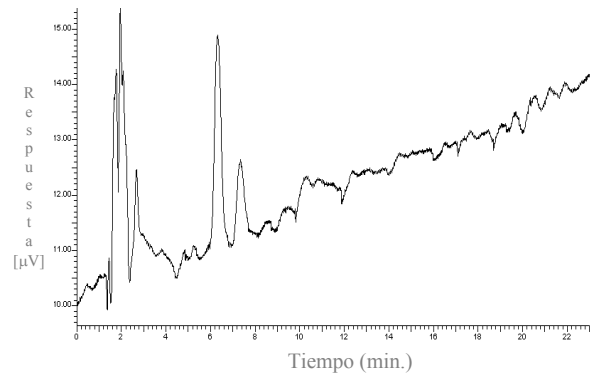
Número	Fracción
1 a la 10	A
11 a la 13	B
14 a la 18	C
19 a la 23	D
24 a la 29	E

A cada una de las mezclas, se le realizaron análisis cualitativos por CL, junto con la oleorresina comercial como patrón. Los cromatogramas se observan en la Figura 9. En el cromatograma de la mezcla A y B, no se observan picos con tiempos de retención cercanos a 6 y 7 min., los cuales se supuso primeramente, se debían a la capsaicina y la dihidrocapsaicina. Por lo que se deduce no presentan los alcaloides de interés, y más bien tienen una cantidad importante de carotenos, por la fuerte coloración roja, arrastrados de primero en la columna por la fase móvil poco polar. Además como estas fracciones no presentaban ningún grado de picor, se decidió descartarlas.

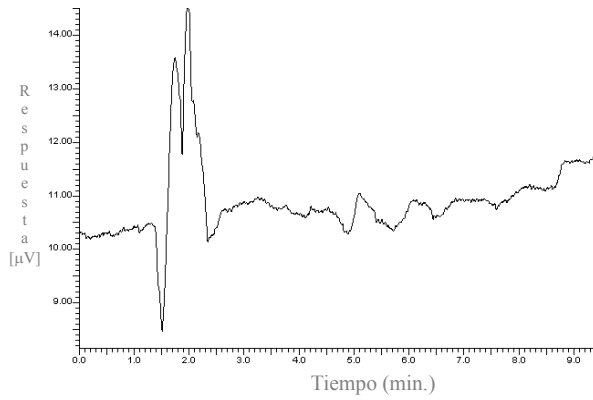
Al comparar las muestras C, D y E con la muestra de oleorresina comercial, se nota la presencia de dos picos principales con los tiempos de retención cercanos a los obtenidos en el cromatograma de la oleorresina patrón. Por otro lado estas fracciones eran menos coloreadas, de consistencia menos oleosa y resultaron ser pungentes al gusto. Por lo tanto fueron elegidas para la formulación de la crema.



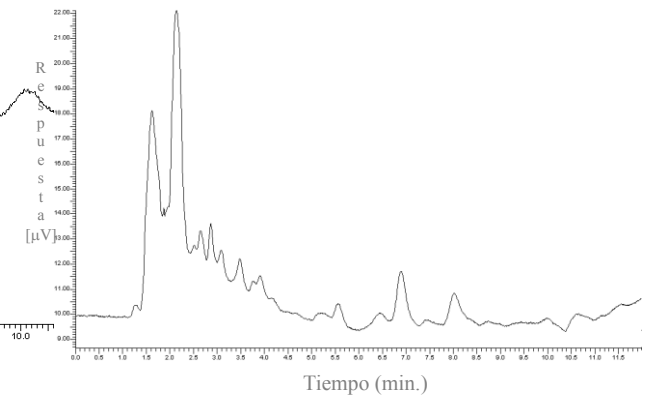
Mezcla de fracciones A.



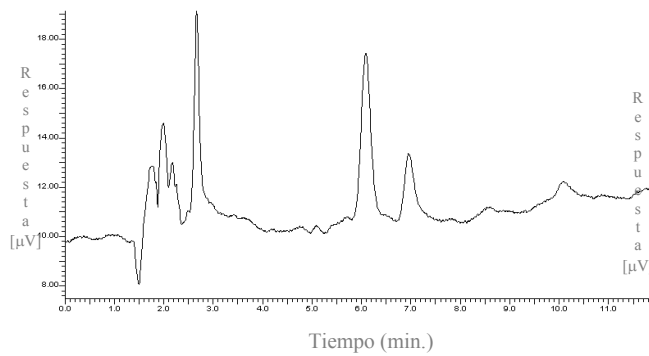
Mezcla de fracciones D.



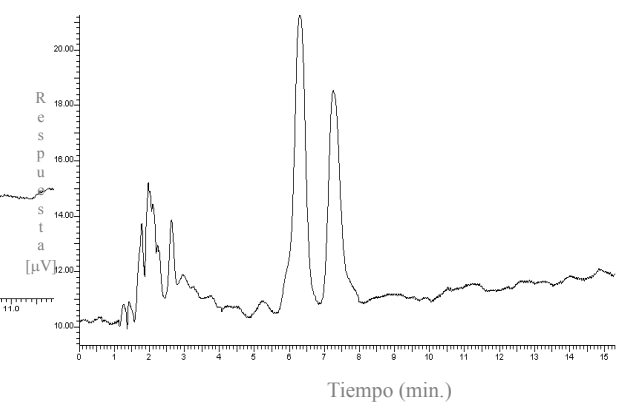
Mezcla de fracciones B.



Mezcla de fracciones E.



Mezcla de fracciones C.



Oleorresina comercial

Figura 9. Cromatogramas CL de las fracciones mezcladas obtenidas en la columna cromatográfica, con columna Waters Spherisorb® 5 μm 4,6 mm x 250 mm a 30° C, 281 nm, 1,5 mL/min. Fase móvil.: ácido fosfórico diluido (1 en 1000) y acetonitrilo 6:4.

3.4. Formulación del producto final.

En la formulación de la crema se utilizaron como excipientes los porcentajes mostrados en el cuadro 3. El lanette N y el cetiol V formaban la parte oleosa, ambas se mezclaron y calentaron hasta fundirlas, posteriormente se agregó propilparabeno como preservante, junto con la fracción resultante de la purificación de capsaicina como principio activo. Por otra parte se disolvió en agua el metilparabeno que tenía función de preservante. Por último se mezclaron las dos fases cuando aún estaba caliente la fase oleosa, obteniéndose una crema de aspecto uniforme, color rosa pálido, de consistencia no grasosa, de fácil aplicación y rápida absorción a la piel, como se muestra en la fotografía 11.

Cuadro 3. Porcentajes de la formulación de la crema con capsaicina como principio activo.

Fase	Materia prima	%
Oleosa	Cetiol V	16
	Lanette N	26
	Propilparabeno	0,1
	Muestra con capsaicina y dihidrocapsaicina	0,5
Acuosa	Metilparabeno	0,2
	Agua	c.s.p.
Total		100



Fotografía 11. Imagen de la crema envasada.

3.5. Evaluación de la acción analgésica de la crema.

Con los datos de tiempo de reacción obtenidos en cada uno de los grupos de ratas, se calcularon los promedios y las desviaciones estándar para cada tratamiento. Posteriormente se calculó el porcentaje de actividad analgésica; al dividir el tiempo que duraban las ratas en quitar las colas del foco, en el tiempo base, a los 30, 60 y 90 min. de aplicado el medicamento, entre el tiempo medido al aplicar el medicamento o tiempo a los 0 min., tomando este como 100 % de actividad. Los resultados se muestran en el cuadro A.2.

Al comparar los resultados de actividad analgésica entre las ratas del control negativo (solución salina) contra el control positivo (diclofenaco) y la formulación evaluada, se determinó si la diferencia entre los datos del grupo control negativo, y los medicamentos sedantes eran estadísticamente significativos, sin embargo la prueba de varianza estadística determinó que no lo eran; esto debido a que las desviaciones estándares relativas entre los comportamientos al estímulo en las ratas fueron datos muy grandes, posiblemente porque el medicamento fue administrado en forma tópica, lo que pudo variar mucho la cantidad de droga aplicada a la superficie de la cola, además de la

dosis absorbida por el animal, alterando el comportamiento de cada rata y provocando la diferencia entre ellas.

Como los datos no eran estadísticamente significativos, se construyó la gráfica de la Figura 10 a partir de los mismos, con el fin de observar el comportamiento analgésico, de los medicamentos administrados respecto a la solución salina.

El comportamiento esperado era una tendencia decreciente de la actividad analgésica en la solución salina respecto al tiempo, pues esta tenía la función de blanco.

Con respecto al diclofenaco sódico como analgésico comercial se esperaba que su actividad de analgesia aumentara con el tiempo, se encontró que su efecto aumentó a la primera media hora, se mantuvo constante hasta una hora después de aplicado y luego comenzó a perder su acción analgésica presentando una tendencia decreciente en la gráfica a los 90 min.

En cuanto a la capsaicina se esperaba que su comportamiento fuera muy similar al del diclofenaco y por ende diferente a la tendencia de la solución salina, que no tenía acción analgésica. Al evaluar la formulación experimental de capsaicina la actividad sedante a los 30 min. de aplicado el tratamiento no era muy alta, y era mucho menor que la del diclofenaco, sin embargo la evaluación a los 60 min. ya había aumentado, y la actividad continuaba prácticamente constante a la hora y media de administrado la crema.

Como se muestra en la gráfica, a los primeros 30 min. el diclofenaco ya había generado una acción sedante en la cola de las ratas, mientras la capsaicina aún era bajo. Luego de una hora de aplicar los tratamientos, la actividad de la crema que tenía capsaicina ya había alcanzado a la del diclofenaco. Se encontró que a los 90 min. de aplicado el tratamiento ya el diclofenaco empezaba a perder su efecto, aunque la acción de la formulación con capsaicina se mantenía alta; este comportamiento se puede explicar ya que el mecanismo de acción en el organismo del diclofenaco es un antiinflamatorio no esteroideos (AINES) específico, y funciona rápidamente inhibiendo la ciclooxigenasa y con ello la síntesis de prostaglandinas, que son las mediadoras del dolor y la inflamación (Goodman, *et al*, 1996); mientras tanto la capsaicina como agonista de los receptores vanilloides tiene un efecto más retardado, requiriendo un periodo mayor para actuar mientras aumenta el flujo de la sustancia P y la agota (Szallasi y Blumberg., 1999). Esto también provoca que el efecto tarde más y se prolonga la acción analgésica por un periodo mayor, por lo que a la hora y media de aplicada la crema todavía las ratas habían perdido la sensibilidad al estímulo calórico del aparato del Tail Flick.

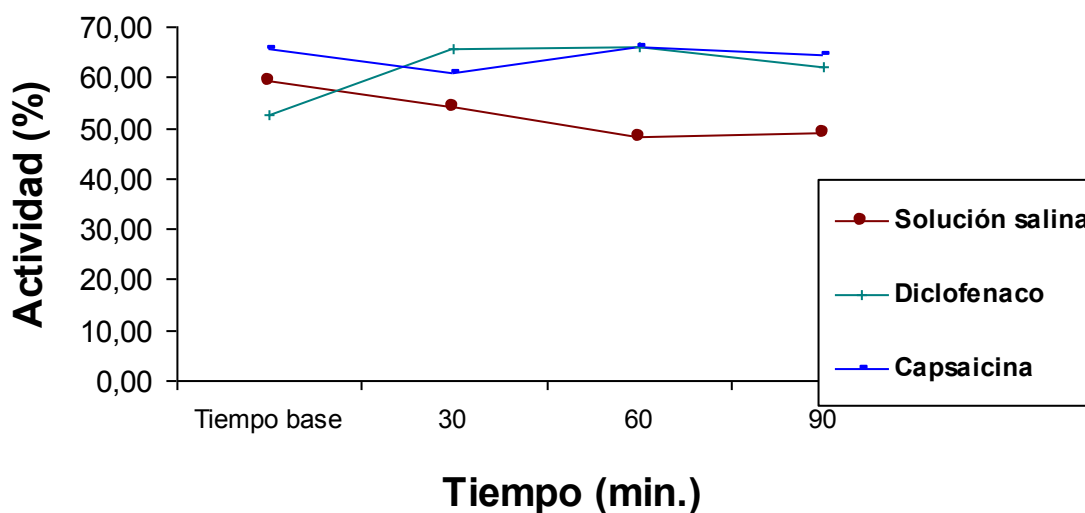
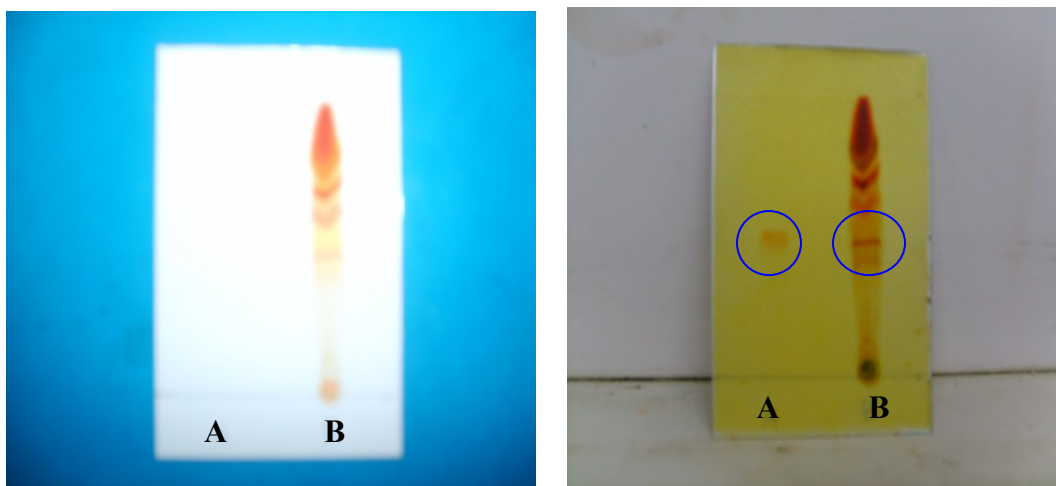


Figura 10. Gráfica de la actividad de los diferentes tratamientos administrados a las ratas en el ensayo del *Tail flick*.

3.6. Identificación de capsaicina.

En la Fotografía 12 se observa la placa de cromatografía de capa fina que se desarrolló al final de la investigación, en ella se desarrolló una muestra de capsaicina grado reactivo (muestra A), junto con la oleorresina obtenida con el extracto de isopropanol utilizado para la formulación de la crema (muestra B). La placa fue revelada con el reactivo de Dragendroff. Se observa una mancha rojiza (resaltada en azul), que aparece tanto en la muestra A como en B después de aplicado el revelador. En A hay solamente una mancha correspondiente a la capsaicina, al comparar con B, se nota la presencia de dicha mancha a la misma altura de A. Con esta identificación, se puede asegurar que la oleorresina que se extrajo con isopropanol, efectivamente presentaba capsaicina.



Fotografía 12. Cromatograma de capa fina del reactivo de capsaicina (A) y la oleoresina de la extracción con isopropanol (B), utilizando una placa de gel de sílice como fase estacionaria; como fase móvil diclorometano : acetonitrilo (95:5), reveladas con el reactivo Dragendroff.

En el cromatograma de la Figura 11, que se obtuvo con el análisis por cromatografía líquida al reactivo de capsaicina, sale un pico principal en un tiempo retención de 6,14; correspondiente a la capsaicina. De igual forma, en la parte inferior de la Figura 11 se observa el cromatograma del mismo análisis realizado a la mezcla utilizada para la formulación de la crema. En el cromatograma se presenta un pico con un tiempo de retención de 6,20, comparando con el respectivo para el reactivo tomado como estándar, queda la certeza de que realmente se obtuvo capsaicina del chile picante panameño para la formulación de la crema.

El tiempo de retención obtenido para el reactivo de capsaicina, también permite comparar con los análisis en cromatografía líquida, realizados anteriormente a cada una de las oleoresinas y a las mezclas de las fracciones obtenidas de la columna. En estos cromatogramas salía un pico definido a un tiempo cercano a 6 min., en las mismas

condiciones de análisis, por lo que se deduce que en esos casos era la capsaicina la responsable de dicha señal.

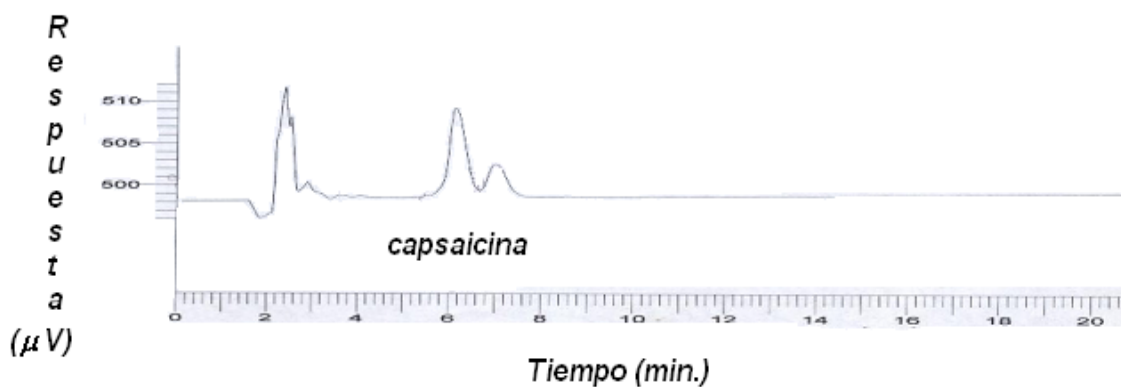
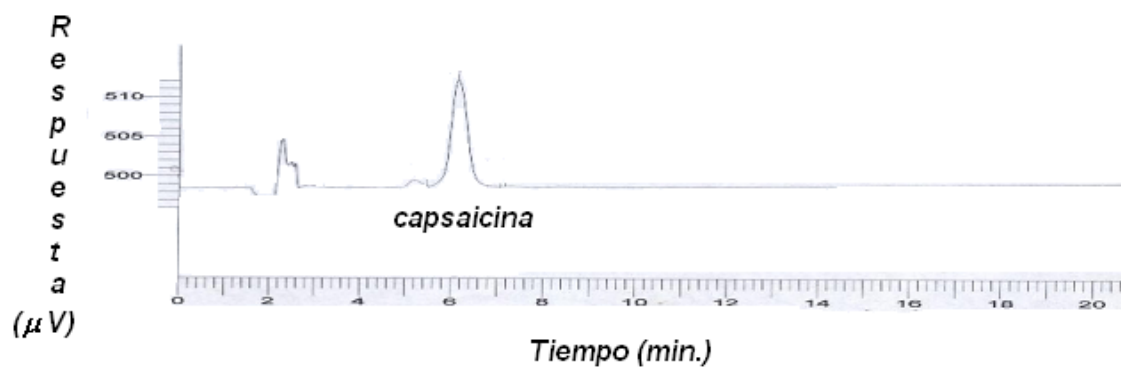


Figura 11. Cromatogramas sobrepuestos de CL del reactivo de capsaicina (a) y de la muestra (b), columna Waters Spherisorb® 5 μm 4,6 mm x 250 mm a 30° C, 281 nm. 1,5 mL/min. F.M.: ácido fosfórico diluido (1 en 1000) y acetonitrilo 6:4.

CAPITULO IV

4.1. CONCLUSIONES

- El isopropanol y el etanol al 95% dieron un mayor rendimiento en la obtención de oleorresina, como disolventes de extracción,.
- El reactivo de Dragendroff reveló alcaloides en cada una de las oleorresinas obtenidas.
- El etanol al 95% y el isopropanol son disolventes adecuados para extraer capsaicina y dihidrocapsaicina; mientras el diclorometano y el hexano extraen mayor cantidad de carotenos y grasas.
- El método de análisis de la farmacopea norteamericana USP 30-NF 25 sirvió para identificar la presencia de capsaicina y dihidrocapsaicina en las oleorresinas y fracciones obtenidas.
- La mezcla de diclorometano : acetonitrilo (95:5), utilizada en cromatografía como fase móvil, permitió una separación favorable de los compuestos en la muestra de la extracción.
- Aplicando la técnica de cromatografía de columna se logró separar gran cantidad de carotenos y grasas presentes en la oleorresina extraída con isopropanol.
- El análisis de la oleorresina comercial de *C. annuum*, como patrón de comparación a las obtenidas experimentalmente y el grado de picor en las

muestras y fracciones de la columna, fueron indicadores para rastrear la presencia de capsaicina y dihidrocapsaicina.

- Se obtuvo como producto final una crema uniforme, con olor característico, color rosa pálido, de consistencia no grasosa, de fácil aplicación y rápida absorción a la piel.
- Con el ensayo del “*Tail flick*” se logró evaluar la actividad analgésica de la crema.
- La capsaicina tuvo un efecto analgésico similar al que presentó el diclofenaco sódico.
- Al final de la investigación se logró demostrar la presencia de capsaicina al comparar contra un reactivo capsaicina.

4.2. RECOMENDACIONES:

- La oleorresina obtenida con etanol al 95% podría ser sometida al proceso de purificación de carotenos y grasas, y utilizarla en la formulación de la crema.
- La identificación de la presencia de capsaicina en las muestras por medio de la sensación de picor, pudiera realizarse con una cantidad estadística de personas que evalúen el grado de picor.
- Para determinar la cantidad exacta de capsaicina y dihidrocapsaicina presentes en la crema, se puede utilizar un estándar de referencia primario.
- Desarrollar otras formulaciones como geles o suspensiones, a base de la capsaicina como opciones fitofarmacéuticas.
- Utilizar diferentes variedades del género *capsicum*, como el chile habanero, para la obtención del principio activo.
- Realizarse estudios posteriores de estabilidad a la crema, determinando así la consistencia y degradación de las materias primas, y ver si estas resultaron las más adecuadas para el producto final.

CAPITULO V**5. BIBLIOGRAFÍA:**

Bolaños A. 1998. Introducción a la olericultura. Universidad Estatal a Distancia, 1ª Edición, Costa Rica. 93-101.

Buddavari S.; M. O'Neil; A. Smith; P. Heckelman. 1989. The Merck Index An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 11va Edición, Merck & CO., Inc. Estados Unidos. 287, 288, 442, 1719,1731.

Carranza R.; H. López; A. Campos. 2007. Guía de farmacología y terapéutica. 1ª Edición. McGraw-Hill Interamericana. México. 43.

D'Amour, E.; F. Smith; 1941. A meted for determining loss of pain sensation. J. Pharmacol. Exp. Ther. Estados Unidos 72-79.

Dewick P. 1999. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. Estados Unidos. 357-359.

Domínguez X. 1988. Métodos de investigación fitoquímica. 4ta Reimpresión, Editorial LIMUSA,S.A., México. 218.

Drucker R. 2005. Fisiología médica. Editorial Manual Moderno, 1ª edición. México. 155-156.

Elizondo A. 2002. Chile Picante. Subgerencia de Desarrollo Agropecuario Dirección de Mercadeo y Agroindustria Servicio de Información de Mercados. Boletín 2 Año 1. SIM/CNP/MERCANET. 1-3.

Everhart E.; C. Haynes; R. Jauron. 2002. Chiles. Guía de horticultura de Iowa State University. El Huerto Doméstico. Iowa State University. University Extention PM 1888(S) 1-4.

Fraser C.; J. Bergeron; A. Mays; S. Aiello. 1993. El Manual Merck de Veterinaria. 4^{ta} Edición. Estados Unidos. 1614.

Goodman A.; J. Hardman; L. Limbird; P. Molinoff; R. Ruddon. 1996. Las bases Farmacológicas de la terapéutica. 9ª Edición, Mc Graw Hill, Interamericana, México, 1717.

Ira Fox S. 2003. Fisiología Humana, 7^{ma} Edición. McGraw-Hill- Interamericana de España, S.A.U., Madrid, 152-181.

Izco J.; E. Barreno; M. Brugués; M. Costa; J. Devesa; F. Fernández; T. Gallardo; X. Llimona; C. Prada; S. Talavera; B. Valdés. 2004. Botánica, 2ª Edición. McGraw-Hill- Interamericana de España, S.A.U. Madrid, 607 -608.

[http:// www.saciencelab.com](http://www.saciencelab.com)

Le Bars D.; M. Gozariu; S. Cadden. 2001. Animal Models of Nociception. Pharmacological Reviews. Estados Unidos. 597-652

Maistre J. 1969, Las plantas de especias, 1ª Edición, Editorial Blume, España. 211 – 222.

Marieb E. 1989. Human Anatomy and Physiology. 1ª Edición, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Estados Unidos. 347-358.

Más P.; J. Ordovás. 2006. Capsaicina Informe para la comisión de Farmacia y Terapéutica. Servicio de Farmacia. HGUA. Informe para la CFT. 1-5.

Nuez F.; R. Gil; J. Costa. 1996. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. 1ª Edición, Ediciones Mundi-Prensa. España-México. 52 ss.

Pavia D.; G. Lampman; G. Kriz. 2001. Introduction to spectroscopy. 3ª Edición Harcourt College Publishers, Inc. Estados Unidos. 359 ss.

Red Tecnológica Alimentaria Apropriada al Desarrollo Agroindustrial Rural RETADAR. 1992. Características de los chiles. Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos U.C.R.- M.A.G. Costa Rica.

Salazar L.; C. Silva. 2004. Efectos farmacológicos de la capsaicina, el principio pungente del chile. *Biología Scripta*, México. 7-14.

Stahl E. 1969. *Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook*. 2da Edición, Springer-Verlag Berlin- Heidelberg-New York. Estados Unidos. 873-874.

Szallasi A.; P. Blumberg. 1999. Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Estados Unidos. 159-204.

The United States Pharmacopeial Convention. 2007. USP30-NF25. ISSN:1068-5456 ISBN:1-88788-51-1. Estados Unidos.

Tresguerres J. 2005. *Fisiología Humana*. Editorial McGraw-Hill Interamericana, 3ª edición. España. 317-326.

Zapata M.; S. Bañón; P. Cabrera. 1992. *El pimiento para pimentón*. Ediciones Mundi-Prensa. España. 35-40.

ANEXOS

Cuadro A.1. Resultados del tiempo, en segundos, de reacción de las ratas en el ensayo *Tail flick* en los tres grupos de ratas.

Tratamiento	Rata	Masa rata (g)	Medición en tiempo base (s)	Medición a los 0 min (s)	Medición a los 30 min (s)	Medición a los 60 min (s)	Medición a los 90 min (s)
Disolución salina	1	215	1,5	3,1	1,4	1,2	1,0
	2	231	1,2	3,3	1,5	1,4	1,3
	3	243	2,0	3,4	1,8	1,4	1,6
	4	239	2,4	3,2	1,6	1,6	1,7
	5	214	1,5	2,0	1,4	1,3	1,2
	6	233	1,9	2,9	1,5	1,4	1,9
	7	223	1,8	3,2	2,2	1,6	1,5
	8	249	1,8	3,0	1,5	1,5	1,4
	Promedio	230	1,7	3,0	1,6	1,4	1,4
Diclofenaco sódico	1	188	2,1	4,4	2,6	2,9	2,1
	2	196	2,7	4,7	2,6	3,0	1,9
	3	192	1,7	3,0	2,9	2,4	2,7
	4	188	2,6	8,1	3,4	2,5	3,2
	5	189	2,4	3,1	2,6	3,5	2,5
	6	189	2,9	3,9	2,0	1,8	2,8
	7	192	1,3	3,3	2,3	2,7	2,8
	8	202	1,8	5,2	3,5	2,4	2,2
	Promedio	192	2,1	4,4	2,7	2,6	2,5
Capsaicina	1	198	2,0	4,1	1,8	2,0	2,4
	2	250	2,1	4,2	1,8	1,9	1,9
	3	259	1,3	2,1	1,9	1,9	2,1
	4	223	1,9	2,7	1,5	1,6	1,5
	5	256	2,0	3,3	1,9	2,0	2,2
	6	235	2,5	1,9	1,7	2,0	1,9
	7	247	2,3	3,5	2,7	1,8	1,8
	8	235	1,8	4,8	1,4	3,3	1,9
	Promedio	237	2,0	3,3	1,8	2,1	2,0

Cuadro A.2. Resultados del porcentaje de actividad analgésica del ensayo *Tail flick* en los tres grupos de ratas.

Tratamiento	Rata	En tiempo base (%)	A los 30 min (%)	A los 60 min (%)	A los 90 min (%)
Disolución salina	1	48,39	45,16	38,71	32,26
	2	36,36	45,45	42,42	39,39
	3	58,82	52,94	41,18	47,06
	4	75,00	50,00	50,00	53,13
	5	75,00	70,00	65,00	60,00
	6	65,52	51,72	48,28	65,52
	7	56,25	68,75	50,00	46,88
	8	60,00	50,00	50,00	46,67
	Promedio	59,42	54,25	48,20	48,86
	Desviación estándar	13,02	9,73	8,15	10,67
Diclofenaco sódico	1	47,73	59,09	65,91	47,73
	2	57,45	55,32	63,83	40,43
	3	56,67	96,67	80,00	90,00
	4	32,10	41,98	30,86	39,51
	5	77,42	83,87	112,90	80,65
	6	74,36	51,28	46,15	71,79
	7	39,39	69,70	81,82	84,85
	8	34,62	67,31	46,15	42,31
	Promedio	52,47	65,65	65,95	62,16
	Desviación estándar	17,20	17,85	25,84	21,75
Capsaicina	1	48,78	43,90	48,78	58,54
	2	50,00	42,86	45,24	45,24
	3	61,90	90,48	90,48	100,00
	4	70,37	55,56	59,26	55,56
	5	60,61	57,58	60,61	66,67
	6	131,58	89,47	105,26	100,00
	7	65,71	77,14	51,43	51,43
	8	37,50	29,17	68,75	39,58
	Promedio	65,81	60,77	66,23	64,63
	Desviación estándar	28,61	22,73	21,25	23,31

Preparación del reactivo Dragendroff:

Disolución A:

1,7 g de nitrato de bismuto

20 g de ácido tartárico

80 mL de agua

Disolución B:

16 g de yoduro de potasio

40 mL de agua

Se mezcló a una proporción de igual volumen de la disolución A y B. Por último 10 mL de esta mezcla se agregaron a 10 g de ácido tartárico en 50 mL de agua (Stahl., 1969)

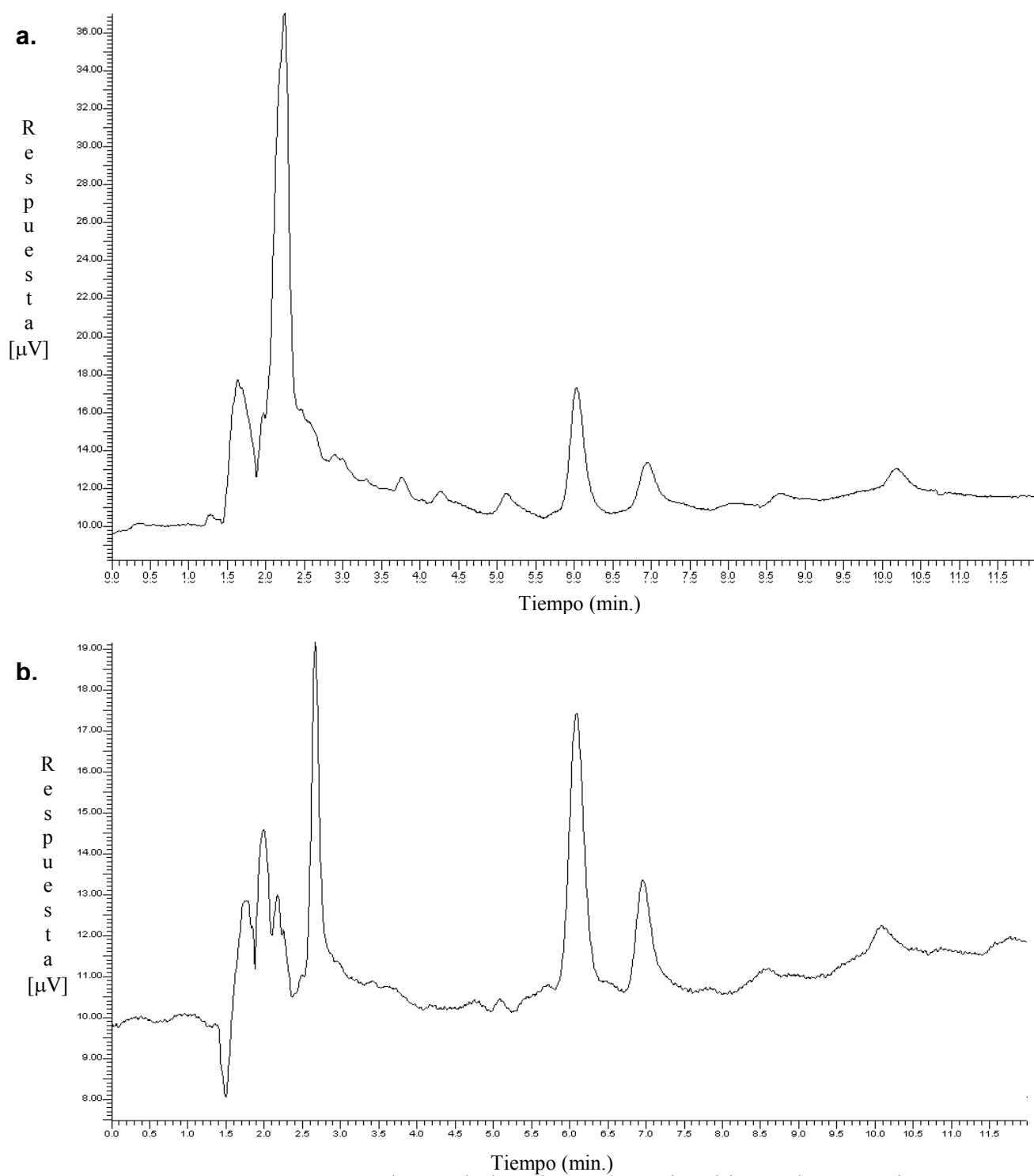


Figura A1. Cromatogramas de CL de las oleorresinas obtenidas en la extracción con diferentes disolventes: a. Etanol 95%, b. Isopropanol, usando columna Waters Spherisorb® 5 μ m 4,6 mm x 250 mm a 30° C, 281 nm. 1,5 mL/min. Fase móvil.: ácido fosfórico diluido (1 en 1000) y acetonitrilo 6:4.

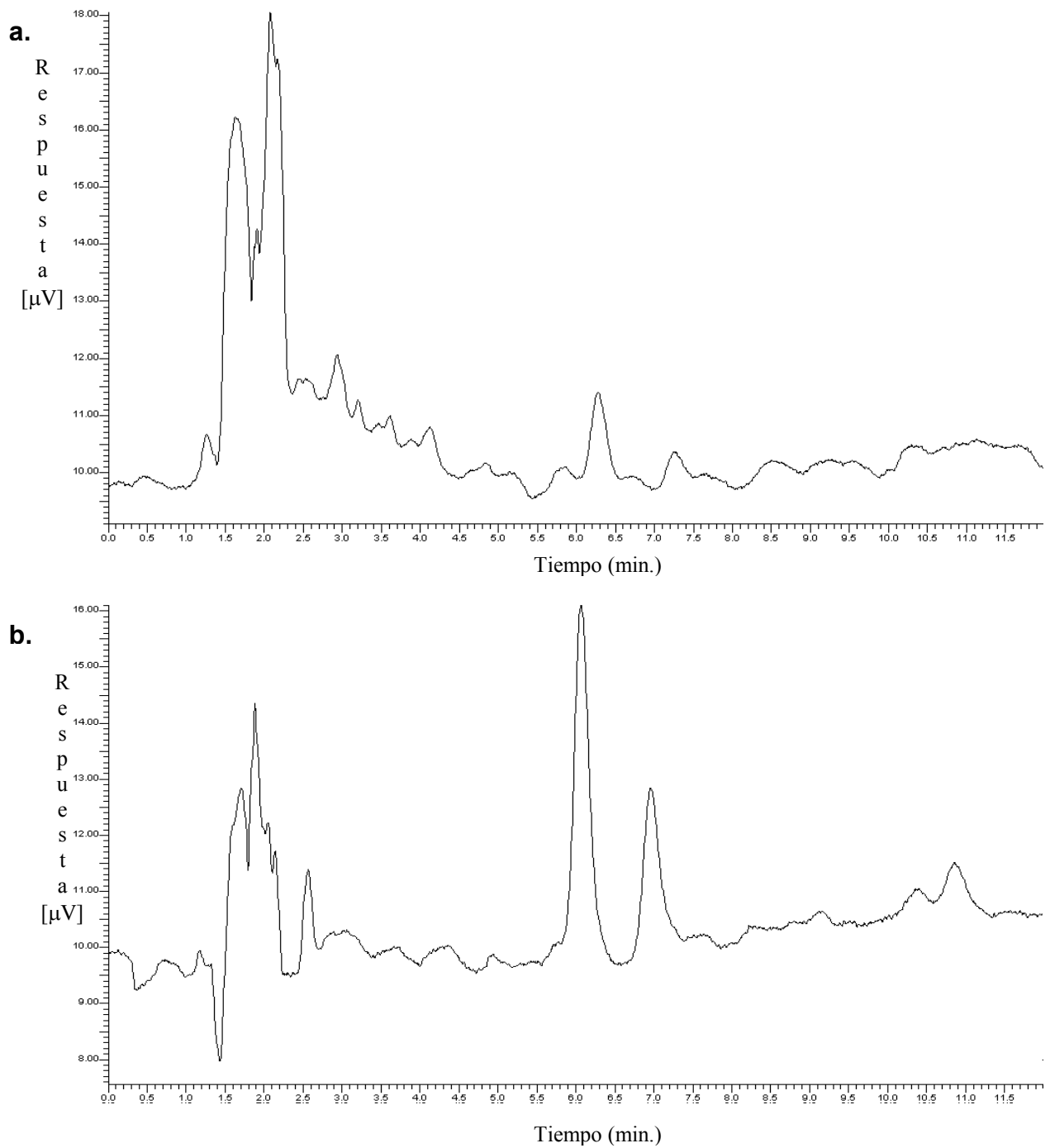


Figura A2. Cromatogramas de CL de las oleorresinas obtenidas en la extracción con diferentes disolventes: a. diclorometano, b. hexano, usando columna Waters Spherisorb® 5 µm 4,6 mm x 250 mm a 30° C, 281 nm. 1,5 mL/min. Fase móvil.: ácido fosfórico diluido (1 en 1000) y acetonitrilo 6:4

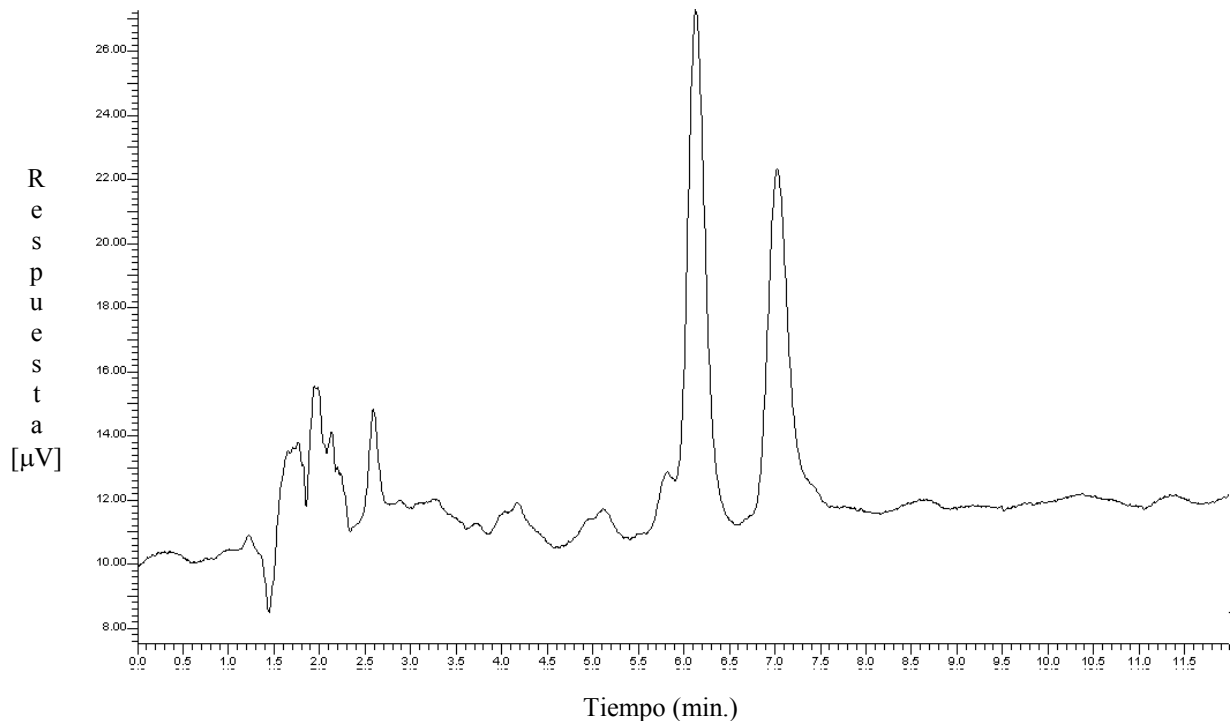


Figura A3. Cromatograma de CL de la oleorresina comercial de *C. annum*, usando columna Waters Spherisorb® 5 µm 4,6 mm x 250 mm a 30° C, 281 nm. 1,5 mL/min. Fase móvil.: ácido fosfórico diluido (1 en 1000) y acetonitrilo 6:4