

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas
Facultad de Química – Farmacia
Departamento de Licenciatura en Ciencias
Farmacéuticas



TRABAJO DE DIPLOMA

Tesis para optar el Título de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas

**Contribución al estudio fitoquímico y
farmacológico de la especie *Eugenia clarensis*
Britton & P. Wilson**

Autora: Anabel Avalos Gavilla

Tutores: Dra. C. Liliana Vicet Muro

Dr. C. Dany Siverio Mota

Santa Clara, Cuba

2017



Exergo

*“The important thing is not to stop questioning;
curiosity has its own reason for existing.”*

- Albert Einstein



Dedicatoria

*A mis padres, siempre,
por ser mi inspiración y mi alegría.*

*A mi hermano,
la otra parte de mí que nunca olvido.*

*A quienes han estado conmigo en esta travesía,
sin apartarse ni un momento de mi lado.*



Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

“Sentir gratitud y no expresarla es como envolver un regalo y no darlo.”

-William Arthur Ward



Este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo de muchas personas a las que agradezco infinitamente.

*En primer lugar, me gustaría agradecer a mis padres, **Inalvis** y **Enrique**, que durante toda mi vida han guiado cada paso que doy y han sido partícipes de mis logros y mis tropiezos, de mis alegrías y mis tristezas, porque gracias a ellos me he convertido en la persona que soy.*

*A mi hermano, **Enriquito**, por quererme tanto, porque no existe en el mundo un cariño tal que lo iguale.*

*A **Denis**, con todo mi corazón, por estar siempre a mi lado durante estos 5 años aún en mis momentos de máximo estrés, y haber compartido tantos malos y buenos momentos.*

A la familia de mi novio por estar siempre pendientes de mí y por considerarme parte de su familia.

*A mis tutores **Liliana** y **Dany**, por darme seguridad infinita, por su paciencia y dedicación y por haber confiado en mí. Gracias por todas las horas dedicadas a la realización de esta tesis*

*A **Elisa** por tener siempre un consejo y una enseñanza oportuna, por brindarme toda la ayuda posible para que mi trabajo fuera un éxito.*

A todos los profesores del departamento de farmacia, así como aquellos que no pertenecen al departamento, pero que a lo largo de estos 5 años han contribuido a mi formación personal y profesional.

*A mis amigas de la infancia, especialmente a mis negritas **Yivian** y **Zulian** y a los amigos que he hecho durante estos años: **Beisy**,*

Arlettys, Eduarditillo, Peña, Leidy Laura, Zuleyra, Sosa, Lisset, Dianelys, Oslaidy y Nelson por brindarme su amistad, por estar siempre ahí cuando los necesité, por llenarme de alegría y sobre todo por dejarme ocupar un espacio importante dentro de sus corazones.

*A mis loquitas de la universidad, **Elianet** (la rubia revoltosa) **Patry** (mi otra negrita) y a **Vivi** (la más normalita) por estar siempre juntas durante estos años, por quererme mucho y por haberme soportado, aún en mis peores momentos, por haber compartido tantas risas y tantas lágrimas y porque haberlas conocido fue una de las mejores cosas que me pasó en la vida.*

A todos los que creyeron que este día nunca llegaría.

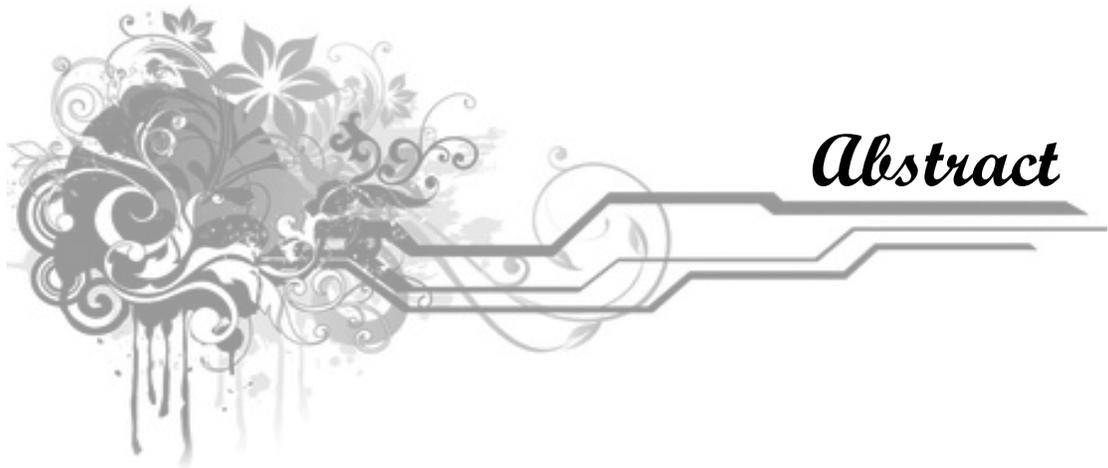
A TODOS, SINCERAMENTE, MUCHAS GRACIAS!!!!!!



Resumen

RESUMEN

Se realizó un estudio experimental con el objetivo de evaluar la composición fenólica y la acción farmacológica del extracto etanólico de las hojas de *Eugenia clarensis* durante el período de junio de 2016 hasta mayo de 2017. Se determinó mensualmente la actividad antioxidante *in vitro* de dichos extractos por el método de la actividad secuestradora del radical libre DPPH• y la actividad antiinflamatoria tópica *in vivo* a través de la técnica edema auricular inducido por TPA en ratones Balb/c hembras a la dosis 1 mg/oreja. Se evaluó la actividad antiinflamatoria oral por el modelo del edema plantar inducido por λ -carragenina. El contenido fenólico en base a ácido gálico y el contenido de flavonoides en base a rutina, resultaron variables, siendo febrero y mayo los meses de mayores valores respectivamente. La especie manifestó resultados como antioxidante con valores de IC₅₀ mayores que los obtenidos para los patrones rutina y eugenol. Además, mostró resultados como antiinflamatorio tópico con porcentajes de inhibición de la inflamación superior al 65% en todos los meses. Se obtuvo una alta correlación lineal entre el efecto secuestrador del radical libre DPPH• y el contenido de fenoles totales con un R²=0,82. Sin embargo, no se encontró una adecuada correlación lineal entre el efecto secuestrador y el contenido de flavonoides R²=0,42; ni entre el contenido de fenoles y flavonoides totales y la actividad antiinflamatoria tópica. El extracto reveló acción antiinflamatoria oral a la dosis de 800 mg/kg, comparable con el control indometacina $p < 0,05$.



Abstract

ABSTRACT

An experimental study was carried out with the objective of evaluating the phenolic composition and pharmacological action of the ethanolic extract from the leaves of *Eugenia clarensis* Britton & P. Wilson. During the period from June 2016 until May 2017 were analyzed. The quantitative determination of the phenolic compounds of each extract obtained was carried out. The *in vitro* antioxidant activity of extracts was determined monthly by the method of the scavenging activity of the free radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH•) and the topical anti-inflammatory activity *in vivo* through the induced topic edema by 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) technique in Balb/c female mice in doses (1 mg/ear). In addition, oral anti-inflammatory activity was evaluated by the λ -carrageenan-induced plantar edema model. The phenolic content, based on gallic acid, and the content of flavonoids, based on rutin, were variable, being February and May the months with the highest values, respectively. The species showed results as antioxidant with IC_{50} values higher than those obtained for rutin and eugenol standards with 10,29 $\mu\text{g/mL}$ and 36,11 $\mu\text{g/mL}$ respectively. In addition, it showed results as topical anti-inflammatory with percentages of inhibition of inflammation greater than 65% in all months. A high linear correlation between the sequestering effect of the free radical DPPH• at the dose of 125 $\mu\text{g/mL}$ and the total phenol content was obtained with $R^2=0,82$. Was not found a suitable linear correlation between the scavenging effect and the flavonoid content $R^2=0,42$. Was not found a suitable linear correlation between total phenol and flavonoid content and topical anti-inflammatory activity. The extract revealed oral anti-inflammatory action at the dose of 800 mg/kg, comparable to the indometacine $p<0,05$.



Índice

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1. Medicina tradicional y plantas medicinales	3
1.2. Género <i>Eugenia</i>	3
1.3. <i>Eugenia clarensis</i> Britton & P. Wilson.....	4
1.3.1. Origen, distribución geográfica.....	4
1.3.2. Clasificación botánica.....	4
1.3.3. Descripción botánica	5
1.3.4. Antecedentes de estudios fitoquímicos y farmacológicos	5
1.4. Composición química de las plantas medicinales	6
1.4.1. Factores que afectan la composición química de las plantas.....	7
1.4.1.1. Edad	7
1.4.1.2. Cambios intrínsecos que se manifiestan durante las diferentes etapas del proceso vegetativo de las especies	7
1.4.1.3. Condiciones climato-geográficas	8
1.4.1.4. Cambios intrínsecos determinados por los ritmos biológicos de ciclo diario y estacionario	8
1.4.1.4. Radiaciones ionizantes	8
1.4.1.5. Procesos fitosanitarios.....	9
1.4.2. Influencia de los factores que afectan la composición química de las plantas en el contenido fenólico	9
1.5. Acciones farmacológicas de los compuestos fenólicos.....	9
1.6. Actividad antioxidante	10
1.6.1 Métodos para determinar actividad antioxidante	11
1.6.1.1 Actividad secuestradora del radical libre DPPH•	12
1.7. Actividad antiinflamatoria	12
1.7.1. Métodos para determinar actividad antiinflamatoria	13
1.8. Consideraciones finales.....	14

2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1. Equipos, materiales, reactivos y/o medicamentos empleados	15
2.2. Recolección y preparación del material vegetal	15
2.2.1. Obtención de los extractos etanólicos de las hojas de <i>E. clarensis</i>	16
2.3. Determinación del contenido fenólico total en los extractos obtenidos	16
2.3.1. Determinación de fenoles totales	16
2.3.2. Determinación de flavonoides totales.....	17
2.4. Evaluación de la actividad farmacológica de los extractos etanólicos de <i>E. clarensis</i> 18	
2.4.1. Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos obtenidos por el método de la actividad secuestradora del radical libre DPPH•.....	18
2.4.2. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad antiinflamatoria de los extractos obtenidos por el modelo de edema auricular inducido por TPA.....	19
2.5. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad antiinflamatoria por el modelo de edema plantar inducido por λ -carragenina	20
2.6. Eutanasia.....	22
2.7. Consideraciones éticas.....	22
2.8. Análisis estadístico	23
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
3.1. Recolección y preparación del material vegetal	24
3.1.1. Obtención de los extractos etanólicos de las hojas de <i>E. clarensis</i>	24
3.2. Determinación del contenido fenólico total en los extractos obtenidos	24
3.3. Evaluación de la actividad farmacológica de los extractos etanólicos de <i>E. clarensis</i> 27	
3.3.1. Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos por el método de la actividad secuestradora del radical libre DPPH•	27
3.3.2. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad antiinflamatoria de los extractos por el modelo de edema auricular inducido por TPA.....	34
3.3.3. Correlación de la actividad farmacológica de los extractos etanólicos de <i>E. clarensis</i> con el contenido fenólico.....	35

3.4. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad antiinflamatoria por el modelo de edema plantar inducido por λ -carragenina	39
CONCLUSIONES	42
RECOMENDACIONES	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	51



Introducción

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han constituido desde tiempos remotos un recurso de gran importancia, para cubrir las necesidades terapéuticas. Su uso como agentes de la salud es ampliamente conocido en múltiples culturas del mundo y ha sido transmitido a través de generaciones.⁽¹⁾ Durante las últimas décadas el interés de pacientes y científicos por la medicina tradicional ha crecido rápidamente debido a las preocupaciones sobre los efectos adversos de las drogas químicas y cuestionamientos de la medicina alopática.^(2, 3) El estudio de las plantas medicinales es, por tanto, un campo abierto para la investigación no solamente para la medicina oriental sino también occidental basado en la producción de fármacos mediante el aislamiento de compuestos activos.^(4, 5)

Este saber tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo de los años para explicar, en forma racional, el uso terapéutico de una planta y permite además la vigencia de su empleo. Sin embargo, a pesar de los avances, éste no ha perdido su importancia, por el contrario, el desarrollo de los medicamentos modernos ha resultado de formas cada vez más complejas de aprovecharlas y su producción sigue dependiendo en gran parte de su uso, como materia prima. La identificación del valor curativo de las plantas ha provenido generalmente de la información proporcionada por el uso de la medicina tradicional, que igualmente ha sido la fuente para la investigación fitoquímica.⁽¹⁾

A pesar de esto solo una cantidad relativamente pequeña de especies de plantas se ha estudiado para las posibles aplicaciones médicas.^(2, 5) En este sentido, la familia *Myrtaceae*, una de las familias con mayor número de especies medicinales distribuidas en América,⁽⁶⁾ no es ajena a esta situación. Posee cerca de 100 géneros y más de 3000 especies, algunas de los cuales poseen efectos farmacológicos importantes como antimicrobiano, antidepresivo, antioxidante, antiinflamatorio y analgésico, entre otros.⁽⁷⁾ Estos efectos están relacionados en buena medida con la presencia de los metabolitos secundarios como aceites esenciales, flavonoides y taninos, entre otros, los que pueden variar según las condiciones climáticas.^(6, 8, 9)

Introducción

En Cuba se ha identificado la especie *Eugenia clarensis* Britton & P. Wilson (*E. clarensis*), la cual es endémica de la región central del país, específicamente en la provincia de Villa Clara, Alturas de Cubanacán.⁽¹⁰⁾ Al igual que otras endémicas, se encuentra en serio peligro de extinción, debido a la reducción de su hábitat natural y al poco conocimiento desde el punto de vista fitoquímico y farmacológico que en alguna medida limita su utilización por parte de la población y con ello su propagación. La especie constituye una fuente vegetal importante e inexplorada con potencialidades farmacológicas.

Tomando en consideración estos aspectos se propone el **Problema Científico** siguiente: La especie *Eugenia clarensis* posee escasos estudios experimentales que permitan el conocimiento de la relación entre la composición química y sus actividades farmacológicas con fines farmacéuticos.

Este trabajo científico parte de la siguiente **Hipótesis**: Si se profundiza en los estudios fitoquímicos y farmacológicos de *Eugenia clarensis* se podrá conocer la relación entre la composición fenólica y las actividades antioxidante y antiinflamatoria de la especie.

Objetivo General:

Evaluar la composición fenólica y la acción farmacológica del extracto etanólico de las hojas de *Eugenia clarensis* Britton & P. Wilson.

Objetivos Específicos:

1. Cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos etanólicos de la especie recolectada en diferentes meses del año.
2. Determinar la actividad antioxidante y el efecto antiinflamatorio tópico de los extractos etanólicos de la especie recolectada en diferentes meses del año.
3. Correlacionar la composición química de los extractos etanólicos de *E. clarensis* con las actividades antioxidante y antiinflamatoria para proponer su uso en el campo farmacéutico.
4. Evaluar el efecto antiinflamatorio oral del extracto etanólico de *E. clarensis*.



*Revisión
Bibliográfica*

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Medicina tradicional y plantas medicinales

El uso de plantas medicinales se remonta a la época prehistórica y es una de las formas más extendidas de medicina, presente virtualmente en todas las culturas conocidas. La medicina tradicional es la suma de conocimientos y prácticas usadas en el diagnóstico, prevención y eliminación de los desequilibrios físicos, mentales o sociales de los individuos. El conocimiento de las plantas medicinales se extiende a cualquier parte del mundo y está basando en la experiencia práctica transmitida de generación en generación de manera oral o escrita. ^(2, 5, 11)

Las plantas son elementales en el desarrollo de la medicina moderna y aunque se conoce que su acción preventiva o curativa se debe a la presencia en sus órganos de sustancias químicas que provocan su efecto fisiológico, en muchas de las plantas medicinales no se han estudiado aún los metabolitos bioactivos. La detección de los principios activos es importante pues permite corroborar o rechazar las propiedades atribuidas a la planta y a la vez detectar nuevas posibles aplicaciones. Por otra parte, el conocimiento de los metabolitos facilita la dosificación y en algunos casos la administración, no obstante, existe la tendencia al uso de los extractos o polvos obtenidos de las plantas o sus órganos. ⁽¹²⁾

Aunque muchas plantas han sido estudiadas y validadas desde el punto de vista químico y biológico, todavía muy poco se conoce de otras. La industria farmacéutica y buena parte de la comunidad científica está considerando en nuestros días las plantas medicinales como fuentes potenciales de moléculas bioactivas con estructuras diferenciadas e innovadores mecanismos de acción y está siendo más flexible en cuanto a la formulación de estos agentes. ⁽¹²⁾

1.2. Género *Eugenia*

Eugenia es un género de plantas con flores perteneciente a la familia *Myrtaceae*. Se distribuye en regiones tropicales y sub-tropicales. Existen aproximadamente unas 1000 especies, principalmente en las regiones tropicales de América, los Andes, el Oriente de Bolivia, el Caribe y los bosques costeros de Brasil. También se pueden encontrar en Nueva Caledonia y Madagascar. ⁽¹³⁾

Capítulo I. Revisión Bibliográfica

Muchas de las especies de este género han sido citadas por sus efectos farmacológicos. En este sentido se destacan como antioxidante, especies como *E. uniflora* L.^(8, 14-17) *E. dysenterica* DC^(18, 19), y *E. stipitata* Mc Vaugh⁽²⁰⁾. Estas plantas han sido además estudiadas desde el punto de vista fitoquímico estableciéndose una adecuada correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido fenólico (polifenoles y flavonoides) de especies y fracciones⁽¹⁸⁻²¹⁾.

Otras actividades ampliamente reportadas son la antiinflamatoria y analgésica donde especies como *E. brasiliensis* Lam⁽²²⁾, *E. Jamolana*⁽²³⁻²⁵⁾, *E. puniceifolia*^(26, 27) y *E. floccosa*⁽²⁸⁾ han mostrado resultados positivos para esta actividad en modelos experimentales. Además este género presenta actividad sobre el sistema nervioso tanto central como autónomo. En este sentido se refiere el aceite esencial de *E. sulcata* Spring ex Mart como anticolinesterásico⁽²⁹⁾, *E. caryophyllata* (clavo de olor)⁽³⁰⁾ que mejora de manera significativa el déficit de retención de memoria inducida por escopolamina y disminuye la depresión e incrementa la actividad locomotora.⁽³¹⁾

Existen varios estudios que comprobaron el efecto de este género sobre el sistema cardiovascular como hipotensor y protector de la disfunción vascular, *Syzygium gratum*^(32, 33). Algunas especies de *Eugenia*, además, presentan efecto antimicrobiano^(6, 7, 34), gastroprotector^(26, 35-37), antidiarréico, hipotérmico e inhibitoria de la actividad de HIV-1 proteasa⁽³⁸⁾, hipoglicémico⁽³⁹⁾ y hepatoprotector.⁽²⁴⁾

1.3. *Eugenia clarensis* Britton & P. Wilson

1.3.1. Origen, distribución geográfica

Eugenia clarensis Britton & P. Wilson es una de las especies endémicas locales de la flora de Cubanacán, zona situada en el centro de la provincia de Villa Clara, alrededor de su capital Santa Clara.⁽⁴⁰⁾

1.3.2. Clasificación botánica

E. clarensis pertenece al reino *Plantae*, dentro de la división *Magnoliophyta* y la clase *Magnoliopsida*. Se encuentra en el orden *Myrtales* y su familia es *Myrtaceae*. Su nombre binomial es *Eugenia clarensis* Britton & P. Wilson y no posee nombre vulgar.⁽⁴¹⁾

1.3.3. Descripción botánica

Arbusto de hasta 6 m, ramitas pubérulas; hojas oblongas a oblongo-oblanceoladas, subcoriáceas, de 1-2,5 cm, agudas en el ápice, la base obtusa, nervios laterales inconspicuos, tuberculadas en el haz y punteadas en el envés; flores solitarias o de 2 a 4; pedicelos de 2-4 mm, pubescentes; cáliz pubescentes, glóbulos ciliados, acuminados; baya globosa y glandulosa, de un 1cm.⁽⁴²⁾

1.3.4. Antecedentes de estudios fitoquímicos y farmacológicos

Recientemente se han realizado estudios con extractos de la planta *E. clarensis*. En el tamizaje fitoquímico preliminar del extracto etanólico se encontraron evidencias de fenoles, taninos, triterpenos, esteroides, quinonas, flavonoides, coumarinas, resinas y azúcares reductores. Dicho extracto presentó una DL₅₀ por encima de 2000 mg/kg, no clasificándose como tóxica, al no provocar mortalidad a la dosis ensayada, ni evidenciar alteraciones morfológicas macroscópicas en los animales de experimentación. Adicionalmente, mostró una ligera actividad sedante sobre el sistema nervioso central a dosis de 400 y 800 mg/kg.⁽⁴³⁾

Se manifestó actividad antioxidante *in vitro* tanto por el mecanismo de captación de radicales libres como por el de inhibición de la peroxidación lipídica. El modelo experimental *ex vivo* de inducción de la peroxidación lipídica mostró actividad antioxidante con un posible comportamiento dosis dependiente.⁽⁴⁴⁾

El extracto etanólico de *E. clarensis* tiene efecto antiinflamatorio tópico *in vivo* a dosis 1 mg/oreja al mostrar elevada inhibición del edema auricular inducido por TPA. Mostró acción diurética a la dosis de 400 mg/kg, una actividad diurética comparable con el control hidroclorotiazida.⁽⁵⁾

En un estudio preliminar desarrollado a extractos etanólicos de la planta, colectada en diferentes meses se determinó la existencia de variaciones en las concentraciones de fenoles totales y su relación directa con la actividad antioxidante secuestradora de especies que inician la oxidación. Además se determinaron los perfiles cromatográficos de extractos obtenidos en los meses de febrero a mayo utilizando cromatografía gaseosa con detector de llama (CG-FID). El Alcanfor, el 1,8-Cineol y el Eugenol se identificaron dentro de los metabolitos volátiles presentes en el extracto etanólico, existiendo una tendencia a la

Capítulo I. Revisión Bibliográfica

disminución de la concentración de estos durante el periodo de estudio. Esta variación cualitativa y cuantitativa se atribuyó a la influencia del estado fenológico de la planta en el momento de la recolección.⁽²⁾

1.4. Composición química de las plantas medicinales

Todas las células vegetales realizan procesos metabólicos comunes esenciales para la vida celular y en la planta en general. Estos procesos constituyen, en su conjunto, el metabolismo primario. Además de estos procesos metabólicos primarios, se pueden desarrollar rutas que conducen a la formación de metabolitos secundarios. Se denominan de metabolitos secundarios de las plantas a aquellos compuestos químicos que cumplen funciones no esenciales en ellas.⁽⁴⁵⁾

Durante muchos años el valor adaptativo de éstos fue desconocido. En principio fueron considerados productos finales de procesos metabólicos, sin función específica o directamente como productos de desecho de las plantas. El estudio de estas sustancias fue iniciado por químicos orgánicos del siglo XIX, que estaban interesados en estas sustancias por su importancia como drogas medicinales, venenos, saborizantes, aceites, ceras y otros materiales utilizados en la industria.

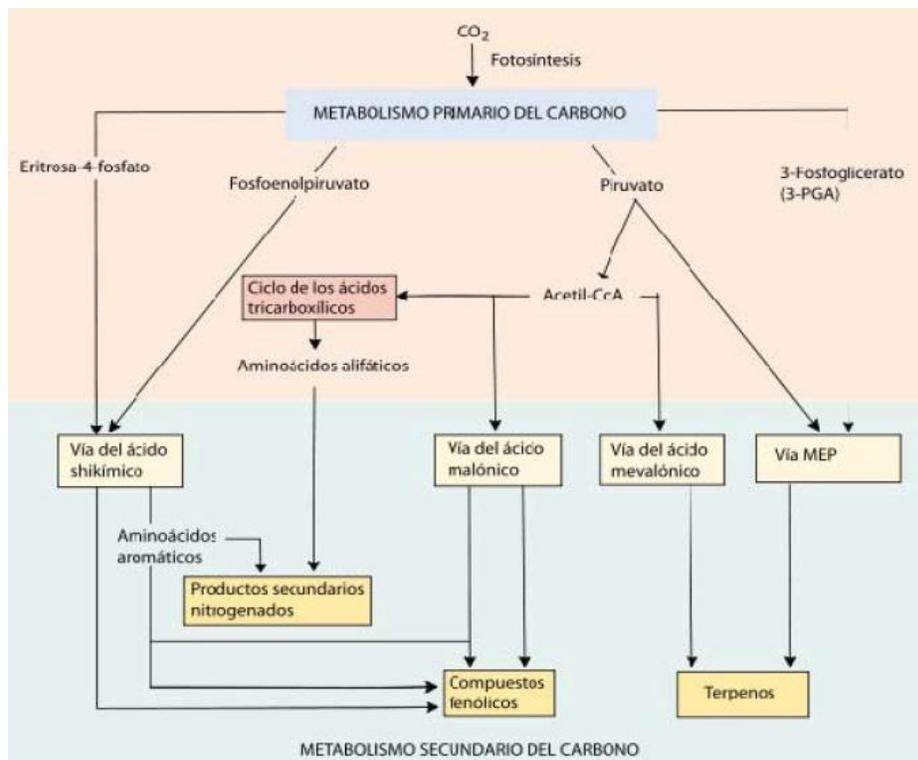


Figura 1. Vías generales de metabolismo secundario de las plantas.⁽⁴⁶⁾

Capítulo I. Revisión Bibliográfica

Los compuestos que forman parte del metabolismo secundario (Figura 1) se clasifican en diferentes tipos: fenoles, terpenoides, compuestos nitrogenados o alcaloides, según Harborne (1997).⁽⁴⁵⁾

Los metabolitos secundarios no son producidos al azar, ya que han sido modelados y optimizados durante la evolución. Estos compuestos intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, y pueden desempeñar una amplia variedad de funciones ecológicas en la planta. La mayoría de los metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra depredadores y patógenos. Inhiben el desarrollo de insectos, nemátodos, hongos, y bacterias, mejorando así el crecimiento de la planta y su consistencia.^(45, 46)

1.4.1. Factores que afectan la composición química de las plantas

El uso de plantas con fines terapéuticos presupone la elaboración de diversas formas farmacéuticas que pueden abarcar desde la infusión más simple hasta las más sofisticadas cremas y pomadas. Para llegar a ello se requiere un largo proceso con implicación de especialistas de diferentes ramas, pero sin lugar a dudas el punto de partida radica en la identificación y recolección correcta de la masa verde a trabajar.⁽⁴⁷⁾ La participación de botánicos o personal debidamente entrenado es esencial ya que no solamente es necesario conocer cada planta sino también se hace imprescindible el dominio de otros elementos que pueden modificar sus propiedades. Así, hay que tener en cuenta los factores que afectan la dinámica de acumulación de los principios activos, entre los que se destacan:

1.4.1.1. Edad

Cada especie en particular presenta una edad óptima para la obtención de sus principios activos. Por lo general en las plantas muy jóvenes no existen sustancias con las propiedades biológicas y químicas bien definidas y las plantas más viejas suelen presentar disminuido el metabolismo y por ende el contenido de sus principios activos.⁽⁴⁷⁾

1.4.1.2. Cambios intrínsecos que se manifiestan durante las diferentes etapas del proceso vegetativo de las especies

Las plantas que contienen aceites esenciales presentan en la época de floración una migración de éstos desde diversas partes del vegetal hacia las flores, con su

Capítulo I. Revisión Bibliográfica

correspondiente disminución en otros lugares acompañado de modificaciones en la composición química. Además, durante el inicio de la floración hay un mayor incremento del metabolismo en las flores, y como consecuencia de ello las raíces dejan de crecer y disminuye el contenido de alcaloides en las mismas. Este efecto se confunde con el anterior debido a que en ocasiones estos procesos pueden actuar simultáneamente, influyendo las variaciones dentro de un año y las variaciones por los años.⁽⁴⁷⁾

1.4.1.3. Condiciones climato-geográficas

El metabolismo que tiene lugar en las especies ocurre de la misma forma que en sus antecesores directos, pero es posible que sucedan variaciones con el propósito de asegurar la adaptabilidad a las nuevas condiciones. Dentro de los factores que pueden influir durante el desarrollo de las especies se describen: tipo de suelo, temperatura, luz, altitud, latitud, humedad, etc. Las plantas que producen mucílagos, como producto de que retienen agua, contienen menos mucílagos cuando crecen sobre un suelo de alto contenido de humedad. Por otro lado, se ha demostrado que en algunas especies los componentes amargos de aguas aumentan con la altitud mientras que los alcaloides disminuyen.⁽⁴⁷⁾

1.4.1.4. Cambios intrínsecos determinados por los ritmos biológicos de ciclo diario y estacionario

Sobre los procesos fisiológicos de los vegetales pueden influir los cambios ambientales, los horarios del día, las fechas del año, los estadios lunares, etc. Se ha demostrado que en existen plantas donde la recolección para la obtención de aceites esenciales se debe realizar durante la mañana para que no se afecten los rendimientos, debido a que su ubicación en los pelos glandulares hace posible su evaporación si la recolección se realiza en las horas de mayor actividad solar como lo es al mediodía o primeras horas de la tarde.⁽⁴⁷⁾

1.4.1.4. Radiaciones ionizantes

Las radiaciones ionizantes pueden alterar el metabolismo de las especies vegetales al interferir en la síntesis de los compuestos básicos y alterar las estructuras de las especies. Algunas especies por el efecto de radiaciones, quedan incapaces de producir alcaloides, pierden viabilidad y mueren.⁽⁴⁷⁾

Capítulo I. Revisión Bibliográfica

1.4.1.5. Procesos fitosanitarios

La presencia de determinadas enfermedades en las plantas afecta la presencia o no de principios activos. Es por ello que se debe tener en cuenta la posibilidad de que las plantas hayan recibido algún producto químico (pesticida, etc.) que obligue a tomar determinadas medidas o precauciones para no emplearlas como masa verde en la elaboración de fitofármacos.⁽⁴⁷⁾

1.4.2. Influencia de los factores que afectan la composición química de las plantas en el contenido fenólico

La nutrición vegetal requiere el conocimiento de las necesidades de nutrientes que precisan las plantas, así como la dinámica de absorción y acumulación que tiene lugar en los distintos órganos y tejidos.⁽¹²⁾ La síntesis de compuestos fenólicos varía y está inducida por factores como la radiación UV, estrés hídrico, u ozono, en este sentido pueden también estos factores potenciar su actividad.⁽⁴⁵⁾ Los compuestos fenólicos en especies vegetales pueden variar, dentro de un mismo individuo, en respuesta a factores genéticos, ontogénicos, bióticos y abióticos, presentando diferentes concentraciones en los diversos órganos de la planta. En lo que respecta a las hojas, la regulación de la síntesis de compuestos fenólicos es una parte importante del desarrollo de dicho órgano. Por otro lado, los carbohidratos formados, útiles en la conformación estructural de la planta, en el metabolismo primario y otros en el metabolismo secundario, tendrán una gran influencia en la cantidad y calidad de los compuestos fenólicos producidos.⁽⁴⁸⁾

En varias especies los flavonoides varían sustancialmente entre genotipos, daños estacionales, edades, daños de la hoja y sitios de ubicación. Las hojas jóvenes son la fuente principal de compuestos fenólicos, porque lo sintetizan como defensa contra predadores herbívoros que la prefieren por su mayor calidad nutricional respecto a las hojas maduras. Sin embargo, eso no siempre ocurre, porque no todos los metabolitos tienen el mismo comportamiento durante el desarrollo foliar. Por ejemplo los flavonoles aumentan conforme avanza el desarrollo de la hoja.⁽¹²⁾

1.5. Acciones farmacológicas de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son compuestos químicos a los que se les atribuye una gran cantidad de actividades biológicas. Entre las más importantes se encuentran

Capítulo I. Revisión Bibliográfica

las actividades antioxidante y antiinflamatoria. A nivel celular, el estrés oxidativo puede dañar proteínas, lípidos y otras biomoléculas. La inflamación es el resultado de la interacción de células y otros factores presentes en los tejidos en respuesta a un daño externo o interno, con producción de Especies Reactivas del Oxígeno (EROs). Entre los posibles mecanismos subyacentes de este desbalance está el inadecuado metabolismo del ácido araquidónico, el cual vía la enzima ciclooxigenasa (COX) genera mediadores pro-inflamatorios sindicados para la mayoría de eritemas causados durante la inflamación, que esta se encuentra implicada en diversas enfermedades crónicas por lo que ambas actividades se encuentran directamente correlacionadas.⁽⁴⁹⁾

La actividad antioxidante de estos compuestos se atribuye a su facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre y a la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático.⁽⁵⁰⁾ Además, presentan una estructura química ideal para captar iones metálicos (principalmente hierro y cobre) y por tanto para inhibir la formación de radicales libres a través de reacciones de Fenton.⁽⁵¹⁾ Además de las propiedades antioxidantes, a estos compuestos se les atribuyen otras actividades biológicas muy beneficiosas: entre estas destacan sus efectos vasodilatadores, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, bactericidas, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales, efectos estrogénicos, o inhibidores de enzimas prooxidantes, como ciclooxigenasa, lipooxigenasa y xantina oxidasa.⁽⁵²⁾

1.6. Actividad antioxidante

Durante los últimos años, el estrés oxidativo ha estado implicado en el desarrollo de diferentes patologías, como diabetes y enfermedades cardiovasculares. Este estrés oxidativo es el proceso que ocurre cuando existe un desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y los sistemas de defensa antioxidantes o existe un exceso de los radicales libres (RL) provenientes de fuentes exógenas (radiación, luz solar, tabaco, xenobióticos, drogas, etc.). Esto conlleva a modificaciones químicas de macromoléculas de relevancia biológica como ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas, lípidos y carbohidratos.^(53, 54)

Capítulo I. Revisión Bibliográfica

Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, los cuales, al ser átomos o grupos de átomos con un electrón desapareado, son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica.^(55, 56) Se clasifican en dos amplios grupos, dependiendo de si son solubles en agua (hidrofílicos) o en lípidos (hidrofóbicos). En general los antioxidantes solubles en agua reaccionan con los oxidantes en el citoplasma celular y el plasma sanguíneo, mientras que los antioxidantes liposolubles protegen las membranas de la célula contra la peroxidación de lípidos.⁽⁵⁷⁾ Entre los compuestos que pueden actuar como antioxidantes se encuentran vitaminas C y E, carotenoides, antocianinas, flavonoides y otros compuestos fenólicos.^(53, 58-60)

1.6.1 Métodos para determinar actividad antioxidante

Existen varias aproximaciones para la clasificación de métodos para medir actividad antioxidante. Una de ellas se basa en clasificar los métodos como directos e indirectos, mientras que otras los clasifican de acuerdo con el mecanismo mediante el cual sucede el proceso antioxidante.^(61, 62) En cuanto a la primera, los métodos indirectos estudian la habilidad del antioxidante para estabilizar algún radical libre (RL). Por su parte, los métodos directos están basados en el estudio del efecto de un antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sistema, de los cuales los más usados han sido: proteínas, ácidos nucleicos, plasma sanguíneo, grasas, lipoproteínas, membranas biológicas, entre otros.^(63, 64)

Otra clasificación de los métodos está basada en el mecanismo de acción que inhibe la formación de RLs o interrumpe la propagación de estos y consta de cuatro categorías: secuestro de las especies que inician la oxidación, quelación de iones metálicos capaces de generar especies reactivas, frenado de la reacción en cadena de la autooxidación y disminución de la concentración de oxígeno focalizada.

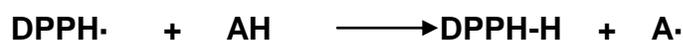
Dentro de los ensayos más utilizados se encuentran: el ensayo de fenoles totales utilizando reactivo Folin-Ciocalteu, el método del molibdato de amonio (TAOC), la actividad secuestradora del RL 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, ensayo de la fuerza

Capítulo I. Revisión Bibliográfica

antioxidante reducida del ión férrico (FRAP), ensayo de actividad quelante, método de tiocianato férrico (FTC) y el ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA).⁽⁶⁴⁾

1.6.1.1 Actividad secuestradora del radical libre DPPH•

El ensayo se fundamenta en la medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical libre DPPH•. La absorbancia característica de este radical, que posee un color violeta intenso, disminuye en presencia de un antioxidante (AH) u otro radical (R). Por tanto, es posible cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que poseen determinados compuestos mediante la determinación espectrofotométrica a 517nm del grado de decoloración que provocan a una disolución metanólica o etanólica de DPPH.⁽⁶⁵⁾



Los resultados se suelen expresar como IC₅₀, es decir, la concentración de antioxidante necesaria para estabilizar un 50% del DPPH. Sin embargo, han surgido otros parámetros como la eficiencia antiradicálica (EA) basada en la cinética de la reacción y que involucran, además de la concentración de antioxidante, el tiempo necesario para ejercer su efecto.⁽⁶⁶⁾

1.7. Actividad antiinflamatoria

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa para el organismo. Se trata de una respuesta inespecífica frente a diversas agresiones (infección, estrés oxidativo, traumatismos, etc.).⁽⁶⁷⁾ La respuesta inflamatoria es propia del tejido conectivo vascularizado y surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado. En ella participan un gran número de mediadores químicos, células tisulares (células del endotelio vascular, mastocitos y macrófagos) y células sanguíneas (plaquetas y leucocitos).⁽⁶⁸⁾ En dependencia del tipo de estímulo es el patrón característico de respuesta y el tiempo necesario para la activación total de los componentes implicados, por lo que la intensidad del proceso inflamatorio depende del grado de lesión tisular.⁽⁶⁹⁾ En la mayoría de las circunstancias, la activación de los sistemas de defensa del organismo conduce a la eliminación de estos agentes sin manifestaciones visibles de inflamación. Sólo si estos se encuentran en grandes

Capítulo I. Revisión Bibliográfica

cantidades, en sitios inusuales, o son capaces de modificar algunas de las funciones del sistema inmunológico, pueden ocurrir daños tisulares como consecuencia de las reacciones inmunes y esto a su vez facilita el desarrollo de diferentes enfermedades inflamatorias.⁽⁷⁰⁾

1.7.1. Métodos para determinar actividad antiinflamatoria

La determinación de la actividad antiinflamatoria de nuevos compuestos y extractos vegetales se puede investigar a través de técnicas *in vitro* e *in vivo*. Las técnicas de evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vitro*, permiten valorar el comportamiento celular o de algún mediador molecular específico tras simulación o activación del proceso inflamatorio utilizando células, fuera de un organismo vivo. Aunque se realizan estudios en varias líneas celulares, los macrófagos RAW 264.7 son los más utilizados.^(71, 72)

Por su parte, las técnicas que permiten evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo* se basan en la evaluación del efecto cuando transcurre de forma aguda o crónica.^(73, 74) Generalmente estos estudios se desarrollan en roedores (ratas y ratones) pues resultan modelos experimentales adecuados por su similitud con los humanos en los procesos cinéticos que sufre el fármaco en el organismo.^(75, 76)

Tradicionalmente se han utilizado dos modelos de inflamación aguda, el edema plantar y el edema auricular. En el primero se administra un agente irritante (λ -carragenina,⁽⁷⁷⁾ dextrano,⁽⁷⁸⁾ entre otros) en la aponeurosis plantar del animal transcurrido un tiempo de la administración de las sustancias de prueba y los controles. El volumen de la pata es medido antes y después de la inyección del irritante a diferentes tiempos, usando un pletismómetro de agua.⁽⁷⁹⁾ También puede determinarse a partir de la medición del grosor con un micrómetro o pie de rey.⁽⁸⁰⁾

En el segundo ensayo se aplica un agente irritante (TPA,⁽⁸¹⁾ ácido araquidónico⁽⁸²⁾ o aceite de croton,⁽⁸³⁾ entre otros) en el pabellón auditivo del ratón. En este caso, la sustancia de prueba y los controles pueden administrarse de forma tópica. A diferentes tiempos, se mide la diferencia de espesor de la oreja antes y después de inducir la reacción inflamatoria con ayuda de un micrómetro; o a un tiempo

Capítulo I. Revisión Bibliográfica

determinado dependiendo del agente irritante, los animales se sacrifican y se les extrae una porción de la oreja inflamada y otra idéntica de la no inflamada.

Como modelo de inflamación crónica se utiliza, fundamentalmente, el granuloma inducido por discos de algodón descrito por Meier y col en 1950.⁽⁷⁴⁾ Otra técnica muy utilizada es la inducción de artritis en roedores donde se analiza la disfunción de miembros. Si bien la información que se obtiene no es absolutamente igual a la respuesta sobre el organismo humano, esta es más cercana a la esperada por ser organismos vivos donde ocurren procesos de ADME que pueden ser evaluados por largos periodos de tiempo.⁽⁷⁶⁾ Sin embargo, muchos factores pueden influir en los resultados que se obtienen debido a la complejidad de cada organismo.

1.8. Consideraciones finales

Los compuestos fenólicos, entre los cuales se encuentran los flavonoides, presentan una amplia distribución en la naturaleza.

La síntesis de compuestos fenólicos en las plantas varía por factores como la radiación UV, estrés hídrico u ozono, y en este sentido pueden también estos factores potenciar su actividad.

Su estructura química permite, muchas veces, ejercer actividad antioxidante. Esta transcurre por diferentes mecanismos de acción, los que se pueden englobar el secuestro y neutralización de radicales libres y quelación de iones metálicos, las que están íntimamente relacionadas con la actividad antiinflamatoria.

La familia *Myrtaceae* y específicamente el género *Eugenia* presenta una gran cantidad de plantas con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.



*Materiales y
 Métodos*

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad Química-Farmacia de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV), en el período comprendido entre junio de 2016 y mayo de 2017.

2.1. Equipos, materiales, reactivos y/o medicamentos empleados

Equipos, instrumentos de medición.	Reactivos
<ul style="list-style-type: none">• Balanza digital, SARTORIUS-B51245, Alemania.• Balanza analítica, BOECO, Alemania.• Baño ultrasónico, BRANSON 1510, México.• Centrífuga YINGTAL-TG16, China.• Cristalería de laboratorio.• Espectrofotómetro UV-VIS, Termo electrón, GENESYS 10UV, Estados Unidos.• Estufa, DHG-9146 A, China.• Jaulas de polipropileno con tapas de acero inoxidable, Jaula Metabólica (TECNIPLAST® 3700M071)• Jeringuillas (1 mL, 10 mL)• Micropipetas, RONGTAL, China.• Molino de cuchillas de 5 pulgadas, Chisty & Norris, Alemania.• Rotoevaporador, BÜCHI R200, Alemania.• Sonda intragástrica rígida 16G.• Zaranda MLV-THYS2, Alemania.	<ul style="list-style-type: none">• 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol SIGMA-ALDRICH.• 2,2- difenil-picril-hidracilo (DPPH), SIGMA-ALDRICH.• 3-Coumarina, SIGMA-ALDRICH.• Acetona, SIGMA-ALDRICH.• Carbón activado, UNI-CHEM.• Carbonato de sodio, MERCK.• Cloruro férrico, MERCK.• Cloruro ferroso, MERCK.• Etanol absoluto, MERCK.• Eugenol, SIGMA-ALDRICH.• Halotano BP, Piramal Healthcare.• Indometacina, SIGMA-ALDRICH.• Metanol, Lichrosolv, Merck.• Pirocatecol, SIGMA-ALDRICH• Reactivo Folin-Ciocalteau (FCR), SIGMA-ALDRICH.• Rutina, ACROS-ORGANICS.• Tricloruro de aluminio, MERCK.

2.2. Recolección y preparación del material vegetal

La recolección del material vegetal se realizó de manera mensual, en lotes independientes en los primeros 15 días de cada mes, en horas tempranas de la mañana en el Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las

Capítulo II. Materiales y Métodos

Villas. Previo a su recolección se realizó la comprobación botánica de la especie por el Dr. C. Idelfonso Castañeda Noa, especialista en Taxonomía Vegetal. Ejemplares de la planta se compararon con muestras identificadas en el herbario localizado en el Jardín Botánico de la citada institución. El material recolectado fue trasladado en bolsas de nylon hasta el laboratorio de Farmacognosia y Química Farmacéutica del Departamento de Ciencias Farmacéuticas, donde se lavó con agua potable y se procedió a la selección de las hojas como parte de interés del material vegetal recolectado. Las hojas de *E. clarensis* se secaron en estufa durante 3 días a 30°C y se pulverizaron en un molino de cuchillas con tamiz de 3mm a 6000rpm, las muestras secas y molinadas se conservaron en bolsas independientes, en una desecadora protegidos de la luz y la humedad.

2.2.1. Obtención de los extractos etanólicos de las hojas de *E. clarensis*

Se pesaron 5 g de la muestra vegetal seca y molinada correspondiente a cada mes y se transfieren a un balón de 250 mL se añadieron 50 mL de etanol absoluto y se maceraron con agitación continua en zaranda durante 24 horas, realizándose dos extracciones sucesivas bajo las mismas condiciones. Los extractos se combinaron y se eliminó la clorofila por tratamiento con carbón activado al 1%. Posteriormente se filtró el extracto y se llevó a sequedad bajo presión reducida en un rotoevaporador. El procedimiento se realizó por duplicado para cada lote de ensayo.

2.3. Determinación del contenido fenólico total en los extractos obtenidos

2.3.1. Determinación de fenoles totales

El contenido total de compuestos fenólicos en los extractos de *E. clarensis* se determinó según el método de Nurmi (1996), empleando la reacción de Folin-Ciocalteu y utilizando ácido gálico como compuesto de referencia.⁽⁸⁴⁾

Preparación de la curva de calibración de ácido gálico:

Para la curva de calibración se preparó una solución pesándose 2 mg de ácido gálico, estos se disolvieron en agua destilada y se enrasó a un volumen de 10 mL para la obtención de una disolución madre de concentración 0,2 mg/mL.

Procedimiento:

Capítulo II. Materiales y Métodos

Se pipetearon alícuotas de 50, 100, 150, 200 y 250 μL de la disolución madre de ácido gálico, se adicionaron 200 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 2 mL de Na_2CO_3 7% y se completó con agua destilada hasta un volumen de 5 mL. Transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia a 765 nm utilizando como blanco la solución preparada por el mismo procedimiento sin la muestra.

Preparación de los extractos de *E. clarensis*:

Se preparó una solución madre a partir de los extractos secos de *E. clarensis* a una concentración de 1 mg/mL en acetona correspondientes a cada muestra.

Procedimiento:

A partir de esta disolución madre se tomaron alícuotas de 300 μL y se transfirieron a volumétricos de 5 mL. Se adicionaron 200 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 2 mL de Na_2CO_3 al 7% y se enrasó finalmente con agua destilada. Luego de transcurrir 30 minutos se midió la absorbancia a 765 nm. La cantidad de compuestos fenólicos en cada extracto se determinó a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración del ácido gálico y se expresó como miligramos de contenido fenólico equivalentes a ácido gálico por gramo de extracto seco (mgEAG/gES).

2.3.2. Determinación de flavonoides totales

El contenido total de flavonoides en los extractos de *E. clarensis* se determinó empleando el reactivo AlCl_3 , donde se siguió la metodología propuesta en la bibliografía⁽⁸⁵⁾ con algunas modificaciones y utilizando la rutina como el compuesto patrón.

Preparación de la curva de calibración de rutina:

Para la curva de calibración se preparó una solución pesándose 2 mg de rutina, se disolvieron en agua destilada y se enrasó a un volumen de 10 mL, para obtener una disolución madre de concentración 0,2 mg/mL.

Preparación de la solución de AlCl_3 :

Se pesaron 500 mg de AlCl_3 y se disolvieron en 25 mL de una disolución de ácido acético al 5% en metanol para una concentración de 20 mg/mL.

Procedimiento:

Capítulo II. Materiales y Métodos

Se pipetearon alícuotas de 200, 400, 600, 800, 1000 μL de la disolución madre de rutina y se enrasó a 1 mL con metanol. A continuación se adicionó 1 mL de AlCl_3 . Transcurridos 15 minutos se midió la absorbancia a 430 nm utilizando como blanco la solución preparada por el mismo procedimiento sin la muestra.

Preparación de los extractos de *E. clarensis*:

Se preparó una solución madre a partir de los extractos secos de *E. clarensis* a una concentración de 5 mg/mL en acetona correspondientes a cada muestra.

Procedimiento:

En todos los casos se tomaron alícuotas de 500 μL y se completó con metanol para obtener un volumen de muestra de 1 mL. A continuación se adicionó 1 mL de AlCl_3 . Transcurridos 15 minutos se midió la absorbancia a 430 nm. La cantidad de compuestos flavonoides en cada extracto se determinó a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración de rutina y se expresó como miligramos de flavonoides equivalentes a rutina por gramo de extracto seco (mgER/gES).

2.4. Evaluación de la actividad farmacológica de los extractos etanólicos de *E. clarensis*

2.4.1. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos obtenidos por el método de la actividad secuestradora del radical libre DPPH•

La actividad antioxidante de los extractos etanólicos de *E. clarensis* procedentes de cada lote mensual se evaluaron mediante el método de actividad secuestradora del radical libre DPPH•⁽⁸⁶⁾

Preparación de la solución de DPPH:

Se pesaron 0,004g de DPPH y se disolvieron con metanol hasta volumen de 100mL para una concentración de 0,004% (p/v).

Procedimiento:

Se prepararon soluciones en acetona de los extractos correspondientes a cada mes, a una concentración de 0.5 mg/mL. Se tomaron alícuotas de 50, 100, 150, 200 y 250 μL . En todos los casos se completó con metanol para obtener un volumen de muestra de 1 mL. Se adicionaron 3 mL de la solución de DPPH y se

Capítulo II. Materiales y Métodos

colocaron durante 30 minutos en la oscuridad. Luego se midió la absorbancia a 517 nm frente a un blanco, metanol.⁽⁸⁷⁾

Se calculó el porcentaje de inhibición del radical libre DPPH• utilizando la expresión:

$$\% \text{ Efecto secuestrador} = \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100$$

Donde:

A_{DPPH} es la absorbancia del control (contiene todos los reactivos excepto la muestra).

A_{S} : es la absorbancia de la muestra.

Se calculó el valor de IC_{50} (concentración de muestra que se requiere para reducir el 50% del radical DPPH•) para cada muestra utilizando la ecuación de regresión obtenida a partir de concentraciones de extractos y de sustancias de referencia y el porcentaje de inhibición de la formación de radicales libres.

2.4.2. Evaluación *in vivo* de la actividad antiinflamatoria de los extractos obtenidos por el modelo de edema auricular inducido por TPA

Los animales de experimentación se suministraron por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) acompañados del correspondiente certificado de calidad Genética e Higiénico Sanitaria (Anexo 1). Los animales fueron mantenidos durante 7 días en adaptación a las condiciones experimentales con una temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $60 \pm 5\%$ y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas. Recibieron alimentación controlada (Alimento concentrado CMO 1000 en forma de pellet) con su correspondiente Certificado de Calidad (Anexo 2) y agua potable apta para consumo *ab libitum*. Se alojaron en jaulas de polipropileno a razón de 6 animales por jaula.

Material biológico:

Se utilizaron ratones BALB/c hembras con peso de $20 \pm 2\text{g}$ dispuestos en grupos de seis animales cada uno.

Procedimiento y diseño experimental:

Se utilizó el modelo de edema auricular inducido por TPA descrita por De Young et al. (1989)⁽⁸⁸⁾ y modificada por Payá et al. (1993).⁽⁸⁹⁾

Capítulo II. Materiales y Métodos

Se administraron de forma tópica 2,5 µg de TPA por oreja, disueltos en 20 µL de una mezcla de acetona: agua: etanol (4:1:5), a razón de 10 µL por cada lado de la oreja derecha del ratón (tratada). Simultáneamente, se aplicó de forma tópica la sustancia de referencia indometacina (grupo control positivo) o el extracto etanólico de *E. clarensis* correspondiente a cada mes de estudio (grupos problema) disueltos en 20 µL de la misma mezcla y a las dosis de 0,5 mg y 1 mg por oreja, respectivamente.

Transcurridas cuatro horas desde la aplicación del agente irritante, se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se tomaron secciones circulares de aproximadamente 6 mm de diámetro de ambas orejas (tratada y no tratada) con ayuda de un sacabocado. Se pesaron las secciones circulares de las orejas y se determinó la inflamación por la diferencia de peso entre ellas, para cada animal. Los compuestos se consideraron activos cuando existieron diferencias significativas con el control negativo ($p < 0,05$). El porcentaje de inhibición del edema se determinó según la expresión matemática:

$$\% \text{ inflamación} = \frac{W_t - W_o}{W_o} \times 100$$

$$\% \text{ inhibición} = \frac{I_c - I_t}{I_c} \times 100$$

Donde

W_t : peso de la sección de la oreja tratada con el agente irritante.

W_o : peso de la sección no tratada

I_c : porcentaje de inflamación media del grupo control.

I_t : porcentaje de inflamación media de cada grupo tratado.

Se considera como actividad antiinflamatoria moderada la inhibición del edema del 35 al 65% y como buen efecto antiinflamatorio un valor mayor de 65%.⁽⁹⁰⁾

2.5. Evaluación *in vivo* de la actividad antiinflamatoria por el modelo de edema plantar inducido por λ -carragenina

Material biológico:

Capítulo II. Materiales y Métodos

Se emplearon ratas albinas machos de la línea Wistar con peso de 170 ± 10 g. Los animales se privaron de alimentación 18 horas antes de iniciar el experimento y de agua potable 1 hora antes.

Procedimiento y diseño experimental:

El edema plantar se produjo con el agente flobógeno λ -carragenina al 1%. Las ratas se dividieron, aleatoriamente, en 5 grupos de 6 animales cada uno, conformándose los siguientes grupos experimentales:

- I. Control Negativo: Cloruro de Sodio 0,9%: 10 mL/kg.
- II. Control Positivo: Indometacina: 10 mg/kg.
- III. Extracto etanólico de las hojas de *E. clarensis*: 200 mg/kg.
- IV. Extracto etanólico de las hojas de *E. clarensis*: 400 mg/kg.
- V. Extracto etanólico de las hojas de *E. clarensis*: 800 mg/kg.

En todos los casos la administración se realizó por vía oral a través de cánulas intragástricas. Se midió con un pie de rey el grosor de la pata posterior derecha del animal antes de la administración de las sustancias. Luego se inyectó 0,1 mL de una solución acuosa de carragenina al 2% en la aponeurosis de la pata de cada animal. Transcurridas 1, 2, 3, 4 y 5 horas de administrada la carragenina, se midió el grosor de la pata inflamada en cada uno de los grupos y se valoró si existían diferencias entre las mediciones realizadas.⁽⁹¹⁾ Los compuestos se consideraron activos cuando existieron diferencias significativas con el control negativo ($p < 0,05$).

2.6. Eutanasia

La eutanasia en los ratones se realizó por dislocación cervical con previa atmósfera de éter según establece la AVMA, la Unión Europea y el Consejo Canadiense del Cuidado de Animales.⁽⁹²⁻⁹⁴⁾

2.7. Consideraciones éticas

Todos los investigadores respetaron los principios éticos que rigen la experimentación animal, garantizando el bienestar y la protección de los mismos, tanto por la sensibilidad humana ante el sufrimiento animal, como por garantizar la validez de los resultados obtenidos, cumpliéndose con las Normas de Bioética y

Capítulo II. Materiales y Métodos

Bioseguridad establecidas. Los estudios se realizaron cumpliendo las guías de buenas prácticas⁽⁹⁵⁾ para el cuidado y uso de animales de laboratorio.⁽⁹⁶⁾

2.8. Análisis estadístico

Los datos se representan como media aritmética \pm desviación estándar. La comparación entre las medias se realizó a través de un análisis de varianza (ANOVA). Cuando se obtuvieron diferencias intragrupos se aplicó el test de la t de Dunnett y el test de Tukey, implementados en el programa SPSS v.22, utilizando un intervalo de confianza del 95% y un nivel de significación (p) menor de 0,05 y 0.001.



Resultados y Discusión

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Recolección y preparación del material vegetal

El material vegetal se colectó en buen estado vegetativo y libre de materias extrañas, identificándose a través de herramientas taxonómicas, como *Eugenia clarensis* Britton & P.Wilson. La recolección se realizó en la primera semana de cada mes durante doce meses consecutivos. La identificación se realizó mediante observación directa de la planta, comparándolas con descripciones publicadas en la literatura.⁽⁹⁷⁾ Adicionalmente, se comparó con la muestra depositada en el herbario con el número 8015, correspondiendo en su totalidad con las características botánicas para la citada especie.

3.1.1. Obtención de los extractos etanólicos de las hojas de *E. clarensis*

Los extractos procedentes de las hojas de *E. clarensis* se obtuvieron por maceración, con agitación continua, con etanol absoluto durante 24 horas según refiere Puerto Abrahan en 2014.⁽⁴²⁾ Posteriormente los extractos se sometieron a un proceso de tratamiento con carbón activado al 1%. Como resultado, en cada caso, se obtuvo un extracto de color amarillo transparente, que al ser rotoevaporado a sequedad permitió obtener un extracto seco amorfo, siendo característico su olor aromático intenso y relativa higroscopicidad.^(5, 98)

3.2. Determinación del contenido fenólico total en los extractos obtenidos

La determinación del contenido fenólico total en extractos obtenido de plantas medicinales ha sido reportada en múltiples investigaciones, justificada por la relación directa de estos compuestos con una alta variedad de efectos biológicos.⁽⁴⁴⁾ En la presente investigación este contenido se calculó empleando una curva de calibración de ácido gálico (Figura 2).

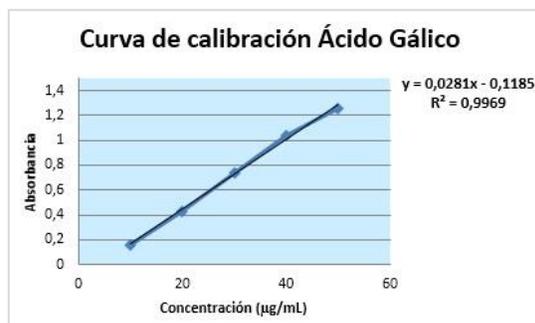


Figura 2. Curva de calibración de ácido gálico.

Capítulo III. Resultados y Discusión

El contenido fenólico obtenido para los extractos etanólicos de *E. clarensis* correspondientes a los meses en estudio, expresado como la cantidad (mg) equivalente a ácido gálico por gramo del extracto y calculado a partir de esta recta con coeficiente de correlación $R^2=0,9969$, se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Contenido fenólico de los extractos de *E. clarensis* en el período evaluado.

Meses	Contenido fenólico total (mgEAG/gES)
junio	41,90 ± 3,2
julio	39,12 ± 4,5
agosto	65,12 ± 2,9
septiembre	82,09 ± 2,6
octubre	68,68 ± 2,7
noviembre	56,29 ± 1,9
diciembre	61,80 ± 2,2
enero	65,27 ± 5,8
febrero	92,88 ± 4,4
marzo	52,58 ± 3,8
abril	58,07 ± 4,9
mayo	90,27 ± 3,5

Se obtuvieron variaciones del contenido fenólico cada mes, sin existir un patrón definido según la época del año. Los máximos valores resultaron en el mes de febrero (92,88 mgEAG/gES) seguido por el mes de mayo (90,27 mgEAG/gES), mientras que los más bajos se obtuvieron para junio y julio con 41,90 y 39,12 mgEAG/gES, respectivamente.

Por otra parte, el contenido total de flavonoides se calculó utilizando la curva de calibración de rutina como patrón de referencia, obteniéndose un coeficiente de correlación $R^2=0.9930$ (Figura 3).

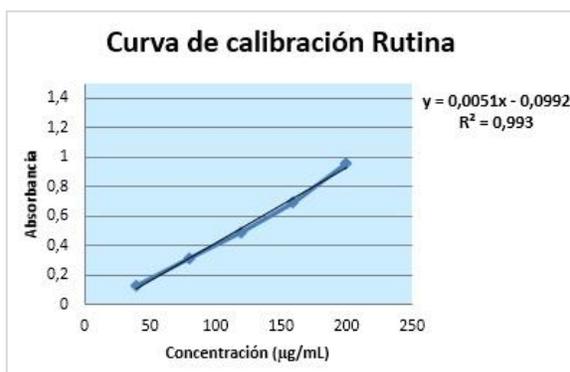


Figura 3. Curva de calibración de la rutina.

Capítulo III. Resultados y Discusión

En la Tabla 2 aparece reportado el contenido de flavonoides totales en los extractos evaluados y expresados como la cantidad (mg) equivalente a rutina por gramo del extracto. En este caso los mayores valores se obtienen para los extractos obtenidos en los meses de febrero y mayo, con valores de 43,43 y 71,11 (mgER/gES) respectivamente. Para el resto de los meses, las concentraciones de flavonoides mostraron variaciones discretas.

Tabla 2. Contenido de flavonoides totales de los extractos de *E. clarensis* en el período evaluado.

Meses	Contenido de flavonoides totales (mgER/gES)
junio	28,86 ± 3,3
julio	27,76 ± 1,9
agosto	29,39 ± 3,1
septiembre	31,31 ± 3,2
octubre	38,53 ± 3,2
noviembre	32,41 ± 1,8
diciembre	29,74 ± 1,5
enero	25,43 ± 4,9
febrero	43,43 ± 1,4
marzo	30,17 ± 4,6
abril	41,37 ± 5,9
mayo	71,11 ± 2,2

En la investigación se obtuvieron contenidos de fenoles superiores al de los flavonoides en todos los extractos evaluados. Esto se encuentra dentro de lo esperado, siendo los flavonoides un subgrupo de los compuestos fenólicos. En el estudio se obtuvo una estabilidad en todos los meses con pequeñas fluctuaciones hacia el incremento en los meses de febrero y mayo. La mayor cantidad de fenoles totales puede estar dado a la presencia de otros metabolitos secundarios como taninos y coumarinas que influyen directamente en la determinación total de compuestos con grupos hidroxilo. Resultados similares han sido publicados en la literatura para especies vegetales como *Pistacia atlantica* donde se evaluó el contenido fenólico de la planta en un estudio estacional, de género y de región.⁽⁹⁹⁾

Existen otras publicaciones donde se muestra que la época del año influye de manera importante en la producción de metabolitos secundarios. Zarate Bello (2012) realizó la cuantificación de compuestos fenólicos totales de látex y corteza

Capítulo III. Resultados y Discusión

de *Croton draco* var. *draco* Schltidl & Cham en diferentes períodos del año resultando otoño la estación en la que se obtuvo la mayor cantidad de estos compuestos. En dicha investigación se muestran diferencias significativas entre otoño e invierno y primavera; en estas dos últimas estaciones no se presentaron diferencias entre sí.⁽¹⁰⁰⁾

Por su parte, Valares (2011), determinó la variación cuantitativa estacional en flavonoides y diterpenos, en hojas jóvenes, maduras y tallos de *Cistus ladanifer*, los resultados evidenciaron una diferencia significativa entre la estacionalidad estudiada siendo en verano cuando se obtuvo la mayor cantidad de estos compuestos y en invierno la menor. En primavera y otoño se cuantificaron cantidades intermedias.⁽¹⁰¹⁾

Según estos autores no existe una relación directa en general para todas las especies entre la época del año y el contenido fenólico. Es por esta razón que se hace indispensable el estudio de las características de cada especie vegetal por separado con la finalidad de obtener fitofármacos de buena calidad, dado que la actividad farmacológica puede variar significativamente según la composición química y esta a su vez puede estar dada por las diferentes épocas de recolección.

3.3. Evaluación de la actividad farmacológica de los extractos etanólicos de *E. clarensis*

Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas y poseen diversas actividades biológicas, como la antioxidante y la antiinflamatoria. Ambas actividades se relacionan partiendo del hecho que los radicales libres que se forman durante el proceso de estrés oxidativo pueden dañar proteínas, lípidos y otras biomoléculas causando eventualmente inflamación sistemática crónica.^(45, 49) Es por esto que se llevó a cabo la determinación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los extractos obtenidos por la droga recolectada en los diferentes meses de estudio.

3.3.1. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos por el método de la actividad secuestradora del radical libre DPPH•

Los radicales libre son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos

Capítulo III. Resultados y Discusión

enzimáticos y de atrapamiento. Cuando el organismo es incapaz por sí solo de corregir la elevación de los niveles de estos radicales se necesitan los antioxidantes, los que engloban un grupo de sustancias que presentan estructuras químicas y mecanismos de acción muy variados.⁽¹⁰²⁾

En la actualidad, las propiedades antioxidantes de extractos, aceites esenciales y compuestos puros pueden ser evaluados utilizando varios ensayos *in vitro*, destacándose los que miden la habilidad secuestradora a los radicales libres.⁽¹⁰²⁾

Este es un método espectrofotométrico rápido y sencillo. El DPPH se comercializa ya en la forma de radical y sencillamente requiere su disolución en metanol o etanol para el desarrollo del método. Es un radical estable en disolución con el color violeta característico a causa del electrón libre en todas partes de la molécula que da una absorbancia fuerte máximo a 517 nm. Cuando se mezcla la solución de DPPH con una sustancia donadora de átomo de hidrógeno, el DPPH-H reducido formado tiene un color amarillo.⁽¹⁰²⁾

El grado de decoloración indica la capacidad secuestradora de DPPH. A mayor decoloración de la solución de DPPH, mayor será la actividad antioxidante y eso se refleja en el valor menor de IC_{50} , que es la concentración necesaria causante del 50% de la inhibición de la absorbancia.⁽¹⁰²⁾

En este ensayo se obtuvieron las curvas de calibración correspondientes a cada uno de los extractos evaluados en el estudio y compuestos de origen natural con actividad antioxidante conocida (rutina, pirocatecol, 3-coumarina y eugenol). Las ecuaciones de las rectas obtenidas para los extractos mostraron coeficientes de correlación $R^2 > 0,92$ para todos los casos. En las figuras 4, 5 y 6 aparecen reflejados estos datos. Cada curva muestra que la actividad secuestradora se incrementa con el aumento de la concentración de la muestra debido a la reacción de donación de electrones entre las moléculas de antioxidante y los radicales libres.⁽¹⁰³⁾

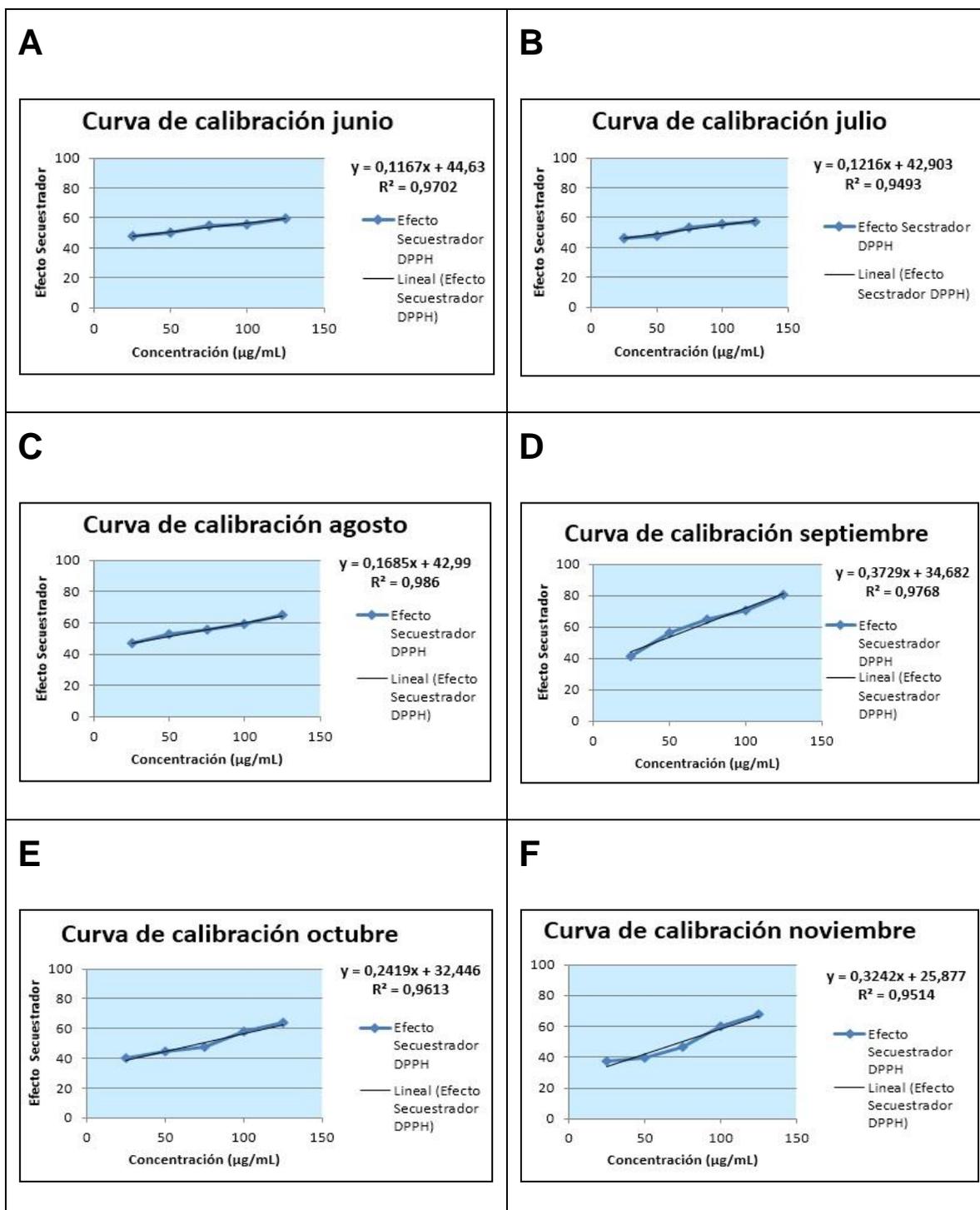


Figura 4. Curvas de calibración obtenidas para los extractos estudiados en el ensayo de la actividad secuestradora del radical libre DPPH• (A: Extracto junio, B: Extracto julio, C: Extracto agosto, D: Extracto septiembre, E: Extracto octubre, F: Extracto noviembre).

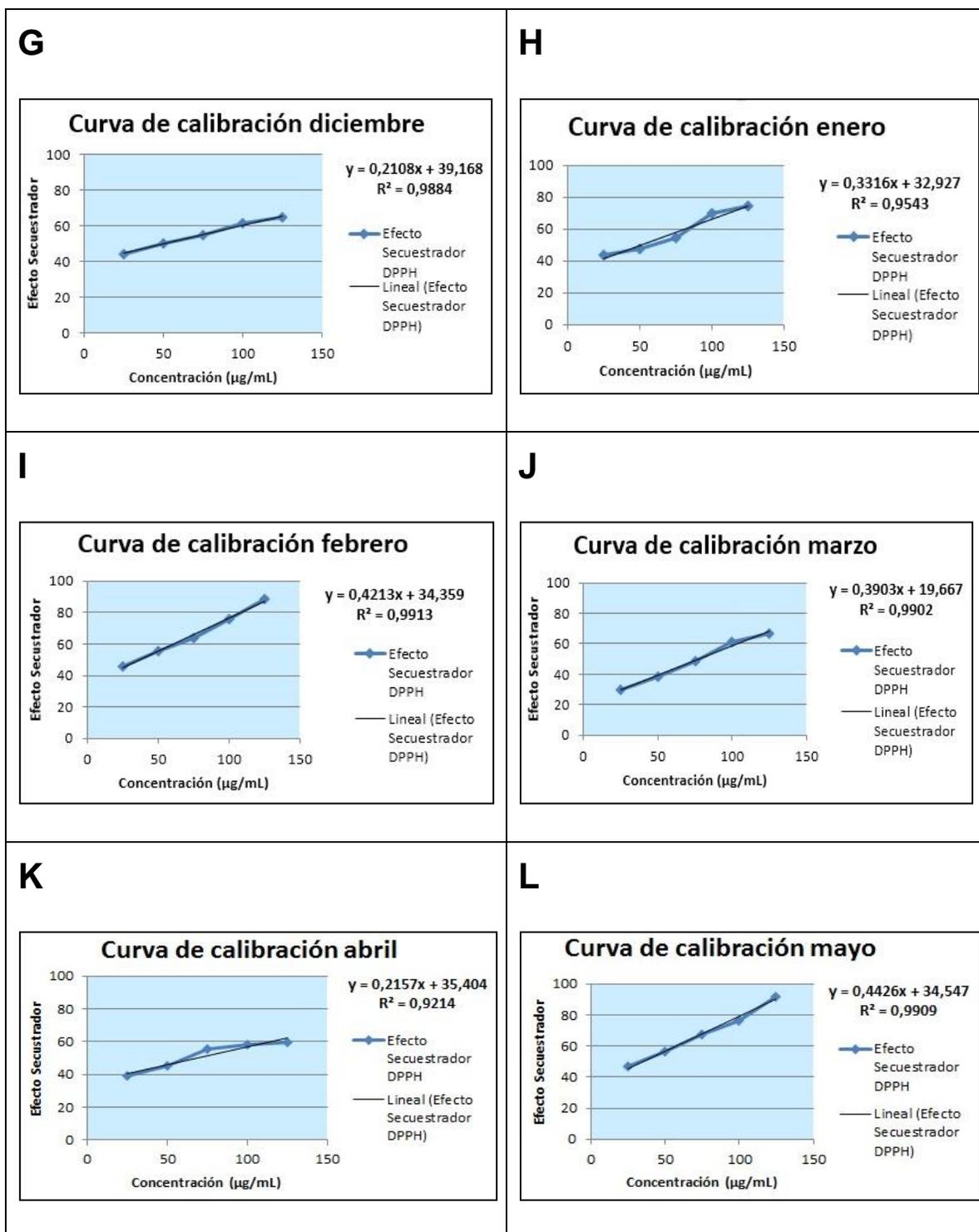


Figura 5. Curvas de calibración obtenidas para los extractos estudiados en el ensayo de la actividad secuestradora del radical libre DPPH[•] (A: Extracto diciembre, B: Extracto enero, C: Extracto febrero, D: Extracto marzo, E: Extracto abril, F: Extracto mayo).

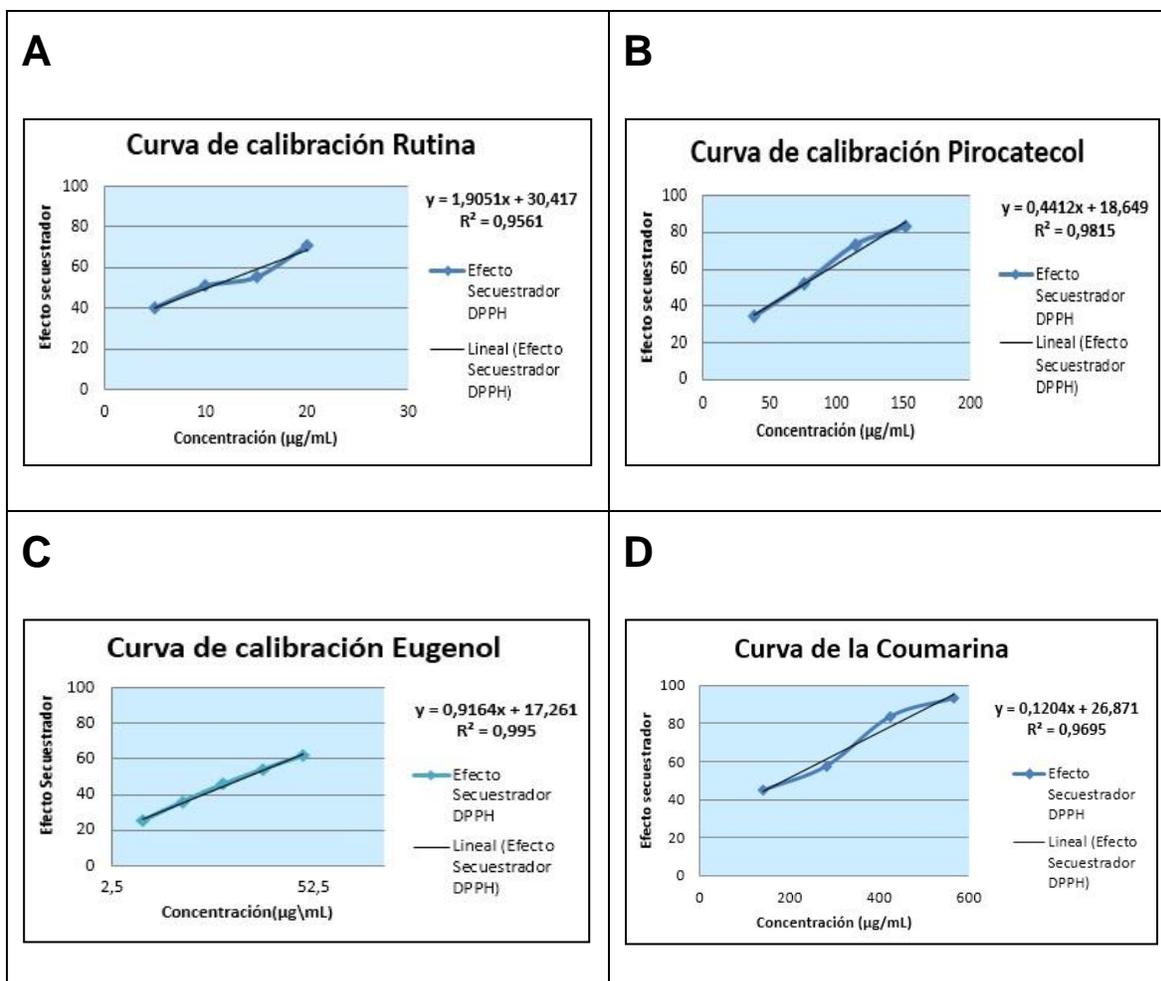


Figura 6. Curvas de calibración obtenidas para los patrones utilizados en el ensayo de la actividad secuestradora del radical libre DPPH• (A: Rutina, B: Pirocatecol, C: Eugenol, D: 3-Coumarina).

A partir de las curvas de calibración se calculó la concentración necesaria para obtener el 50% de efecto secuestrador del radical DPPH• (IC_{50}). Los resultados de IC_{50} obtenidos para cada extracto aparecen reportados en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de IC_{50} de la actividad secuestradora del radical DPPH• de los patrones antioxidantes y los extractos evaluados.

Muestra	Concentraciones $\mu\text{g/mL}$	Efecto secuestrador DPPH	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Rutina	5	40,26	10,29
	10	50,90	
	15	55,19	
	20	70,58	

Capítulo III. Resultados y Discusión

Eugenol	10	25,33	36,11
	20	36,10	
	30	45,97	
	40	54,33	
	50	62,03	
Pirocatecol	38	34,07	71,27
	76	52,12	
	114	73,08	
	152	82,96	
3-Coumarina	142	44,65	192,75
	284	57,42	
	426	83,35	
	568	92,27	
junio	25	47,47	49,09
	50	50,00	
	75	54,67	
	100	55,45	
	125	59,34	
julio	25	46,01	59,17
	50	47,71	
	75	53,48	
	100	55,69	
	125	57,22	
agosto	25	44,78	44,38
	50	52,41	
	75	55,47	
	100	58,84	
	125	64,63	
septiembre	25	41,33	41,62
	50	55,97	
	75	64,62	
	100	70,61	
	125	80,62	
octubre	25	40,04	73,33
	50	44,27	
	75	47,37	
	100	57,69	
	125	63,57	
noviembre	25	37,26	75,63
	50	39,62	
	75	46,60	
	100	59,72	
	125	67,74	

Capítulo III. Resultados y Discusión

diciembre	25	43,94	51,90
	50	50,07	
	75	54,74	
	100	61,61	
	125	64,53	
enero	25	43,54	57,00
	50	47,55	
	75	54,38	
	100	69,54	
	125	74,00	
febrero	25	45,98	37,38
	50	55,76	
	75	63,59	
	100	75,87	
	125	88,59	
marzo	25	29,54	77,95
	50	38,62	
	75	48,28	
	100	61,26	
	125	67,01	
abril	25	39,52	69,52
	50	45,05	
	75	55,29	
	100	58,25	
	125	59,84	
mayo	25	46,57	35,27
	50	56,37	
	75	67,52	
	100	76,35	
	125	91,91	

Los resultados de IC₅₀ oscilan entre 35 y 77 µg/mL donde los meses de mayo y febrero constituyen los de menor valor con 35,23 y 37,38 µg/mL, respectivamente. De esta forma estos extractos representan los de mayor capacidad antioxidante. Sin embargo, los meses de octubre (73,33 µg/mL), noviembre (75,63 µg/mL) y marzo (77,95 µg/mL) reflejan la menor capacidad antioxidante.

En sentido general, los extractos exhiben valores mayores que los que se obtienen para los patrones rutina y eugenol con 10,29 y 29,00 µg/mL, respectivamente; sin embargo resultan menores que el obtenido para la 3-coumarina con 192,75 µg/mL. Es de destacar que algunos extractos de *E. clarensis* muestran concentraciones cercanas al patrón pirocatecol (71,27 µg/mL), mientras que para otros, estas son menores reflejando un mayor efecto antioxidante. A partir de estos resultados se

Capítulo III. Resultados y Discusión

puede plantear que los extractos, a las concentraciones evaluadas, presentan una capacidad antiradicálica similar a la de los patrones evaluados. La actividad antiradicálica de las muestras estudiadas se resume en el siguiente orden:

Rutina > Eugenol > Ext. mayo > Ext. febrero > Ext. septiembre > Ext. agosto > Ext. junio > Ext. diciembre > Ext. enero > Ext. julio > Ext. abril > Ext. octubre > Ext. noviembre > Ext. marzo > Pirocatecol > 3-Coumarina

3.3.2. Evaluación *in vivo* de la actividad antiinflamatoria de los extractos por el modelo de edema auricular inducido por TPA

Considerando los resultados para la actividad antiradicálica de los extractos, estos se evaluaron en el modelo de edema auricular inducido por TPA. Este método se basa en la aplicación del TPA, uno de los componentes responsables de la acción irritante del aceite de crotón, en el pabellón auditivo del ratón. La respuesta inflamatoria consiste en eritema, edema e infiltración por leucocitos polimorfonucleares, así mismo se liberan mediadores de tipo eicosanoides y se induce la desgranulación de mastocitos.⁽¹⁰⁴⁾ En consecuencia, las sustancias inhibitoras de la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos son evaluables por esta técnica.⁽¹⁰⁵⁾

Tabla 4. Actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *Eugenia clarensis* por el modelo de edema auricular inducido por TPA.

No	Sustancia	ΔPe (mg)	Inhibición (%)
-	Control	15,7 \pm 2	-
-	Indometacina	1,3 \pm 1*	91
1	Junio	0,7 \pm 0,4*	95
2	Julio	1,1 \pm 0,7*	93
3	Agosto	1,0 \pm 0,6*	93
4	Septiembre	1,2 \pm 0,3*	92
5	Octubre	1,5 \pm 0,3*	90
6	Noviembre	1,7 \pm 1,0*	88
7	diciembre	1,6 \pm 0,8*	90
8	Enero	1,4 \pm 0,4*	90
9	Febrero	0,4 \pm 0,3*	97
10	Marzo	0,6 \pm 0,4*	96
11	Abril	1,1 \pm 0,5*	94
12	Mayo	1,0 \pm 0,7*	94

ΔPe = incremento de peso en mg. * Los valores representan la media \pm DE (n=6).

* Diferencias significativas comparado con el grupo control; $p < 0,001$ (t de Dunnett).

Capítulo III. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos para los compuestos evaluados se muestran en la Tabla 4. En este ensayo se valora el incremento de peso de las orejas, tratada y no tratada, del animal de experimentación al cabo de 4 horas, donde se considera que el edema es máximo después de la aplicación del agente irritante⁽¹⁰⁶⁾. Una de las ventajas de este método reside en la pequeña cantidad de muestra que requiere, debido a la acción local del agente flobógeno que, por otro lado, está libre de posibles restricciones de índole farmacocinética⁽⁷³⁾.

Según el estudio, los extractos de los diferentes meses (dosis de 1mg por oreja) evitan la formación del edema auricular inducido por TPA, en comparación con el edema mostrado en los animales del grupo control negativo que sólo recibieron el vehículo y el agente flobógeno.

Los extractos mostraron valores de inhibición por encima del 90%, solo el del mes de noviembre mostró valores inferiores con 88% de inhibición, por lo que se puede decir que todos los extractos poseen un buen efecto antiinflamatorio. En todos los casos, se observaron diferencias significativas con el control negativo ($p < 0.001$), sin embargo no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de incremento de peso de los extractos. El mes de febrero exhibió el mayor porcentaje de inhibición (97%). Los resultados son similares estadísticamente a los obtenidos para el control positivo, indometacina, potente fármaco antiinflamatorio inhibidor de la síntesis de prostaglandinas ($p > 0.05$).

3.3.3. Correlación de la actividad farmacológica de los extractos etanólicos de *E. clarensis* con el contenido fenólico

Las determinaciones de los contenidos de fenoles y flavonoides totales, así como la capacidad secuestradora del radical libre DPPH• a la concentración de 125 µg/mL, permitió establecer relaciones entre las actividades fitoquímica y farmacológica para los extractos etanólicos de *E. clarensis* de cada uno de los meses. En la figura 7 se muestra de forma gráfica los resultados obtenidos para los metabolitos evaluados contra la actividad antioxidante.

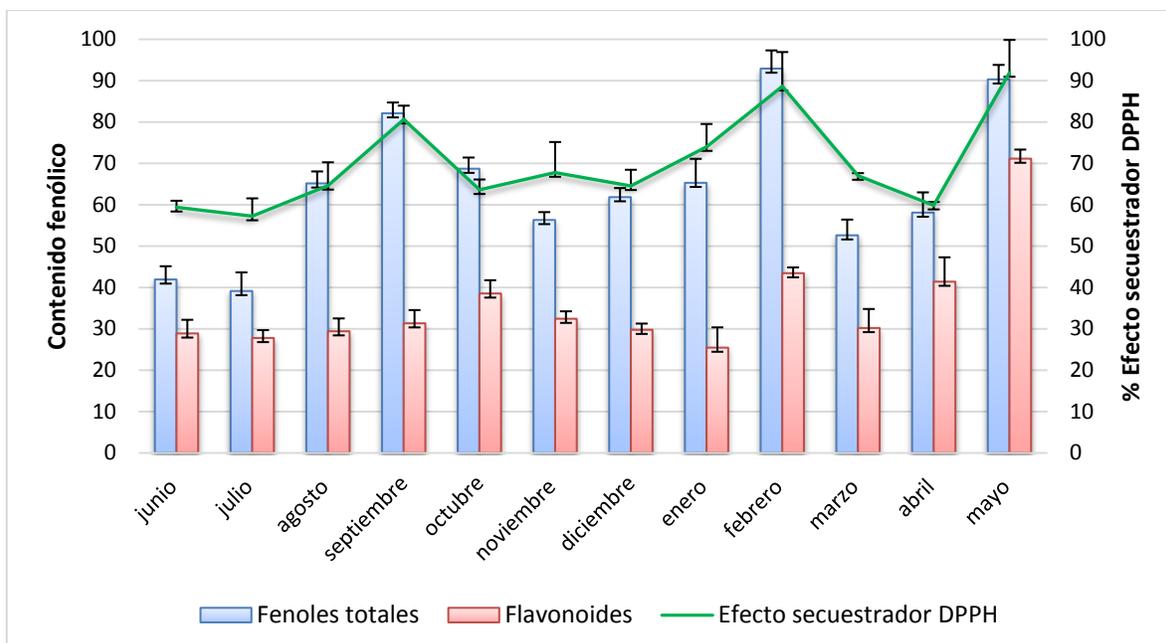


Figura 7. Relación entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico.

De esta forma se observa una tendencia similar para el contenido de fenoles y el efecto secuestrador, de modo que el aumento del primero causa un incremento del segundo.

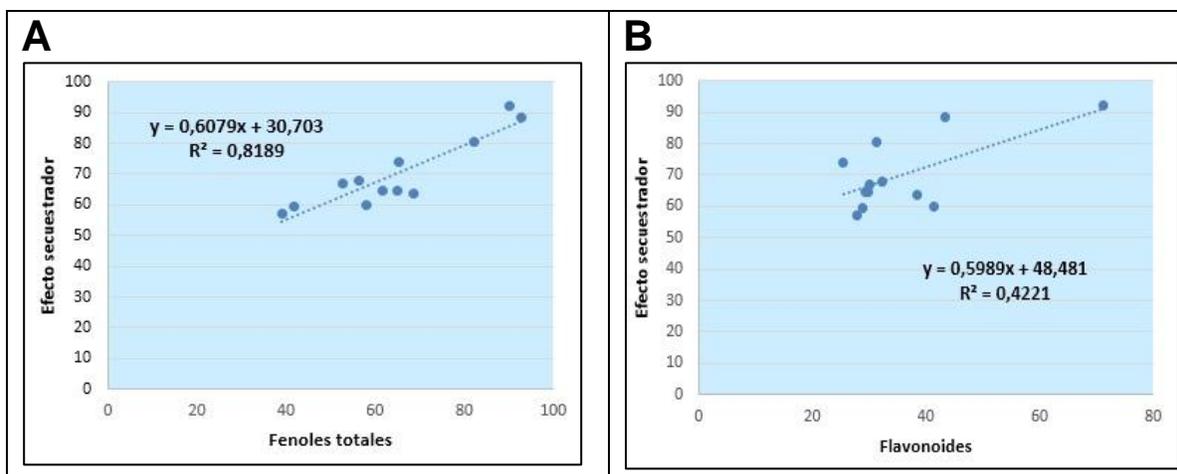


Figura 8. Correlación entre el contenido de fenólico de los extractos de *E. clarensis* y su actividad antioxidante (A: Fenoles totales, B: Flavonoides).

En la figura 8-A se puede observar la correlación lineal directa que existe entre estos a partir de la ecuación de la recta con pendiente positiva y el coeficiente de $R^2=0,82$, sin embargo en la figura 8-B no se observa una adecuada correlación lineal entre el contenido de flavonoides y el efecto secuestrador, con un coeficiente de correlación de $R^2=0,42$.

Capítulo III. Resultados y Discusión

Cabe señalar que los flavonoides son solo un subgrupo de los compuestos fenólicos y que la actividad antioxidante no está simplemente relacionada con ellos. Los siguientes hechos deben ser tomados en cuenta: la existencia de agliconas libres y su incorporación a la determinación, además el hecho de que pueden ocurrir interacciones entre los componentes del extracto. En este sentido el sinergismo de los flavonoides con tocoferoles, palmitato ascorbil y ácido cítrico ya ha sido reportado.⁽¹⁰⁷⁾

De igual forma se determinó la correlación lineal entre la ganancia de peso de las porciones de orejas, como medida de la actividad antiinflamatoria tópica de los extractos, y el contenido de fenoles y flavonoides totales

En la figura 9 se muestra de forma gráfica los resultados obtenidos para la ganancia de peso auricular y el contenido fenólico en cada mes de estudio.

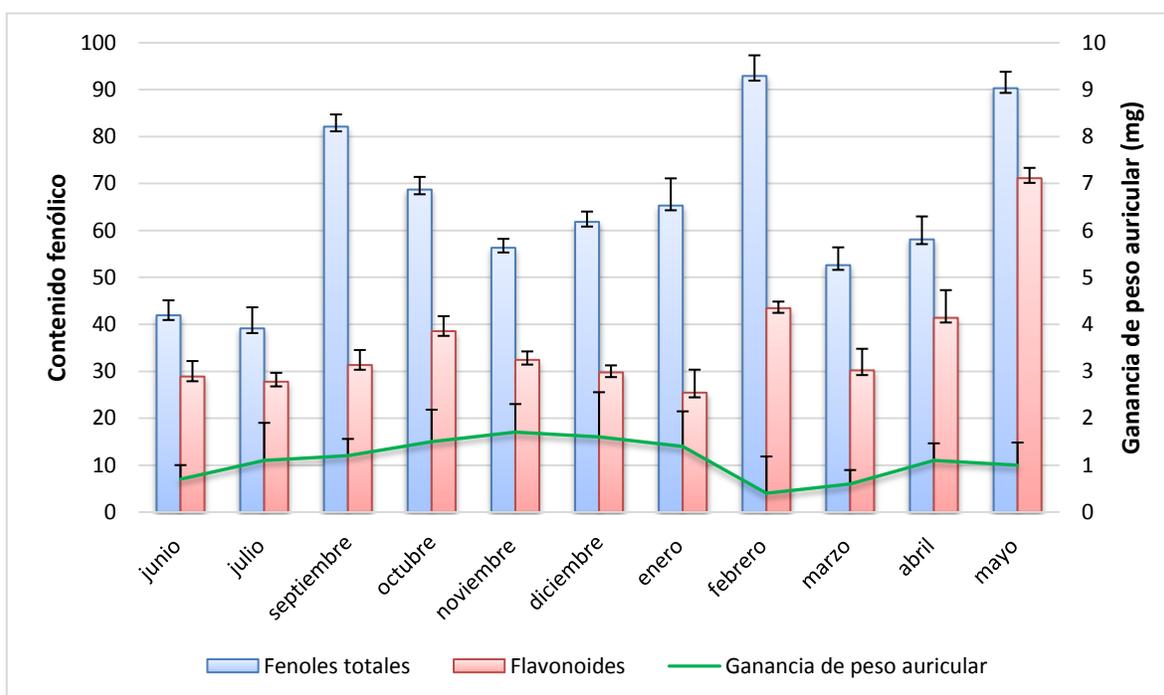


Figura 9. Relación entre la ganancia de peso auricular y el contenido fenólico.

Las variaciones obtenidas en el peso auricular de los animales tratados muestran pequeñas oscilaciones entre los meses, mientras que el contenido de fenoles y flavonoides totales varía considerablemente. Un incremento del contenido de los metabolitos, debería corresponderse con una menor ganancia de peso de las porciones auriculares de los grupos de animales tratados con los extractos y esto

Capítulo III. Resultados y Discusión

a su vez con una mayor actividad antiinflamatoria. Esto solo es apreciable en el mes de febrero.

En la figura 10-A y 10-B se muestran las correlaciones lineal entre la ganancia de peso y los contenidos de fenoles y flavonoides totales, respectivamente.

Aún cuando las pendientes de las rectas obtenidas indican un comportamiento inversamente proporcional, los coeficientes de correlación son pequeños con $R^2=0.02$ y $R^2=0.03$, respectivamente.

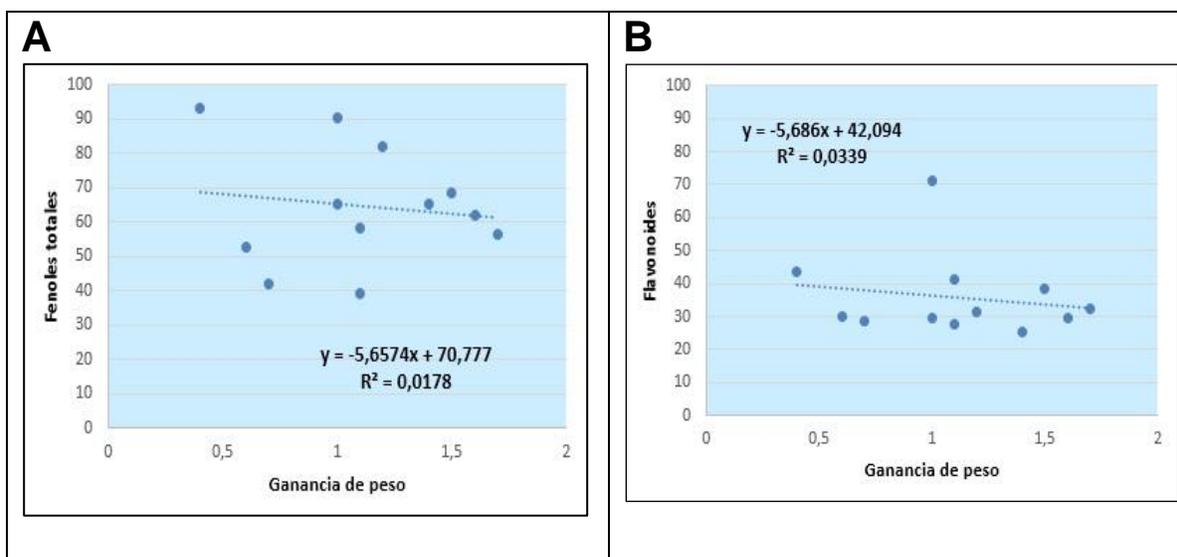


Figura 10. Correlación entre la ganancia de peso auricular y el contenido fenólico.

De este resultado se puede inferir que el efecto antiinflamatorio no está dado por la cantidad de fenoles y flavonoides totales. Podría deberse a la concentración estable, en los meses del año, de algunos compuestos pertenecientes a estos grupos y que influyen directamente sobre la actividad. Sin embargo esto es poco probable si se tiene en cuenta lo reportado por varios autores, que plantean la variación de flavonoides en función de la estación del año, la temperatura, la iluminación del día, etc.⁽⁹⁹⁾ Otra explicación podría ser la de la variación compensadora entre las concentraciones de algunos flavonoides, taninos u otros metabolitos presentes en las hojas de la planta y que son extraídos con el disolvente e influyen en conjunto para el mantenimiento de las funciones de la planta y que poseen actividad antiinflamatoria.

Capítulo III. Resultados y Discusión

3.4. Evaluación *in vivo* de la actividad antiinflamatoria por el modelo de edema plantar inducido por λ -carragenina

Considerando los resultados obtenidos para la actividad farmacológica, se procedió a evaluar la actividad antiinflamatoria de la especie utilizando el modelo de edema plantar inducido por λ -carragenina. Mediante esta técnica, se valora la capacidad de las sustancias de inhibir el edema producido en la pata trasera de la rata, tras la administración subcutánea en el nivel de la aponeurosis plantar de una solución de este mucopolisacárido sulfatado, extraído del alga marina *Chondrus crispus*. De esta forma, se provoca una reacción de carácter inflamatorio agudo no específica y de tipo bifásica, que resulta de la acción secuencial de varios mediadores: histamina, serotonina, bradiquinina y prostaglandinas. La fase inicial es atribuida a la liberación de histamina y serotonina mientras que en la segunda fase predominan las prostaglandinas: E₁, E₂ y F₂.^(108, 109) El edema mantenido entre la primera y segunda fase es debido a la bradicinina y diversos factores del complemento implicados en la inflamación que actúan como amplificadores de la respuesta.⁽¹¹⁰⁾ Otro importante mediador en este proceso es el óxido nítrico producido por las enzimas óxido nítrico sintetasas constitutivas e inducibles, en la primera y segunda fase de la inflamación, respectivamente.^(111, 112) Estos mediadores químicos producen un incremento de la permeabilidad vascular, promoviendo la acumulación de fluidos en los tejidos y como consecuencia el desarrollo del edema,⁽¹¹³⁾ el cual es empleado como variable para la evaluación de la actividad antiinflamatoria en este modelo experimental.⁽⁷⁷⁾

El efecto antiinflamatorio de una sustancia a través de esta técnica puede ser determinado por varias vías. Usualmente, el volumen de la pata inyectada es medido antes de la aplicación del irritante y posteriormente. El incremento en el volumen del miembro del grupo tratado es comparado en el tiempo con el del grupo control que sólo recibe el vehículo. Muchos métodos han sido descritos, desde simples y menos exactos hasta otros electrónicamente sofisticados.⁽⁷⁴⁾ En este trabajo se utilizó un pie de rey para el seguimiento del edema en el tiempo, donde se hicieron mediciones cada hora hasta un tiempo total de cinco horas después de la administración de la λ -carragenina.

Capítulo III. Resultados y Discusión

Para la evaluación del extracto se utilizaron las dosis de 200, 400 y 800 mg/Kg. Los valores de edema y los porcentajes de inhibición respecto al grupo control negativo (cloruro de sodio 0,9%), se muestran en Tabla 5.

Tabla 5. Actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *Eugenia clarensis* por el modelo de edema plantar inducido por λ -carragenina.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Edema (grosor en mm) ^a				
		1(h)	2(h)	3(h)	4(h)	5(h)
Control	-	1,90 ± 0,61	2,37 ± 0,34	2,62 ± 0,54	2,44 ± 0,55	1,81 ± 0,51
Indometacina	10	0,90 ± 0,20*	1,01 ± 0,12)*	1,01 ± 0,46*	0,80 ± 0,37*	0,54 ± 0,30*
		(52,87)	(57,51)	(61,29)	(67,19)	(69,97)
Extracto <i>E. clarensis</i>	200	1,86 ± 0,12 [‡]	1,97 ± 0,13 [‡]	2,40 ± 0,37 [‡]	2,02 ± 0,52 [‡]	1,42 ± 0,36 [‡]
		(2,34)	(16,86)	(8,38)	(17,41)	(21,78)
	400	1,48 ± 0,57	1,89 ± 0,82 ^{*‡}	2,47 ± 0,16 [‡]	2,27 ± 0,32 [‡]	1,38 ± 0,20 [‡]
		(21,93)	(20,28)	(5,66)	(6,89)	(24,02)
	800	1,29 ± 0,30	1,56 ± 0,28 ^{*‡}	1,71 ± 0,14*	1,40 ± 0,29*	1,09 ± 0,45*
		(32,16)	(34,09)	(34,76)	(42,66)	(39,74)

^a Los valores representan la media ± DE (n=6). * Diferencias significativas comparado con el grupo control $p < 0,05$; [‡] Diferencias significativas comparado con el grupo indometacina $p < 0,05$ (Anova de un factor, Tukey). Los valores en paréntesis representan porcentajes de inhibición del edema a cada tiempo.

Los resultados para la indometacina (10mg/kg) son adecuados, donde los porcentajes de inhibición de la inflamación para este control positivo, a partir de las tres horas de aplicado el agente flobógeno resultó por encima del 60%, lo que se encuentran en correspondencia con los referidos en la literatura en estudios similares.⁽¹¹⁴⁾ Las tres dosis del extracto evaluadas mostraron efecto antiinflamatorio respecto al grupo control negativo a partir de la segunda hora de estudio, sin embargo, solo la dosis de 800mg/kg de peso mostró diferencias significativas con el control negativo ($p < 0.05$) a los diferentes tiempos del estudio. Los valores de edema para los animales del grupo que recibieron esta dosis, aunque un poco mayores que los obtenidos para el grupo de la indometacina, resultan comparables estadísticamente a estos con $p < 0,05$.



Conclusiones

CONCLUSIONES

- ✓ El contenido de fenoles y flavonoides totales, varía en la especie en dependencia de la época de recolección, obteniéndose las mayores concentraciones en los meses de febrero y mayo, respectivamente.
- ✓ Los extractos obtenidos de las hojas de *E. clarensis*, en cada uno de los meses evaluados, mostraron actividad antioxidante *in vitro* por el método de actividad secuestradora del radical libre DPPH•, así como efecto antiinflamatorio tópico *in vivo* a dosis 1mg/oreja en modelo de edema auricular inducido por TPA.
- ✓ La actividad secuestradora del radical libre DPPH• mostró una alta correlación lineal con el contenido de fenoles totales, no siendo así con los flavonoides.
- ✓ La actividad antiinflamatoria tópica no manifestó una correlación lineal con el contenido de fenoles y flavonoides totales de los extractos etanólicos.
- ✓ El extracto etanólico de *E. clarensis* mostró acción antiinflamatoria oral a la dosis de 800mg/kg, comparable con el control indometacina.



Recomendaciones

RECOMENDACIONES

1. Extender el estudio a otros grupos de metabolitos presentes en la planta que puedan constituir marcadores de las actividades farmacológicas demostradas para la especie.



Referencias

Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alonso J. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Argentina: CORPUS; 2004.
2. Fuentes Valdés M. Obtención de la huella dactilar cromatográfica de *Eugenia clarensis*. Correlación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria con su composición química. [Tesis de Diploma]. Santa Clara, Cuba: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2016.
3. Tistaert C, Dejaegher B, Vander Heyden Y. Chromatographic Separation Techniques and Data Handling Methods for Herbal Fingerprints: a Review. *Analytica Chimica Acta*. 2011;690:148-61.
4. Osorio JD. Aspectos básicos de farmacognosia: Universidad de Antioquía; 2009.
5. Nguyen Thi Minh N. Evaluación fitoquímica y farmacológica del extracto etanólico de *Eugenia clarensis* (Britton & P.Wilson) [Tesis de Maestría]. Santa Clara, Cuba: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2015
6. Benfatti CS, Cordova SMD, Guedes A, Magina MDA, Cordova CMMd. Atividade antibacteriana in vitro de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp frente a cepas de mollicutes. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2010;1(2):33-9.
7. Mahakittikun V, Soonthornchareonnon N, Foongladda S, Boitano JJ, Wangapai T, Ninsanit P. A preliminary study of the acaricidal activity of clove oil, *Eugenia caryophyllus*. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 2013;32(1):46 DOI 10.12932/AP0342. 32.1. 2014.
8. Torres-Cubiña MG. Determinación de la Actividad Antioxidante de los Extractos Clorofórmico, Etanólico y Acuoso del Arrayán, Calaguala, Canayuyo y Tipo. 2012.
9. Valle MEd. Aislamiento y determinación de estructura química de principios activos presentes en *Eugenia uniflora*, centrado en los compuestos solubles en metanol: Facultad de Ciencias Exactas; 2008.
10. Córdova-Acosta E, Vite F, Valverde P. Efecto de la orientación y caracteres de las flores en el éxito reproductivo de *Pachycereus weberi* en la región de Tehuacán-Cuicatlán. *Bol Soc Latin Carib Cact Suc*. 2012;9(1):7-8.
11. Armas González Y. Evaluación fitoquímica y farmacológica del extracto hidroalcohólico de *Mosiera bullata* (Britton & P. Wilson) Bisse. [Tesis de Maestría]. Santa Clara, Cuba: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2014.
12. García Salmerón L. Estudio preliminar de la cinética de acumulación de fenoles y flavonoides totales en la especie *Capraria biflora* L. [Tesis de Diploma]. Santa Clara, Cuba: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2011.
13. Malaret A. *Lexicón de Fauna y Flora*. Comisión Permanente de la Asociación de Academias de la Lengua Española. 1970:569.
14. Auricchio MT, Adriana-Bugno A, Barros SB, Bacchi EM. Atividade antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2007;26(1):76.
15. Bagetti M, Facco EMP, Piccolo J, Hirsch GE, Rodriguez-Amaya D, Kobori CN, et al. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). *Food Science and Technology (Campinas)*. 2011;31(1):147-54.
16. Fortes GA, Carvalho AG, Ramalho RR, da Silva AJ, Ferri PH, Santos SC. Antioxidant Activities of Hydrolysable Tannins and Flavonoid Glycosides Isolated from *Eugenia uniflora* L. *Records of Natural Products*. 2015;9(2):251-6.
17. Francine Novack V, Lenardão EJ, Savegnago L, Perin G, Jacob RG, Alves D, et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L. antioxidant and antimicrobial properties. *Food and chemical toxicology*. 2012;50(8):2668-74.
18. Magina MA, Gilioli A, Moresco HH, Colla G, Pizzolatti MG, Brighente IM. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). *Lat Am J Pharm*. 2010;29(3):376-82.

Referencias Bibliográficas

19. Neuza Jorge Débora Maria Moreno Bruna Jorge Bertanha. *Eugenia dysenterica* DC: actividad antioxidante, perfil de ácidos grasos y determinación de tocoferoles. *Revista chilena de nutrición*. 2010;37(2):208-14.
20. Galeano P, Cuellar N, Paladines M, Ortiz F, Silva Y, Velasquez H. Contenido de compuestos Fenólicos y actividad antioxidante del arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) en diferentes estados de maduración. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 2015;2(2).
21. Figueirôa EdO, Nascimento da Silva LC, de Melo CML, Neves JKdAL, da Silva NH, Pereira VRA, et al. Evaluation of antioxidant, immunomodulatory, and cytotoxic action of fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.: correlation with polyphenol and flavanoid content. *The Scientific World Journal*. 2013;2013.
22. Pietrovski EF, Magina MDA, Gomig F, Pietrovski CF, Micke GA, Barcellos M, et al. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam.(Myrtaceae) leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2008;60(4):479-87.
23. Avila-Peña D, Peña N, Quintero L, Suárez-Roca H. Antinociceptive activity of *Syzygium jambos* leaves extract on rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2007;112(2):380-5.
24. El-Shenawy S. Evaluation of Some Pharmacological Activities of ethanol extracts of seeds, pericarp and leaves of *Eugenia Jamolana* in Rats. *Inflammopharmacology*. 2009;17(2):85-92.
25. Hegde SV, Yarappa RL, Rai PS. Anti-inflammatory and analgesic activities of stem bark extracts of *Eugenia jambolana*. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. 2011;2(3):202.
26. Basting RT, Nishijima CM, Lopes JA, Santos RC, Périco LL, Laufer S, et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC. in rodents. *Journal of ethnopharmacology*. 2014;157:257-67.
27. Leite PEC, Lima-Araújo KG, França GR, Lagrota-Candido J, Santos WC, Quirico-Santos T. Implant of Polymer Containing Pentacyclic Triterpenes from *Eugenia puniceifolia* Inhibits Inflammation and Activates Skeletal Muscle Remodeling. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2014;62(6):483-91.
28. Kala S, Tresina P, Mohan V. Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of *Eugenia floccosa* Bedd leaf. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 2014;28(2):52-4.
29. Rocha L, Silva-Filho MV, Santos MG, Botas GdS, Cruz RA, Fernandes CP, et al. Chemical composition of essential oils and anticholinesterasic activity of *Eugenia sulcata* Spring ex Mart. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2012;31.
30. Halder S, Mehta AK, Mediratta PK, Sharma KK. Acute effect of essential oil of *Eugenia caryophyllata* on cognition and pain in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2012;385(6):587-93.
31. Mehta AK, Halder S, Khanna N, Tandon OP, Sharma KK. The effect of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in animal models of depression and locomotor activity. *Nutritional neuroscience*. 2013;16(5):233-8.
32. Kukongviriyapan U, Luangaram S, Leekhaosong K, Kukongviriyapan V, Preeprame S. Antioxidant and vascular protective activities of *Cratoxylum formosum*, *Syzygium gratum* and *Limnophila aromatica*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2007;30(4):661-6.
33. Consolini AE, Baldini OA, Amat AbG. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae) as antihypertensive. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999;66(1):33-9.
34. Al-Hussaini JA-AS. Comparative study of the inhibitory efficacy of some medicinal plant oils on the growth of pure isolates from a group of pathogenic microorganisms in vitro. *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences*. 2010;1(1).
35. Chaturvedi A, Kumar MM, Bhawani G, Chaturvedi H, Kumar M, Goel R. Effect of ethanolic extract of *Eugenia jambolana* seeds on gastric ulceration and secretion in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2007;51(2):131.

Referencias Bibliográficas

36. Meyre-Silva C, Petry CM, Berté TE, Becker RG, Zanatta F, Delle-Monache F, et al. Phytochemical analyses and gastroprotective effects of *Eugenia umbelliflora* (Myrtaceae) on experimental gastric ulcers. *Natural product communications*. 2009;4(7):911-6.
37. Prado LCdS, Silva DB, Oliveira-Silva GLd, Hiraki KRN, Canabrava HAN, Bispo-da-Silva LB. The gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) leaf extract: the possible role of condensed tannins. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2014;37(5):722-30.
38. Pepato M, Folgado V, Kettelhut I, Brunetti IL. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2001;34(3):389-95.
39. David E, Therasa S, Hemachandran J, Elumalai E, Thirumalai T. *Eugenia jambolana* seed extract inhibit uptake of glucose across rat everted gut sacs in vitro. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*. 2010;2:107-12.
40. Palmarola A, Barrios B, González L. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*. 2012;9:3.
41. Govaerts R, Sobral N, Ashton P, Barrie F, Holst BK, Landrum LL ea. *Eugenia clarensis* Britton & P.Wilson Kew: Royal Botanic Gardens. 2008.
42. Puerto Abraham R. Evaluación farmacognóstica y fitoquímica de las hojas de *Eugenia Clarensis* (Britton & P.Wilson). Santa Clara, Cuba: Universidad Central de Las Villas; 2014.
43. Nguyen Thi Minh N, Vicet Muro L, Siverio Mota D, Jorge Rodriguez M, González Mosquera D, Castañeda Noa I. Tamizaje fitoquímico y evaluación de la actividad sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico de *Eugenia clarensis* Britton & P.Wilson. *J Pharm Pharmacogn Res*. 2016;4(1):25-38.
44. Coba Sánchez Y. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos obtenidos de las hojas de *Eugenia clarensis* Britton & P.Wilson. [Trabajo de Diploma]. Santa Clara, Cuba: Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas; 2015.
45. Gracia Nava M. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales: Universidad Autónoma de Querétaro.
46. Taíz I, Lincoln L, Geiger E. *Secondary Metabolites and Plant Defense*. Fourth ed 2006.
47. Rodríguez Rivas M. *Introducción a la Fitoterapia y la Medicina Tradicional*. México: Editorial Herbal; 1998.
48. Pérez Pérez E, Ettiene G, Marín M, Casassa-Padron A, Silva N, J. Raga, et al. Determinación de fenoles y flavonoides totales en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Rev Fac Agron*. 2014;31:60-77.
49. Ramírez E, Bonilla P, Suarez S, Choquesillo F, Castro A. Actividad antioxidante, antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* "Huamanpinta". *Ciencia e Investigación*. 2014;17(1):37-42.
50. Duthie G, Crozier A. Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Lipidol*. 2000;11:43-7.
51. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*. 1997;2:152-9.
52. Cao G, Sofic E, Prior R. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids. Structure activity relationships. *Free Rad Biol Med*. 1997;22:749-60.
53. Martínez-Vásquez J. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus*: Tesis de Ingeniería. Universidad Tecnológica de la Mixteca; 2007.
54. Mohamed AA, Ali SI, El-Baz FK. Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* Leaves. *Plos one*. 2013;8(4):e60269.
55. Khalaf NA, Shakya AK, Al-Othman A, El-Agbar Z, Farah H. Antioxidant activity of some common plants. *Turk J Biol*. 2008;32(11).

Referencias Bibliográficas

56. Valenzuela Bustamante PD. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de Ugni molinae Turcz. Santiago de Chile, Chile: Universidad de Chile; 2015.
57. Coello-Frías VN. Efecto de la adición de Ácido Ascórbico y Butil Hidroxitolueno (BHT) en la oxidación enzimática y rancidez oxidativa de pasta de aguacate (*Persea americana*) variedades Hass y Bacon. Ecuador: Universidad Técnica De Ambato; 2015.
58. García Bacallao L, Vicente García Gómez L, Rojo Domínguez DM, Sánchez García E. Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista cubana de investigaciones biomédicas*. 2001;20(3):231-5.
59. Rattmann YD, de Souza LM, Malquevicz-Paiva SM, Dartora N, Sasaki GL, Gorin PA, et al. Analysis of flavonoids from *Eugenia uniflora* leaves and its protective effect against murine sepsis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;2012.
60. Pugliese AG, Tomas-Barberan FA, Truchado P, Genovese MI. Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) pulp and seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61(11):2720-8.
61. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(10):4290-302.
62. Londoño Londoño J. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. 2012.
63. Guy RA, Maguire GF, Crandall I, Connelly PW, Kain KC. Characterization of peroxynitrite-oxidized low density lipoprotein binding to human CD36. *Atherosclerosis*. 2001;155(1):19-28.
64. Watanabe Y, Nakanishi H, Goto N, Otsuka K, Kimura T, Adachi S. Antioxidative properties of ascorbic acid and acyl ascorbates in ML/W emulsion. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2010;87(12):1475-80.
65. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. se of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss U-Technol* 1995;28:25 - 30.
66. P. I-C, Ponce-Pardo J, Zarzosa-Norabuena E. *Horiz Med*. valuación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. 2015;15(1):57-60.
67. Hidalgo Jerez M. Antocianos: metabolismo y actividad biológica [Tesis Doctoral]. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid; 2013.
68. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Local homones inflammation and inmune reactions. *Rang and Dale's Pharmacology* 6^{ta} ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2007. p. 202-25.
69. Guyton AC, Hall JE. *Guyton and Hall's Textbook of medical physiology* 11^{na} ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006. 429-38 p.
70. Signore A, Annovazzi A, Corsetti F, Capriotti G, Chianelli M, De Winter F, et al. Biological imaging for the diagnosis of inflammatory conditions. *BioDrugs* 2002;16(4):241-59.
71. Lyu SY, Park WB. Production of cytokine and NO by RAW 264.7 macrophages and PBMC *in vitro* incubation with flavonoids. *Arch Pharm Res* 2005;28(5):573-81.
72. Kwon TH, Yoona IH, Shinb JS, Leea YH, Kwona BJ, Leea KT, et al. Synthesis of indolyl-3-acetonitrile derivatives and their inhibitory effects on nitric oxide and PGE2 productions in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(9):2571-4.
73. Gupta MP, San Roman-del Barrio L, Pinzón R. *Manual de técnicas de investigación, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) subprograma X Química Fina Farmacéutica*1995.
74. Vogel HG. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. 2^{da} ed. Berlin: Springer-Verlag; 2002.
75. Sugishita E, Amagaya S, Ogihara Y. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *J Pharmacobiodyn* 1981;4(8):565-75.

Referencias Bibliográficas

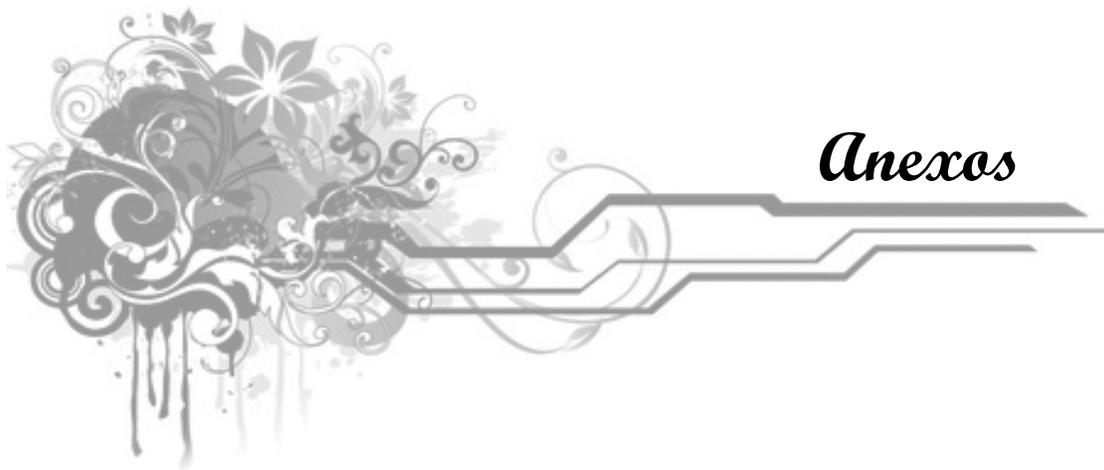
76. Törnell J, Snaith M. Transgenic systems in drug discovery: from target identification to humanized mice. *Drug Disc Today* 2002;7(8):461-70.
77. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rats as an assay for antiinflammatory drug. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962;111:544-7.
78. Shinichi N, Kyoichi K, Setsuo T. Correlation between histamine content in exudate and degree of edema produced by dextran. *Biochem Pharmacol* 1978;27(2):2641-6.
79. Marín-Loaiza JC, Nieto-Camacho A, Céspedes CL. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Pittocaulon* species from México. *Pharm Biol* 2013;51(2):260-6.
80. Magina MDA, Pietrovski EF, Gomig F, Falkenberg DB, Cabrini DA, Otuki MF, et al. Topical antiinflammatory activity and chemical composition of the epicuticular wax from the leaves of *Eugenia beaurepaireana* (Myrtaceae). *Braz J Pharm Sci* 2009;45(1):171-6.
81. Young JM, Wagner BM, Spires DA. Tachyphylaxis in 12-O-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. *J Invest Dermatol*. 1983;80:48-52.
82. Young JM, Spires DA, Bedord CJ, Wagner B, Ballaron SJ, de Young LM. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *J Invest Dermatol* 1984;82(4):367-71.
83. Tubaro A, Dri P, Melato M, Mulas G, Bianchi P, Del Negro P, et al. In the croton oil ear test the effects of non steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are dependent on the dose of the irritant. *Agents Actions*. 1986;19(5-6):371-3.
84. Nurmi K. Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* ssp. *tortuosa*). *Journal of Chemistry and Ecology*. 1996;22:2023-40.
85. Messaoud C, H. Chograni, and M. Boussaid,. Chemical composition and antioxidant activities of essential oils and metanol extracts of three wild *Lavandula L.* species. *Natural Product Research*. 2011:1-9.
86. Alam M. Actividad antioxidante de las Myrtaceae. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 2013; 15(1):1731.
87. Shimada K, al. e. Antioxidative properties of xanthan on auto oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1992; 40: 945-8.
88. De Young L, Kheifets J, Ballaron S, Young J. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents and actions*. 1989;26(3-4):335-41.
89. Payá M, Ferrándiz ML, Sanz MJ, Bustos G, Blasco R, Rios JL, et al. Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranean coast in mice. *Phytotherapy Research*. 1993;7(2):159-62.
90. Matulevich-Peláez JA. Estudio fitoquímico de hojas, flores y frutos de *Bejaria resinosa* Mutis ex linné filius (Ericaceae) y evaluación de su actividad antiinflamatoria. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana; 2013.
91. Rodríguez Rivas M, Boffill Cárdenas M, Lorenzo Monteagudo G, Sánchez Freire P, López Guerra RL, Verdecía Machado B, et al. Evaluación preclínica del efecto antiinflamatorio del jugo de *Morinda citrifolia L.* *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2013(10):(3-4).
92. AVMA. Guidelines on Euthanasia (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia). June 2007. American Veterinary Medical Association; 2007.
93. EU. Recomendación de la comisión de 18 de junio de 2007 sobre las líneas directrices relativas al alojamiento y al cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 2007;1:L197.
94. Charbonneau R, Niel L, Olfert E, von Keyerserlingk M, Griffin G. CCAC guidelines on: euthanasia of animals used in science. Canadian Council on Animal Care Ottawa ON, Canada. 2010.
95. WHO. Laboratory biosafety manual: World Health Organization; 2004.

Referencias Bibliográficas

96. Barthold SW, Bayne K, Davis M. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: National Academy Press; 2011.
97. Puerto Abraham R. Evaluación farmacognóstica y fitoquímica de las hojas de *Eugenia Clarensis* (Britton & P.Wilson). [Tesis de grado]. Santa Clara,Cuba: Universidad Central de Las Villas; 2014.
98. Puerto AR. Evaluación farmacognóstica y fitoquímica de las hojas de *Eugenia Clarensis* (Britton & P.Wilson) [Tesis de Grado]. Santa Clara,Cuba: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2014.
99. Ziyad Ben Ahmed MY, Johan Viaene, Bieke Dejaegher, Kristiaan Demeyer, Debby Mangelings & Yvan Vander Heyden. Seasonal, gender and regional variations in total phenolic, flavonoid, and condensed tannins contents and in antioxidant properties from *Pistacia atlantica* ssp. leaves. *Pharmaceutical Biology* 2017;55(1):1185-94.
100. Zarate Bello S. Cuantificación de compuestos fenólicos totales y taninos condensados de látex y corteza de *Croton draco* var. *draco*,Schltdl. & Cham., provenientes de un bosque tropical perennifolio. Córdoba: Universidad Veracruzana; 2012.
101. Valares MC. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente [Tesis doctoral]. Badajoz, España: Universidad de Extremadura; 2011.
102. Vu Ngoc A. Evaluación del contenido fenólico y de flavonoides y la actividad antioxidante de extractos obtenidos de las hojas de la *Harpalyce macrocarpa* [Tesis de Diploma]. Santa Clara, Cuba: Universidad central "Marta Abreu" de Las Villas; 2013.
103. Villano D, al. e. Radical Scavenging of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 2007:230-5.
104. De Vry CG, Valdez M, Lazarov M, Muhr E, Buelow R, Fong T, et al. Topical application of a novel immunomodulatory peptide, RDP58, reduces skin inflammation in the phorbol esterinduced dermatitis model. *J Invest Dermatol* 2005;125(3):473-81.
105. Inoue H, Mori T, Shibata S, Koshihara Y. Modulation by glycyrrhetic acid derivatives of TPA-induced mouse ear oedema. *Br J Pharmacol*. 1989;96(1):204-10.
106. Payá M, Ferrándiz M, Sanz MJ, Bustos G, Blasco R, Ríos JL, et al. Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the Mediterranean coast in mice. *Phytother Res*. 1993;7:159-62.
107. Hras R, Hadolin A, Knez M, Baumann Z. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extraction with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*. 2000;71(229-333).
108. Di Rosa M, Giround JP, Willoughby DA. Studies of the mediators of acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol* 1971;104(1):15-29.
109. Heller A, Koch T, Schmeck J, van Ackern K. Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs* 1998;55(4):487-96.
110. Burch R, DeHaas C. A bradykinin antagonist inhibits carrageenan edema in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1990;342(2):189-93.
111. Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. Modulation of Prostaglandin Biosynthesis by Nitric Oxide and Nitric Oxide Donors. *Pharmacol Rev*. 2001;57(2):217-52.
112. Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paws inflammation. *Br J Pharmacol* 1996;118:829-38.
113. Williams T, Morley J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. *Nature* 1973;246(5430):215-7.

Referencias Bibliográficas

114. Baluprakash T, Arumugasamy K, Ramanathan M, Danya U. *In Vitro* Anti-inflammatory Activity of *Exacum wightianum* Arn. (Gentianaceae)- An Endemic Medicinal Plant. J App Pharm Sci 2011;1(10):163-6.



Anexos

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de calidad Genética e Higiénico Sanitaria de los animales.

GC.CC.09.13 Dirección de Aseguramiento de la Calidad  **CENPALAB**
 Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio

Folleto: 0122 Grupo de Aseguramiento de la Calidad

CERTIFICADO DE CALIDAD DE ROEDORES SPF. Salud y Zootecnia

Especie	Blanco Genético	Colonia Expansión	Colonia Producción	Línea	Lote	Total de cages	
Ratón	-	-	-	BALB/c/Camp	1301217	3	
Machos	Hembras	Total	Peso	Edad	Centro de destino	Fecha Expedición	Hora
-	120	120	19-21g	3-8w	U.C.I.V. Villo Chao	28/03/17	9:30am

Dictamen Zootécnico e Inspección Clínica

Los animales en el momento de la expedición se encuentran clínicamente sanos, sus características morfológicas, fisiológicas y reproductivas se corresponden con la especificación de calidad de este producto. Proceden de una colonia con ambiente controlado y mantenidos en un sistema de producción intensivo aprobados para la línea, la alimentación se realiza con alimentos concentrados fórmulas **ALYco**® EMO 1002 y EAO 1004 esterilizable a razón de 3.40 a 6 g diarios. Dicha producción se encuentra bajo las BPP y un Sistema de Gestión de la Calidad que garantiza el estado higiénico sanitario de los animales que se expiden.

Resultados de Bacteriología *

Entidad	Método	Pos. Neg. % Total	Fecha	Entidad	Método	Pos. Neg. % Total	Fecha
Salmonella sp.	Cult/ Serol	X	21/07/16	Streptococcus pneumoniae	Cult/ Serol	X	18/07/16
Streptococcus β hemolítico	Cult/ Serol	X	18/07/16	Pasteurella pneumotropica	Cult/ ELISA	X	18/07/16
Bacterioides bronchiseptica	Cult/ ELISA	X	08/12/16	Clostridium piliforme	Inspe. Clínica	X	01/02/16
Corynebacterium kutscheri	Cultivo	X	21/10/16	Leptospira sp.	ELISA	X	08/08/16
Haemobacter sp.	Cultivo	X	01/02/16	Cytophaster freundi	Cultivo	X	01/02/16
Streptococcus macedonensis	Cultivo	X	18/07/16	Mycoplasma pulmonis	Cult/ ELISA	X	18/04/16
Dermatofitos	Inspe. Clínica/Cultivo	X	18/07/16				

Resultados de Parasitología *

Entidad	Método	Pos. Neg. % Total	Fecha	Fecha:
Endoparásitos	DIRIFLOT	X	18/12/16	18/10/16
Trichostrongylus axei	ELISA	X	18/12/16	Examen macroscópico:
Ectoparásitos	INSPECCIÓN	X	18/12/16	No se observan lesiones macroscópicas compatibles con alteraciones zoológicas.

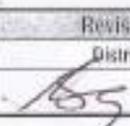
Resultados de Virología * Serología

Entidad	Método	Pos. Neg. % Total	Fecha	Entidad	Método	Pos. Neg. % Total	Fecha
Virus de la Hepatitis (MHV)	ELISA/IFA	X	07/11/16	Coleusporingilis kv. (LCM)	ELISA/IFA	X	07/11/16
Rotavirus Tipo 3 (REQ 3)	IFA	X	07/11/16	Salm.	ELISA/IFA	X	07/11/16
Sincitiotriomvir (TRIMV)	IFA	X	07/11/16	SpVSV	IFA	X	21/04/16
Pneumonía del ratón (PVM)	ELISA/IFA	X	07/11/16	Adenovirus (MAD)	ELISA/IFA	X	21/04/16
Virus demérito del ratón (MVM)	ELISA/IFA	X	07/11/16	Citomegalovirus (MCNV)	IFA	X	21/04/16
Rotavirus (EDRV)	ELISA/IFA	X	21/04/16	Distemperado Leócor (LDH)	Test LDH Plasma	X	-
Echovirus	ELISA/IFA	X	25/04/16	Virus K	IFA	X	21/04/16
Hantavir	IFA	X	-	Virus Tímico (MTV)	IFA	X	-

* Según lo certificado por la Dirección de Aseguramiento de la Calidad del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, de acuerdo al cronograma de monitoreo de los roedores criados y mantenidos en sistemas protegidos y que consta en los expedientes de la línea archivados en la Dirección de Calidad. Documento de referencia "Recomendaciones del monitoreo microbiológico para Roedores mantenidos y criados en condiciones controladas".

Válido a partir de **ENERO /2017** hasta **MARZO /2017**

Este certificado es copia fiel de la original que se elabora a partir de la liberación de la línea para su comercialización.

	Realizado por	Aprobado por	Revisado por
Cargo	Especialista Liberación de Aseg. Calidad	Dirección de Producción	Distribuidor
Firma			

Co-In-Calidad

Anexo 1. Certificado de calidad Genética e Higiénico Sanitaria de los animales (continuación).

GC.CC.10.13 Dirección de Aseguramiento de la Calidad  **Grupo de Aseguramiento de la Calidad**

Folio: **0057**

CERTIFICADO DE CALIDAD DE ROEDORES SPF. Salud y Zootecnia

Especie	Banco Genético	Colonia Expansión	Colonia Producción	Línea	Lote	Total de cajas	
Rata	-	-	-	Cemp/WI	13004912	3	
Machos/Hembras	Total	Peso	Edad	Centro de destino		Fecha Expedición	Hora
30	-	30	120-150g	7-8sm	UCIV Univ. Cero	28/03/17	9:45am

Dictamen Zootécnico e Inspección Clínica

Los animales en el momento de la expedición se encuentran clínicamente sanos, sus características morfológicas, fisiológicas y reproductivas se corresponden con la especificación de calidad de este producto. Proceden de una colonia con ambiente controlado y mantenidos en un sistema de producción intensivo aprobados para la línea, la alimentación se realiza con alimentos concentrados fórmula **ALYco®** EMO 1002 esterilizable a razón de 22.4 a 30 g diarios. Dicha producción se encuentra bajo las BPP y un Sistema de Gestión de la Calidad que garantiza el estado higiénico sanitario de los animales que se expiden.

Resultados de Bacteriología *

Entidad	Método	Pos./neg.	Nº Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos./neg.	Nº Test.	Fecha
Salmonella sp.	Cult. Serol.	X		21/10/16	Streptococcus pneumoniae	Cult. Serol.	X		28/07/16
Streptococcus maritimus	Cultivo		X	-	Pasteurella pneumotropa	Cult.ELISA	X		28/07/16
Streptococcus β hemolítico	Cult. Serol.	X		28/07/16	Chlamydia pneumoniae	Ins. Clínica	X		08/02/16
Bordetella bronchiseptica	Cult. ELISA	X		28/07/16	Capnocytophaga sp.	ELISA/Ins	X		28/05/16
Helicobacter sp.	Cultivo	X		08/02/16	Mycoplasma arthritidis	Cult.ELISA	X		19/04/16
Corynebacterium kutscheri	Cult. ELISA	X		21/10/16	Mycoplasma pneumoniae	Cult.ELISA	X		19/04/16
Dermatophitos	Ins. Clínica/Cultivo	X		08/02/16					

Resultados de Parasitología *

Entidad	Método	Pos./neg.	Nº Test.	Fecha
Endoparásitos	DIRI/FLOT	X		19/10/16
Fitoparásitos goodii	ELISA	X		16/09/16
Trichostema ves. crassicauda	Sedimentación	X		03/02/16
Ectoparásitos	Ins. Clínica	X		19/10/16

Resultados de Patología *

Fecha: 18/10/16

Examen macroscópico:

No se observan lesiones macroscópicas condescendientes con alteraciones patológicas.

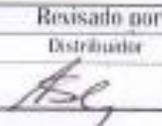
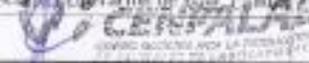
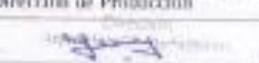
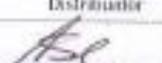
Resultados de Virología * (Serología)

Entidad	Método	Pos./neg.	Nº Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos./neg.	Nº Test.	Fecha
Virus Sendai/parainfluenza Virus canino (SDARCV)	IFA	X		09/11/16	Coronavirus Inoculosa (LCM)	IFA	X		09/11/16
Virus Paramona (PVM)	IFA	X		09/11/16	Virus Sendai	ELISA/IFA	X		09/11/16
Virus Erctofarsetes Thaler (TNEV)	IFA	X		09/11/16	Respirovirus Top-1 (REC-3)	IFA	X		09/11/16
Virus Totar (H-1)	IFA	X		09/11/16	Virus Rabari (RRV)	IFA	X		09/11/16
					Virus Hantani	IFA		X	-

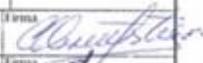
* Según lo certificado por la Dirección de Aseguramiento de la Calidad del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, de acuerdo al cronograma de monitoreo de los roedores criados y mantenidos en sistemas protegidos y que consta en los expedientes de la línea archivados en la Dirección de Calidad. Documento de referencia "Recomendaciones del monitoreo microbiológico para Roedores mantenidos y criados en condiciones controladas".

Válido a partir de **ENERO/2017** hasta **MARZO/2017**

Este certificado es copia fiel de la original que se elabora a partir de la liberación de la línea para su comercialización.

Cargo	Realizado por	Aprobado por	Revisado por
Especialista en Producción de Animales de Laboratorio			
Firma			

Anexo 2. Certificado de Calidad del alimento

Fórmula	Ciclo	Lote	Fecha de Producción	Presentación	
CMO 1000	III	221/2017	16/04/2017	Pellet Ø 16 mm.	
Especificaciones para su uso					
Dieta completa concentrada para el mantenimiento de ratas y ratones convencional. Todo propósito. No esterilizable. No requiere suplemento dietético. Conservar en lugar fresco y ventilado, protegido de la humedad y de vectores. Este alimento conserva sus propiedades nutritivas durante 60 días a partir de la fecha de fabricación.					
Componentes					
Maíz, Trigo, Soya H, Azúcar Refino, Fosfato Dicalcico, Carbonato de Calcio, Sal común, Premezcla Minero-Vitaminica.					
Análisis calculado *					
Descripción	UM	Valor	Descripción	UM	Valor
Proteína bruta (Min.)	%	16.0	Cálcio	%	0.39
Energía Metabolizable (Min.)	kcal/ g	2.80	Fósforo	%	0.49
Fibra bruta (Máx.)	%	3.40	Relación Calcio/ Fósforo	%	0.79
Grasa bruta (Min.)	%	1.50			
* Según análisis calculado por la Dirección de Alimentación - Nutrición del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. Recibirá el Certificado de Calidad en un periodo de 10 días posteriores a este documento a través de la Dirección de Comercialización.			Realizado por:	Cargo Dirección de Producción	Firma 
			Revisado por:	Cargo Distribuidor	Firma 