



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE *Critonia
aromatisans*, *Thevetia ahouai* y *Montanoa
grandiflora***

Tesis que presenta

FABIOLA ELIZABETH VILLA DE LA TORRE

En opción al título de

**DOCTOR EN CIENCIAS
(Ciencias biológicas: Opción Biotecnología)**

Mérida, Yucatán, Mayo 2014



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO



Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Actividad antiinflamatoria de *Critonia aromatisans*, *Thevetia ahouai* y *Montanoa grandiflora*" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez, dentro de la Opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado de Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

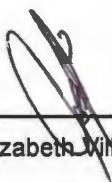
Coordinador de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Mérida, Yucatán, México; Mayo del 2014

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de Materiales y Métodos Experimentales y los Resultados y Discusión de este documento provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Fabiola Elizabeth Villa de la Torre

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (No. de apoyo 35184).

Quiero agradecer a Dios y todas sus expresiones por haberme dado la oportunidad de realizar mis sueños. De haberme mandado lo necesario para completar mis metas y para tener la fuerza de superar los obstáculos. De haberme mandando una familia maravillosa y amorosa (que incluye a mis animalitos) que me apoyo siempre.

Agradezco muy especialmente a la Dra. Rocío Borges Argáez, directora de tesis, por darme todo el apoyo necesario y las facilidades para la realización de esta tesis; a pesar de todos los obstáculos, salimos a delante y concluimos los objetivos. Gracias por depositar su fe y confianza en mí, además por estar ahí cuando necesité consejos y una plática amiga. Me quedo con un buen recuerdo y la extrañaré junto con todo el grupo de trabajo.

A la Dra. Martha Méndez González, quien fue la que trajo el proyecto a mí, sin sus contribuciones este proyecto no hubiera podido concluirse. Muchas gracias por su confianza y su fe, espero no haberla defraudado. Siempre sentí un apoyo incondicional y una mano amiga para platicar.

Al Dr. Sergio Peraza Sánchez y al Dr. Felipe Barahona Pérez, que fueron parte de mis tutorías y sínodo, quienes siempre estuvieron dispuestos a resolver mis dudas, y expresaban sus opiniones de forma correcta y acertada. Dr. Sergio gracias por sus lecciones de ortografía y gramática, causaron un impacto muy favorable en mi vida. Dr. Felipe, gracias por su paciencia y guía. Ambos personas que siempre ofrecen amistad y ayudan cuando la necesitamos.

A los Dres. Miguel Rosado Vallado, Rolffy Ortiz Andrade y Víctor Arana Argáez que me apoyaron y guiaron en farmacología. Además, de la colaboración académica me dieron consejos y me escucharon siempre que lo necesité. Gracias por todo, fue realmente un placer haber sido su alumna.

A la Dra. Ana María Puebla Pérez, por las facilidades otorgadas en la estancia de investigación en el Laboratorio de Inmunofarmacología, CUCEI, Universidad de Guadalajara y por el apoyo para asistir al curso de fitoterapia avanzada.

Al Dr. Iván Delgado Saucedo de la U de G, quien me enseñó el manejo y la realización de los experimentos in vivo y, además, gran amigo que estuvo ahí para motivarme y no dejarme caer en los momentos que le necesité.

Al Dr. Ralf Kinscherf por abrirme las puertas al Instituto de Anatomía, de la Universidad Philipps Marburg en Alemania. Por confiar en mí y, además, brindarme su amistad y apoyarme en la solución a problemas en el momento que lo requerí. Al Dr. Gabriel Bonaterra del laboratorio de Biología Celular y Molecular por tener el gusto y paciencia de enseñarme todas las técnicas necesarias y sus fundamentos, además, el cual me apoyó cuando más lo necesite, siendo un amigo y confidente. A Andrea, que me enseñó muchas técnicas y me ayudó a realizar muchos experimentos nuevos, me aconsejó y estuvo ahí cuando la necesité. A Anne, quien me hizo compañía en muchos momentos y junto con Andrea, hicieron lo posible por enseñarme Alemán. Ellen, Gabriela, Claudia e Irmgard, amigas increíbles que además de ayudarme en algunas técnicas me ayudaban con consejos. A los chicos del laboratorio que estuvieron conmigo hasta tarde haciendo más amena mi estadía.

A la Lic. Gilma Michell, quien siempre me animó y motivó para cumplir mi sueño de hacer una estancia de investigación; siempre estuvo al pendiente de mi enriquecimiento como estudiante y, que en lo personal, siempre tuve apoyo y consejos de amiga para solucionar mis problemas.

Al Dr. Oscar Moreno Valenzuela, quien siempre estuvo abogando por mí y me dio consejos oportunos. Gracias por los apoyos de estancias y congresos. Gracias por apoyarme!!!.

A todo el grupo de trabajo, especialmente a Bella por haberme enseñado muchas cosas y apoyarme en mis experimentos, Luisito, gracias por también haberme enseñado tantas cosas, eres una excelente persona, Lety, nos ayudaste en lo que se podía y estuviste con nosotros todos los días. Gracias a un excelente equipo de técnicos y amigos.

A Narce, Offir, Miriam y Sergio, quienes hicieron de la biblioteca un excelente lugar para trabajar o de refugio en los sillones (y para ser sinceros también para una buena plática). Ustedes siempre me otorgaron el material adecuado para la elaboración de la tesis y el acceso a las revistas electrónicas. A Landy, Ale, Nancy, Marco, Vero, Lili y demás personal administrativo, al que visité frecuentemente con dudas y, además, para platicar de trivialidades. El mejor equipo que he conocido. Landy, tú me motivaste a decidirme en un lapso de tres días a cambiar mi vida de rumbo y llegar al CICY. Muchas gracias!!!!.

También quiero agradecer a los dos ángeles del cielo que me cuidan en cada momento de mi vida, mi padre Rogelio Villa Amerena y mi abuelo Guillermo de la Torre Dávila.

Quiero agradecer a mi hermosa madre, Elizabeth de la Torre Carrillo que me ha apoyado tanto, que hizo que nunca olvidara mis sueños y me dio ánimos para seguir adelante a cada momento y como siempre el amor incondicional que nunca me ha faltado. A mi abuela Felicitas Carrillo Sandoval quien me motivo a venir a Mérida y continuar mis estudios, siempre estuvo al pendiente. A mis hermanas Mónica y Milagros que también me ayudaron mucho para lograr este cambio de vida. A Mis hermanos Joaquín y Alberto por formar parte valiosa en mi vida.

Muy especialmente a Gregorio Carballo, amigo y cómplice, quien me ayudo a estandarizar y realizar experimentos farmacológicos. En la marcha aprendimos muchas cosas nuevas.

A mis amigos del CICY que tanto me apoyaron en los momentos difíciles brindándome su amistad, consejos y buenas experiencias para recordar, Ana Laura, Nelly, Pablo, Leonel, Alberto, Isaias e Igor, por su amistad e intercambio de conocimientos.

A Carlos y Andrés, quienes resolvieron mis dudas y en ocasiones se quedaron conmigo hasta tarde para lograr concluir algún experimento. A Edgar y Nacho de quienes también aprendí mucho. A mis amigos del laboratorio Ana, Arely, Deisy, Lilian, Karely, Glendy, Ángel, Angelito y Karla, sin ellos el tiempo trabajando no hubiera sido tan ameno. Me encantó haber compartido el laboratorio con ustedes!.

Y en general al CICY por haberme dado la oportunidad de lograr esta meta profesional.

Fueron cuatro años maravillosos de mi vida de crecimiento personal y profesional, donde hice lo que me gusta... investigación.... Trabajar y estudiar con un gran equipo y excelentes compañeros fue enriquecedor.

Por todo eso y más GRACIAS!!!!

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
CAPITULO I	4
GENERALIDADES.....	5
1.1 INTRODUCCIÓN	5
1.2 ANTECEDENTES GENERALES.....	8
1.2.1 Inflamación y medicina tradicional	8
1.2.2 El género <i>Critonia</i>	9
1.2.2.1 Características morfológicas y distribución	9
1.2.2.2 Estudios fitoquímicos y farmacológicos.....	10
1.2.2.3 <i>Critonia aromatisans</i>	10
1.2.3 El género <i>Thevetia</i>	11
1.2.3.1 Características morfológicas y distribución	11
1.2.3.2 Estudios fitoquímicos y farmacológicos.....	12
1.2.3.3 <i>Thevetia ahouai</i>	12
1.2.4 El género <i>Montanoa</i>	13
1.2.4.1 Características morfológicas y distribución	13
1.2.4.2 Estudios químicos y farmacológicos	13
1.2.4.3 <i>Montanoa grandiflora</i>	14
1.3 JUSTIFICACIÓN	14
1.4 HIPÓTESIS.....	16
1.5 OBJETIVOS	17
1.5.1 Objetivo general	17
1.5.2 Objetivos específicos.....	17
1.6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
1.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

CAPITULO II	22
Evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> y toxicológica preliminar de extractos de <i>Critonia aromatisans</i>, <i>Thevetia ahouai</i> y <i>Montanoa grandiflora</i>, selección y fraccionamiento de extractos activos	23
2.1 INTRODUCCIÓN	23
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	26
2.2.1 Selección de extractos activos	26
2.2.1.1 Recolección y preservación del material vegetal	26
2.2.1.2 Obtención de los extractos	26
2.2.2 Animales	26
2.2.3 Administración de los extractos y dosis para las evaluaciones <i>in vivo</i>	26
2.2.4 Inducción de edema plantar con carragenina	27
2.2.5 Inducción de edema en el pabellón auricular inducido por TPA.....	27
2.2.6 Actividad anti-inflamatoria <i>in vitro</i> de extractos obtenidos de <i>C. aromatisans</i> y <i>M. grandiflora</i>	28
2.2.6.1 Cultivo celular	28
2.2.6.2 Determinación de NO en macrófagos peritoneales de ratón NIH.....	28
2.2.6.3 Viabilidad celular	29
2.2.7 Estudio toxicológico	29
2.2.7.1 Toxicidad aguda preliminar	29
2.2.7.2 Toxicidad oral aguda del extracto hexánico activo de <i>C. aromatisans</i>	29
2.2.8 GC-MS	31
2.2.9 Análisis estadístico	31
2.3 RESULTADOS	32
2.3.1 Evaluación de los extractos totales en el modelo de inducción de edema plantar con carragenina en rata.....	32
2.3.2 Evaluación de las particiones en el modelo de inducción de edema plantar con carragenina en ratón.....	32
2.3.3 Inducción de edema en el pabellón auricular por TPA en ratón	34
2.3.4 Determinación de NO en macrófagos peritoneales de ratón NIH.....	35
2.3.5 Evaluación de la Toxicidad Aguda preliminar	35
2.3.6 Toxicidad oral aguda	36
2.3.7 CG-EM	38

2.4 DISCUSIÓN.....	38
2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
CAPITULO III	45
Evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de extractos y fracciones de <i>Crítoria aromatisans</i>	45
3.1 INTRODUCCIÓN.....	45
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	48
3.2.1 Procedimientos generales	48
3.2.1.1 Recolección y preservación del material vegetal	48
3.2.1.2 Preparación de los extractos	48
3.2.1.3 Partición hexánica	48
3.2.1.4 Compuestos químicos y disolventes.....	48
3.2.1.5 Cromatografía en capa fina (CCF).....	49
3.2.1.6 Cromatografía Líquida de Vacío (CLV) del extracto hexánico de <i>C. aromatisans</i>	49
3.2.1.7 Animales	49
3.2.2 Actividad anti-inflamatoria <i>in vivo</i> de extractos obtenidos de <i>C. aromatisans</i> : Inducción de edema plantar con carragenina.....	50
3.2.3 Actividad anti-inflamatoria <i>in vitro</i> de extractos obtenidos de <i>C. aromatisans</i> : Determinación de la inhibición de la producción de NO en macrófagos peritoneales de ratón NIH.....	50
3.2.3.1 Cultivo celular.....	50
3.2.3.2 Determinación de NO	51
3.2.3.3 Viabilidad celular	51
3.2.4 Análisis molecular de las fracciones obtenidas del extracto hexánico activo	51
3.2.4.1 Preparación de las muestras	51
3.2.4.2 Cultivo celular.....	51
3.2.4.3 Determinación de TNF- α por el método de ELISA.....	52
3.2.4.4 Viabilidad de células THP-1.....	52
3.2.4.5 Extracción de ARNm	53
3.2.4.6 Síntesis de ADNc	53
3.2.4.7 Determinación de la expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y COX-2 por qRT-PCR	53
3.2.5. Análisis estadístico	54

3.3 RESULTADOS	54
3.3.1 Inducción de edema plantar con carragenina en ratón	54
3.3.2 Determinación de óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratón NIH	55
3.3.3 Evaluación de las fracciones obtenidas del extracto hexánico mediante el ensayo de inhibición de la producción de óxido nítrico	56
3.3.4 Viabilidad celular	59
3.3.5 Determinación de TNF- α por el método de ELISA	59
3.3.6 Determinación de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y COX-2 por qRT-PCR	62
3.3.7 Viabilidad de células THP-1	65
3.4 DISCUSIÓN	66
3.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
CAPITULO IV	71
Estudio fitoquímico de <i>Critonia aromatisans</i>	71
4.1 INTRODUCCIÓN	71
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	75
4.2.1 Procedimientos generales	75
4.2.1.1 Recolección y preservación del material vegetal	75
4.2.1.2 Compuestos químicos y disolventes	75
4.2.1.3 Obtención del extracto hexánico	75
4.2.1.4 Obtención de aceites esenciales (AE) por arrastre de vapor a partir de hojas frescas de <i>C. aromatisans</i>	75
4.2.2 Cromatografía de gases acoplada a masas CG-EM de los aceites esenciales y fracciones activas del extracto hexánico de hojas de <i>C. aromatisans</i>	76
4.2.3 Filtración a vacío con tonsil del extracto hexánico de <i>C. aromatisans</i>	76
4.2.4 Cromatografía en capa fina (CCF)	77
4.2.5 Cromatografía líquida al vacío (CLV) del extracto hexánico de <i>C. aromatisans</i>	77
4.2.6 Análisis de la fracción C	78
4.2.6.1 CLV de la fracción C	78
4.2.6.2 CCF preparativa de la fracción C-6	78
4.2.6.3 Análisis de RMN	79
4.2.6.4 Compuesto C6-3	79
4.2.7 Análisis de la fracción D	81
4.2.7.1 Cromatografía de mediana presión o "Flash"	81

4.2.7.2 Compuesto D1-B.....	81
4.3 RESULTADOS	82
4.3.1 Comparación del perfil cromatográfico de los aceites esenciales (AE) y de las fracciones activas obtenidas del extracto hexánico (Hx) de hojas de <i>C. aromatisans</i> por CG-EM.....	82
4.3.2 Análisis de la fracción C	85
4.3.2.1. Fracción C6	85
4.3.3 Análisis de la Fracción D: purificación de D1-B y D3-B.....	94
4.4 DISCUSIÓN.....	96
4.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
CAPITULO V	100
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	101
5.1 DISCUSIÓN.....	101
5.2 CONCLUSIONES GENERALES	108
5.3 PERSPECTIVAS	109
5.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
ANEXO.....	111
Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de <i>Critonia aromatisans</i>, <i>Thevetia ahouai</i> y <i>Montanoa grandiflora</i>.....	111
A1 INTRODUCCIÓN	111
A2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	113
A2.1 Selección de extractos activos	113
A2.1.1 Recolección y preservación del material vegetal	113
A2.1.2 Obtención de los extractos.....	113
A2.1.1 Obtención de aceites esenciales de <i>C. aromatisans</i> por arrastre de vapor	113
A2.2 Cromatografía en capa fina (CCF)	114
A2.3 Compuestos químicos y disolventes	114
A2.4 Fraccionamiento y evaluación de extractos activos.....	114
A2.4.1 Obtención del extracto hexánico de <i>C. aromatisans</i>	114
A2.4.2 Cromatografía Líquida de Vacío (CLV) del extracto hexánico de <i>C. aromatisans</i>	115
A2.5 Ensayos antimicrobianos	115
A2.5.1 Microorganismos de prueba.....	115
A2.5.2 Método bioautográfico de detección.....	115

A2.5.3 Método de microdilución y concentración mínima inhibitoria (CMI)	116
A2.5.4 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).....	117
A3 RESULTADOS	117
A3.1 Rendimientos obtenidos de la extracción del material vegetal de las 3 especies.....	117
A3.2 Método Bioautográfico	117
A3.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración mínima bactericida (CMB).....	118
A3.4 Actividad antimicrobiana de las fracciones del extracto hexánico de <i>C. aromatisans</i>	120
A4 DISCUSIÓN	121
A5 CONCLUSIONES	123
A6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Critonia aromatisans</i> (M. Méndez, 2009).....	11
Figura 2. <i>Thevetia ahouai</i> (M. Méndez, 2009).....	13
Figura 3. <i>Montanoa grandiflora</i> (M. Méndez, 2009).....	14
Figura 4. Esquema de la estrategia experimental.	18
Figura 5. Determinación de la toxicidad oral aguda del extracto hexánico en ratas Wistar según la guía 423 de la OECD.	30
Figura 6. Parámetros hepáticos de ratas tratadas a los 14 días posteriores a la administración oral de diferentes concentraciones de extracto hexánico de <i>C. aromatisans</i>	37
Figura 7. Prueba de viabilidad celular de macrófagos peritoneales de ratón NIH a distintas concentraciones de extractos de <i>C. aromatisans</i>	56
Figura 8. Producción de NO de las fracciones obtenidas del extracto hexánico de <i>C. aromatisans</i> con Tween 80.	57
Figura 9. Evaluación de diferentes concentraciones de extractos y fracciones de <i>C. aromatisans</i> en la inhibición de la liberación de TNF- α en células THP-1 activadas con LPS 1 μ g/mL.	60
Figura 10. Cuantificación relativa de los extractos y fracciones a diferentes concentraciones. A) TNF- α , B) IL-1 β , C) IL-6 y D) COX-2.	63
Figura 11. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células THP-1 en presencia de LPS y los extractos y fracciones de <i>C. aromatisans</i> a diferentes concentraciones.....	65
Figura 12. Compuestos aislados de <i>E. perfoliatum</i>	72
Figura 13. Compuestos aislados de <i>E. maculatum</i>	73
Figura 14. Compuestos aislados de <i>E. glutinosum</i>	73
Figura 15. Compuestos aislados de <i>E. amottanum</i>	74
Figura 16. Perfil cromatográfico de las fracciones resultantes del fraccionamiento por CLV del extracto Hx con el sistema Hx/An 8:2.	77
Figura 17. Perfil cromatográfico de las fracciones resultantes de la CLV de la fracción C con el sistema Hx/DCM 2:8.....	78
Figura 18. Perfil cromatográfico de las fracciones resultantes de la CCF preparativa de la fracción C-6 con el sistema DCM/An 2:8.	79
Figura 19. Esquema de purificación de C6-3	80
Figura 20. Perfil cromatográfico CCF de las 11 fracciones obtenidas de la fracción hexánica D, por cromatografía de mediana presión (Flash).	81
Figura 21. Cromatograma del compuesto C6-3 por CG-EM.....	86

Figura 22. Espectro de masas del compuesto C6-3.....	86
Figura 23. Espectro de RMN H^1 del compuesto 1 que corresponde a ciclocolorenona.....	87
Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 1 que corresponde a la ciclocolorenona, indicando los carbonos de cada señal.....	89
Figura 25. Espectro de HSQC del compuesto 1 que corresponde a la ciclocolorenona, indicando los protones que corresponden a cada carbono. En rojo se muestran los grupos metilo, en azul los CH_2 y en verde los metinos CH.....	90
Figura 26. Correlaciones obtenidas con el espectro de HMBC de ciclocolorenona.....	92
Figura 27. Biosíntesis de la ciclocolorenona a partir del 2α -gurjuneno.....	93
Figura 28. Perfil cromatográfico CCF de la fracción D1 y D1-B (A) y cromatograma del compuesto D1-B por CG-EM (B).....	94
Figura 29. Espectro de masas del compuesto sugerido por la base de datos como "2H-1 cremen-2-ona" (A) y D1-B (B).....	94
Figura 30. Espectro de RMN H^1 del compuesto D1-B que corresponde a 2-H-cremen -2-ona.....	95
Figura 31. Perfil cromatográfico CCF de la fracción D2 y D3-B.....	96
Figura A1. Evaluación de extractos de <i>C. aromatisans</i> , por el método bioautográfico contra <i>S. aureus</i> y <i>C. albicans</i>	119
Figura A2. Resultados de la bioautografía de las fracciones del extracto hexánico de <i>C. aromatisans</i> (sistema de elución Hx/An 80:20).....	120

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Efecto de los extractos metanólicos totales de <i>T. ahouai</i> , <i>C. aromatisans</i> y <i>M. grandiflora</i> en ratas Wistar con edema en el cojinete plantar inducido con carragenina.....	32
Cuadro 2. Efecto de las particiones ACN/MeOH y Hx de <i>T. ahouai</i> , <i>C. aromatisans</i> y <i>M. grandiflora</i> en ratones BALB/c con edema en el cojinete plantar inducido con carragenina.....	33
Cuadro 3. Efecto de las particiones ACN/MeOH y Hx de <i>T. ahouai</i> , <i>C. aromatisans</i> y <i>M. grandiflora</i> en ratones con edema del pabellón auricular inducido con TPA.....	34
Cuadro 4. Evaluación de las particiones ACN/MeOH y Hx de <i>C. aromatisans</i> y <i>M. grandiflora</i> sobre la inhibición de la producción de NO en macrófagos peritoneales.....	35
Cuadro 5. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria por el modelo de inducción de edema plantar con carragenina en ratones NIH de las particiones de <i>C. aromatisans</i>	55
Cuadro 6. Efecto inhibitorio de los extractos ACN/MeOH y hexánico sobre la producción de NO en macrófagos peritoneales obtenidos de ratones NIH.....	56
Cuadro 7. Porcentaje de inhibición de la producción de NO de las fracciones obtenidas del extracto Hx de <i>C. aromatisans</i> diluidas con Tween 80.....	57
Cuadro 8. Porcentaje de inhibición de NO en macrófagos de ratón NIH producido por los extractos de <i>C. aromatisans</i> a diferentes concentraciones.....	58
Cuadro 9. Porcentaje de viabilidad celular de las fracciones del extracto Hx de <i>C. aromatisans</i> mediante el ensayo de MTT.....	59
Cuadro 10. Evaluación de la liberación de TNF- α en células THP-1 activadas con LPS 1 μ g/mL, en presencia de diferentes concentraciones de extractos y fracciones de <i>C. aromatisans</i>	61
Cuadro 11. Índices de relatividad obtenidos para la inhibición de la expresión de ARNm en las células THP-1 tratadas con los extractos y fracciones.....	64
Cuadro 12. CG-EM de los aceites esenciales y las fracciones obtenidas a partir de hoja fresca de <i>C. aromatisans</i>	83
Cuadro 12 (Continuación). CG-EM de los aceites esenciales y las fracciones obtenidas a partir de hoja fresca de <i>C. aromatisans</i>	84
Cuadro 13. Actividad biológica de los compuestos puros encontrados en el aceite esencial de <i>C. aromatisans</i>	85
Cuadro 14. Comparación de los datos de RMN- 1 H (H, m, J = Hz) del compuesto C6-3 con los reportados para ciclocolorenona (Handayani, 1997).....	87
Cuadro 15. Datos obtenidos del espectro de HSQC del compuesto C6-3 ciclocolorenona.....	89
Cuadro 16. Correlaciones obtenidas con el espectro de HMBC del compuesto C6-3.....	91

Cuadro A1. Rendimientos de los extractos de hojas de <i>C. aromatisans</i> , <i>T. ahouai</i> y <i>M. grandiflora</i>	118
Cuadro A2. Rendimientos de las particiones de <i>C. aromatisans</i> , <i>T. ahouai</i> y <i>M. grandiflora</i>	118
Cuadro A3. Sistemas de elución y factores de retención de los extractos activos.....	119
Cuadro A4. Factores de retención de los componentes activos de las fracciones del extracto hexánico.....	121

RESUMEN

Critonia aromatisans (D.C.) R.M. King & H. Rob (Asteraceae), *Thevetia ahouai* (L.) A. DC. (Apocynaceae), y *Montanoa grandiflora* Alamán ex DC. (Asteraceae) son tres especies nativas de la península de Yucatán empleadas en la elaboración de pomadas artesanales de uso antiinflamatorio con escasos estudios biológicos y fitoquímicos. Estas especies fueron seleccionadas para evaluar el efecto antiinflamatorio de los extractos preparados a partir de las hojas, mediante un estudio fitoquímico biodirigido a fin de seleccionar la especie que presente mayor actividad para el aislamiento e identificación de sus componentes activos. En la evaluación antiinflamatoria en ratones BALB/c, se encontró que las fracciones de acetonitrilo/metanol (ACN/MeOH) y hexánicas (Hx) de *C. aromatisans* poseen la mayor actividad a una dosis de 200 mg/Kg; esta actividad resultó ser mayor al 90% sobre el edema plantar inducido con carragenina. Con base en estos resultados, se continuó el estudio antiinflamatorio con los extractos de ACN/MeOH y Hx de *C. aromatisans* empleando ratones NIH, encontrándose que únicamente el extracto Hx mostró actividad antiinflamatoria a 100 y 200 mg/Kg. Así mismo, este extracto disminuyó la producción de óxido nítrico (NO) a concentraciones más bajas que la basal a partir de 100 hasta 1,000 µg/mL. En el ensayo de toxicidad oral aguda en ratas Wistar se encontró una DL₅₀ mayor a 2,000 mg/Kg y, a esta dosis, se encontró un efecto de somnolencia y letargo. Además, el extracto Hx disminuyó la producción de TNF-α, IL-1β, IL-6 y COX-2 a nivel transcripcional. Por otro lado, se encontró que las fracciones C y D, obtenidas del fraccionamiento del extracto Hx, poseen un efecto inhibitorio de NO mayor del 50% a 500 µg/mL. La subfracción D2-B analizada por CG-EM sugirió una mezcla de esteroides; la purificación del compuesto D1-B y su posterior análisis por RMN sugiere una estructura de cumarina. El compuesto C6-3 identificado por RMN correspondió al sesquiterpeno ciclocolorenona. Con base en estos resultados, se concluye que *C. aromatisans* es una especie nativa capaz de producir un efecto antiinflamatorio significativo, además, estos resultados justifican el uso tradicional de la especie en la medicina tradicional Maya.

ABSTRACT

Critonia aromatisans (D.C.) R.M. King & H. Rob (Asteraceae), *Thevetia ahouai* (L.) A. DC. (Apocynaceae) and *Montanoa grandiflora* Alamán ex DC. (Asteraceae) are three native species from the Yucatán Peninsula used in the preparation of ointments for inflammatory use. The extracts obtained from the leaves of these species were selected to evaluate the antimicrobial and anti-inflammatory activities using a bioguided phytochemical study. In the *in vivo* anti-inflammatory evaluation using BALB/c mice the acetonitrile/methanol (ACN/MeOH) and hexane (Hx) extracts from *C. aromatisans* showed the highest activity at a dose of 200 mg/Kg of weight and this activity was greater than 90% using the carrageenan-induced hind paw edema model. The study was continued with the active extracts of *C. aromatisans* using the carrageenan anti-inflammatory model with NIH mice. From this bioassay, only the Hx extract showed anti-inflammatory activity at doses of 100 and 200 mg/Kg. Likewise, this extract reduced the production of nitric oxide (NO) at lower concentrations than the baseline from 100-1,000 $\mu\text{g/mL}$. In the acute oral toxicity test using Wistar rats it was found an LD₅₀ greater than 2,000 mg/Kg, and at this dose, it was found an effect of drowsiness and lethargy. The hexane extract was fractionated and it was found that fraction C had inhibitory activity at 500 $\mu\text{g/mL}$. Moreover, the Hx extract decreased production of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and COX-2 at a transcriptional level. Furthermore, it was found that the fractions C and D from the hexanic crude extract have an inhibitory effect more than 50% of NO production at 50 $\mu\text{g/mL}$. Analysis of D2-B subfraction by GC-MS suggested a mixture of sterols; the purification of compounds D1-B and C6-3 and their NMR analysis allowed their identification as coumarin and the sesquiterpene ciclocolorenone, respectively. Based on these results, we conclude that *C. aromatisans* is a native species capable of producing a significant anti-inflammatory effect; in addition, these results support the traditional use of the species in Mayan traditional medicine.

CAPITULO I

GENERALIDADES

1.1 INTRODUCCIÓN

Los padecimientos crónicos degenerativos tales como diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer, artritis y otras enfermedades reumáticas, requieren de un gasto insustentable de los sistemas gubernamentales de salud y en los bolsillos de los propios pacientes. Las dolencias reumáticas inflamatorias (RRPS, por sus siglas en inglés) tienen una prevalencia nacional del 5% y en el Estado de Yucatán la prevalencia es del 2.3%. En este contexto, se estima que el gasto por paciente reumático en consulta privada asciende a más de los \$100,000 MN anuales (Alvarez-Nemegyei *et al.*, 2011). En estudios publicados recientemente por investigadores mexicanos, se reportó que alrededor del 14% de la población padece alguna de las aproximadamente más de 200 enfermedades inflamatorias de tipo reumático conocidas. Entre las enfermedades reumáticas más frecuentes en la población mexicana están la osteoartritis (10.5% de la población), dolor de espalda y cintura (5.8%), síndrome doloroso localizado (3.8%), artritis reumatoide (1.6%), fibromialgia (0.7%), espondiloartropatías (0.6%) y gota (0.3%). En Yucatán, la prevalencia de enfermedades inflamatorias de origen reumático es del 2.8%, siendo uno de los estados con mayor prevalencia de esta enfermedad. Un síntoma característico de todos estos padecimientos es que en algún momento se presenta inflamación en alguno de los tejidos, por lo que los antiinflamatorios y/o analgésicos son medicamentos de uso común (Álvarez-Hernández, 2012). Los medicamentos por excelencia para el tratamiento de los procesos inflamatorios son los AINES (antiinflamatorios no esteroideos), los inhibidores selectivos de la enzima inducible ciclooxigenasa-2 (COXIBS) y los esteroides (Flores, 2003). Para el caso de los AINES se tiene el sustento científico de sus efectos secundarios en el tracto gastrointestinal, mediante la presencia de lesiones o úlceras en pacientes con un uso continuo de estos medicamentos. Por otra parte, si bien el descubrimiento de los inhibidores selectivos para la COX-2 abrió la posibilidad de evadir estos efectos, algunos como el Rofecoxib®, se han visto implicados en complicaciones cardiovasculares, lo que ocasionó en 2004 el retiro de este fármaco del mercado mundial por la compañía farmacéutica Merck (Rainsford, 2005). Por lo anterior, existe un interés mundial en la búsqueda de nuevas alternativas efectivas y de bajo costo para la población

que no tiene acceso a estos recursos, o bien, en donde el empleo de los mismos es vital para la mejora de la calidad de vida, sobre todo de los padecimientos inflamatorios crónicos (Méndez y Durán, 1997).

La medicina tradicional es la suma de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas y que se utilizan para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar trastornos físicos o mentales (OMS 1, 2013). En algunos países asiáticos y africanos, el empleo de la medicina tradicional es la única fuente de atención primaria a la salud. Para millones de personas, las medicinas herbarias, los tratamientos tradicionales y los curanderos tradicionales son la principal fuente, si no la única, de atención sanitaria (OMS 1 y 2, 2009). En algunas formas de medicina tradicional, como la medicina tradicional China y el sistema Ayurveda surgido en la India, las prácticas tradicionales se sustentan en conocimientos y experiencias adquiridos a lo largo de siglos (Mallavadhani *et al.*, 1998). Las plantas han sido ampliamente reconocidas como una fuente valiosa de medicinas efectivas. Los tratamientos herbarios, que son la forma más popular de medicina tradicional, resultan muy lucrativos en el mercado internacional. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80% de la población mundial utiliza plantas para tratar diversos padecimientos. En el período comprendido entre 2003-2004 la medicina basada en plantas generó unos ingresos anuales de US\$5,000 millones. Sólo en China la venta de esos productos reportó US\$14,000 millones en 2005. En Brasil, los ingresos generados por la medicina herbaria ascendieron a US\$ 160 millones en 2007 (OMS 1, 2, 2009). Es importante mencionar que la OMS ha recomendado a sus países miembros incorporar el uso de plantas en sus esquemas de salud. En el caso específico de México, las plantas han constituido desde la época prehispánica un recurso importante para el alivio de múltiples enfermedades. Estas especies vegetales no solamente se han utilizado en el medio indígena y en el área rural, sino también en las zonas urbanas. En Yucatán, el conocimiento herbolario de la cultura Maya se ha transmitido a través de los años y gracias a esto se sigue empleando hasta la fecha el uso de remedios con plantas nativas y cultivadas provenientes de la península (Ankli *et al.*, 2002).

Yucatán cuenta con una riqueza florística interesante, tanto desde el punto de vista botánico, taxonómico como químico, ya que integra elementos centroamericanos, caribeños y del sur de México que, aunados a los elementos endémicos, dan como

resultado una flora nativa muy peculiar (Mendieta y Del Amo, 1981). Se estima la presencia de 2,500 especies de plantas vasculares, de las cuales alrededor del 30% tienen un uso medicinal, con un número de 680 especies empleadas como medicinales. De éstas, un porcentaje mínimo han sido estudiadas farmacológica y fitoquímicamente; un diagnóstico sobre el conocimiento de las plantas medicinales de la península de Yucatán realizado por Méndez y Duran (1997) reveló que sólo el 12.9% agrupaba estudios de índole fitoquímica y taxonómica. De entre los padecimientos para los que se emplean las plantas medicinales en la península están los relacionados a articulaciones y huesos; cabe señalar que una misma especie medicinal puede emplearse para tratar diversos padecimientos (Durán *et al.*, 2009).

Critonia aromatisans (Asteraceae), *Montanoa grandiflora* (Asteraceae) y *Thevetia ahouai* (Apocynaceae) son, entre otras especies, empleadas en la medicina tradicional maya para tratar la inflamación de extremidades, aplicadas en forma de emplasto o como pomadas artesanales. Además, son empleadas individualmente para el tratamiento del dolor, entre otros padecimientos. Siguiendo el enfoque etnobotánico, se seleccionaron estas especies, a fin de estudiar las especies que presenten mayor actividad antiinflamatoria, mediante el estudio fitoquímico biodirigido en los modelos biológicos empleados y purificar e identificar las fracciones que podrían ser responsables de dichos efectos farmacológicos. Para la evaluación antiinflamatoria se emplearon tanto modelos *in vitro* como *in vivo*; los modelos *in vitro* incluyeron la inhibición de la producción de mediadores antiinflamatorios como óxido nítrico (NO) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), determinación de la liberación de interleucinas como IL-1 β e IL-6 y la expresión de la ciclooxygenasa-2 inducible (COX-2); los modelos *in vivo* incluyeron inducción de edema plantar con carragenina e inducción de edema del pabellón auricular con TPA. Para la caracterización química de las fracciones activas se empleó cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) y para la caracterización estructural de los compuestos puros, resonancia magnética nuclear (RMN).

1.2 ANTECEDENTES GENERALES

1.2.1 Inflamación y medicina tradicional

La inflamación es un proceso complejo que forma parte de diversas patologías y se produce debido a la reacción del organismo contra un agente que causa lesión celular, puede ser de naturaleza física, química o infectiva. La inflamación se caracteriza esencialmente, desde los tiempos de Celso, por los cuatro síntomas cardinales: rubor, tumor, calor y dolor, a los que Galeno añadió el trastorno funcional. Una de las causas que activan los mecanismos de la inflamación es, por ejemplo, cuando un tejido se hiere o infecta, lo que produce una migración celular leucocitaria con el objeto de fagocitar y destruir los microorganismos invasores y/o reparar el tejido dañado. En el caso de las enfermedades inflamatorias degenerativas tales como artritis reumatoide, la inflamación es un proceso autoinmune por lo que no hay microorganismo invasor pero se desencadenan procesos que llevan a la inflamación crónica y posible destrucción del tejido (Rubin y Strayer, 2012).

El uso de las plantas medicinales, a lo largo de la historia, ha tenido un papel importante en la búsqueda de nuevos medicamentos, ya que han provisto de una amplia gama de compuestos bioactivos, sin embargo, los fitomedicamentos actuales, no poseen necesariamente un solo compuesto bioactivo sino que contienen varios componentes que pudieran presentar un efecto sinérgico, ya sea como componentes de un extracto o fracción activa y han demostrado efectos positivos en algunas patologías. Las diversas formulaciones empleadas en la medicina tradicional yucateca para tratar la inflamación de extremidades, tienen la característica de utilizar la planta pulverizada y aplicarla de manera tópica sobre la piel (con alcohol) o bien, en forma de pomada o emplastro (con petrolato) sobre la zona afectada (Mendieta y Del Amo, 1981). Entre las especies que se encuentran registradas para esos fines y que forman parte de la herbolaria maya están: *Aconitum napellus* L. (Ranunculaceae) conocida comúnmente como acónito, su aceite es empleado como analgésico y antiinflamatorio y como jugo específicamente para la inflamación e irritación del aparato digestivo y urinario. Esta especie debe ser empleada con cuidado ya que puede producir entumecimiento, vómito, parálisis y muerte. Las hojas molidas de *Aloe vera* L. (Xanthorrhoeaceae), conocida comúnmente como sábila, se utilizan en forma de emplastro y para tratar los dolores reumáticos, como tintura. La decocción de la corteza de *Alvaradoa amorphoides* Liebm. (Simaroubaceae), conocida

comúnmente como plumajillo y ruda cimarrona, se utiliza para el tratamiento de los dolores reumáticos. Los dientes machacados de *Allium sativum* L. (Amaryllidaceae), conocida comúnmente como ajo, además de su uso antibacterial conocido, también son empleados para el tratamiento de la neuralgia y dolores reumáticos, entre otros. La infusión de la raíz de *Amaranthus spinosus* L. (Amaranthaceae), conocida comúnmente como epazote de la mula, quelita o bleo, es empleada para tratar los dolores reumáticos y la inflamación de la vejiga. *Ambrosia hispida* Pursh (Asteraceae), conocida comúnmente como margarita del mar o palma rosa de la playa, se utiliza para tratar los dolores reumáticos. Asimismo, se emplea macerada en alcohol y se aplica por medio de fricción en la zona afectada. *Metopium brownei* (Jacq) Urban (Anacardiaceae), conocida comúnmente como palo de rosa o cheche, es aplicada en forma local como antiinflamatoria y antireumática. Las hojas de la enredadera *Melothria pendula* L. (Cucurbitaceae), conocida comúnmente como chilacalotillo, chilacayotillo, pepinillo o sangría de cólera, son empleadas machacadas (local) o en decocción (oral o fomentos) para tratar la inflamación. *Mirabilis violacea* (L.) Hermerl (Nyctaginaceae), conocida comúnmente como hierba del golpe, es empleada para tratar la fiebre e inflamaciones. *Pedilanthus itzaeus* Millsp. (Euphorbiaceae), cuyo nombre Maya es *ya'axhalalche*, es empleada para el tratamiento de la inflamación en forma de loción preparada con el látex de esta hierba y es aplicada de forma local. Las hojas de la hierba *Phytolacca icosandra* L. (Phytolaccaceae), conocida comúnmente como tarasca de la negra o consora, son empleadas para el tratamiento del reumatismo mercurial y las inflamaciones de las glándulas producidas por sífilis. *Critonia aromatisans* (DC.) R.M. King & H. Rob, *Thevetia ahouai* (L.) A. DC. y *Montanoa grandiflora* Alamán ex DC., especies con uso antiinflamatorio, se describen a continuación (Mendieta y Del Amo, 1981).

1.2.2 El género *Critonia*

1.2.2.1 Características morfológicas y distribución

El género *Critonia* pertenece a la familia Asteraceae; este género lo conforman 43 especies distribuidas en el sureste de México, Centro América, América del Sur y Antillas Mayores. Lo constituyen pequeños árboles o subarbustos, vides leñosas o trepadoras; sus hojas tienen forma de lámina elíptica a ovada, entera a serrada; sus inflorescencias

son paniculadas con ramas opuestas; sus frutos glabros y dispuestos en aquenio (Browne, 1756; Benítez de Rojas, 2011).

1.2.2.2 Estudios fitoquímicos y farmacológicos

El género *Critonia* no posee estudios fitoquímicos y farmacológicos reportados en la literatura; dado que la especie objeto de estudio es *Critonia aromatisans* (sinónimo *Eupatorium hemipteropodum* y *Eupatorium aromatisans*), se presentan algunos de los reportes encontrados para el género *Eupatorium*.

Entre algunos de los estudios fitoquímicos realizados en especies de este género están los reportados para *E. perfoliatum* identificándose al ácido clorogénico, ácido neoclorogénico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 2,5-dicafeoilglucárico, ácido 3,4-dicafeoilglucárico y el ácido 2,4- y 3,5-dicafeoilglucárico (Maas *et al.*, 2008). El alcaloide pirrolizidínico lucopsamina y el guaianólido cumambrina B fueron aislados de *E. maculatum* L. (Wiedenfeld *et al.*, 2009). Existen reportes de que algunas especies de este género han mostrado actividad biológica, tal es el caso de los extractos orgánicos obtenidos a partir de *E. viscidum*, los cuales poseen un efecto inhibitor de acetilcolinesterasas hasta del 80% (Carpinella *et al.*, 2009). Las partes aéreas de *E. lindleyanum* son empleadas en la medicina tradicional china por sus propiedades antipiréticas y detoxificantes y se le atribuyen sus efectos a la presencia de sesquiterpén lactonas de tipo germacrano (Yang *et al.*, 2009). El extracto acuoso de hojas de *E. adenophorum* ha sido evaluado en su actividad molusquicida para el control de la esquistosomiasis humana (Zou *et al.*, 2009). A partir de *E. aschenbornianum* se aisló la encecanescina, la cual posee un efecto gastroprotector en modelos animales (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2010).

1.2.2.3 *Critonia aromatisans*

Esta especie fue descrita por Fuentes y col. en 1998 como un arbusto aromático de 2 a 4 m de altura; sus tallos son herbáceos, huecos, estriados y mayormente glabros; sus hojas opuestas, aovadas u aovado-lanceoladas, de 10 a 28 cm de largo y de 4.5 a 20 cm de ancho; acuminadas en el ápice, con la base truncada a cuneada y bruscamente estrechada en el pecíolo alado; inflorescencia en panículas anchas, flores blancuzcas y frutos en aquenio (Figura 1).

C. aromatisans es cultivada en la península de Yucatán, en donde se le da el nombre de “chiople”, es empleada en la medicina tradicional maya para el tratamiento de la inflamación; se puede utilizar sola o en mezcla de hierbas en forma de emplastos o linimentos, que básicamente consisten en colocar la hoja molida en un trapo sola o con vaselina y la mezcla de hierbas. También se cultiva en Cuba y se le conoce como “trébol criollo” y “trébol de olor”. Las hojas se utilizan aplicadas sobre la frente contra la cefalea, y en decocción para tratar la hidropesía; también se han empleado para aromatizar el tabaco torcido (Roig *et al.*, 1974).



Figura 1. *Critonia aromatisans* (M. Méndez, 2009).

1.2.3 El género *Thevetia*

1.2.3.1 Características morfológicas y distribución

El género *Thevetia* pertenece a la familia Apocynaceae que incluye árboles, arbustos, hierbas, o lianas. La mayoría de las especies de este género son árboles de gran tamaño que se encuentran en la selva tropical, y en gran medida en los trópicos y los subtrópicos, aunque algunas son hierbas perennes de la zona templada. Estas plantas tienen savia lechosa y muchas especies son venenosas si se ingieren. Las plantas pertenecientes al género *Thevetia* se pueden encontrar en el sur de Asia, sur y sureste de México, Centro América y norte de Sudamérica (Diego-Pérez, 2004).

1.2.3.2 Estudios fitoquímicos y farmacológicos

El género *Thevetia* es reconocido por poseer especies muy tóxicas por lo que sus estudios químicos y farmacológicos tienen relación con esta propiedad: por ejemplo, *T. peruviana* y *T. neriifolia* contienen una variedad de glicósidos de cardenólidos incluyendo el peruvósido, thevefolina, neriifolina, thevetina A y B y oleandrina (Bandara *et al.*, 2010). *T. peruviana* ha mostrado tener actividad contra células de adenocarcinoma gástrico humano (Miyagawa *et al.*, 2009; Gaitondé, 1977). También posee un efecto molusquicida, el cual puede deberse a la presencia del flavonoide 5-metil-éter de apigenina (Singh *et al.*, 2010). Estudios histopatológicos de hígado y riñón de ratas alimentadas con una mezcla que contenía 20 o 30% de semilla de *T. neriifolia* muestran que produce cambios inflamatorios y degenerativos en dichos órganos además de atrofia, erosión e inflamación en la mucosa estomacal (Pahwa *et al.*, 1990).

1.2.3.3 *Thevetia ahouai*

Es un arbusto de 2 a 5 m de alto; cuando es cortado escurre látex blanco. Sus hojas son alternas, glabras, afiladas y con la punta triangular con un color verde intenso; mide de 11 a 12 cm de largo y de 4 a 5.5 cm de ancho (Figura 2). Esta planta puede ser encontrada desde México hasta el norte de Sudamérica, en donde se le conoce con diversos sinónimos tales como: *Cerbera ahouai*, *Cerbera nitida*, *Chica sylvestre*, *Chica venenosa*, *Plumeriopsis ahouai*, *Thevetia nitida* y *Thevetia calophylla*. Los nombres comunes de *Thevetia ahouai*, dependiendo de la región, son: cojón de perro, chilindrón (Guatemala), cojotón, cojón de mico (Belice), yambigo (Oaxaca), *He' pek'*, huevos de perro y huevo de gato (De la Rosa *et al.*, 2005).

Las hojas, los frutos y el látex son tradicionalmente empleados para el tratamiento de las hemorroides. El látex también es usado para el dolor de muelas y las hojas en forma de emplasto para el tratamiento del reumatismo. En lo que respecta a estudios químicos de esta especie se ha reportado en las hojas el aislamiento de veinte saponinas, junto con α -amirina; alcaloides y terpenos se han reportado como compuestos pertenecientes a los frutos. Por otro lado, el estudio biológico de las hojas ha mostrado poseer actividad antipromastigote contra *Leishmania sp.* (De la Rosa *et al.*, 2005; Endo y Warashina, 1997).



Figura 2. *Thevetia ahouai* (M. Méndez, 2009).

La búsqueda de nuevos metabolitos efectivos y potentes contra ciertos efectos biológicos ha llevado al estudio de plantas que podrían ser tóxicas y, en este caso, dado que esta especie es empleada por la medicina tradicional yucateca, el conocer más sobre sus componentes activos por medio de la evaluación en modelos biológicos, incluyendo estudios toxicológicos, permitirá además del aislamiento y elucidación de compuestos, transmitir información a la población consumidora, sobre el uso de esta especie.

1.2.4 El género *Montanoa*

1.2.4.1 Características morfológicas y distribución

El nombre de este género conmemora al botanista amateur y político mexicano del siglo XVIII Luis Montana y es uno de los pocos géneros en la familia Asteraceae que consiste en árboles y arbustos. El género se localiza en el sureste de México, América central y en el norte de Sudamérica (Pérez-Amador *et al.*, 2006).

1.2.4.2 Estudios químicos y farmacológicos

Se ha reportado que los extractos crudos de *M. tomentosa* tienen un efecto afrodisíaco en ratas macho. Las moléculas bioactivas son los diterpenos, ácido kaurenoico, ácido grandiflorénico y ácido monoginoico. (Villa-Ruano *et al.*, 2009; Carro-Juárez *et al.*, 2004). Las partes aéreas de *M. hibiscifolia* contienen eudesmanólidos montabibisciolidos, germacranólidos, melampólidos y sesquiterpén.lactonas. Estos últimos mostraron un efecto inhibitorio en el ADN en la unión del factor de transcripción NF-kappa β (Müller *et al.*, 2004).

1.2.4.3 *Montanoa grandiflora*.

M. grandiflora, también conocida como *Ericoma hartwegiana*, es un arbusto perenne de 10 a 15 pies de alto, sus hojas son ovadas arriba de 10 pulgadas de largo, con márgenes dentados. Las flores tienen 7 u 8 pétalos y son esféricas, blancas con un centro amarillo de diámetro arriba de 2 pulgadas. Las flores son usadas como ornamentales (Figura 3). Esta planta posee una fragancia resinosa y se le conoce como "árbol de margarita". En la medicina tradicional se emplean las hojas de esta planta para tratar el dolor de estómago y en emplasto para tratar el reumatismo. El análisis de los aceites esenciales de las inflorescencias, tallos y hojas mostró la presencia de limoneno, citronello, campheno, pineno y felandreno (Pérez-Amador *et al.*, 2006). Del extracto clorofórmico de *M. grandiflora* se obtuvo el compuesto 6 β -hidroxi-germacradien-8,12-olido (6-epi-desacetillaurenobiólido) (Quijano *et al.*, 1984). Por otro lado, no se han encontrado reportes sobre estudios de actividad biológica para esta especie.



Figura 3. *Montanoa grandiflora* (M. Méndez, 2009).

1.3 JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de nuevos compuestos con actividad farmacológica pretende producir medicamentos potentes, efectivos, específicos, con pocos efectos adversos y sobretodo económicos, y en este caso, que lleven a la solución o disminución de la inflamación, pues es importante para mejorar la calidad de vida de los afectados. El estudio de los productos naturales brinda la oportunidad de elaborar nuevos medicamentos y/o sustentar y fomentar el uso de las plantas medicinales, ya que se ha

demostrado a lo largo de la historia que numerosas especies vegetales que tienen uso medicinal constituyen fuentes potencialmente valiosas para la obtención de compuestos bioactivos que pueden proveer prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos medicamentos. Nuestro país posee una gran tradición en el empleo de plantas con fines medicinales, la cual se remonta a la época prehispánica y ha permanecido hasta la actualidad. En la península de Yucatán, el conocimiento Maya ancestral sobre las plantas localizadas en esta zona ha proporcionado remedios que gran parte de la población yucateca hace uso para el tratamiento de diversas enfermedades, y existen pocos estudios multidisciplinarios que involucren investigaciones etnomédicas, químicas y farmacológicas de especies vegetales nativas y valiosas por sus propiedades medicinales. Para lograr el aislamiento de un metabolito o la obtención de un extracto bioactivo se necesita una especie vegetal con potencial, por este motivo, el presente trabajo se enfocó en la búsqueda de especies empleadas en la medicina tradicional yucateca para el tratamiento de la inflamación. En los géneros *Critonia*, *Thevetia* y *Montanoa* se han encontrado metabolitos con propiedades antiinflamatorias. Estos estudios ponen en evidencia que los géneros mencionados contiene compuestos bioactivos cuyos efectos podrían justificar el uso etnomédico que se le atribuye en la medicina tradicional lo que los hace candidatos idóneos para la búsqueda de nuevos fármacos. *Critonia aromatisans*, *Thevetia ahouai* y *Montanoa grandiflora* son tres especies nativas de la península de Yucatán empleadas en la medicina tradicional que, a la fecha, no han sido objeto de estudios fitoquímicos y farmacológicos encaminados a la purificación de metabolitos secundarios bioactivos. Con base en estas consideraciones, tomando un criterio etnomédico, se planteó en el presente proyecto evaluar el efecto antiinflamatorio de los extractos orgánicos obtenidos a partir de las hojas de *Critonia aromatisans*, *Thevetia ahouai* y *Montanoa grandiflora* mediante el estudio fitoquímico biodirigido, a fin de seleccionar las especies que presenten mayor actividad en los modelos biológicos empleados y purificar e identificar las fracciones que podrían ser responsables de dichos efectos farmacológicos.

1.4 HIPÓTESIS

Los extractos orgánicos obtenidos a partir de las hojas de *Critonia aromatisans*, *Thevetia ahouai* y *Montanoa grandiflora* contienen metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antiinflamatorio de los extractos orgánicos preparados a partir de las hojas de *Critonia aromatisans*, *Thevetia ahouai* y *Montanoa grandiflora*, a fin de seleccionar las especies que presenten mayor actividad y mediante el estudio fitoquímico biodirigido identificar sus fracciones activas.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo* de los extractos orgánicos preparados a partir de las hojas de *Critonia aromatisans*, *Thevetia ahouai* y *Montanoa grandiflora* en el ensayo de inducción de edema plantar con carragenina.
2. Evaluar la toxicidad oral aguda del extracto que presente mayor actividad en el monitoreo antiinflamatorio preliminar.
3. Evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* de las fracciones o compuestos bioactivos mediante el efecto de éstos sobre los mediadores de inflamación como son NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 y la enzima COX-2.
4. Seleccionar, para cada caso, los extractos activos y realizar el fraccionamiento biodirigido.
5. Elucidar las estructuras de los componentes mayoritarios, mediante el empleo de métodos espectroscópicos y espectrométricos.

1.6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se realizó un monitoreo de la actividad biológica empleando los modelos antiinflamatorios, para seleccionar la especie activa y continuar con el fraccionamiento biodirigido (Figura 4).

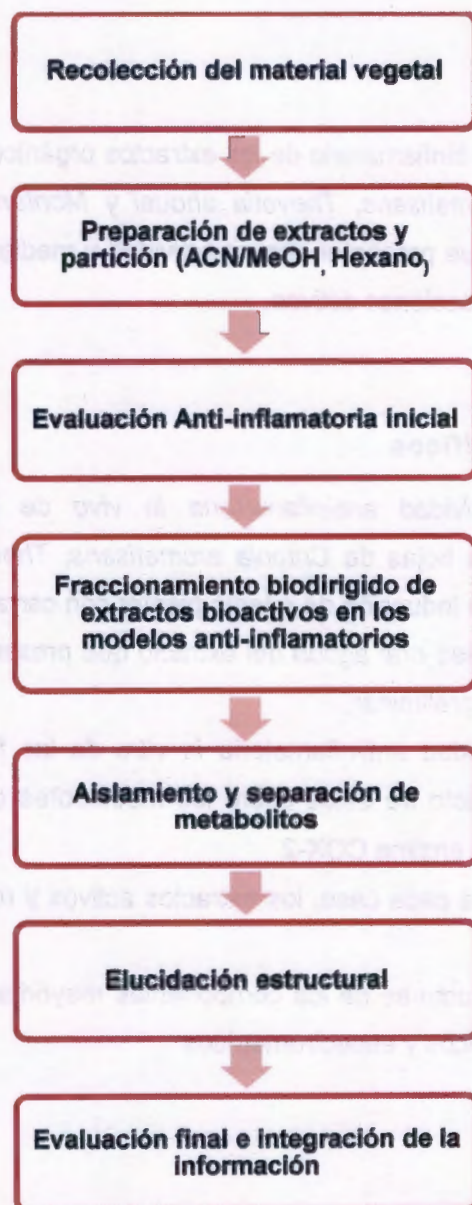


Figura 4. Esquema de la estrategia experimental.

1.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez-Nemegyei, J., Peláez-Ballestas, I., Rodríguez-Amado, J., Sanin, L.H., García-García, C., Garza-Elizondo, M.A., Loyola-Sánchez, A., Burgos-Vargas, R., Goycochea-Robles, M.V. (2011). Prevalence of rheumatic regional pain syndromes in adults from Mexico: a community survey using COPCORD for screening and syndrome-specific diagnostic criteria. *J Rheumatol Suppl*, 86, 15-20.
- Ankli, A., Heinrich, M., Bork, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., Schmid, C., Weiss, C., Bruggisser, R., Gertsch, J., Wasescha, M. and Sticher, O. (2002). Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *J Ethnopharmacol*, 79, 43-52.
- Bandara, V., Weinstein, S.A., White, J., Eddleston, M., (2010). A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. *Toxicon*, 56, 273-81.
- Browne, P. (1756). *Crítoria*. Civ Nat. Hist. Jamaica, 490 p.
- Carpinella, M.C., Androne, D.G., Ruiz, G. y Palacios, S.M. (2009). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts from Argentina. *Phytother Res*, 24, 259-63.
- Carro-Juárez M., Cervantes, E., Cervantes-Méndez, M., Rodríguez-Manzo, G., (2004). Aphrodisiac properties of *Montanoa tomentosa* aqueous crude extract in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 78, 129-34.
- De la Rosa-Torres, C., Márquez-Vizcaíno, R.L., Mendoza-Mendoza, D., Prieto-Galvis, E., Anillo-Anillo, G., (2005). Actividad Antinflamatoria y Antifúngica de *Thevetia ahouai*. *Actual Biol*, 27, 31-34.
- Endo, H. and Warashina, T., (1997). Cardenolide glycosides from *Thevetia ahouai* (Linn.) A.DC. *Chem Pharm Bull*, 45, 1536-1538.
- Gaitondé B.B., Joglekar S.N., (1977). Mechanism of neurotoxicity of cardiotonic glycosides. *Br J Pharmacol*, 59, 223-9.
- Maas, M., Petereit, F., Hensel, A. (2008). Caffeic acid derivatives from *Eupatorium perfoliatum* L. *Molecules*, 14, 36-45.
- Mallavadhani, U.V., Panda, A.K. and Rao Y.R. (1998). Pharmacology and chemotaxonomy of *Diospyros*. *Phytochemistry*, 4, 901-51.

- Mendieta, R.M., Del Amo, R.S., (1981). Plantas Medicinales del Estado de Yucatán. CECSA, Xalapa, Veracruz.
- Miyagawa, T., Ohtsuki, T., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Ishibashi, M., *Cardenolide glycosides of Thevetia peruviana and triterpenoid saponins of Sapindus emarginatus as TRAIL resistance-overcoming compounds.* J Nat Prod, 72, 1507-11.
- Müller, S., Murillo, R., Castro, V., Brecht, V., Merfort, I., (2004). Sesquiterpene lactones from *Montanoa hibiscifolia* that inhibit the transcription factor NF-kappa B. J Nat Prod, 67, 622-630.
- OMS, Organización Mundial de la Salud 1: Consultado en octubre del 2013
http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
- OMS, Organización Mundial de la Salud 2: consultado en noviembre del 2009
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/es/>
- OMS, Organización Mundial de la Salud 3: consultado en noviembre del 2009
<http://www.who.int/dg/speeches/2008/20081107/es/>
- Pahwa, R. and Chatterjee, V.C. (1990). The toxicity of yellow oleander (*Thevetia neriifolia* juss) seed kernels to rats. Vet Hum Toxicol, 32, 561-4.
- Perez-Amador, M.C., Muñoz v., Noyola, A. (2006). Essential oil and phytotoxic compounds in *Clibadium surinamens* L. and *Montanoa grandiflora* D.C. (Asteraceae). Rev Intern Bot Exp, 75, 145-150.
- Quijano, L., Calderón J.S., Gómez, G.F., (1984). The crystal structure of 6-epi-desacetyl-laurenobiolide, a germacra-1(10),4-diene-12,8 α -olide from *Montanoa grandiflora*. Phytochem, 23, 1971-1974.
- Roig, J.T. (1974). Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana: Instituto del Libro. P 949.
- Sánchez-Mendoza, M.E., Reyes-Trejo, B., Sánchez-Gómez, P., Rodríguez-Silverio, J., Castillo-Henkel, C., Cervantes-Cuevas, H., Arrieta, J. (2010). Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer chromene from *Eupatorium aschenbornianum*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. Fitoterapia, 81, 66-71.
- Singh, S.K., Yadav, R.P., Singh, A., (2010). Molluscicides from some common medicinal plants of eastern Uttar Pradesh, India. J Appl Toxicol, 30, 1-7.

- Villa-Ruano, N., Betancourt-Jiménez, M.G., Lozoya-Gloria, E. (2009). Biosynthesis of uterotonic diterpenes from *Montanoa tomentosa* (zoapatle). J Plant Physiol, 166, 1961-1967.
- Wiedenfeld H., Hösch, G., Roeder, E., Dingeramn, T. (2009). Lycopsamine and cumambrin B from *Eupatorium maculatum*. Pharmazie, 64, 415-416.
- Yang, N.Y., Duan, J.A., Shang, E.X., Tian, L.J.(2009). Analysis of sesquiterpene lactones in *Eupatorium lindleyanum* by HPLC-PDA-ESI-MS/MS. Phytochem Anal, 2, 144-149.
- Zou, F.C., Duan, G., Xie, Y.J., Zhou, Y., Dong, G.D., Lin, R.Q., Zhu, X.Q. (2009). Molluscicidal activity of the plant *Eupatorium adenophorum* against *Oncomelania hupensis*, the intermediate host snail of *Schistosoma japonicum*. Ann Trop Med Parasitol, 103, 549-53.

CAPITULO II

Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo* y toxicológica preliminar de extractos de *Critonia aromatisans*, *Thevetia ahouai* y *Montanoa grandiflora*, selección y fraccionamiento de extractos activos

2.1 INTRODUCCIÓN

La inflamación es el mecanismo fisiológico que opera en un ambiente restringido para erradicar un tejido infectado o moribundo. Usualmente está diseñado para sanar al organismo, destruyendo intrínsecamente lo que le rodea de forma inmediata (Ahmed *et al.*, 1995). Durante el desarrollo de la respuesta inflamatoria, ocurre una vasodilatación que incrementa el flujo sanguíneo que transporta el contenido celular liberado por las células dañadas, además lleva leucocitos (células inflamatorias como mastocitos, macrófagos, linfocitos y polimorfonucleares) atraídos al área dañada. Las células de defensa activadas, como los macrófagos, liberan mediadores inflamatorios como el óxido nítrico (NO), proteínas plasmáticas, citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF), neuropéptidos, histamina, serotonina, iones de potasio, bradiquinina y metabolitos derivados del ácido araquidónico como las prostaglandinas (PG), entre otros (Rang *et al.*, 1991; Gallin and Snyderman, 1999). En las lesiones inflamatorias, las enzimas inducibles ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), son principalmente responsables para la síntesis de PG y NO, respectivamente. Si la inflamación sobrepasa el control localizado, se genera una respuesta sistémica generalizada y las sustancias liberadas potencian la respuesta inflamatoria activando más células inflamatorias y endoteliales en compartimentos vasculares remotos del sitio inicial de la inflamación. Esta respuesta inmune mal dirigida y sin regulación lleva a la inflamación generalizada del cuerpo, coagulopatías y daños en los tejidos. Si persiste, se logra ocasionar una disfunción en los órganos y eventualmente la muerte (Brenner *et al.*, 1989; Ahmed *et al.*, 1995).

Los mediadores pro inflamatorios pueden ser medidos para el monitoreo de la actividad antiinflamatoria *in vivo* e *in vitro* de medicamentos y productos naturales, para esto, los bioensayos más empleados son:

a) Inducción de edema plantar con carragenina al tejido subplantar de rata o ratón como agente edematógeno: La carragenina es un polímero aniónico lineal compuesto por

1,3- α -1,4- β -galactanos con grupos sulfato en los carbonos, 2, 4 o 6, (mucopolisacárido) obtenido de la pared celular de algas marinas rojas de la clase *Rhodophyta*. Al administrar esta sustancia de forma subcutánea en disolución al 1%, provoca una reacción inflamatoria mediada por la liberación de histamina, serotonina, bradiquinina y prostaglandinas, entre otros; una hora después de la administración del extracto, la histamina y la serotonina son los principales mediadores involucrados. Después, los mediadores involucrados son las quininas y ocurre la migración celular principalmente de leucocitos polimorfonucleares, y por último las prostaglandinas. La respuesta vascular máxima coincide con la fase mediada por las prostaglandinas, pero la extravasación de proteínas ocurre durante toda la respuesta al agente edematógeno (Garrido, 2001). Existen otros agentes edematógenos que se pueden emplear para este ensayo, como por ejemplo dextrans, histamina, serotonina, entre otros (Tillán-Capo *et al.*, 2007).

b) Inducción de edema del pabellón auricular con TPA: El acetato de tetradecanoil forbol (TPA) es un agente edematógeno tópico que actúa sobre la estimulación del metabolismo del ácido araquidónico, específicamente sobre las ciclooxigenasas, produciéndose la liberación de prostaglandinas responsables del edema. Lo que se evalúa en este ensayo es la inhibición de la producción del edema al administrar el extracto con potencial antiinflamatorio (Carlson *et al.*, 1985). Además, causa la formación de tumores, ya que estimula la proteína cinasa "C" (PKC), que desempeña un papel fundamental en la transducción de señales y regula el crecimiento y la diferenciación celular (Nishizuka, 1992).

c) Determinación de la producción de NO: El óxido nítrico es un mediador inflamatorio sintetizado por la enzima NO sintasa a partir del aminoácido L-arginina. En este ensayo se busca que el compuesto o extracto a evaluar inhiba la producción de este mediador en macrófagos, ya que la sobreproducción de NO está implicada en la patogénesis de la inflamación crónica, de infecciones y trastornos relacionados. Incluso, inhibidores del NO son agentes con una potente actividad quimiopreventiva frente al cáncer (Hofseth, 2008).

b) Determinación de prostaglandina E2 (PGE₂): La PGE₂ es el principal metabolito de la ruta de la ciclooxigenasa 2 (COX-2). Su formación resulta de la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana celular mediante enzimas fosfolipasas y convertido a PGE₂ por la vía de la COX-2 y otras enzimas PGE₂ sintasas. Numerosos

estudios avalan el papel de este mediador en la patogénesis de diversos trastornos crónicos, como los procesos inflamatorios, esclerosis múltiple, el Parkinson, el Alzheimer y el cáncer. En este ensayo se busca que el extracto o compuesto de prueba disminuya la producción de esta prostaglandina en los macrófagos (Wu *et al.*, 2008).

Los medicamentos más empleados para tratar la inflamación son los AINEs (Anti-Inflamatorios No Esteroideos). Entre ellos se encuentran el diclofenaco, sulindaco, naproxeno, paracetamol, metamizol sódico, ibuprofeno, ácido acetil salicílico, entre otros. Estos medicamentos actúan inhibiendo la producción de prostaglandinas, mediante la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2, por lo que se les conoce como no selectivos. Dado que estas enzimas no sólo producen compuestos proinflamatorios si no compuestos útiles en otros órganos o sistemas, se desarrolló un nuevo tipo de compuestos, los COXIBs (rofecoxib, celecoxib, parecoxib, etoricoxib y valdecoxib), que actúan selectivamente sobre la enzima COX-2, disminuyendo así algunos efectos adversos. En general, los compuestos que inhiben y/o regulan los productos de las enzimas COX-2/iNOS, o que inhiben la liberación de las citocinas o demás mediadores podrían tener un efecto antiinflamatorio (Flores, 2005).

En la medicina tradicional de diversas culturas se emplean una infinidad de plantas de las que se han demostrado sus efectos antiinflamatorios; sólo por mencionar algunos ejemplos son el extracto etanólico de corteza de *Daphne retusa* H. y el extracto etanólico de frutos de *Rosa multiflora* T. (China), el extracto etanólico de hojas de *Rhododendron ponticum* L. (Turquía), el extracto metanólico de frutos de *Forsythia koreana* (Corea del Sur) y el mucílago de *Opuntia ficus-indica* (México), entre otras (Hu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Erdemoglu *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2008; Vázquez-Ramírez *et al.*, 2006).

En el presente trabajo se realizó la evaluación antiinflamatoria *in vivo* de *C. aromatisans*, *T. ahouai* y *M. grandiflora* empleando los ensayos de inducción de edema plantar e inducción de edema del pabellón auricular e *in vitro* en los ensayos de inhibición de la producción de NO. Además, el extracto que presentó mayor actividad fue evaluado en el modelo de toxicidad oral aguda.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Selección de extractos activos

2.2.1.1 Recolección y preservación del material vegetal

Considerando un criterio etnomédico se recolectaron en la localidad de Yaxcabá, hojas provenientes de árboles y/o arbustos de *Critonia aromatisans* (A. Dorantes colecta 134, octubre de 2009), *Thevetia ahouai* y *Montanoa grandiflora* (M. Méndez colecta 1752 y 1754, junio de 2010). Las hojas fueron secadas en una estufa a 37 °C y una vez secas se procedió a su preservación mediante el empleo de bolsas con cierre hermético. Los ejemplares de referencia herborizados, se depositaron en el herbario de la Unidad de Recursos Naturales del CICY. Para la identificación de las especies se contó con la participación de la Dra. Marta Méndez de la Unidad de Recursos Naturales del CICY.

2.2.1.2 Obtención de los extractos

Las hojas secas pulverizadas de las tres especies, fueron maceradas con metanol (MeOH) a temperatura ambiente por tres días, separando el filtrado de la parte sólida mediante filtración. El filtrado fue secado a vacío por medio del empleo de un evaporador rotatorio, repitiendo el proceso tres veces. Los extractos metanólicos secos de cada especie fueron preservados en refrigeración hasta su uso. A partir del extracto metanólico, se pesó 1 g de material seco y se realizó una partición con acetonitrilo/metanol (3:1) y hexano en una proporción 3:1, con lo que se obtuvieron dos fracciones de distinta polaridad, la fracción ACN/MeOH y la fracción hexánica.

2.2.2 Animales

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar de 200-220 g proporcionadas por el bioterio del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la UADY y ratones de la cepa BALB/c de 20-25 g de ambos sexos, proporcionados por el bioterio del Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente (CIBO) del IMSS.

2.2.3 Administración de los extractos y dosis para las evaluaciones *in vivo*

Los extractos metanólicos totales de las especies vegetales fueron administrados en las ratas a una dosis de 500 mg/Kg. Se formaron 4 grupos de 3 ratas c/u. A un grupo

se le administró *C. aromatisans*, al siguiente *T. ahouai*, al siguiente *M. grandiflora* y al último, únicamente solución salina (grupo control). El grupo control fue tomado como el 100% de inflamación. Las particiones ACN/MeOH (3:1) y Hx se administraron en ratones BALB/c a una dosis de 200 mg/Kg. Se formaron 8 grupos de 5 ratones c/u, de los cuales 6 grupos fueron administrados con las particiones correspondientes a cada especie y al grupo 7 se le administró indometacina (10 mg/Kg) como control positivo. Al último grupo, únicamente se le administró solución salina y fue tomado como grupo control negativo. Los extractos y particiones fueron disueltos en solución salina al 0.85% empleando Tween 80 al 5% para integrar las fases; una vez preparada la mezcla, ésta fue administrada a cada grupo en un volumen de 1.5 mL en ratas y 100 μ L en ratón por vía oral mediante una cánula conectada a una jeringa.

2.2.4 Inducción de edema plantar con carragenina

Se midió la pata de cada rata y ratón con un vernier o un micrómetro, respectivamente, antes de administrar los extractos y el control. Los extractos de prueba y el control fueron administrados por vía oral y 30 minutos después de la administración cada ratón fue inyectado con una suspensión fresca preparada con carragenina (1 mg/25 μ L) en solución salina fisiológica (154 mM NaCl) en el tejido subplantar de la pata trasera izquierda, para inducir inflamación. El edema de la pata fue medido a las 3 h después de la inducción de la inflamación. El valor de la media de los grupos tratados fueron comparados con el valor de la media de un grupo control y analizado empleando métodos estadísticos. Indometacina (10 mg/kg) fue empleado como fármaco de referencia.

2.2.5 Inducción de edema en el pabellón auricular inducido por TPA

Este ensayo fue realizado únicamente en ratones para evaluar las particiones. Se midió la oreja derecha de cada ratón con el micrómetro en condiciones basales (sin el extracto y sin el agente edematógeno). Se preparó una solución de TPA de 1,000 μ g/1mL y pasados 30 minutos de la administración del extracto por vía oral se administraron 10 μ L de la solución de TPA por vía tópica en la oreja derecha a cada animal y 3 h después se realizó la medición del edema.

2.2.6 Actividad anti-inflamatoria *in vitro* de extractos obtenidos de *C. aromatisans* y *M. grandiflora*

2.2.6.1 Cultivo celular

Se extrajeron macrófagos peritoneales de ratones NIH mediante la inyección de solución salina isotónica en la cavidad intraperitoneal, se presionó aleatoriamente la cavidad abdominal por 2 min y se extrajo el líquido administrado previamente, el cual fue colocado en tubos Falcon de 15 mL. El contenido peritoneal fue centrifugado a 1,500 rpm por 10 min a 4 °C. El botón celular fue lavado con PBS y centrifugado nuevamente en las mismas condiciones. El botón celular obtenido fue resuspendido en medio Eagle's modificado por Dubelcos (DMEM); suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 50 µg/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina. Esta prueba se realizó en placas de 96 pozos utilizando 5×10^5 células por pozo. Las células fueron incubadas a 37°C por 24 h en una atmósfera humidificada conteniendo 5% CO₂.

2.2.6.2 Determinación de NO en macrófagos peritoneales de ratón NIH

El análisis del NO se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Green y colaboradores (1982), con algunas modificaciones. Los macrófagos cultivados se incubaron bajo condiciones de esterilidad durante 24 h a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Posteriormente, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de 10, 100, 500 y 1,000 µg/mL de extracto ACN/MeOH y extracto hexánico, las placas se dejaron incubar por 24 h, posteriormente las células fueron estimuladas con LPS a una concentración de 1 mg/mL y se incubaron por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación se tomaron 50 µL del sobrenadante, los cuales fueron transferidos a una placa de 96 pozos, y se le añadieron 50 µL del reactivo de Greiss. La placa se incubó durante 10 min y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas Multiskant Ascent (Thermo). Se empleó una curva estándar de nitrito de sodio para obtener las concentraciones en µM de las muestras (Nacimiento *et al.*, 2003).

2.2.6.3 Viabilidad celular

Una vez retirado el sobrenadante de las células, para determinar que las propiedades inhibitorias ejercidas por los extractos no fue debido a efectos citotóxicos se realiza la prueba de MTT (5 mg/mL) que consistió en colocar la sal de tetrazolio en las células e incubar por 4 h. Transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante y se añadió reactivo de Sorensen y DMSO, las placas se dejaron reposar durante 10 min y se leyó la absorbancia en un lector de placas a 570 nm.

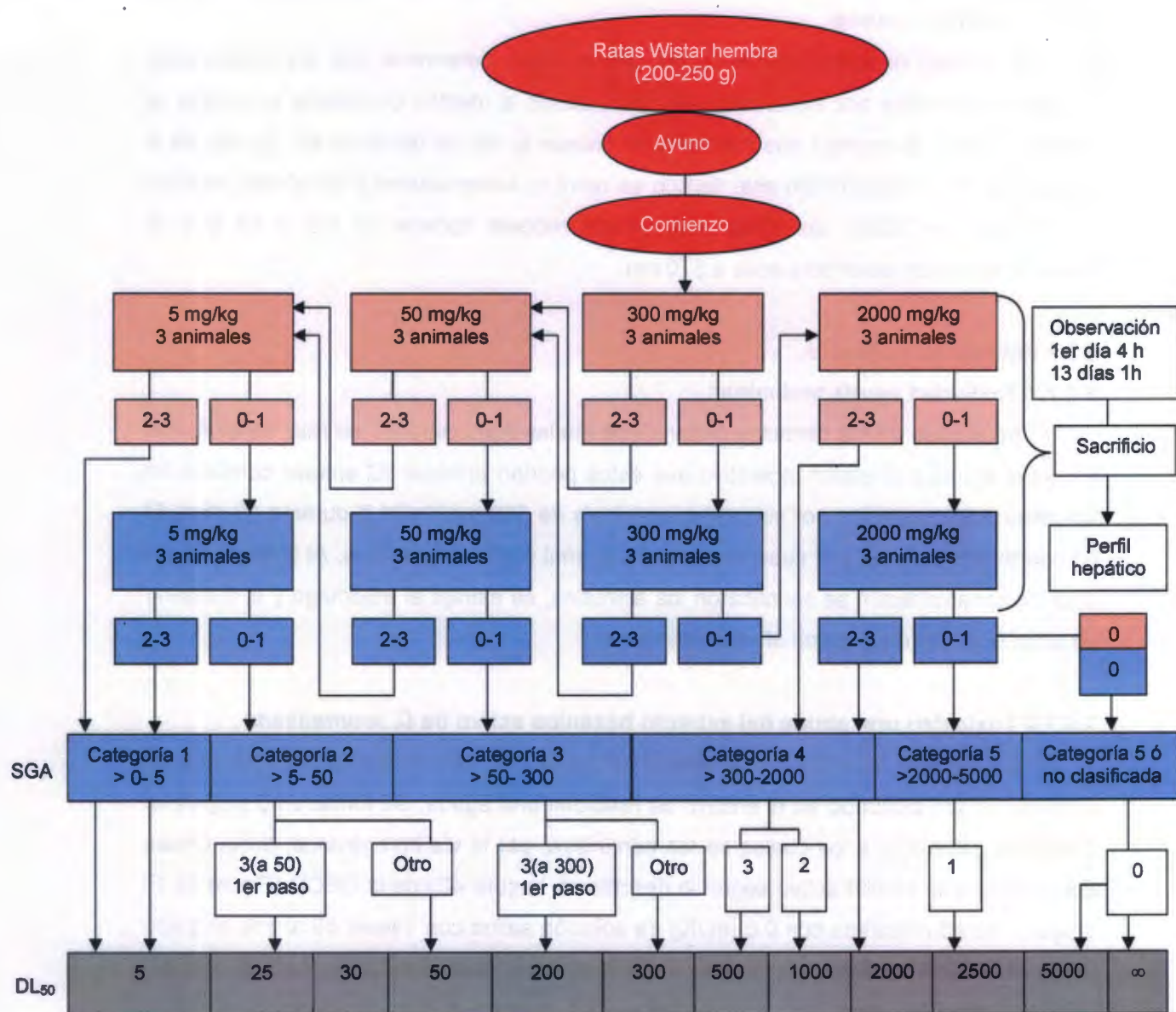
2.2.7 Estudio toxicológico

2.2.7.1 Toxicidad aguda preliminar

En el caso de los extractos metanólicos totales administrados en rata, se evaluó la toxicidad aguda y el efecto ulcerativo que éstos podrían producir. El ensayo consistió en administrar los extractos por vía oral a una dosis de 500 mg/Kg/24 h durante 10 días. El comportamiento diario y la supervivencia del animal fueron registrados. Al finalizar los 10 días de administración se sacrificaron los animales, se extrajo el estómago y el duodeno de cada uno y se observaron al estereoscopio.

2.2.7.2 Toxicidad oral aguda del extracto hexánico activo de *C. aromatisans*

El extracto que presentó mayor actividad en los modelos antiinflamatorios empleados, fue evaluado en el ensayo de toxicidad oral aguda. Se formaron 3 grupos de 4 ratones cada uno, a los cuales se les administró, por la vía intragástrica, dosis únicas del extracto que resultó activo según lo descrito en la guía 423 de la OECD (Figura 5). El grupo 1 fue administrado con 0.5 mL/Kg de solución salina con Tween 80 al 5%, el grupo 2 con el extracto hexánico a una dosis de 300 mg/Kg y, finalmente, el grupo 3, el extracto hexánico en una dosis de 2,000 mg/Kg. Los ratones fueron observados por 4 h posteriores a la administración poniendo especial atención en los cambios y alteraciones en comportamiento y pelaje. Los parámetros a observar fueron: respiración, prurito, letargo, erizamiento del pelaje, consumo excesivo de agua, cambios en ojos y mucosas, alteraciones en la marcha, postura y manipulación, somnolencia, exceso de aseo, convulsiones, salivación, diarrea, automutilación, coma, muerte. Transcurrido este tiempo los ratones fueron pesados diariamente y observados durante 14 días por 1 h diaria de manera aleatoria (Walum, 1998; OECD, 2001).



0, 1, 2, 3: Número de animales moribundos o muertos

SGA: Sistema Globalmente Armonizado

DL₅₀: Dosis Letal media

Figura 5. Determinación de la toxicidad oral aguda del extracto hexánico en ratas Wistar según la guía 423 de la OECD.

Posteriormente se repitió el ensayo con 3 grupos de ratas con 3 ratas cada grupo con las mismas dosis administradas en ratón. Después de la administración, las ratas fueron observadas 4 h (los mismos parámetros que los de los ratones) y en el transcurso de los 14 días por 1 h diaria. Transcurrido este tiempo, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico a una dosis de 50 mg/Kg (ip), sacrificadas mediante dislocación cervical y por punción cardiaca se obtuvieron muestras de sangre para realizar el perfil hepático por métodos rutinarios de laboratorio (Laboratorio de Análisis Clínicos de Servicio a la Comunidad, FQ-UADY). En este estudio se evaluaron los siguientes parámetros: proteína total (PT), albúmina (Alb), globulinas (Glob), relación albúmina/globulinas (A/G), bilirrubina total (BT), bilirrubina directa (BD), bilirrubina indirecta (BI), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (ALP). Los datos fueron comparados con el grupo sano control.

2.2.8 GC-MS

Los análisis preliminares de los extractos hexánicos se realizaron con un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (marca Agilent Technologies 5975B y 6890N, respectivamente) equipado con una columna capilar HP-5 MS (30 m × 25 mm × 0.25 micras), empleando helio como gas acarreador, y un volumen de inyección de un microlitro. La temperatura utilizada fue de 80 °C (3 min) con una temperatura inicial de 50 °C (5 min), con incrementos hasta 215 °C a 4 °C/min y la temperatura mantenida a 215 °C durante 5 min. La identificación de los componentes se basó en la comparación de sus espectros de masas con los de la librería NIST05.

2.2.9 Análisis estadístico

Tanto para las evaluaciones *in vivo* como *in vitro*, los valores experimentales se expresan como la media ± error estándar de la media (SEM) siendo los experimentos realizados por triplicado. Los datos fueron analizados usando un modelo lineal ANOVA de una sola vía con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, utilizando PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, versión 5:01). En ambos casos, $p \leq 0.05$ fue usado como criterio de significancia estadística (muestra frente a control).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Evaluación de los extractos totales en el modelo de inducción de edema plantar con carragenina en rata

En el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos para esta evaluación, donde se observa que el extracto que mostró mayor inhibición de la inflamación fue *T. ahouai* con 21.5% de reducción de la inflamación.

Cuadro 1. Efecto de los extractos metanólicos totales de *T. ahouai*, *C. aromatisans* y *M. grandiflora* en ratas Wistar con edema en el cojinete plantar inducido con carragenina.

Extracto	Dosis p.o. (mg/Kg)	Grosor del cojinete plantar a las 3 h ($\times 10^{-2}$ mm) $\pm$ D.E.	Inflamación (%)
Control con Carragenina al 1%	Sol. salina y Tween 80 al 5%	498 $\pm$ 11.7	100
<i>T. ahouai</i> MeOH	500	390.8 $\pm$ 7.2 *	78.5
<i>C. aromatisans</i> MeOH	500	432.8 $\pm$ 2.7 *	86.8
<i>M. grandiflora</i> MeOH	500	405.2 $\pm$ 13.7 *	81.3

Nota: Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Datos marcados con * muestran una significancia $P < 0.05$.

2.3.2 Evaluación de las particiones en el modelo de inducción de edema plantar con carragenina en ratón

En el grupo del control negativo se observó una inflamación de 44×10^{-2} mm y esto fue tomado como 100 % de inflamación del tejido subplantar de la pata izquierda; tomando este valor como comparativo. En el cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos para cada partición donde se observa que el extracto ACN/MeOH de *T. ahouai* y el extracto Hx tienen 44.4 y 74.3% de inflamación, respectivamente. Esto representa 55.6 y 25.7% de inhibición de la inflamación. Estos resultados sugieren que los metabolitos responsables del efecto antiinflamatorio se localizan principalmente en la partición polar de ACN/MeOH.

Cuadro 2. Efecto de las particiones ACN/MeOH y Hx de *T. ahouai*, *C. aromatisans* y *M. grandiflora* en ratones BALB/c con edema en el cojinete plantar inducido con carragenina.

Extracto	Dosis p.o. (mg/Kg)	Grosor del cojinete plantar a las 3 h ($\times 10^{-2}$ mm) $\pm$ D.E.	Inflamación (%)
Control con Carragenina al 1%	Sol. salina y Tween 80 al 5%	44 ± 6.2	100
Indometacina	10	2.4 ± 1.6 ***	4.5
<i>T. ahouai</i> ACN/MeOH	200	19.8 ± 15.8 **	44.4
<i>T. ahouai</i> Hx	200	33.0 ± 8.8	74.3
<i>C. aromatisans</i> ACN/MeOH	200	1.8 ± 4.7 ***	3.4
<i>C. aromatisans</i> Hx	200	3.6 ± 2.7 ***	6.7
<i>M. grandiflora</i> ACN/MeOH	200	33.9 ± 12.4	76.3
<i>M. grandiflora</i> Hx	200	23.3 ± 14 *	41.6

Nota: Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Datos marcados con * muestran una significancia $P < 0.05$; datos marcados con ** muestran significancia $P < 0.01$; datos marcados con *** muestran significancia $P < 0.001$.

Las particiones ACN/MeOH y Hx, provenientes de *C. aromatisans* mostraron poseer efecto antiinflamatorio con una reducción de la inflamación del 96 y 92%, respectivamente, lo que sugiere que hay más de un grupo de metabolitos antiinflamatorios y se encuentran distribuidos entre las dos polaridades, además, existe la posibilidad de poseer un efecto sinérgico.

En el caso de *M. grandiflora*, la partición ACN/MeOH redujo la inflamación 23.7% y la partición hexánica 58.4%. Estos resultados sugieren que los metabolitos responsables del efecto antiinflamatorio se encuentran en la partición de menor polaridad.

2.3.3 Inducción de edema en el pabellón auricular por TPA en ratón

En el cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos al realizar la evaluación de inducción de edema en el pabellón auricular en ratón. En el caso de *T. ahouai*, no se realizó la evaluación debido a que la dosis de 200 mg/Kg mostró un efecto tóxico desde el inicio del experimento y no se procedió a continuar con la administración de los demás agentes edematógenos, en este caso el TPA. Sin embargo, en el caso de *M. grandiflora*, no se observó disminución del edema en el pabellón auricular, en este caso no se encontró relación en los resultados obtenidos con este modelo en comparación con los obtenidos con edema plantar con carragenina.

En contraste, los extractos de *C. aromatisans* presentaron un efecto antiinflamatorio mayor al 80%, esto se correlaciona con el modelo de carragenina donde la inhibición de la inflamación fue mayor al 90%, lo que sugiere que los metabolitos de esta especie actúan sobre la vía de las prostaglandinas, por este motivo, se sugiere realizar estudios que corroboren dichas observaciones.

Cuadro 3. Efecto de las particiones ACN/MeOH y Hx de *T. ahouai*, *C. aromatisans* y *M. grandiflora* en ratones con edema del pabellón auricular inducido con TPA.

Extracto	Dosis p.o. (mg/kg)	Grosor del pabellón auricular a las 3 h ($\times 10^{-2}$ mm) $\pm$ D.E.	Inflamación (%)
Control	Sol. salina y Tween		
TPA 1 mg/mL	80 al 5%	6.1 ± 2.2	100
Indometacina	10 mg/kg	$2 \pm 1.0^*$	32.7
<i>C. aromatisans</i> ACN/MeOH	200	$0.8 \pm 1.5^{**}$	6.5
<i>C. aromatisans</i> Hx	200	$2.4 \pm 0.5^*$	19.7
<i>M. grandiflora</i> ACN/MeOH	200	7.2 ± 2.8	118.0
<i>M. grandiflora</i> Hx	200	6.4 ± 2.6	104.9

Nota: Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Datos marcados con * muestran una significancia $P < 0.05$; datos marcados con ** muestran significancia $P < 0.01$.

2.3.4 Determinación de NO en macrófagos peritoneales de ratón NIH

Esta determinación se realizó únicamente con *C. aromatisans* y *M. grandiflora*, debido a que los resultados de las demás evaluaciones mostraron la toxicidad de la especie *T. ahouai*. Se observó que los extractos de *C. aromatisans* y *M. grandiflora* inhiben la producción de NO en una forma dependiente de la concentración. La mayor actividad se encontró para el extracto Hx de *C. aromatisans* (Cuadro 4). Este extracto inhibió la producción de NO de los macrófagos peritoneales arriba del 85% a las concentraciones de 500 y 1,000 µg/mL. Sin embargo, el efecto antiinflamatorio se observó desde la administración de 10 µg/mL obteniéndose un efecto inhibitorio mayor al 50%. Por otro lado, no hubo efectos sobre la viabilidad de los macrófagos peritoneales expuestos a diferentes concentraciones de extractos, lo que indica que el efecto inhibitorio de la producción de NO por los macrófagos peritoneales no se debe a muerte celular.

Cuadro 4. Evaluación de las particiones ACN/MeOH y Hx de *C. aromatisans* y *M. grandiflora* sobre la inhibición de la producción de NO en macrófagos peritoneales.

Extracto	% de inhibición				
µg/mL	1	10	100	500	1000
<i>C. aromatisans</i> ACN/MeOH	6.88±2.92	49.54±4.83	64.20±0.88	77.78±2.22	86.80±1.02
<i>C. aromatisans</i> Hx	5.33±5.43	58.17±5.13	77.58±3.05	96.18±1.52	97.58±2.17
<i>M. grandiflora</i> ACN/MeOH	2.88±2.45	42.62±5.50	53.39±2.16	62.28±8.73	73.32±0.73
<i>M. grandiflora</i> Hx	1.44±1.90	29.37±2.21	48.30±3.77	75.30±3.03	80.96±0.41

Nota: Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Las células sin tratamiento se tomaron como control de esta evaluación.

2.3.5 Evaluación de la Toxicidad Aguda preliminar

Los extractos totales de *C. aromatisans*, *T. ahouai* y *M. grandiflora* se continuaron administrando en las ratas Wistar en la misma dosis (500 mg/Kg) cada 24 h por 10 días encontrándose que no presentaron toxicidad aparente a la administración y se observó un comportamiento normal de los animales, esto quiere decir sin sedentarismo, taquicardia o taquipnea, y sin cambios en el pelaje. Al analizar los estómagos, después de los 10 días de administración de los extractos, no se encontraron evidencias de úlceras gástricas. Por

otro lado, en la evaluación realizada en ratones BALB/c que recibieron las particiones ACN/MeOH y Hx de las especies, se observó que al administrar *T. ahouai* los ratones mostraron efectos adversos como letargo y taquipnea; en el grupo que recibió la partición de ACN/MeOH a los 10 minutos posteriores de la administración oral un animal murió. Estos grupos se pusieron en observación durante 3 días. En el lapso de este tiempo los animales se recuperaron en lo referente al letargo y taquipnea. Para determinar la dosis terapéutica de *T. ahouai* en ratones BALB/c se sugiere en un futuro, evaluar una concentración menor de estos extractos y observar si los efectos adversos continúan o desaparecen. En lo que respecta a las particiones ACN/MeOH y Hx de *C. aromatisans* y *M. grandiflora*, no se encontró un comportamiento anormal, ni síntomas de efectos adversos, toxicidad o letalidad a la dosis de 200 mg/Kg. Así también, se sugiere la evaluación de las particiones en ratas Wistar.

2.3.6 Toxicidad oral aguda

Los ratones NIH a los que se les administró la dosis de 2,000 mg/Kg de peso de extracto Hx de *C. aromatisans* mostraron somnolencia y letargo a los pocos minutos de la administración, este síntoma desapareció a las 24 h, donde los ratones recuperaron su comportamiento normal. El grupo al que se le administró la dosis de 300 mg/Kg no mostró síntomas de alteración de comportamiento únicamente se observó irritación ocular, además de esto, no se observaron otros efectos secundarios ocasionados por el extracto. De los 5 ratones tratados por grupo sólo uno murió durante los 14 días de evaluación, en ninguno de ellos se presentaron síntomas de estrés como diarrea y pérdida de apetito, reforzando la evidencia de la ausencia de efectos tóxicos ocasionados por su ingesta. Dado que los ratones sobrevivieron a la administración de dosis altas de extracto Hx, se realizó el mismo experimento con ratas en las mismas dosis por 14 días y, una vez transcurrido este tiempo, se obtuvieron muestras de sangre para analizar los parámetros de perfil hepático y descartar toxicidad hepática por parte del extracto. Los resultados fueron similares a los obtenidos en ratón, debido a que la dosis de 300 mg/Kg no mostró efectos adversos pero la dosis de 2,000 mg/Kg mostró somnolencia y letargo e incapacidad para alimentarse, estos efectos duraron 48 h, pasado este tiempo las ratas se recuperaron por completo y en los días restantes de observación no mostraron alteraciones en el comportamiento. Transcurridos los 14 días, al sacrificar las ratas, se

encontró que 1 de 3 ratas en la dosis de 300 y 2,000 mg/Kg presentaban pólipos intestinales, efecto no atribuible al extracto y mayormente frecuente en estados de estrés aislados en los roedores. En lo que respecta al perfil hepático realizado (Figura 6), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados y el control (SS = solución salina).

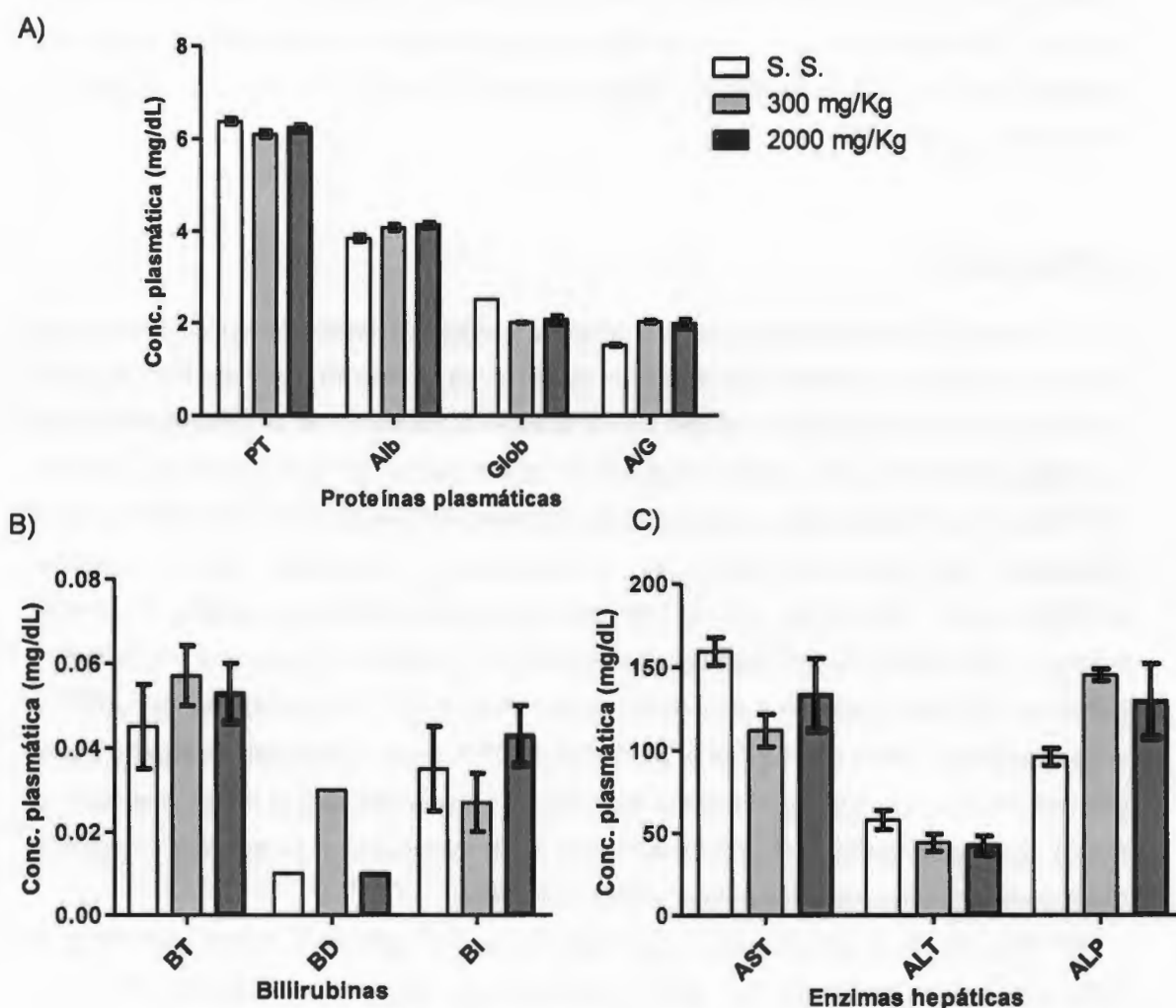


Figura 6. Parámetros hepáticos de ratas tratadas a los 14 días posteriores a la administración oral de diferentes concentraciones de extracto hexánico de *C. aromatisans*. a) Proteínas plasmáticas (PT: proteínas totales; Alb: albúmina; Glob: Globulinas; A/G: Relación albúmina-globulinas), b) bilirrubinas (BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina directa; BI: bilirrubina indirecta) y c) enzimas hepáticas (AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina transaminasa; ALP: fosfatasa alcalina).

2.3.7 CG-EM

El análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) de los extractos no polares de *C. aromatisans* y *M. grandiflora* mostró que ambos extractos se componen principalmente de ácidos grasos y terpenoides. *C. aromatisans* presentó 82 componentes, entre los cuales, cuatro son compuestos mayoritarios, siendo estos cumarina, acetato de lupenilo, palmitato de metilo y estigmasterol. *M. grandiflora* presentó 23 componentes, los seis compuestos mayoritarios son el óxido de cariofileno, palmitato de etilo, ácido linolénico, eicosano, acetato de olean-12-en-3-ilo y ácido 1-benzazireno-1-carboxílico.

2.4 DISCUSIÓN

Los efectos antiinflamatorios *in vivo* de los extractos se determinaron empleando los modelos de edema plantar inducido con carragenina y edema del pabellón auricular inducido por TPA. Estos dos modelos son indicadores conocidos de la inflamación aguda y ambas evaluaciones se pueden realizar al mismo tiempo, ya que utilizan los mismos animales y las mismas dosis de tratamiento. Además, ambos modelos permiten la rápida evaluación del efecto producido por un extracto o compuesto con propiedades antiinflamatorias potenciales. Cuando se inyecta el polisacárido carragenina en la pata posterior, se produce edema mediado por leucocitos (neutrófilos, monocitos y linfocitos) y por los principales mediadores de la inflamación, como el NO, la prostaglandina E₂ (PGE₂) y las citoquinas TNF- α e IL-6 (Kim *et al.*, 2012). El TPA es un agente edematógeno tópico y causa irritación de la piel y formación de tumores, ya que estimula la proteína cinasa "C" (PKC), que desempeña un papel fundamental en la transducción de señales y regula el crecimiento y la diferenciación celular (Nishizuka, 1992).

El TPA afecta la membrana, lo que resulta en una adhesión celular alterada y la inducción del metabolismo del ácido araquidónico, que causa específicamente la liberación de prostaglandinas, que son responsables del edema (Weinstein *et al.*, 1979). Los resultados obtenidos sugieren que los diferentes grupos de metabolitos antiinflamatorios activos de *C. aromatisans* se distribuyen entre las dos polaridades. Además, estos resultados indicaron que el mecanismo antiinflamatorio del extracto hexánico de *M.*

grandiflora (que mostró efecto antiinflamatorio sólo en el modelo de carragenina) no implica la ruta de PKC; su mecanismo antiinflamatorio podría estar relacionado con la inhibición de algunos mediadores como NO, PGE₂, TNF- α e IL-6.

Por otra parte, debido a los efectos tóxicos observados en los ratones administrados con los extractos de *T. ahouai*, esta especie no pudo ser evaluada en el modelo de inducción de edema del pabellón auricular, por lo que hasta este momento sólo podemos confirmar que el extracto ACN/MeOH posee un efecto antiinflamatorio mayor al 60%, indicando que los metabolitos responsables de este efecto son de naturaleza polar. En *T. ahouai* han sido reportadas más de 20 diferentes saponinas. Una de las propiedades de las saponinas es su efecto antiinflamatorio por lo que el efecto observado puede deberse a la presencia de éstas (Romo de Vivar, 2006). Saponinas de diferentes especies han sido estudiadas para determinar su mecanismo antiinflamatorio, como es el caso de las saponinas totales obtenidas del ginseng evaluadas en la activación microglial. Estos compuestos inhibieron la expresión de la iNOS, MMP-9 y citocinas proinflamatorias en células de la microglia inducida por LPS. También se observó que se suprimió de forma significativa las actividades de NF-kappaB y MAP quinasa, moléculas de señalización importantes en la inflamación. Por lo tanto, la inhibición de la activación de la microglia por saponinas de ginseng tuvieron un buen potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Park, 2009). Existen reportes de saponinas que reducen la adhesión leucocitaria en vénulas inhibiendo la expresión de moléculas de adhesión (CD11b y CD11) en neutrófilos (Sun *et al.*, 2006); este efecto impide en cierta manera, la extravasación de los leucocitos haciendo que éstos no lleguen al sitio de la lesión celular. Sin embargo, a pesar de estos efectos antiinflamatorios, también se ha reportado que las saponinas poseen un efecto hemolítico, por lo que estos metabolitos podrían ser responsables de los efectos adversos observados; las saponinas poseen afinidad con el colesterol de las membranas de los eritrocitos formando poros, además esta interacción también produce la solubilización de estas membranas (Bangham *et al.*, 1962; Kensil *et al.*, 1991). Los efectos adversos no fueron observados al administrar el extracto total en ratas, esto puede deberse a que al fraccionar el extracto los componentes responsables de dichos efectos se encuentran en mayor cantidad, superando la concentración plasmática terapéutica.

Por otro lado, estudios *in vitro* posteriores empleando los extractos de *M. grandiflora* y *T. ahouai* podrían elucidar el mecanismo antiinflamatorio de estas especies. *T. ahouai* mostró efectos adversos y tóxicos en ratones BALB/c además de producir hemólisis en eritrocitos humanos, y esto puede deberse a la presencia de saponinas en la planta, por lo que esta especie fue descartada para continuar con su evaluación.

La búsqueda en la literatura sobre *C. aromatisans* no mostró ningún estudio químico previo. Un estudio previo de *M. grandiflora* reveló la presencia de limoneno, citronela, canfeno, pineno y felandreno en aceites esenciales preparados a partir de las inflorescencias, los tallos y las hojas (Pérez-Amador *et al.*, 2006). El compuesto 6 β -hidroxi-germacradien-8,12-olido (6-epi-desacetyl-laurenobiolido) fue obtenido a partir del extracto de cloroformo de *M. grandiflora* (Quijano *et al.*, 1984). Diferentes especies de la familia Asteraceae, incluidas las especies del género *Eupatorium*, contienen terpenoides tales como estigmasterol y acetato de taraxerilo. El estigmasterol, en evaluaciones *in vitro*, reduce los mediadores pro-inflamatorios como NO y PGE₂ en macrófagos murinos RAW 264.7 (Pandith *et al.*, 2013). El acetato de taraxerilo reduce la inflamación en modelos *in vivo* como el edema de la pata trasera inducido por carragenina y el edema del pabellón auricular inducido por TPA en ratón (Pérez-García, *et al.*, 2005). En esta evaluación preliminar del extracto no polar de *C. aromatisans*, se encontró estigmasterol, pero no el acetato de taraxerilo. El estigmasterol tiene un efecto antiinflamatorio conocido, aunado a la presencia de otros componentes en el extracto no polar, que en conjunto, pueden actuar de forma sinérgica. Los experimentos *in vitro* se realizaron mediante la prueba de determinación de NO. Se ha documentado que durante el proceso inflamatorio, después de diferentes eventos de señalización, los macrófagos inducen la expresión de enzimas proinflamatorias, tales como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Esta enzima está regulada por la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y produce NO a partir de L-arginina. Grandes cantidades de NO pueden causar daños colaterales graves en el tejido porque el NO puede formar peroxinitrito (ONOO⁻), una molécula citotóxica relacionada con patologías inflamatorias. Por esta razón, la regulación de la producción de NO es un objetivo importante para las enfermedades inflamatorias (Guzik *et al.*, 2003). En la evaluación *in vitro*, se observó que los extractos inhibieron la producción de NO de forma dependiente de la concentración; esta actividad inhibitoria podría corresponder a uno de los mecanismos antiinflamatorios responsables del efecto observado en los experimentos

in vivo. Sin embargo, considerando que existen diferentes mediadores, otros mecanismos podrían estar involucrados, por lo que es necesario realizar otras evaluaciones, como por ejemplo, la determinación de citocinas proinflamatorias en modelos *in vitro*.

La presencia de terpenoides y ácidos grasos en los extractos no polares, componentes conocidos por sus propiedades antiinflamatorias, podría validar el uso de esta especie en la medicina tradicional y el uso de petrolato, vehículo afín a estos componentes, para preparar los ungüentos. Debido a su composición no polar, el petrolato retendría los compuestos no polares y aceites esenciales de las hojas, para posteriormente administrarse por vía tópica. De acuerdo a los resultados obtenidos, se recomienda el aislamiento y caracterización de los compuestos bioactivos de cada planta. Con base en este trabajo, se puede concluir que los extractos no polares y polares de *C. aromatisans* y el extracto no polar de *M. grandiflora* poseen actividad antiinflamatoria *in vitro* e *in vivo*, y ambas especies parecen ser útiles para tratar los síntomas inflamatorios.

En el ensayo de toxicidad oral aguda en rata, a dosis de 300 y 2,000 mg/Kg se observaron pólipos intestinales, y por este motivo se recomienda realizar más experimentos para confirmar este hallazgo y evaluar la dosis de 5,000 mg/Kg. El extracto Hx a 2,000 mg/Kg produjo somnolencia y letargo en ratones y ratas. Este efecto adverso podría sugerir un efecto similar al ocasionado por los antihistamínicos de primera generación que actúan sobre el receptor H1, ya que son empleados para el tratamiento de la inflamación crónica de las vías respiratorias superiores (para tratar los síntomas derivados de la liberación de histamina en procesos alérgicos exudativos) y, dado que atraviesan la barrera hematoencefálica, actúan también sobre el SNC, efecto que explicaría los efectos adversos tales como sedación, somnolencia, cansancio y debilidad observado en los roedores administrados con *C. aromatisans*. Algunos antihistamínicos H1 bloquean los canales de Na⁺ en las membranas excitables de modo como lo hacen los anestésicos locales (Flores, 2003). Ante esta sospecha, se sugieren evaluaciones posteriores para confirmar o descartar este mecanismo.

Aunque la forma de aplicación de *C. aromatisans* en la medicina tradicional es tópica, en este proyecto se evaluó la toxicidad oral aguda, y con los resultados obtenidos se sugiere una posible nueva forma de administración, además se observa el potencial que tiene la especie para convertirse en un medicamento con potencial antiinflamatorio.

2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, N.A., Christou, N.V., Meakins, J.L. (1995). The systemic inflammatory response syndrome and the critically ill surgical patient. *Curr Opin Crit Care*, 1, 209.
- Bangham, A.D., Horne, R.W., Glauert, A.M., Dingle, J.T., Lucy, J.A., (1962). Action of saponins on biological membranes. *Nature*, 196, 952-955.
- Brenner, B.M., Troy, J.L., Baltermann, B.J. (1989). Endothelium-dependent vascular responses: mediators and mechanisms. *J Clin Invest*, 84, 1373.
- Carlson R.P., O'Neill-Davis L, Chang J, Lewis A.J. (1985). Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agents Actions*, 17, 197-204.
- Flores, J. (2005). *Farmacología humana* 4 ed. Masoon. Barcelona, España. pp 375-400.
- Gallin, J.I. and Snyderman, R. (eds). (1999). *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. 3rded Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia. pp. 1-4.
- Guzik, T.J., Korb, R., Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*, 54, 469-87.
- Hofseth, L. J. (2008). Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and cancer. *Cancer Lett*, 268, 10-30.
- Hu, X., Jin, H., Xu, W., Zhang, W., Liu, X., Yan, S., Chen, M., Li, J., Zhang, W.D. (2008). Anti-inflammatory and analgesic effects of *Daphne retusa* Hemsl. *J Ethnopharmacol*, 120, 118-122.
- Kensil, C.R., Patel, U., Lennick, M., Marciani, D. (1991). Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja-saponaria* molina cortex. *J Immunol*, 146, 431-437.
- Kim, D., Park, D., Kyung, J., Yang, Y.H., Choi, E.K., Lee, Y.B., *et al.* (2012). Anti-inflammatory effects of *Houttuynia cordata* supercritical extract in carrageenan-air pouch inflammation model. *Lab Anim Res*, 28, 137-140.
- Lim, H., Lee J.G., Lee, S.H., Kim, Y.S., Kim, H.P.(2008).Anti-inflammatory activity of phylligenin, a lignan from the fruits of *Forsythia koreana*, and its cellular mechanism of action. *J Ethnopharmacol*, 118, 113-117.
- Pandith, H., Zhang, X., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., Gritsanapan, W., Joon-Baek, S. (2013). Effect of Siam weed extract and its bioactive component

-
- scutellarein tetramethyl ether on anti-inflammatory activity through NF- κ B pathway. *J Ethnopharmacol*, 147, 434-441.
- Park, J.S., Park, E.M., Kim, D.H., Jung, K., Jung, J.S., Lee, E.J., Hyun, J.W., Kang, J.L., Kim, H.S. (2009). Anti-inflammatory mechanism of ginseng saponins in activated microglia. *J Neuroimmunol*, 209, 40-9.
- Pérez-Amador, M.C., Munoz, V., Noyola, A. (2006). Essential oil and phytotoxic compounds in *Clibadium surinamensis* L. and *Montanoa grandiflora* D.C. (Asteraceae). *Rev int Bot Exp*, 75, 145-150.
- Pérez-García, F., Marin, E., Parella, T., Adzet, T., Canigual, S. (2005). Activity of taraxasteryl acetate on inflammation and heat shock protein synthesis. *Phytomedicine*, 12, 278-284.
- Quijano, L., Calderón, J.S., Gómez, G.F. (1984). The crystal structure of 6-*epi*-desacetyllaurenobiolide, a germacrene-1(10),4-diene-12,8 α -olide from *Montanoa grandiflora*. *Phytochemistry*, 23, 1971-1974.
- Rang, H.P., Bevan, S., Dray, A. (1991). Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. *Br Med Bull*, 47, 534-48.
- Sun, K., Wang, C.S., Guo, J., Liu, Y.Y., Wang, F., Liu, L.Y., He, J.G., Fan, J.Y., Han, J.Y., (2006). Effect of *Panax notoginseng* saponins on lipopolysaccharide-induced adhesion of leukocytes in rat mesenteric venules. *Clin Hemorheol Microcirc*, 34, 103-108.
- Tillán-Capó, J., Nuñez-Figueroa, Y., Agüero-Fernández, S. y Carrillo-Domínguez, C. (2007). Actividad antiinflamatoria de compuestos liposolubles de *Zingiber officinale* Roscoe frente a diferentes agentes flogísticos. *Rev Cubana Plant Med*, E-pub 12 (2).
- Vázquez-Ramírez R., Olguín-Martínez, M., Kubli-Garfias, C., Hernández-Muñoz, R. (2006). Reversing gastric mucosal alterations during ethanol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *World J Gastroenterol*, 12, 4318-4324.
- Weinstein, J.B., Lee, L.S., Fisher, P.B., Mufson, A., Yamasaki, H. (1979). Action of phorbol esters in cell culture: mimicry of transformation, altered differentiation, and effects on cell membranes. *J Supramol Struct*, 12, 195-208.
-

- Wu, S.J., Liu, P-L., Ng, L-T. (2008). Tocotrienol-rich fraction of palm oil exhibits anti-inflammatory property by suppressing the expression of inflammatory mediators in human monocyte cells. *Mol Nutr Food Res*, 52, 921-929.
- Zhang, G.Q., Huang, X.D., Wang, H., Leung, A.K., Chan, C.L., Fong, D.W., Yu, Z.L. (2008). Anti-inflammatory and analgesic effects of the ethanol extract of *Rosa multiflora* Thunb. *hips. J Ethnopharmacol*, 118, 290-294.

CAPITULO III

Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo* e *in vitro* de extractos y fracciones de *Crinia aromatisans*

3.1 INTRODUCCIÓN

Dentro del proceso complejo de la inflamación, además de los signos característicos, rubor, calor, tumor, dolor y pérdida de la función, a nivel intracelular, las citocinas o citoquinas son reguladores liberados en respuesta a infecciones, respuestas inmunes, inflamación y trauma. Cuando la inflamación aumenta, la producción masiva de citocinas pro-inflamatorias tales como TNF- α , IL-1 e IL-6 por los macrófagos, puede causar daño tisular y disfunción masiva de distintos órganos (Delgado *et al.*, 2003; Miyake, 2004; Ahmed *et al.*, 2005). En particular TNF- α e IL-1 son importantes mediadores que contribuyen a los desórdenes inflamatorios crónicos tales como la artritis reumatoide (RA) (Bingham III, 2002). TNF- α está también involucrada en la inducción de daño celular por promover estrés oxidativo en las mitocondrias (Sies, 1997). Los antagonistas de los receptores de TNF- α e IL-1 han sido un éxito clínico en mejorar los síntomas de estos pacientes. Los inhibidores de las citocinas pro-inflamatorias han sido considerados como candidatos a convertirse en fármacos anti-inflamatorios. Los modelos que emplean lipopolisacáridos bacterianos o "LPS", se basan en que este componente principal de las bacterias Gram negativas es una endotoxina que induce el síndrome de choque séptico y estimula la producción de mediadores pro-inflamatorios tales como el NO, TNF- α , interleucinas, prostanoïdes y leucotrienos (Hewett and Roth, 1993; Kubes and McCafferty 2000). Medicamentos anti-inflamatorios corticoesteroides, como la prednisolona y la dexametasona, son conocidos por reducir la producción de estas citocinas. En años recientes se ha incrementado el interés en el estudio de plantas medicinales y sus metabolitos, que sean capaces de regular la producción de estas citocinas, un ejemplo es el estudio de la amoradicina, genisteína y silibina, flavonoides que disminuyen la producción de TNF- α en células RAW 264.7 tratadas con LPS (Cho *et al.*, 2000).

La inflamación es un mecanismo diseñado para reparar tejidos lesionados o muertos, este es un proceso inmunológico que también se desencadena en respuesta a

virus, bacterias e incluso parásitos. Las enfermedades autoinmunes también desencadenan este proceso, que si no es controlado, causa la lesión del tejido e incluso la muerte de este. Una de las complicaciones que puede causar un proceso inflamatorio crónico es que la célula del tejido dañado puede alterar su ciclo celular y convertirse en cáncer. En el desarrollo del proceso inflamatorio, durante la última fase de una serie de eventos de señalización, los macrófagos inducen la expresión de genes proinflamatorios tales como los de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Esta enzima es regulada por la secreción de citocinas proinflamatorias, y produce óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina. Grandes cantidades de este mediador pueden causar un daño severo colateral en el tejido porque el NO puede formar peroxinitrito (ONOO⁻), una molécula citotóxica, ya que produce daño celular, lo cual produce un proceso inflamatorio y, además, puede producir daño directo a enzimas, proteínas, lípidos de membrana y ADN. En consecuencia, estos eventos pueden desencadenar alteraciones irreversibles que conduzcan a la formación de células cancerosas. Por este motivo, la regulación de la producción del NO es un importante blanco para las enfermedades inflamatorias (Guzik *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que algunos extractos de especies del género *Eupatorium* disminuyen la producción de NO, tal es el caso de *E. ripartum*; el extracto metanólico de esta especie inhibe la producción de NO en macrófagos estimulados por LPS con una IC₅₀ de 42 µg/mL sin causar un efecto citotóxico. De esta especie se han aislado compuestos como estigmasterol, epi-fidelinol, acetato de taraxasterilo y palmitato, de estos compuestos el estigmasterol y el acetato de taraxasterilo poseen efecto antiinflamatorio (Patra *et al.*, 1981; Perez-Garcia *et al.*, 2005). En otra especie, *E. arnottianum*, se han encontrado tres compuestos antiinflamatorios: nepetina, jaceosidina e hispiduina. La nepetina, obtenida del extracto de diclorometano (DCM), reduce el edema del pabellón auricular inducido por TPA en un 46.9% y la jaceosidina en un 23.2%; ambos compuestos inhiben la inducción de NFκB en un 91 y 77%, respectivamente (Clavin *et al.*, 2007). Los extractos MeOH, EtOH y DCM de *E. perfoliatum* poseen actividad antiinflamatoria inhibiendo la liberación de NO en macrófagos estimulados con LPS (IC₅₀ > 100, 89, 19 µg/mL, respectivamente), además de disminuir la producción de citocinas como la IL-1. Los compuestos responsables de este efecto son la eupafolina y un guaianólido dimérico (Mass *et al.*, 2001). En el presente trabajo, los extractos MeOH y Hx de *C. aromatisans* disminuyeron el edema plantar inducido con carragenina en más de un

90%, lo que sugiere que esta especie es una buena fuente de metabolitos con actividad antiinflamatoria.

Critonia aromatisans, conocida con el nombre común de “chiople”, es una especie perteneciente a la familia Asteraceae, que se emplea en la medicina tradicional yucateca sola o en combinación con otras plantas en la elaboración de pomadas artesanales con efecto antiinflamatorio. En el monitoreo del potencial antiinflamatorio inicial realizado a las tres especies vegetales incluidas en este estudio, *C. aromatisans* presentó mejores efectos en el ensayo de inducción de edema plantar por carragenina en ratones BALB/c; los extractos hexánico y el de ACN/MeOH a dosis de 200 mg/Kg inhibieron la inflamación en un porcentaje mayor al 90%, efecto comparable al ejercido por indometacina (10 mg/kg).

Dentro de los bioensayos seleccionados para el estudio de *C. aromatisans* y sus fracciones, se encuentra el de inducción de edema plantar con carragenina y la determinación de NO. La carragenina es un polisacárido que aplicado en el cojinete plantar del animal experimental desencadena una respuesta inflamatoria aguda localizada (no sistémica), por lo que este modelo permite evaluar de manera rápida el efecto de un extracto o compuesto. Este modelo es el más empleado para la realización de cribados de especies vegetales con potenciales efectos antiinflamatorios. El NO es un mediador inflamatorio sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir del aminoácido L-arginina. Al igual que otros mediadores, la sobreproducción de NO está implicada en la patogénesis de la inflamación crónica inducida por infecciones e impacto y otros trastornos relacionados. En la terapéutica actual, los inhibidores del NO son empleados en diversos padecimientos en donde se encuentra comprometido el sistema inmunológico en respuesta a una inflamación localizada, así como en la quimioterapia del cáncer (Hofseth, 2008).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Procedimientos generales

3.2.1.1 Recolección y preservación del material vegetal

Considerando un criterio etnomédico se recolectaron en la localidad de Yaxcabá, hojas provenientes de los arbustos de *Critonia aromatisans* (A. Dorantes colecta 134, octubre de 2009). Las hojas fueron secadas en una estufa a 37 °C y una vez secas se procedió a su preservación mediante el empleo de bolsas con cierre hermético. Los ejemplares de referencia herborizados, se depositaron en el herbario de la Unidad de Recursos Naturales del CICY. Para la identificación de las especies se contó con la participación de la Dra. Martha Méndez González de la Unidad de Recursos Naturales CICY.

3.2.1.2 Preparación de los extractos

Para la evaluación anti-inflamatoria *in vivo*, el extracto total metanólico de *C. aromatisans* fue re-suspendido en MeOH-ACN/agua y fraccionado por partición cromatográfica con Hx, CH₂Cl₂ y AcOEt, obteniéndose un residuo acuoso que posteriormente fue liofilizado. Para la evaluación anti-inflamatoria *in vitro*, el extracto total metanólico de *C. aromatisans* fue re-suspendido en MeOH y acetonitrilo (3:1), disolución que posteriormente fue particionada con Hx (3:1).

3.2.1.3 Partición hexánica

A 3 kg de hojas secas pulverizadas se les realizó una maceración con metanol (MeOH) durante 3 días (3×) a temperatura ambiente. El extracto metanólico obtenido por evaporación a presión reducida fue mezclado con acetonitrilo (ACN) para retirar el precipitado, al cual se le añadió hexano (3:1); las fracciones resultantes fueron la de ACN/MeOH (410 g) y la fracción hexánica (36 g).

3.2.1.4 Compuestos químicos y disolventes

Todas las sales y disolventes fueron obtenidos de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) o Sigma. Los reactivos empleados en los ensayos farmacológicos fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, USA).

3.2.1.5 Cromatografía en capa fina (CCF)

Se pesó 1 mg de cada extracto o fracción y se disolvió en 1 mL del disolvente correspondiente, con un capilar se aplicó en la placa de gel de sílice (placas de soporte de aluminio con película de 0.254 mm de gel de sílice de la marca Merck 60F₂₅₄) y se eluyó con los sistemas de elución correspondientes. Los agentes reveladores utilizados fueron físicos (luz ultravioleta de 254 y 365 nm) y químicos (disolución al 4% de ácido fosfomolibdico).

3.2.1.6 Cromatografía Líquida de Vacío (CLV) del extracto hexánico de *C. aromatisans*

Se emplearon 34 g de extracto hexánico, el cual fue aplicado en sólido a una columna de filtración empacada con gel de sílice para CCF con una altura de 7 cm y diámetro de 10 cm. La fase móvil consistió en un sistema por gradiente que consistió en 100% Hx, Hx/AcOEt 98:2, 96:4, 94:6, 92: 8, 90: 10, 85:15, 80: 20, 75: 25, 70:30, 60:40, 50:50, 100% AcOEt, AcOEt/ MeOH 50: 50 y MeOH 100%, obteniéndose 21 fracciones las cuales fueron analizadas por CCF, reuniéndose en 7 fracciones finales de acuerdo a su similitud cromatográfica, las cuales sirvieron para realizar los bioensayos de determinación de NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 y COX-2. Los rendimientos para las fracciones A-G obtenidas de la CLV de 34 g de extracto hexánico son: A, 2.02 g (6%); B, 8.91 g (26%); C, 3.37 g (10%); D, 9.53 g (28%); E, 3.56 g (10%); F, 3.55 g (10%); G, 2.91 g (8%).

3.2.1.7 Animales

Para la evaluación de los efectos antiinflamatorios se utilizaron ratones de ambos sexos de la cepa NIH con un peso oscilante entre 25 a 30 g. Para la determinación de los ensayos de toxicidad oral aguda se emplearon ratas hembra de la cepa Wistar con un peso de 200 a 250 g. Ambas cepas fueron obtenidas del bioterio del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" de la Universidad Autónoma de Yucatán y mantenidos en condiciones de bioterio, como señala la NOM-62-ZOO-1999, en el Área de Experimentación Animal del laboratorio de Farmacología de la Facultad de Química-UADY. Así mismo, se les proporcionó agua purificada "*ad libitum*" y alimento certificado para su nutrición, con un ciclo de luz-obscuridad de 12/12 h. Los animales fueron

manejados bajo la supervisión del responsable del laboratorio de farmacología experimental, Dr. Rolffy Ortiz Andrade de la Facultad de Química, UADY.

3.2.2 Actividad anti-inflamatoria *in vivo* de extractos obtenidos de *C. aromatisans*: Inducción de edema plantar con carragenina

Se midió la pata derecha o izquierda de cada ratón con un micrómetro electrónico calibrado antes de administrar los extractos y el control. Los extractos de prueba y el control fueron administradas por vía intragástrica empleando una sonda de alimentación nasogástrica infantil FR8 Kendall® y 30 minutos después de la administración cada ratón fue inyectado con una solución de carragenina (1 mg/25 µL) en solución salina fisiológica (154 mM NaCl) en el tejido subplantar de la pata trasera derecha o izquierda, con la finalidad de inducir la inflamación. El edema de la pata fue medido a las 3 h posteriores a la inducción de la inflamación. El valor de la media de los grupos tratados fueron comparados con el valor de la media de un grupo control y analizado empleando un ANOVA de dos vías. Indometacina (15 mg/Kg) fue empleado como fármaco de referencia.

3.2.3 Actividad anti-inflamatoria *in vitro* de extractos obtenidos de *C. aromatisans*: Determinación de la inhibición de la producción de NO en macrófagos peritoneales de ratón NIH

3.2.3.1 Cultivo celular

Se extrajeron macrófagos peritoneales de ratones NIH mediante la inyección de solución salina isotónica en la cavidad intraperitoneal, se presionó aleatoriamente la cavidad abdominal por 2 min y se extrajo el líquido administrado previamente, el cual fue colocado en tubos Falcon de 15 mL. El contenido peritoneal fue centrifugado a 1,500 rpm por 10 min a 4 °C. El botón celular fue lavado con PBS y centrifugado nuevamente en las mismas condiciones. El botón celular fue resuspendido en medio Eagle's modificado (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 50 µg/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomycin. Esta prueba se realizó en placas de 96 pozos utilizando 50 mil células por pozo. Las células fueron incubadas a 37 °C por 24 h en una atmósfera humidificada conteniendo 5% CO₂.

3.2.3.2 Determinación de NO

Los macrófagos cultivados se incubaron bajo condiciones de esterilidad durante 24 h a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Posteriormente, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de 1,000, 500, 100 y 10 µg/mL de extracto hexánico y siete fracciones de *C. aromatisans*, las placas se dejaron incubar por 24 h, posteriormente las células fueron estimuladas con LPS a una concentración de 1 mg/mL y se incubaron por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación se tomaron 50 µL del sobrenadante, los cuales fueron transferidos a una placa de 96 pozos, y se le añadieron 50 µL del reactivo de Greiss. La placa se incubó durante 10 min y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas Multiskant Ascent (Thermo). Se empleó una curva estándar de nitrito de sodio para obtener las concentraciones en µM de las muestras (Nacimiento *et al.*, 2003).

3.2.3.3 Viabilidad celular

Una vez retirado el sobrenadante de las células, se realizó la prueba de MTT que consistió en colocar la sal de tetrazolio en las células e incubar por 4 h. Transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante y se añadió reactivo de Sorensen y DMSO, las placas se dejaron reposar durante 10 min y se leyeron en un lector de placas a 570 nm.

3.2.4 Análisis molecular de las fracciones obtenidas del extracto hexánico activo

3.2.4.1 Preparación de las muestras

Los extractos y fracciones fueron diluidos a diferentes concentraciones (200, 100, 50, 25 µg/mL) empleando una mezcla de Tween 80 al 0.05% y DMSO al 0.05% como diluyentes.

3.2.4.2 Cultivo celular

Se empleó la línea celular de leucemia aguda humana, THP-1 (Cell Lines Service, Eppelheim, Germany), estas fueron cultivadas a una concentración de 1×10^6 células/mL en placas de 12 pozos en medio RPMI 1640 (PAA Laboratories Gmb Pasching, Austria) conteniendo 10% de suero fetal bovino inactivado, 100 U/mL de penicilina y 100 µL estreptomicina. Para diferenciar los monocitos en macrófagos, se añadieron 100 ng/mL de PMA (phorbol myristate acetate, Sigma-Aldrich) por 48 h a 37 °C en una estufa de cultivo,

humidificada y con 5% CO₂. Posteriormente las células no adherentes fueron removidas por aspiración y las células adherentes lavadas con medio fresco.

3.2.4.3 Determinación de TNF- α por el método de ELISA

Las células THP-1 diferenciadas en macrófagos con PMA, fueron tratadas con y sin los extractos y fracciones obtenidos de *C. aromatisans* a diferentes concentraciones (200, 100, 50, 25 μ g/mL); los extractos fueron pre-incubados por una hora con las células THP-1 y posteriormente se añadió LPS (1 μ g/mL) para activar los macrófagos, posteriormente las células fueron incubadas por 4 h. Concluido este tiempo, el sobrenadante fue colectado y se realizó la prueba de viabilidad celular (método PrestoBlue, descrito posteriormente). El sobrenadante fue empleado para la detección de TNF- α liberado al medio, empleando un kit ELISA de inmunoensayo (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL. USA). Como controles se emplearon las células sin tratamiento (control negativo), células con LPS (control positivo) células con dexametasona (control antiinflamatorio) y células con el diluyente (control negativo del diluyente).

3.2.4.4 Viabilidad de células THP-1

La determinación de la viabilidad celular se llevó a cabo en cultivos de células THP-1 diferenciadas en macrófagos expuestas a las concentraciones de extractos y fracciones similares a las empleadas para las técnicas de evaluación de mediadores. Brevemente, se emplearon placas de 12 pozos, se inocularon 1×10^6 células y éstas fueron diferenciadas con 100 ng/mL de PMA por 48 horas. Posteriormente, las células fueron pre-tratadas con los extractos y fracciones de prueba e incubadas durante 1 h, luego se añadió 1 μ g/mL de LPS y posteriormente fueron incubadas durante 4 h; el medio de cultivo (RPMI-1640) fue cambiado 2 veces y se añadió 1 mL de medio y el reactivo PrestoBlue® Cell Viability Reagent (Life Technologies Corporation, California, USA) en una concentración final del 10%. La incubación se realizó por 45 minutos a 37 °C y transcurrido este tiempo, se realizó la lectura de absorbancias en un espectrofotómetro para placas SUNRISE ELISA-reader (Tecan, Salzburg, Austria) a una longitud de onda de 570 y 600 nm como referencia. Se emplearon dos controles de color, medio sin sustancias ni células y medio con PrestoBlue™. El valor de absorbancia de este último

control se consideró como 100% de mortalidad. Altos valores de absorbancia se correlacionan con una mayor actividad metabólica total y un mayor número de células.

3.2.4.5 Extracción de ARNm

Después de colectar los sobrenadantes las células fueron homogeneizadas en 1 mL de PqGold Tri-Fast (PEQLAB, Erlangen, Germany) y el ARN fue purificado de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Brevemente, se realizó una partición pEqGold/cloroformo y se centrifugó la mezcla obteniéndose la fase acuosa. Esta fase fue tratada con isopropanol para precipitar el RNA total. Después de centrifugar 10 minutos a $12,000 \times g$, 4°C , el pellet fue lavado con etanol al 75% etanol dos veces y centrifugado 10 minutos, a $12,000 \times g$, 4°C . Luego de eliminar el sobrenadante el pellet se dejó secar a temperatura ambiente. El pellet fue resuspendido en una adecuada cantidad de agua libre de ARNasa y ADNasas (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Life Technologies Corporation, California, USA). La concentración y pureza de ARN fue determinada por el índice A260/A280 ($A260/A280 = 1.7-2.0$) utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Schwerte, Germany). La integridad del ARN fue determinada utilizando un "lab-on-a-chip" 6000 NanoChip kit y el Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

3.2.4.6 Síntesis de ADNc

Una alícuota (1 μg) de ARN fue tratado con 1 unidad de ADNsa (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) por 30 min a 37°C . La transcripción reversa de ARN fue llevada a cabo con el primer oligo (dT)₁₂₋₁₈ y AffinityScript RT transcriptasa reversa (Agilent Technologies, Inc. La Jolla, USA) y 24 unidades de Ribo Lock™ inhibidor ARNsa (Fermentas, St-Leon-Rot, Germany). La transcripción reversa se realizó durante 45 min a 42°C y 5 min a 95°C para desactivar la enzima y terminar la reacción de síntesis de ADNc.

3.2.4.7 Determinación de la expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y COX-2 por qRT-PCR

El ADNc fue empleado para cuantificar la expresión de distintos genes utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (real time RT-PCR o qRT-PCR) empleando los primers de QuantiTect/PrimerAssays (QIAGEN GmbH, Hilden,

Germany). Los siguientes genes de interés fueron analizados: prostaglandin-endoperóxido sintasa 2 (COX-2, NM_000963) amplicon de 68 bp; factor de necrosis tumoral (TNF- α , NM_000594) amplicon de 104 bp; interleucina 6 (IL6, NM_000600) amplicon de 107 bp; interleucina 1, beta (IL1B, NM_000576) amplicon de 117 bp; y como gen de referencia, para normalizar la expresión de los genes de interés, se utilizó beta actina (ACTB, NM_001101) 146 bp amplicon de 117 bp. El ADNc fue amplificado por RT-PCR empleando brilliant® II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix (Stratagene-Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). El perfil térmico consistió en 1 ciclo a 95 °C por 3 minutos seguidos de 40-45 ciclos a 95 °C (10 seg) y 60 °C (20 seg). Para confirmar la especificidad de los productos obtenidos (amplicon) se efectuó un protocolo de disociación (55 °C-92 °C) llevado a cabo después del análisis de PCR. La amplificación se realizó utilizando el sistema Mx3005P™ qPCR (Stratagene-Agilent Technologies). Los datos fueron analizados con el software de análisis Mx3005P (Stratagene-Agilent). Para efectuar la cuantificación relativa, se generó una curva estándar utilizando una dilución seriada de un pool de ADNc. Los datos fueron analizados usando el método de curva estándar relativa. Por cada muestra desconocida, la cantidad relativa fue calculada empleando análisis de regresión lineal de su respectiva curva estándar.

3.2.5. Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media $\pm$ su desviación estándar. Para analizar el efecto de los diferentes extractos se realizó una ANOVA de una vía, empleando un análisis de Dunnett *post hoc* mediante el programa GraphPad Prism 5.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Inducción de edema plantar con carragenina en ratón

En este ensayo se repitieron los estudios realizados con ratones endogámicos BALB/c de los extractos ACN/MeOH y Hx en ratones no consanguíneos NIH a la misma dosis de 200 mg/Kg. Los ratones BALB/c son una cepa de ratón sensible, por este motivo fue importante evaluar los extractos en una cepa menos sensible como es el ratón suizo albino común (NIH). Adicionalmente, se evaluaron las fracciones obtenidas por partición del extracto de ACN/MeOH con CH₂Cl₂ y AcOEt y el residuo acuoso en dosis de 10 y 100

mg/Kg. Se encontró que en esta cepa de ratones el extracto ACN/MeOH no tuvo efecto significativo en la inhibición del edema plantar, sin embargo, el extracto hexánico mostró una inhibición de la inflamación mayor al 80% a una dosis de 100 mg/Kg. Se decidió evaluar las particiones de CH_2Cl_2 , AcOEt y el residuo acuoso como se indica en el Cuadro 5; estos extractos no tuvieron una actividad mayor al 50%, por esta razón el extracto hexánico fue seleccionado para continuar con evaluaciones posteriores.

Cuadro 5. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria por el modelo de inducción de edema plantar con carragenina en ratones NIH de las particiones de *C. aromatisans*.

Extracto	Dosis p.o. (mg/kg)	Grosor del edema a las 3h ($\times 10^{-2}$ mm) $\pm$ D.E.	Inhibición de la Inflamación (%)
Control con Carragenina al 1%	Sol. salina y Tween 80 al 5%	75 $\pm$ 12	0
Indometacina	10	18 $\pm$ 10	76.5
<i>C. aromatisans</i> ACN/MeOH	200	45 $\pm$ 16 ^a	40.0
<i>C. aromatisans</i> Hx	10	60 $\pm$ 9	24.6
<i>C. aromatisans</i> Hx	100	12.1 $\pm$ 7 ^c	84.0
<i>C. aromatisans</i> Hx	200	20.6 $\pm$ 18 ^c	76.0
<i>C. aromatisans</i> CH_2Cl_2	10	54.6 $\pm$ 10	27.1
<i>C. aromatisans</i> CH_2Cl_2	100	57.5 $\pm$ 10	23.4
<i>C. aromatisans</i> AcOEt	10	48 $\pm$ 22 ^a	35.4
<i>C. aromatisans</i> AcOEt	100	40 $\pm$ 18 ^b	46.8
<i>C. aromatisans</i> acuoso	10	48 $\pm$ 22 ^a	35.4
<i>C. aromatisans</i> acuoso	100	43 $\pm$ 21 ^a	43.0

Nota: Valores expresados como media $\pm$ D.E.; la significancia fue representada como: a= $p < 0.05$ b= $p < 0.01$ c= $p < 0.001$.

3.3.2 Determinación de óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratón NIH

En este ensayo se evaluaron las fracciones obtenidas de la partición líquido-líquido del extracto metanólico (MeOH/ACN y Hx). Como se observa en el Cuadro 6, la mayor actividad fue encontrada en la fracción Hx; esta fracción inhibió casi completamente la producción de NO. El diluyente Tween 80, empleado en la preparación de las diluciones para la evaluación de los extractos, no tuvo efecto sobre la evaluación (C (-) = 1.11 $\pm$ 0.06

μM , C + Tween 80 = $1 \pm 0.29 \mu\text{M}$, LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ = $97.49 \pm 2.25 \mu\text{M}$, LPS + Tween 80 = $91.02 \pm 3.13 \mu\text{M}$), además, no se observaron efectos en la viabilidad (Figura 7) de los macrófagos peritoneales expuestos a las diferentes concentraciones de los extractos (1 a 1,000 $\mu\text{g/mL}$), lo que indica la potencial especificidad de éstos contra la producción de NO en los macrófagos de ratón NIH.

Cuadro 6. Efecto inhibitorio de los extractos ACN/MeOH y hexánico sobre la producción de NO en macrófagos peritoneales obtenidos de ratones NIH.

	% de inhibición en $\mu\text{g/mL}$				
	1	10	100	500	1000
ACN/MeOH	6.88 ± 2.9	49.54 ± 4.8	64.20 ± 0.9	77.78 ± 2.2	86.80 ± 1.0
Hx	5.33 ± 5.4	58.17 ± 5.1	77.58 ± 3.1	96.18 ± 1.5	97.58 ± 2.2

Nota: Valores expresados como media $\pm$ D.E. Las células sin tratamiento se tomaron como control de esta evaluación.

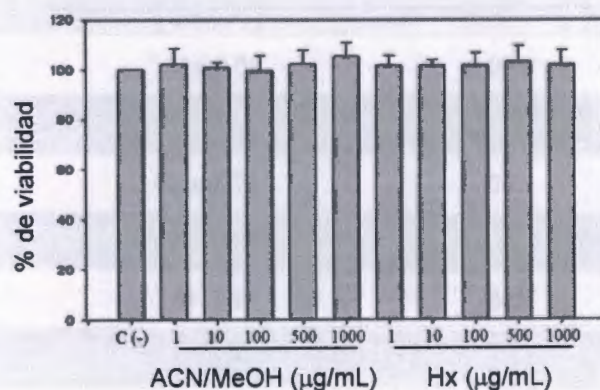


Figura 7. Prueba de viabilidad celular de macrófagos peritoneales de ratón NIH a distintas concentraciones de extractos de *C. aromatisans*.

3.3.3 Evaluación de las fracciones obtenidas del extracto hexánico mediante el ensayo de inhibición de la producción de óxido nítrico

Dado que el vehículo más empleado es el DMSO y debido a la solubilidad de las fracciones, se decidió realizar la comparación de ambos diluyentes (DMSO y Tween 80). Las fracciones fueron altamente solubles al Tween 80 (Cuadro 7 y Figura 8) y

medianamente solubles al DMSO por lo que el diluyente seleccionado para realizar las evaluaciones fue Tween 80.

Cuadro 7. Porcentaje de inhibición de la producción de NO de las fracciones obtenidas del extracto Hx de *C. aromatisans* diluidas con Tween 80.

Conc μg/mL	Hx %in	A %in	B %in	C %in	D %in	E %in	F %in	G %in
1000	69.5	24.1	49.7	57.6	92.2	51.9	52.6	27.7
500	44.2	21.2	48.2	48.2	90.0	49.3	45.4	20.2
100	43.4	13.3	29.8	38.9	89.3	32.8	15.1	22.0
10	1.8	5.04	0	21.2	74.9	27.0	18.7	1.4

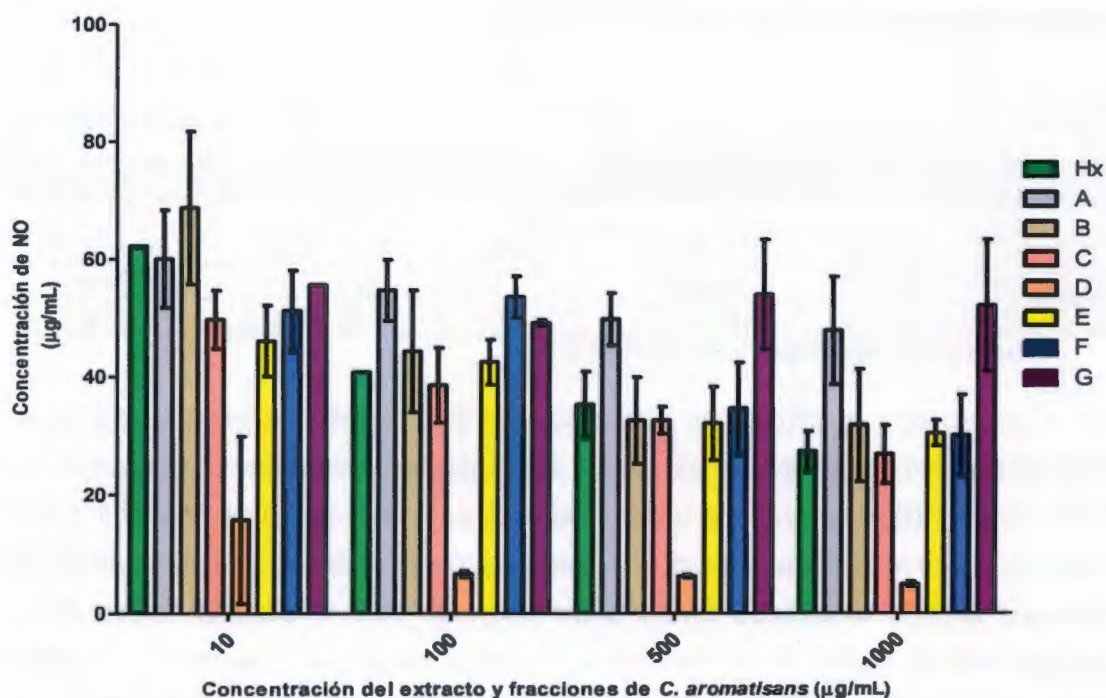


Figura 8. Producción de NO de las fracciones obtenidas del extracto hexánico de *C. aromatisans* con Tween 80. *Nota: Datos expresados como media $\pm$ DE comparados contra la producción de Nitritos (μg/mL) de los siguientes controles: C- (11.8 ± 5.3), C- + LPS (63.0 ± 3.7) y C- +LPS + Tween 80 (48.5 ± 6.9)

Los resultados mostraron que en el experimento realizado con Tween 80 la fracción D fue activa en un 89.3% a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo, la fracción D empleando DMSO sólo tuvo actividad superior al 50% a 1,000 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados pudieron deberse a que los compuestos responsables de la inhibición de la producción de NO no fueron solubilizados totalmente, y la concentración aplicada de los metabolitos responsables fue menor. Por este motivo, se decidió realizar una repetición de la determinación de NO empleando las particiones ACN/MeOH, Hx y fracción D (Cuadro 8). El resultado indica que la partición Hx y las fracciones C y D inhiben la producción de NO arriba del 80%, la partición ACN/MeOH ligeramente de forma menor. Al incrementar la concentración del extracto Hx y la fracción D disminuye la producción de NO, lo que sugiere que los metabolitos capaces de disminuir la producción de este mediador en los macrófagos se encuentran presentes en la fracción D.

Cuadro 8. Porcentaje de inhibición de NO en macrófagos de ratón NIH producido por los extractos de *C. aromatisans* a diferentes concentraciones.

%Inhibición					
	1	10	100	500	1000
Hx	4.74 $\pm$ 4.8	51.45 $\pm$ 4.6	68.63 $\pm$ 1.8	85.05 $\pm$ 1.6	86.12 $\pm$ 1.5
MeOH/ACN	6.08 $\pm$ 2.6	43.86 $\pm$ 4.4	56.75 $\pm$ 0.6	68.73 $\pm$ 1.8	76.74 $\pm$ 0.9
Hx-D	3.34 $\pm$ 4.3	54.56 $\pm$ 1.1	65.65 $\pm$ 2.7	85.01 $\pm$ 0.3	88.63 $\pm$ 0.5

Nota: Valores expresados como media $\pm$ D.E.

Por otro lado, el extracto Hx y las fracciones B y C mostraron un comportamiento similar empleando ambos diluyentes, siendo éstas activas e inhibiendo la producción de NO en un porcentaje aproximado o mayor al 50% en concentraciones de 500 y 1,000 $\mu\text{g/mL}$. En lo que respecta a la fracción A, ésta mostró una inhibición de la producción de NO mayor al 50% empleando DMSO como diluyente pero empleando Tween 80 el porcentaje fue de 29.6%. En el caso de E y F, estas fracciones tuvieron una actividad mayor al 50% empleando Tween 80 como diluyente, pero con DMSO no se produjo un efecto significativo a ninguna concentración. Por último, la fracción G no produjo actividad superior al 50% empleando Tween 80 o DMSO.

3.3.4 Viabilidad celular

Para demostrar que los extractos y fracciones poseen un efecto inhibitorio de la producción de NO en macrófagos y no un efecto citotóxico, se realizó el ensayo de viabilidad celular (Cuadro 9). Los resultados obtenidos en el ensayo de MTT con los extractos diluidos en DMSO sugieren que tanto el DMSO y las fracciones de *C. aromatisans*, no poseen un efecto citotóxico, ya que todas las células produjeron cantidades de formazán similares a la del control. En el caso de las fracciones que indujeron la producción de mayor cantidad de formazán, se observa un porcentaje mayor a 100, esto puede deberse a que *C. aromatisans* estimula el metabolismo celular. Esta hipótesis tendría que ser verificada por medio de otros experimentos.

Cuadro 9. Porcentaje de viabilidad celular de las fracciones del extracto Hx de *C. aromatisans* mediante el ensayo de MTT.

Conc. μg/mL	HX %V	A %V	B %V	C %V	D %V	E %V	F %V	G %V
1000	101.11	81.98	119.9	96.914	114.07	96.54	108.8	84.32
500	123.20	125.4	123.7	136.05	127.78	120.1	122.2	83.83
100	121.60	147.2	123.1	148.77	128.15	140.1	139.9	162.7
10	109.87	143.7	94.69	137.04	115.8	142	113.5	107.4

*C-: macrófagos sin tratamiento considerados como 100% de viabilidad celular

LPS: 96.91 % de viabilidad celular

DMSO: 105.6 % de viabilidad celular.

3.3.5 Determinación de TNF-α por el método de ELISA

Este método fue empleado para realizar la evaluación inicial de los extractos. Los resultados del Cuadro 10 y Figura 9 muestran el estudio realizado de disminución de la producción de este mediador por parte de las células THP-1, donde se observa que la fracción Hx a una concentración de 100 μg/mL obtiene el mayor porcentaje de inhibición; tanto el extracto total como las fracciones ACN/MeOH y Hx poseen un efecto mayor al 80%, así mismo, para la fracción Hx se obtuvo un efecto casi del 90% empleando una concentración de 50 μg/mL. Estos resultados nos indican que la fracción Hx posee un buen efecto inhibitorio de la liberación de TNF-α en el medio de cultivo. En lo que

respecta a las fracciones A, C, E y F, se encontró que son las que poseen el mayor efecto inhibitorio de este mediador, sin embargo, esto no indica que B, D y G no tienen efecto inhibitorio de la liberación de TNF- α , los resultados indican que alcanzan un 50% de inhibición aproximado, por lo que también estas fracciones poseen metabolitos responsables de dicho efecto. En general, estos resultados muestran que la fracción Hx posee una inhibición similar a la de las fracciones subsiguientes, empleando la misma concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$. Por este motivo, en lo que respecta a la inhibición de TNF- α , es posible emplear la fracción Hx como agente inhibitorio de esta citosina, sin necesidad de realizar un fraccionamiento posterior.

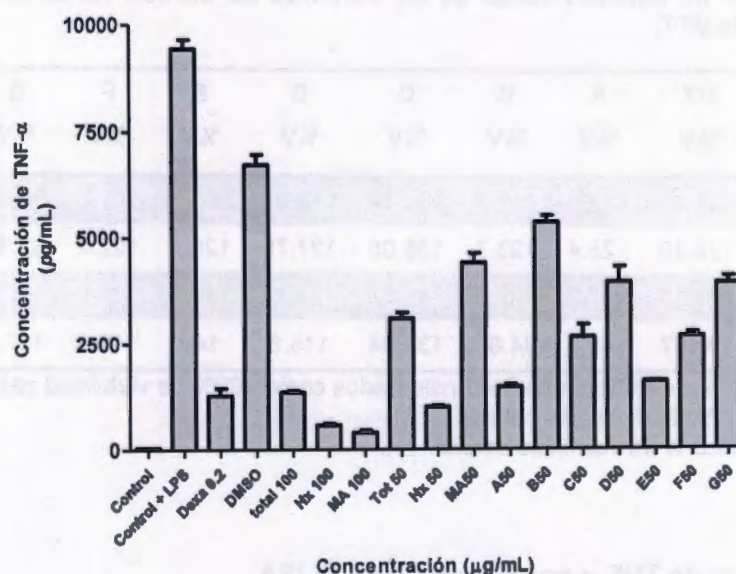


Figura 9. Evaluación de diferentes concentraciones de extractos y fracciones de *C. aromatisans* en la inhibición de la liberación de TNF- α en células THP-1 activadas con LPS 1 $\mu\text{g/mL}$.

Cuadro 10. Evaluación de la liberación de TNF- α en células THP-1 activadas con LPS 1 μ g/mL, en presencia de diferentes concentraciones de extractos y fracciones de *C. aromatisans*.

	Concentración (100 μ g/mL)						ACN/MeOH
	Control	Control + LPS	Dexa	DMSO	Total	Hx	
Concentración de TNF- α (pg/mL)	46.3 $\pm$ 3.3	9435 $\pm$ 304.1	1272.5 $\pm$ 243.9	6711.3 $\pm$ 498	1355 $\pm$ 56.6	575 $\pm$ 53	398.8 $\pm$ 68.9

Concentración (50 μ g/mL)							
	Control	Control + LPS	Dexa	DMSO	Total	Hx	ACN/MeOH
Concentración de TNF- α (pg/ml)	46.3 $\pm$ 3.3	9435 $\pm$ 304.1	1272.5 $\pm$ 243.9	6711.3 $\pm$ 498	3085 $\pm$ 198	1006 $\pm$ 26.5	4398 $\pm$ 314.6
Inhibición (%)	100	0	86.5	28.9	67.3	89.3	53.4

Concentración (50 µg/mL)								
	Hx	A	B	C	D	E	F	G
Concentración de TNF-α (pg/ml)	1006±26.5	1469±79.5	5349±213.9	2650±568.1	3941±503.8	1597.5±10.6	2661.3±132.6	3920±219.2
Inhibición (%)	89.3	84.4	43.3	71.9	58.2	83.1	71.8	58.5

Nota: Valores expresados como media $\pm$ D.E. Abreviaturas: Dexa = dexametasona

3.3.6 Determinación de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y COX-2 por qRT-PCR

En la Figura 10 y el Cuadro 11 se muestran los índices de relatividad para las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 y la enzima COX-2. En esta evaluación se observa que la expresión de ARNm convertido en ADNc fue menor en el extracto Hx a 100 μ g/mL en presencia del estímulo ocasionado por LPS. Por este motivo, se realizó una evaluación a una dosis menor de extracto (50 μ g/mL), la cual fue únicamente activa para IL-1 β .

Este extracto previamente fue fraccionado y sus siete fracciones fueron evaluadas a la misma dosis de 50 μ g/mL con lo que se encontró que las fracciones C, E y F son las más activas, siendo C la fracción que presentó mayor inhibición de la expresión de la enzima COX-2.

En todos los casos, C fue la fracción más activa. A pesar de que en la determinación de TNF- α por el método de ELISA muestra una gran disminución de la liberación de este mediador al medio ocasionada por el extracto Hx, el análisis de PCR muestra que a nivel de expresión del ARNm, la fracción C sí posee una diferencia significativa con respecto al extracto Hx, obteniéndose una disminución mayor ocasionada por C que por el extracto Hx.

Por este motivo, C es la fracción considerada para posteriores análisis y la identificación de los principales componentes químicos.

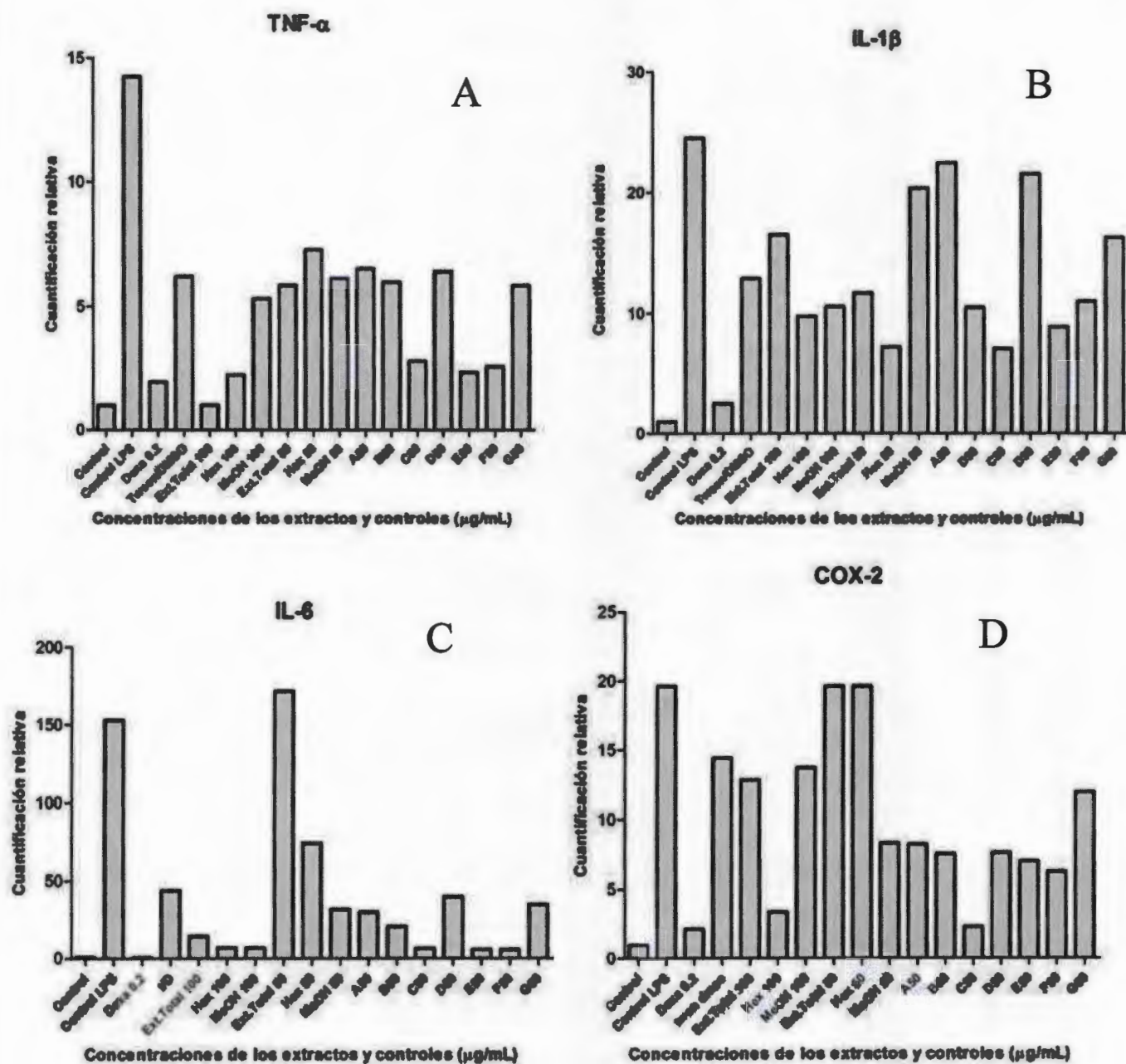


Figura 10. Cuantificación relativa de los extractos y fracciones a diferentes concentraciones. A) TNF-α, B) IL-1β, C) IL-6 y D) COX-2.

Cuadro 11. Índices de relatividad obtenidos para la inhibición de la expresión de ARNm en las células THP-1 tratadas con los extractos y fracciones.

Mediador	Control	Control LPS	Dexa 0.2	Tween/DMSO	Ext.Total	Hex	MeOH	Ext.Total	Hex	MeOH
					100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	50µg/ml
TNF-a	1	14.2	1.9	6.2	1.0	2.2	5.3	5.8	7.3	6.1
IL-1b	1	24.5	2.5	12.9	16.5	9.8	10.6	11.7	7.3	20.4
IL-6	1	152.9	0.6	44.0	14.5	6.8	6.8	171.7	74.1	31.7
PGE2	1	19.6	2.1	14.4	12.8	3.4	13.7	19.6	19.6	8.3

Mediador	Control	Control LPS	Dexa 0.2	Tween/DMSO	A	B	C	D	E	F	G
					50 µg/ml						
TNF-a	1	14.2	1.9	6.2	6.5	5.97	2.81	6.4	2.35	2.59	5.84
IL-1b	1	24.5	2.5	12.9	22.47	10.48	7.13	21.55	8.92	11.02	16.29
IL-6	1	152.9	0.6	44.0	30.13	20.84	6.75	39.94	6	5.82	34.9
PGE2	1	19.6	2.1	14.4	8.21	7.51	2.29	7.62	6.98	6.23	11.94

*Nota: Datos obtenidos considerando el control como 1 (unidades arbitrarias).

3.3.7 Viabilidad de células THP-1

Las células THP-1 fueron evaluadas por el método de coloración con Presto Blue®, donde se evalúa la actividad metabólica celular. Los resultados indicaron que todas las células mantuvieron una actividad metabólica cercana al 100% como indica el control de células sin tratamiento. Sin embargo, el control con LPS, el extracto Hx y sus fracciones (a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$) superaron, en su mayoría, el 100% de viabilidad celular en múltiples experimentos, lo que puede indicar que el LPS y los extractos además de no dañar el metabolismo celular, lo activa. El extracto Hx mostró el mayor incremento metabólico celular, lo que podría indicar que no es el efecto del LPS lo que activa mayormente a las células, sino componentes que se encuentran en el extracto y que al fraccionarlo, no se obtiene el mismo porcentaje de activación metabólica (Figura 11).

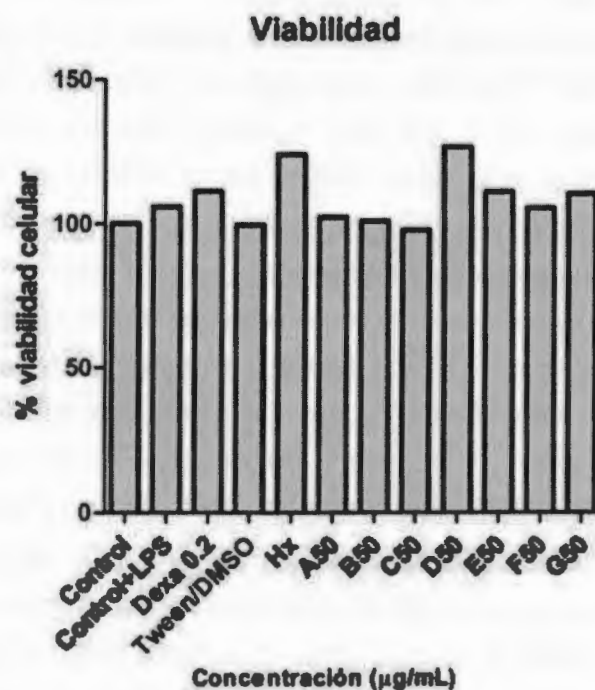


Figura 11. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células THP-1 en presencia de LPS y los extractos y fracciones de *C. aromatisans* a diferentes concentraciones.

3.4 DISCUSIÓN

C. aromatisans es empleada en la medicina tradicional en forma de pomada y se prepara arrojando hojas molidas de la planta al fuego junto con petrolato. El petrolato, de naturaleza no polar, a temperatura ambiente mantiene una consistencia firme y semisólida lo que le permite aplicarse sobre la piel formando una capa cerosa, y cuando es calentado este se vuelve líquido. Al fabricarse esta pomada, no se sabe exactamente cuáles compuestos son los que permanecen con el petrolato, pero la hipótesis es que las hojas al fuego liberan algunos aceites esenciales que son capturados por el petrolato, dada su característica consistencia, además, por su polaridad, es muy probable que extraiga los compuestos de menor polaridad que contienen las hojas y que estos sean los responsables de la actividad farmacológica de esta especie. Los resultados satisfactorios del extracto Hx, que contiene compuestos mayormente de baja polaridad, podrían darle sustento a esta teoría; por lo que se propone realizar la evaluación antiinflamatoria de los aceites esenciales con los modelos empleados y comparar los resultados, además de continuar con el estudio fitoquímico biodirigido del extracto Hx para encontrar los compuestos responsables de la actividad y estudiar su mecanismo de acción. La evaluación antiinflamatoria preliminar *in vivo* en ratones BALB/c de *C. aromatisans* por inducción de edema plantar con carragenina indicó que tanto el extracto ACN/MeOH como el Hx tenían un alto potencial antiinflamatorio; por esta razón el ensayo fue repetido en ratones NIH (cepa menos sensible), encontrándose que el extracto ACN/MeOH no tenía efecto significativo sobre el edema plantar, a diferencia del extracto Hx, que mostró actividad significativa a 100 y 200 mg/Kg, por esta razón, este extracto fue seleccionado para determinar la actividad inhibitoria de la producción de NO en macrófagos humanos activados, encontrándose que este extracto disminuyó la producción de NO a concentraciones más bajas que la basal a partir de 10 a 1,000 $\mu\text{g/mL}$. Los macrófagos participan activamente en la respuesta antiinflamatoria liberando citocinas y factores que reclutan otras células hacia los sitios de infección o donde surgió la alteración o el daño tisular. Adicionalmente, los macrófagos rápidamente activan la expresión de los genes responsables de la síntesis de lípidos bioactivos derivados del ácido araquidónico y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, como por ejemplo el NO. Todas estas moléculas contribuyen a la regulación de la respuesta antiinflamatoria (Boscá, 2005). El empleo de macrófagos en los estudios antiinflamatorios contribuye a la determinación del

mecanismo de acción de las sustancias antiinflamatorias evaluadas, por lo tanto, esto puede sugerir que parte del mecanismo de acción del extracto Hx de *C. aromatisans* es inhibir la producción de algunos de los mediadores proinflamatorios que producen los macrófagos, entre ellos el NO; para confirmar esto, es necesario realizar una prueba de viabilidad celular para descartar que la disminución de NO se deba a muerte celular y no inhibición de la producción de NO. Los resultados de la determinación de NO sugieren que el extracto Hx disminuye la producción de este mediador, y las fracciones responsables de este efecto posiblemente sean B, C y D, en las cuales se sugiere la presencia de terpenos y ácidos grasos como responsables de dicha actividad. También, estos resultados sugieren que uno de los mecanismos involucrados en la inhibición de la inflamación de *C. aromatisans* es inhibir la producción de NO celular. Sin embargo, éste posiblemente no sea el único mecanismo responsable del efecto antiinflamatorio de *C. aromatisans*, por lo que explorar la implicación de otras vías y otros mediadores es recomendable, ya que podrían estar complementándose para potenciar el efecto antiinflamatorio de la especie. La posible presencia de compuestos terpenoides y ácidos grasos, una vez más, reafirmaría el hecho de que en la medicina tradicional esta especie se utilice en una base de petrolato, que retendría estos compuestos no polares y aceites esenciales para administrarse de forma tópica; así mismo, estos estudios podrían sugerir el uso de *C. aromatisans* como antiséptico (uso no reportado directamente), para lo que se necesitaría evaluar esta especie en otros microorganismos.

Por otra parte, la importancia de los análisis celulares y moleculares recae en el mecanismo de acción de los extractos y fracciones de *C. aromatisans*; por un lado, se ha comprobado que tanto el extracto Hx como la fracción C disminuyen la cantidad de óxido nítrico, ahora comprobamos no sólo que este extracto y esta fracción son capaces de inhibir la liberación al medio de cultivo algunos mediadores pro inflamatorios importantes, tales como el TNF- α , sino que la inhibición de la liberación de mediadores es a nivel de ARNm. El objetivo de las evaluaciones mediante PCR con ADNc, es precisamente conocer a qué nivel el extracto está deteniendo la expresión de los mediadores. Por lo tanto, dado que TNF- α , IL-1b, IL-6 y COX-2 están siendo inhibidas por el extracto Hx y la fracción C, podemos concluir que el bloqueo inhibitorio se está llevando a cabo desde el núcleo celular, por este motivo se disminuye la expresión de los mediadores; esta característica nos indica que el extracto Hx y la fracción C contienen metabolitos capaces

de disminuir o inhibir los procesos inflamatorios. Estos mecanismos evaluados explican los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* con el ensayo de carragenina, donde la disminución de la inflamación fue superior al 80%. *C. aromatisans* es una planta potencial para la elaboración de medicamentos antiinflamatorios y tal vez con otros fines relacionados a la disminución de TNF- α , como por ejemplo, algún efecto anticancerígeno, y como actúa a nivel de la enzima COX-2 es muy probable que tenga a su vez efecto analgésico.

C. aromatisans es una planta utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de la inflamación y algunos síntomas causados por la artritis reumatoide, que ha sido empleada a través de los años por las comunidades Mayas de la península de Yucatán, esta investigación valida el uso tradicional que se le da a esta planta.

3.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, S., Anuntiyo, J., Malemud, C.J. and Haqqi, T. M. 2005. Biological basis for the use of botanicals in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a review. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2, 301-308.
- Bingham III, C.O. 2002. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *Journal of rheumatology*. 29:65. pp 3-9.
- Boscá, L., Zeini, M., Través, P.G. and Hortelano, S. (2005). Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology*, 208, 249-258.
- Cho, J.Y., Kim, P.S., Park, J., Yoo, E.S., Baik, K.U., Kim, Y.K., Park, M.H. 2000. Inhibitor of tumor necrosis factor- α production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells from *Amorpha fruticosa*. *J Ethnopharmacol*, 70, 127-133.
- Clavin, M., Gorzalczany, S., Machoc, A., Muñoz, E., Ferraro, G., Acevedo, C., Martino, V. (2007). Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium amottianum*. *J Ethnopharmacol*, 112, 585-589.
- Delgado, A.V., McManus, A.T., Chambers, J.P. 2003. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*, 37, 355-61.
- El-Seedi, H.R., Ohara, T., Sata, N., Nishiyama, S. (2002). Antimicrobial diterpenoids from *Eupatorium glutinosum* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol*, 81, 293-296.
- Flores, J. (2003). *Farmacología humana 4a ed.* Masson. Barcelona España. pp. 330-333.
- Guzik, T.J., Korb, R., Adamek-Guzik, T., (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Phys Pharmacol*, 54, 469-487.
- Hewett, J. A. and Roth, R.A. 1993. Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharides. *Pharmacol Rev*, 45, 382-411.
- Hofseth, L. J. (2008). Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and cancer. *Cancer Lett*, 268, 10-30.
- Kubes, P. and McCafferty, D.M. 2000. Nitric oxide and intestinal inflammation. *Am J Med*, 109, 150-158.
- Maas, M., Deters, A. M., Hensel, A. (2011). Anti-inflammatory activity of *Eupatorium perfoliatum* L. extracts, eupafolin, and dimeric guaianolide via iNOS inhibitory activity

- and modulation of inflammation-related cytokines and chemokines. *J Ethnopharmacol*, 137, 371-381.
- Maas, M., Hensel, A., Costa, F.B., Brun R., Kaiser, M., Schmidt TJ. (2011). An unusual dimeric guaianolide with antiprotozoal activity and further sesquiterpene lactones from *Eupatorium perfoliatum*. *Phytochemistry*. 72, 635-44.
- OECD. (2001) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals / Section 4: Health Effects Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method.
- Patra, A., Mukhopadhyay, A.K., Mitra, A.K., (1981). Constituents of *Eupatorium riparium* Regel. *J Indian Chem Soc*, 58, 1124-1125 (abstract in Chemical Abstracts).
- Perez-Garcia, F., Marin, E., Parella, T., Adzet, T., Canigüeral, S., (2005). Activity of taraxasteryl acetate on inflammation and heat shock protein synthesis. *Phytomedicine*, 12, 278-284.
- Saad, B., Abouatta, B.S., Basha, W., Hmade, A., Kmail, A., Khasib, S., Said, O. (2011). Hypericum triquetrifolium-Derived Factors Downregulate the Production Levels of LPS-Induced Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- α in THP-1 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011:586470, 1-7.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 82, 291-295.
- Walum, E. (1998). Acute oral toxicity *Environ Health Perspect*, 106, 497-503.
- Watson, W.H., Zhao, Y., Chawla, R.K. (1999). S-adenosylmethionine attenuates the lipopolysaccharide-induced expression of the gene for tumour necrosis factor alpha. *Biochem J*, 342, 21-25.

CAPITULO IV

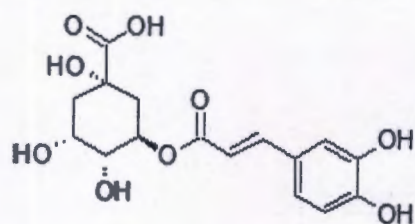
Estudio fitoquímico de *Critonia aromatisans*

4.1 INTRODUCCIÓN

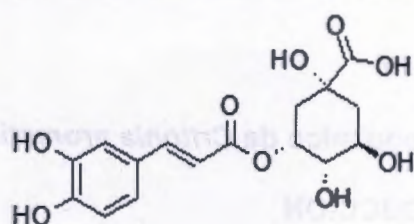
Critonia aromatisans (sinonimia *Eupatorium hemipteropodum* o *Eupatorium artomatisans*) pertenece a la familia Asteraceae y es empleada en la medicina tradicional para tratar las molestias ocasionadas por padecimientos reumáticos. A la fecha, no se han encontrado reportes de estudios fitoquímicos sobre esta especie, pero sí relacionadas al género *Eupatorium*. Entre algunos de los estudios fitoquímicos están los reportados para *E. perfoliatum* L. identificándose ácido clorogénico (1), ácido neoclorogénico (2), ácido 2,4- o 3,5-dicafeoilglucárico (3), ácido 3,4-dicafeoilglucárico (4), ácido 2,5-dicafeoilglucárico (5) y el ácido 3,5-dicafeoilquínico (6) (Maas *et al.*, 2008). Además, los extractos MeOH, EtOH y DCM de esta especie contienen eupafolina (7) y diguaiaperfolina (8), responsables del efecto antiinflamatorio de esta especie (Mass *et al.*, 2011).

El alcaloide pirrolizidínico licopsamina (9) y el guaianólido cumambrina B (10) fueron aislados de *E. maculatum* L. (Wiedenfeld *et al.*, 2009). El fraccionamiento biodirigido del extracto hexánico de hojas de *E. glutinosum* llevó al aislamiento de dos componentes activos: ácido 15-hidroxi-7-labden-17-oico y su derivado acetilado. Adicionalmente, en esta especie han sido aislados los compuestos dammara-20,24-dien-3-acetato (11), estigmasterol (12), epi-friedelanona (13) y palmitato de nepehinol (El-Seedi, 2002). En otro estudio, el exudado resinoso de las hojas de *E. salvia* llevó al aislamiento del ácido 7-hidroxi-8(17)-labden-15-oico (ácido sálvico) (Urzua, 1998).

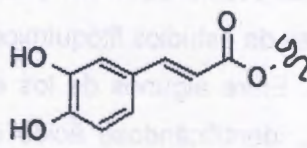
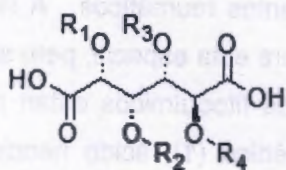
Se ha demostrado que algunos extractos de especies del género *Eupatorium* disminuyen la producción de NO, tal es el caso de *E. ripartum*. De las partes aéreas de esta especie se han aislado compuestos como estigmasterol, epi-fridelinol, acetato de taraxasterilo (14) y palmitato (15). De estos compuestos, estigmasterol y el acetato de taraxasterilo son los que poseen efecto antiinflamatorio (Patra *et al.*, 1981; Perez-Garcia *et al.*, 2005). En otra especie, *E. amottianum*, se han encontrado tres compuestos antiinflamatorios: nepetina (16), jaceosidina (17) e hispидуina (18) (Clavin *et al.*, 2007).



(1)



(2)

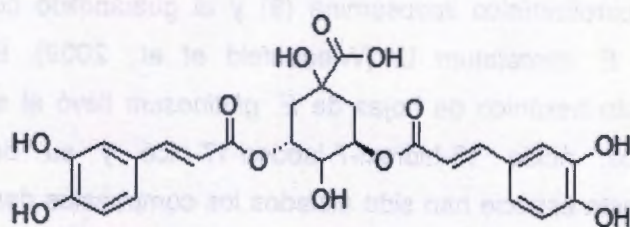


R4= Cafeoil

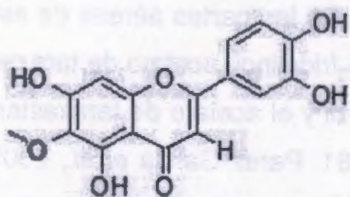
(3): R1 = R3 = cafeoil, R2 = R4 = H o R2 = R4 = cafeoil, R1 = R3 = H

(4): R2 = R3 = cafeoil, R1 = R4 = H

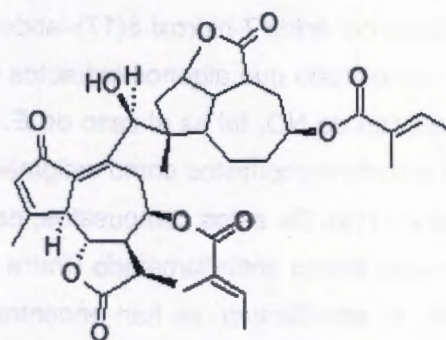
(5): R1 = R4 = cafeoil, R2 = R3 = H



(6)

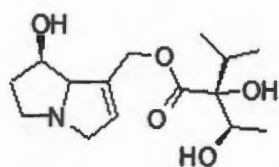


(7)

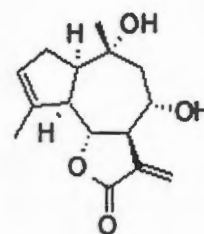


(8)

Figura 12. Compuestos aislados de *E. perfoliatum*.

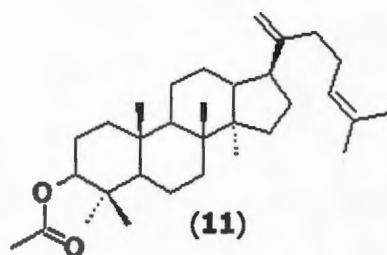


(9)

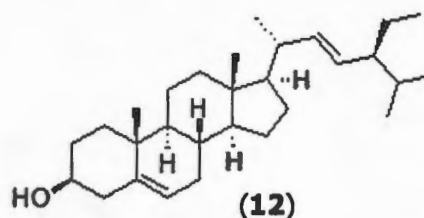


(10)

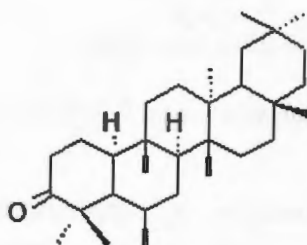
Figura 13. Compuestos aislados de *E. maculatum*.



(11)

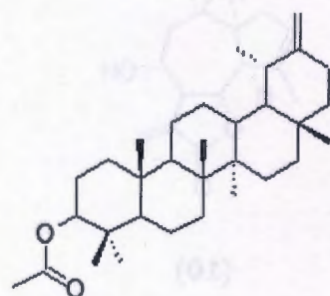


(12)



(13)

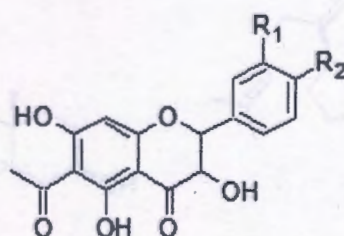
Figura 14. Compuestos aislados de *E. glutinosum*.



(14)



(15)



- (16) $R_1 = OH$ $R_2 = OH$
 (17) $R_1 = OH$ $R_2 = OCH_3$
 (18) $R_1 = OH$ $R_2 = H$
 (19) $R_1 = OCH_3$ $R_2 = OCH_3$

Figura 15. Compuestos aislados de *E. arnottanum*.

En el presente capítulo se describe la caracterización química, mediante cromatografía de gases acoplada a masas, así como la purificación e identificación por resonancia magnética nuclear, de uno de los metabolitos mayoritarios presentes en las fracciones que mostraron actividad antiinflamatoria y antimicrobiana, obtenidas a partir del extracto Hx activo de *C. aromatisans*, así como el análisis comparativo por CG/EM de los aceites esenciales de *C. aromatisans*.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Procedimientos generales

4.2.1.1 Recolección y preservación del material vegetal

Considerando un criterio etnomédico se recolectaron en la localidad de Yaxcabá, hojas provenientes de árboles y/o arbustos de *Critonia aromatisans* (A. Dorantes colecta 134, octubre de 2009). Las hojas fueron secadas en una estufa a 37 °C y una vez secas se procedió a su preservación mediante el empleo de bolsas con cierre hermético. Los ejemplares de referencia herborizados se depositaron en el herbario de la Unidad de Recursos Naturales del CICY. Para la identificación de las especies se contó con la participación de la Dra. Marta Méndez de la Unidad de recursos naturales CICY.

4.2.1.2 Compuestos químicos y disolventes

Todos los disolventes (MeOH, EtOH, ACN, DCM, Hx) fueron obtenidos de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

4.2.1.3 Obtención del extracto hexánico.

3 Kg de hojas secas pulverizadas se maceraron con metanol (MeOH) durante 3 días (3×) a temperatura ambiente, obteniéndose por evaporación a presión reducida (385.24 g) de extracto MeOH. Una porción del extracto MeOH (200 g) fue resuspendida en MeOH, adicionando a esta suspensión tres veces (3X) el volumen de ACN. La suspensión resultante mostró la presencia de un precipitado blanco insoluble en la mezcla, pero soluble en agua, la cual fue retirada de la suspensión. Una vez retirado el precipitado, se adicionó un volumen de hexano en proporción 3:1 con respecto a la mezcla ACN/MeOH. La extracción con hexano se realizó tres veces obteniéndose 36 g de extracto Hx.

4.2.1.4 Obtención de aceites esenciales (AE) por arrastre de vapor a partir de hojas frescas de *C. aromatisans*.

Los aceites se obtuvieron colocando 40 g de material vegetal fresco en un matraz conectado a otro con 600 mL de agua a 100 °C. Los aceites esenciales arrastrados por el vapor del agua destilada fueron colectados y extraídos mediante una partición con hexano (3:1). La fracción hexánica fue secada a vacío por medio de un evaporador rotatorio, y

posteriormente los aceites fueron pesados en el vial correspondiente y preservados en congelación.

4.2.2 Cromatografía de gases acoplada a masas CG-EM de los aceites esenciales y fracciones activas del extracto hexánico de hojas de *C. aromatisans*

Para el análisis de los componentes presentes en el aceite esencial de hojas frescas de *C. aromatisans* obtenido por el método de hidrodestilación así como el compuesto puro ciclocolorenona se utilizó un cromatógrafo de gases-masas marca Agilent Technologies 6890N acoplado a un detector selectivo de masas 5973N. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: inyección modo Split de 1 μ L de una disolución al 1% en diclorometano, columna Ultra 1 (Marca J8W Scientific) de metilsiloxano con diámetro interno de 0.32 mm y longitud de 25 m. El flujo fue de 1.5 mL/min empleando Helio como gas acarreador. Las muestras se analizaron a una temperatura inicial de inyección de 100 °C por 4 minutos; después de la inyección, con una rampa de 10 °C por minuto hasta una temperatura final de 215 °C la cual se mantuvo por 5 minutos más. Los espectros de masas obtenidos fueron comparados con los de la biblioteca NIST05 del equipo.

Para el análisis del extracto hexánico de *C. aromatisans* y las fracciones A, B, C y D obtenidas de la CLV se utilizó el CG-EM. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: inyección modo split de 1 μ L de una disolución al 1% en diclorometano, columna HP 5MS con diámetro interno de 0.25 mm y longitud de 30 m. El flujo fue de 0.8 mL/min empleando helio como gas acarreador. Las muestras se analizaron a una temperatura inicial de inyección de 50 °C por 10 minutos; después de la inyección, con una rampa de 15 °C por minuto hasta una temperatura final de 310 °C que se mantuvo por 10 minutos.

4.2.3 Filtración a vacío con tonsil del extracto hexánico de *C. aromatisans*

Una fracción del extracto hexánico (100 mg) fue prepurificado por filtración a vacío (Figura 1), en una columna empacada con tonsil (bentonita sódica) empleando una columna con filtro de vidrio poroso de 2 cm de diámetro interno por 7 cm de altura. La muestra fue aplicada en sólido (adsorbida en gel de sílice de 200-300 mallas) a la columna, empleando hexano (100%) como eluyente, e incrementando la polaridad del

sistema con acetato de etilo de la siguiente manera: 98:2 hexano/acetato de etilo, 95:5 Hx/AcOEt, 90:10 Hx/AcOEt, 85:15 Hx/AcOEt y 80:20 Hx/AcOEt. Se obtuvieron 6 fracciones, F1 (20.4 mg), F2 (16.7 mg), F3 (2.6 mg), F4 8.5 mg), F5 (15.4) y F6 (9.4 mg).

4.2.4 Cromatografía en capa fina (CCF)

Se pesó 1 mg de cada fracción seca y se disolvió en 1 mL del disolvente correspondiente y la disolución se aplicó en la placa de gel de sílice con ayuda de un capilar. En el caso del monitoreo de las fracciones, con un capilar se aplicó 10 veces la muestra en la placa (placas de soporte de aluminio con película de 0.254 mm de gel de sílice de la marca Merck 60F₂₅₄) y se eluyó empleando los sistemas de elución correspondientes (Hx/DCM 20:80 y DCM/An 97:03 y 98:02). Los agentes reveladores utilizados fueron físicos (luz ultravioleta de 254 y 365 nm) y químicos (disolución al 4% de ácido fosfomolibdico).

4.2.5 Cromatografía líquida al vacío (CLV) del extracto hexánico de *C. aromatisans*

Se emplearon 34 g de extracto hexánico, el cual fue aplicado en sólido a una columna de filtración empacada con gel de sílice para CCF con una altura de 7 cm y diámetro de 10 cm. La fase móvil consistió en un sistema por gradiente con 100% Hx, Hx/AcOEt 98:2, 96:4, 94:6, 92: 8, 90: 10, 85:15, 80: 20, 75: 25, 70:30, 60:40, 50:50, 100% AcOEt, AcOEt/ MeOH 50: 50 y MeOH 100%. Se colectaron 21 fracciones con volúmenes de 500 mL, las cuales fueron analizadas por CCF, y se reunieron en 7 fracciones finales (Figura 16) de acuerdo a su similitud cromatográfica. Estas fracciones fueron seleccionadas para realizar los bioensayos de actividad antimicrobiana y determinación de NO en macrófagos de ratón NIH (ver capítulos II y IV).



Figura 16. Perfil cromatográfico de las fracciones resultantes del fraccionamiento por CLV del extracto Hx con el sistema Hx/An 8:2.

4.2.6 Análisis de la fracción C

4.2.6.1 CLV de la fracción C

Se empleó 1.1 g de la fracción C, aplicada en sólido a una columna de 5 cm de diámetro empacada con gel de sílice para CCF con una altura de 7 cm y 5 cm de diámetro. La fase móvil por gradiente que consistió en 100% Hx, Hx/DCM 99:01, 98:02, 97:03, 96:04, 95:05, 94:06, 93:07, 92:08, 91:09, 90:10, 88:12 y reduciendo el Hx de 2 en 2 hasta llegar a 100% de DCM y posteriormente 50:50 DCM/AcOEt, 100% AcOEt, AcOEt/MeOH 50: 50 y MeOH 100%. Se obtuvieron 118 fracciones las cuales fueron analizadas por CCF, reuniéndose en 8 fracciones finales (Figura 17) de acuerdo a su similitud cromatográfica, que posteriormente fueron secadas y pesadas.

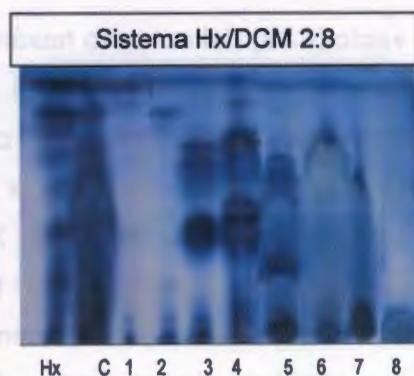


Figura 17. Perfil cromatográfico de las fracciones resultantes de la CLV de la fracción C con el sistema Hx/DCM 2:8.

4.2.6.2 CCF preparativa de la fracción C-6

Con 29 mg de la fracción C-4 se realizó una CCF preparativa con placas de gel de sílice de 20 × 20 cm con el sistema DCM/An 97:0.3 donde se obtuvieron 5 fracciones; F1 (2 mg), F2 (1.1 mg), F3 (13.7), F4 (2.5 mg) y F5 (0.3 mg). La fracción C6-3 se encontraba pura por lo que se denominó compuesto C6-3 (mayoritario) y se obtuvieron 12.7 mg de color amarillo y de consistencia aceitosa con un Rf de 0.7 empleando el sistema DCM:An 97:03 (Figuras 18 y 19).

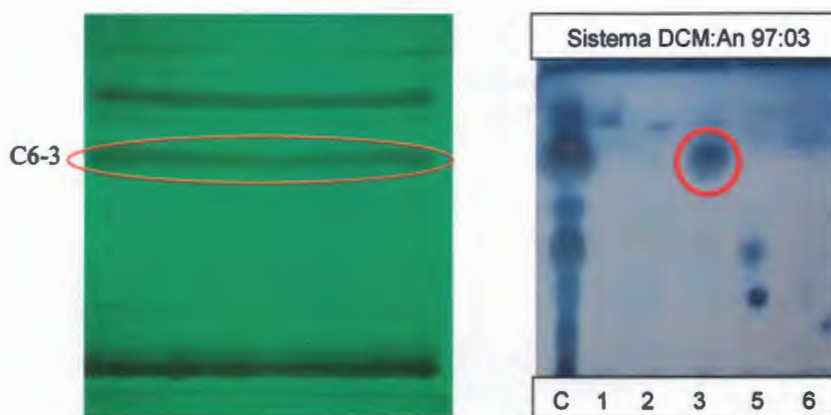


Figura 18. Perfil cromatográfico de las fracciones resultantes de la CCF preparativa de la fracción C-6 con el sistema DCM/An 2:8.

4.2.6.3 Análisis de RMN

Los análisis de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ^1H) y de carbono 13 (RMN- ^{13}C) mono y bidimensionales, homo y heteronucleares para elucidar la ciclocolorenona se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance Ultrashield 500 con sonda dual de 5 mm (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Para la disolución de las muestras se utilizó cloroformo, deuterado. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm). El análisis de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ^1H) para elucidar la cumarina

4.2.6.4 Compuesto C6-3

RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 0.79 (3H, d, $J = 6.9$, H-14), 1.02 (3H, s, H-12*), 1.24 (3H, s, H-13*), 1.25 (1H, m, H-10), 1.43 (1H, tt, $J = 13.2, 3.2$ Hz, H-8), 1.47 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6). 1.59 (1H, m, H-9), 1.72 (3H, d, $J = 2.0$ Hz, H-15), 1.96 (1H, m, H-9), 1.99 (1H, m, H-7), 2.06 (1H, dd, $J = 18.4, 2.8$ Hz H-2), 2.07 (1H, m, H-8), 2.49 (dd, $J = 18.4, 6.6$, H-2), 2.95 (1H, bs, H-1). RMN- ^{13}C : (500 MHz, CDCl_3): 8.2 (C-15), 16.5 (C-12), 17.4 (C-14), 21.1 (C-9), 25.9 (C-11), 28.5 (C-6), 29.5 (C-13), 31.6 (C-7), 32.3 (C-10), 32.4 (C-8), 40.2 (C-2), 42.5 (C-1), 140.3 (C-5), 176.4 (C-4), 208.3 (C-3). *Señales intercambiables.

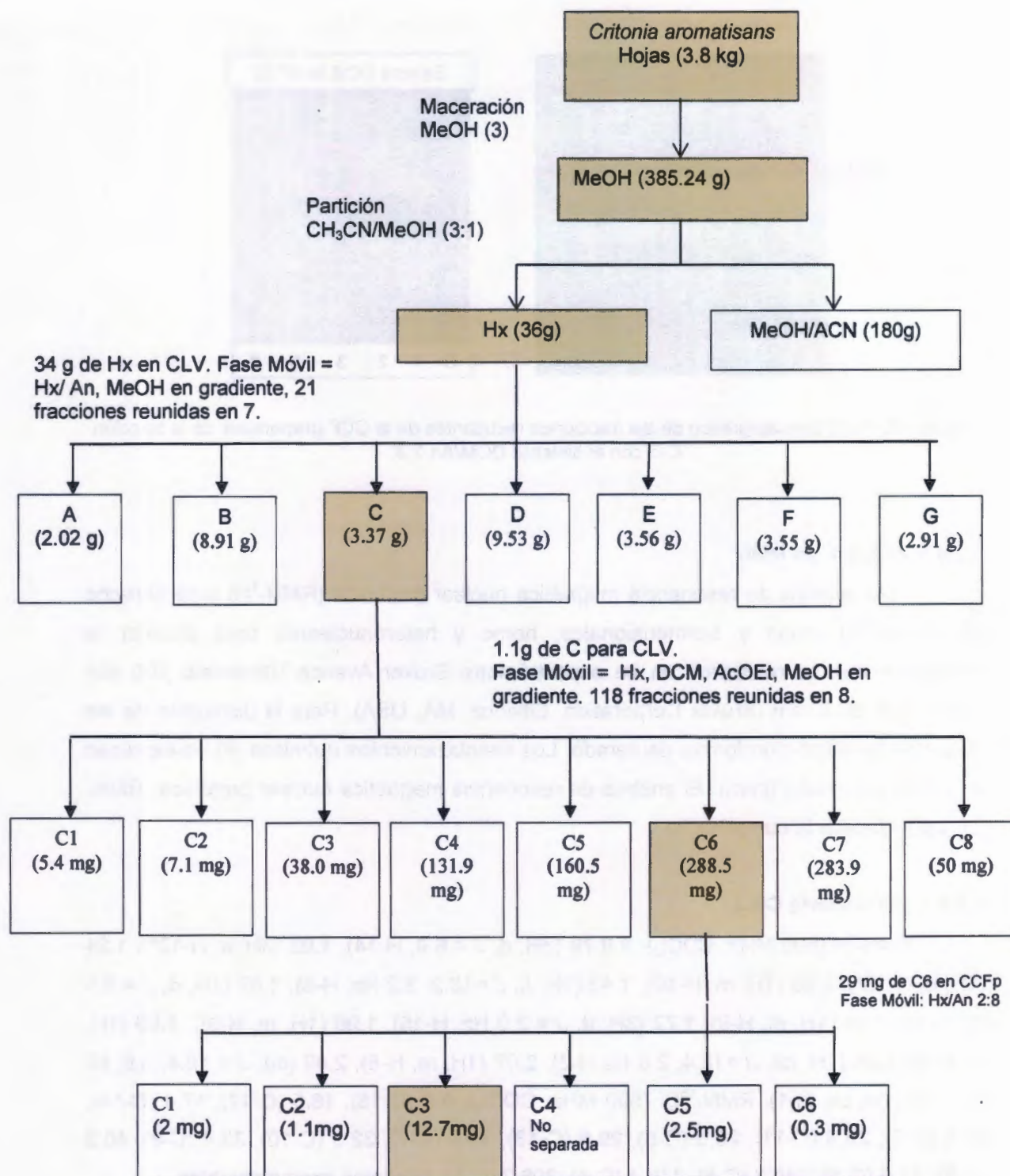


Figura 19. Esquema de purificación de C6-3

4.2.7 Análisis de la fracción D

4.2.7.1 Cromatografía de mediana presión o "Flash"

En el caso de la fracción D (Figura 20) se empleó una columna de vidrio de 5 cm de diámetro empacada con gel de sílice de 35 cm de alto, calibrada a una presión de 0.5 in/15 s. La muestra fue aplicada en seco como cabeza y la fase móvil fue empleada en un gradiente de DCM/An iniciando con hexano al 100%, seguida de Hx/DCM 50:50, DCM 100%, DCM/An 99:1, 98:2, 97:3, 95:5, 90:10, 50:50 y 100% An, seguida de An/AcOEt 50:50, AcOEt 100%, AcOEt/MeOH 50:50 y MeOH 100%. Se obtuvieron 117 fracciones que fueron reunidas por similitud cromatográfica (CCF) en 11 fracciones principales. En las fracciones 1, 2 y 3 se indujo la cristalización de algunos componentes añadiendo éter etílico.

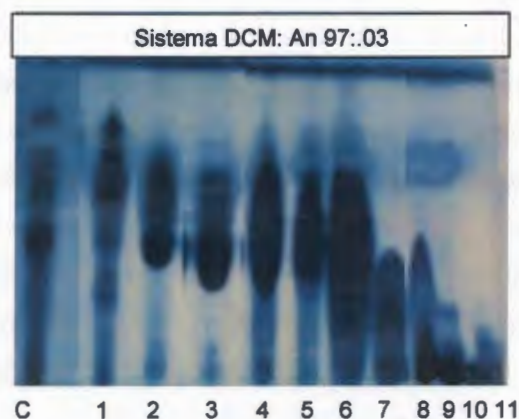


Figura 20. Perfil cromatográfico CCF de las 11 fracciones obtenidas de la fracción hexánica D, por cromatografía de mediana presión (Flash).

4.2.7.2 Compuesto D1-B

A una parte de la subfracción D1 se le añadió éter etílico y el producto cristalizado de color blanco fue llamado D1-B, el cual se analizó por RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃): δ 6.43 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3), 7.27 (1H, ddd, *J* = 7.5, 7.5, 1.1, H-6), 7.32 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-8), 7.48 (1H, dd, *J* = 7.7, 1.6, Hz, H-5), 7.53 (1H, ddd, *J* = 7.4, 7.3, 1.8, H-7), 7.71 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4).

4.3 RESULTADOS

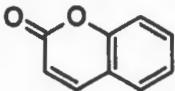
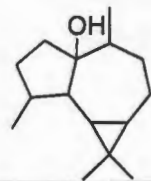
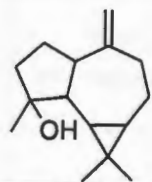
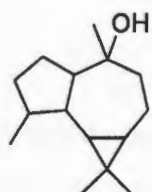
4.3.1 Comparación del perfil cromatográfico de los aceites esenciales (AE) y de las fracciones activas obtenidas del extracto hexánico (Hx) de hojas de *C. aromatisans* por CG-EM.

El extracto Hx mostró un total de 82 componentes, de acuerdo al análisis de CG-EM se determinó que está constituido principalmente de ácidos grasos y terpenoides. Se observaron 5 componentes mayoritarios, los principales fueron señalados como isolongifolen-5-ona y 2H-1-benzopiran-2-ona, seguido por acetato de lupenilo, palmitato de metilo y estigmasterol.

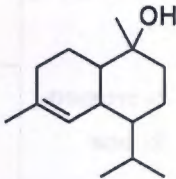
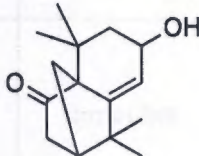
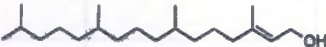
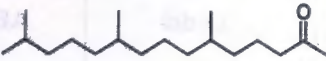
En el cuadro 12 se presenta el análisis comparativo de los AE, el extracto Hx y las fracciones activas "C" y "D" obtenidas de la prepurificación del extracto Hx por CLV con gel de sílice. Se puede observar que los distintos extractos y fracciones presentan similitud de componentes, empleando distintos métodos de análisis (Sección 4.2.2).

El análisis de los aceites esenciales de esta especie reveló la presencia de seis compuestos mayoritarios en CG-EM los cuales fueron identificados con un porcentaje de certeza del 89 al 99%, y corresponden posiblemente a 2H-1-benzopiran-2-ona (10.575 min), palustrol (14.700 min), ledol (16.507 min), α -cadinol (18.535 min), 1H-cicloprop (e) azulén-7-ol (14.776 min) e isolongifolen-5-ona (18.535 min). En lo que respecta al extracto Hx, en la fracción C, se encontró una posible similitud con la base de datos mayor al 90% con los compuestos: 2H-1-benzopiran-2-ona (24.422 min), 1H-cicloprop (e) azulén-7-ol (28.563 min), α -cadinol (30.788 min), isolongifolen-5-ona (33.927 min) y fitol (42.223 min). En la fracción D se encontró similitud con los compuestos 2H-1-benzopiran-2-ona (25.453 min), isolongifolen-5-ona (33.691 min), 2-pentadecanona (35.828 min), ácido palmítico (39.394 min) y ácido tetracosanoico (49.002).

Cuadro 12. CG-EM de los aceites esenciales y las fracciones obtenidas a partir de hoja fresca de *C. aromatisans*.

No.	Posible compuesto o derivado	Fracción	% de certeza	Tiempo de retención (min)	Fórmula
1	2H- 1- cromo-2- ona	AE	98	10.575	
		Frac C	<90	24.422	
		Frac D	<90	25.453	
2	Palustrol	AE	99	14.700	
3	1H- cicloprop (e) azulen- 7-ol	Frac C	<90	28.563	
		AE	93	14.776	
4	Ledol	AE	98	16.507	

Cuadro 12 (Continuación). CG-EM de los aceites esenciales y las fracciones obtenidas a partir de hoja fresca de *C. aromatisans*.

No.	Posible compuesto o derivado	Fracción	% de certeza	Tiempo de retención (min)	Fórmula
5	α -cadinol	AE	89	18.535	
		Frac C	<90	30.788	
6	Isolongifolen-5-ona	AE	89	18.535	
		Frac C	<90	33.927	
		Frac D	<90	33.691	
7	Ácido tetracosanoico	Frac D	<90	49.002	
8	Fitol	Frac C	<90	42.223	
9	2-pentadecanona	Frac D	<90	35.828	
10	Ácido hexadecanoico (palmítico)	Frac D	<90	39.394	

Existen reportes sobre la actividad biológica de algunos compuestos encontrados en el aceite esencial de *C. aromatisans*. La 2H-1-Benzopiran-2-ona y algunos derivados como la 2H-1-cromen-2-ona han sido encontrados en *Mikania glomerat*; el palustrol y ledol en *Ledum palustre*, *Cordylandra fluminensis* y *Drimys angustifolia*; α -cadinol en *Cordylandra fluminensis*; 1H-cicloprop (e) azulen-7-ol en *Magnolia grandiflora* (Hall *et al.*, 1973; Mikhailova *et al.*, 1979; Cabral *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2001; Da Silva *et al.*, 2004; Limberger *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2009). La actividad biológica de algunos de estos componentes se presenta en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Actividad biológica de los compuestos puros encontrados en el aceite esencial de *C. aromatisans*.

Compuesto	Actividad	Referencia
Derivados de 2H-1-Benzopiran- 2-ona	Antifilariasis	Tripathi <i>et al.</i> , 2000
1H-cicloprop (e) azulen-7-ol	Se sospecha de actividad insecticida.	Tawatsin <i>et al.</i> , 2006
α -cadinol	Antitermítico	Chang <i>et al.</i> , 2001

4.3.2 Análisis de la fracción C

4.3.2.1 Fracción C6

De la cromatografía preparativa de la fracción C-6 se obtuvieron 5 fracciones. La fracción C6-3 (12.7 mg) se obtuvo como un aceite de color amarillo, y presentó un R_f de 0.70 en el sistema de disolventes DCM/An 97:03; y fue soluble en DCM y Hx. El análisis de CG-EM indicó la pureza del compuesto mediante la aparición de una sola señal con un t_R de 11.002 min, y el análisis de masas muestra un ión molecular $[M^+]$ a m/z 218.2 indicando el peso molecular (Figuras 21 y 22). En el espectro de masas de alta resolución se obtuvo una masa de 218.2 que corresponde a la fórmula molecular $C_{15}H_{22}O$, cuyo índice de deficiencia de hidrógeno sugiere la presencia de 5 insaturaciones (dobles enlaces y/o anillos saturados).

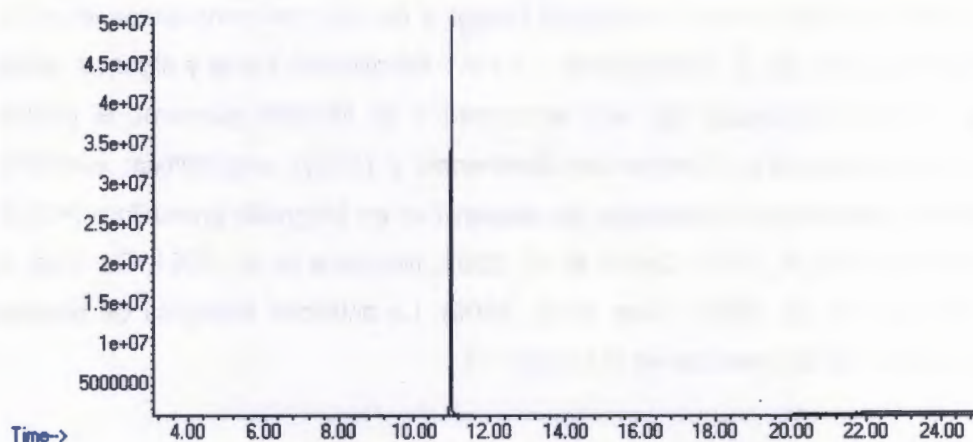


Figura 21. Cromatograma del compuesto C6-3 por CG-EM.

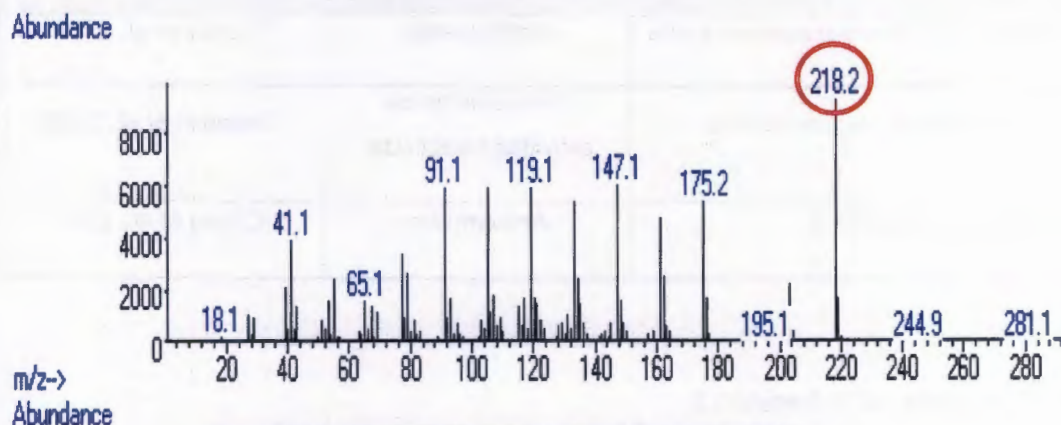


Figura 22. Espectro de masas del compuesto C6-3.

Los análisis de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , HSQC y HMBC permitieron la identificación del compuesto como ciclocolorenona, como se describe a continuación.

En el espectro de RMN H^1 (Figura 23 y Cuadro 14) se observaron señales correspondientes a los 22 protones en las regiones de 0.7 a 3 ppm y ausencia de anillos aromáticos y protones base de alcohol. La integración de las señales confirma la cantidad de protones calculados por masas de alta resolución. Se observaron cuatro señales de metilo a δ 0.79 (*d*, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.02 (*s*, 3H), 1.24 (*s*, 3H) y 1.72 (*d*, $J = 1.8$ Hz, 3H), una señal doble de dobles a δ 2.48 ($J = 6.6, 18.4$ Hz, 1H) que integra para un protón, un doblete a δ 2.06 ($J = 18.4$ Hz, 1H), un singulete ancho a δ 2.95 (1H) y multipletes a δ 1.25 (1H), δ 1.42 (1H), δ 2.07 (1H), δ 1.47 (1H), δ 1.59 (1H), δ 1.96 (1H) y δ 1.99 (1H).

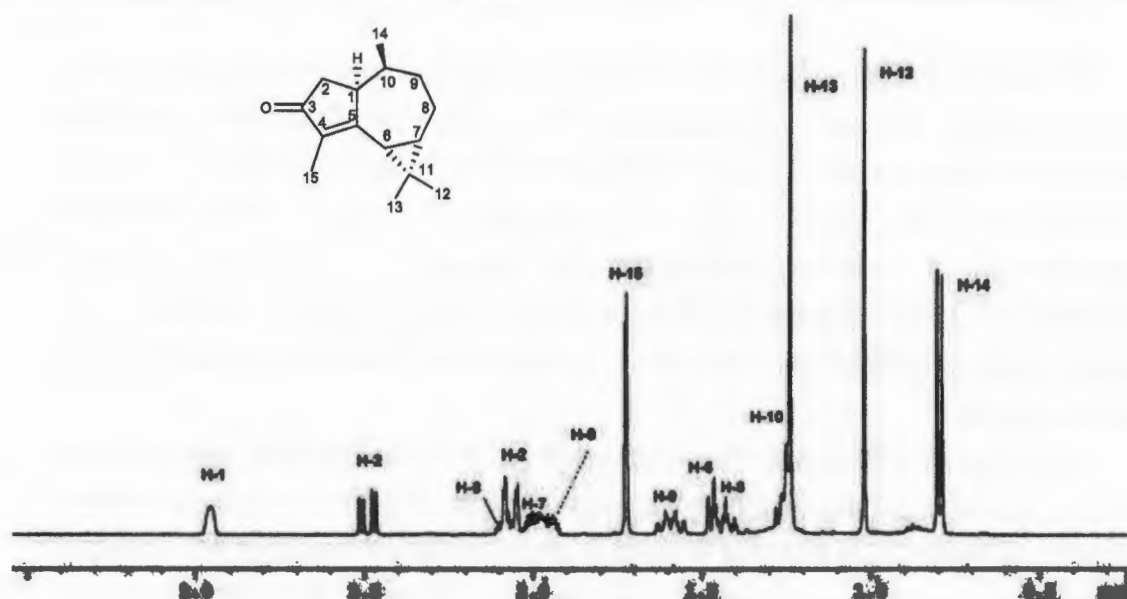


Figura 23. Espectro de RMN ^1H del compuesto C6-3 que corresponde a ciclocolorona.

Cuadro 14. Comparación de los datos de RMN- ^1H (H, m, J = Hz) del compuesto C6-3 con los reportados para ciclocolorona (Wu and Chen, 1992).

Posición	Compuesto C6-3 (500 MHz, CDCl_3)	Ciclocolorona (400 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$)
1	2.95 (1H, bs)	2.91 (1H, br s, 16)
2	2.06 (1H, dd, 18.4, 2.8) 2.49 (dd, 18.4, 6.6)	2.04 (1H, dd, 18.5, 2.3) 2.44 (1H, dd, 18.5, 6.7)
6	1.47 (1H, d, 8.5)	1.43 (1H, br d, 6.2)
7	1.99 (1H, m)	1.93 (1H, m)
8	1.43 (1H, tt, 13.2, 3.2) 2.07 (1H, m)	1.37 (1H, tt, 10.1, 3) 2.02 (1H, m)
9	1.59 (1H, m) 1.96 (1H, m)	1.54 (1H, dq, 10.1, 3) 1.90 (1H, m)
10	1.25 (1H, m)	1.20 (1H, m)
12	1.02 (3H, s)	0.97 (3H, s)
13	1.24 (3H, s)	1.19 (3H, s)
14	0.79 (3H, d, 6.9)	0.74 (3H, d, 6.9)
15	1.72 (3H, d, 2.0)	1.67 (3H, d, 1.9)

El espectro de RMN- C^{13} (Figura 24) presentó los 15 carbonos de la molécula que, junto con el análisis del espectro bidimensional HSQC (Figura 25 y Cuadro 15), permitió la asignación de cuatro metilos (δ 8.2, 16.5, 17.4, 29.5), tres metilenos (δ 32.4, 21.1, 40.2) y cuatro metinos (δ 32.3, 28.5, 31.6, 42.5), quedando las cuatro señales restantes correspondientes a carbonos cuaternarios. La presencia de una señal a 208.3 corresponde a un grupo cetona ($C=O$) y las señales a 140.3 y 176.4 corresponden a carbonos cuaternarios unidos a doble enlace. Estas señales confirman la presencia de la cetona conjugada.

Los datos obtenidos sugirieron la presencia de un terpeno de tipo sesquiterpeno (C₁₅), en donde dos de sus insaturaciones son las correspondientes al sistema conjugado. La ausencia de protones vinílicos sugieren que el sistema α,β insaturado está completamente sustituido, quedando 3 insaturaciones restantes correspondientes a 3 anillos, por lo que la estructura corresponde a un sesquiterpeno tricíclico en donde uno de los anillos incluye al sistema insaturado.

El análisis de gases masas de la muestra mostró una coincidencia con la estructura de la isolongifolenona; sin embargo, los datos espectroscópicos obtenidos no coinciden con dicha estructura puesto que no se tienen señales de protones vinílicos, ni el número de metinos, metilenos ni carbonos cuaternarios coincide para este compuesto. Más aún, la estructura no posee un sistema alfa beta insaturado.

Analizando los datos de gases masa de la mezcla de aceites esenciales, se tiene la presencia de sesquiterpenos de tipo aromadendreno como el palustrol y ledol, cuyo anillo base coincide con los datos obtenidos.

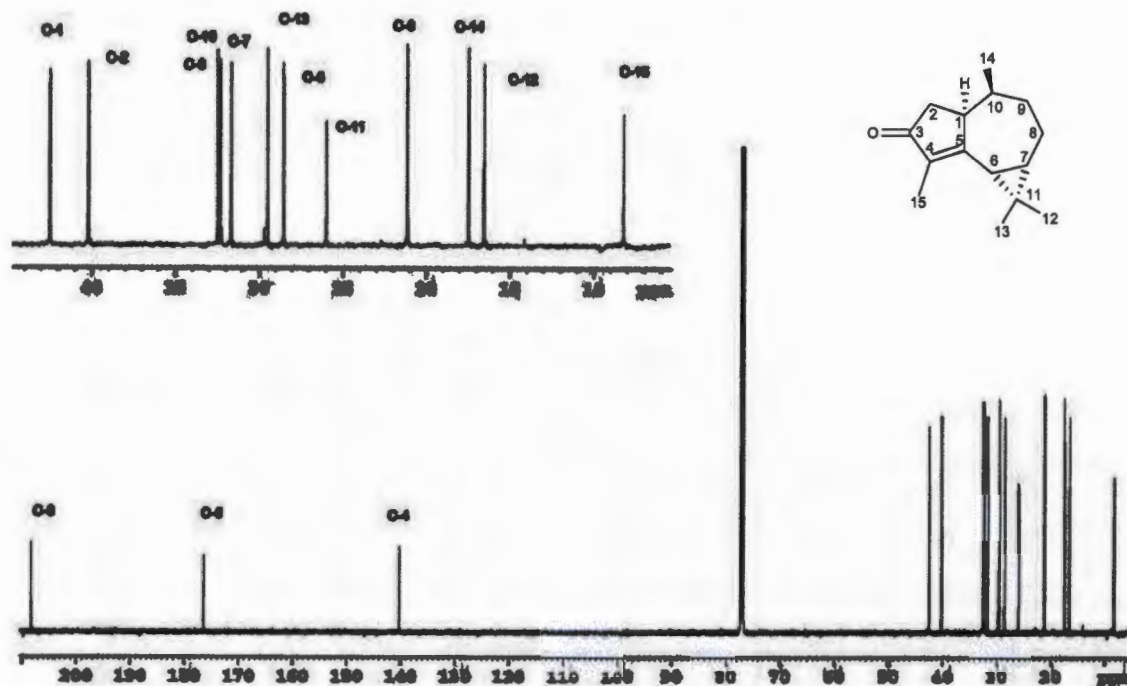


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto C6-3 que corresponde a la ciclocolorenona, indicando los carbonos de cada señal.

Cuadro 15. Datos obtenidos del espectro de HSQC del compuesto C6-3 ciclocolorenona.

Posición	H δ	C δ	Posición	H δ	C δ
1	2.95	42.4	9	1.59, 1.96	21.1
2	2.06, 2.48	40.1	10	1.25	32.2
3		208.2	11		25.9
4		176.4	12	1.03	16.5
5		140.3	13	1.27	29.4
6	1.47	28.4	14	0.79	17.4
7	1.99	31.6	15	1.73	8.1
8	1.42, 2.07	32.4			

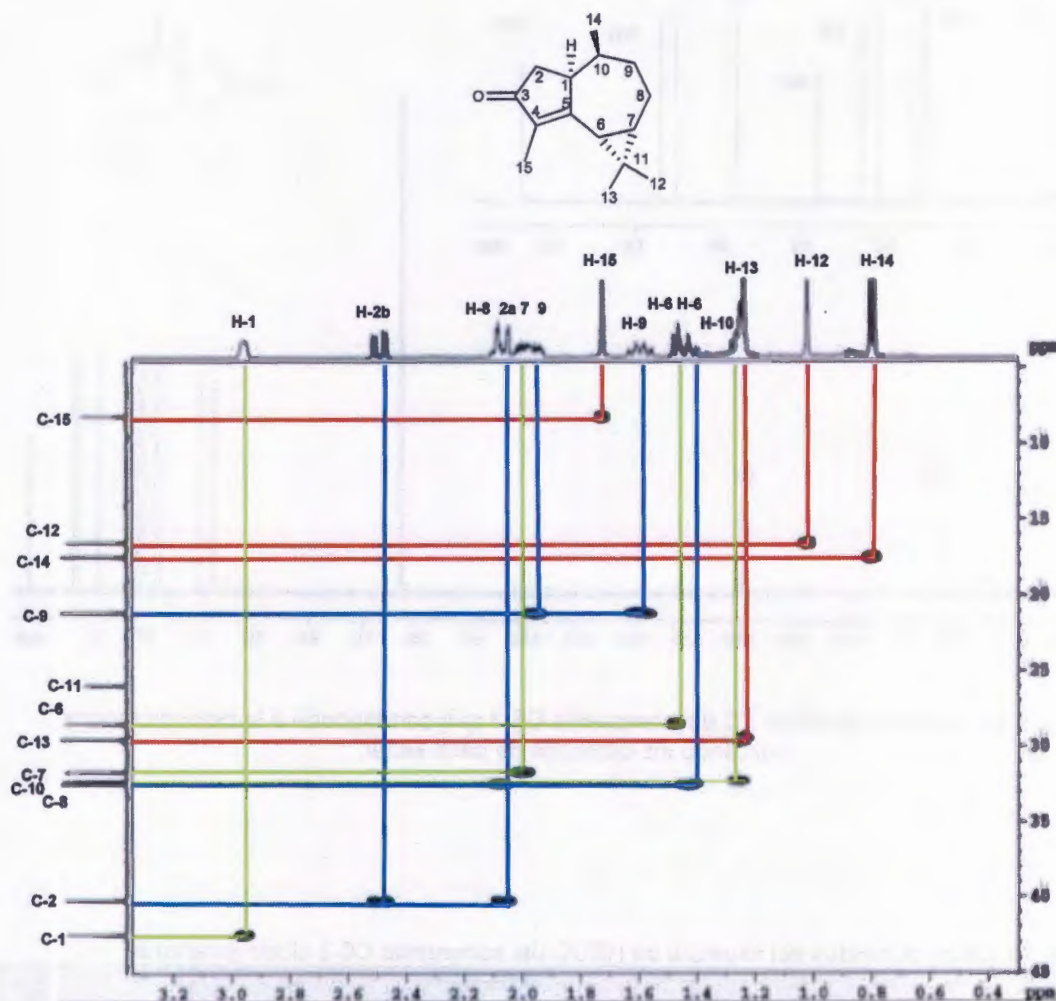


Figura 25. Espectro de HSQC del compuesto C6-3 que corresponde a la ciclocolorenona, indicando los protones que corresponden a cada carbono. En rojo se muestran los grupos metilo, en azul los CH_2 y en verde los metinos CH.

Como se observa en el Cuadro 16 y en la Figura 26, la presencia de la estructura tricíclica de sesquiterpeno de tipo aromadendreno se confirma en el experimento HMBC con las correlaciones a dos ($^2J_{\text{CH}}$) o tres ($^3J_{\text{CH}}$) enlaces de distancia entre los protones y los carbonos. Las correlaciones encontradas para los protones del anillo de ciclopentenona corresponden a H-2 (δ 2.48) con δ 140.30 (C-5), 176.44 (C-4) y 208.28

(C-3), el anillo de cicloheptanona se deduce por las correlaciones entre H-14 (δ 0.79) y δ 32.27 (C-10) y 42.46 (C-1), el protón H-8 (δ 2.07) con δ 21.10 (C-9) y 31.64 (C-7) y por último el tercer anillo de ciclopropano por las correlaciones de H-12 (δ 1.03) con 25.94 (C-11), 28.49 (C-6), 29.49 (C-13) y 31.64 (C-7).

Cuadro 16. Correlaciones obtenidas con el espectro de HMBC del compuesto C6-3.

Posición	H δ	HMBC	
		$^2J_{HC}$	$^3J_{HC}$
1	2.95	C5, C4	
2	2.06, 2.48	C3	C4
3			
4			
5			
6	1.47	C11, C5	C13, C1, C8
7	1.99		C13
8	1.42, 2.07	C7, C9	
9	1.59, 1.96		C8
10	1.25	C14	
11			
12	1.03	C11	C13, C6, C7
13	1.27	C11	C12, C6, C7
14	0.79	C10	C1
15	1.73	C4	C5, C3

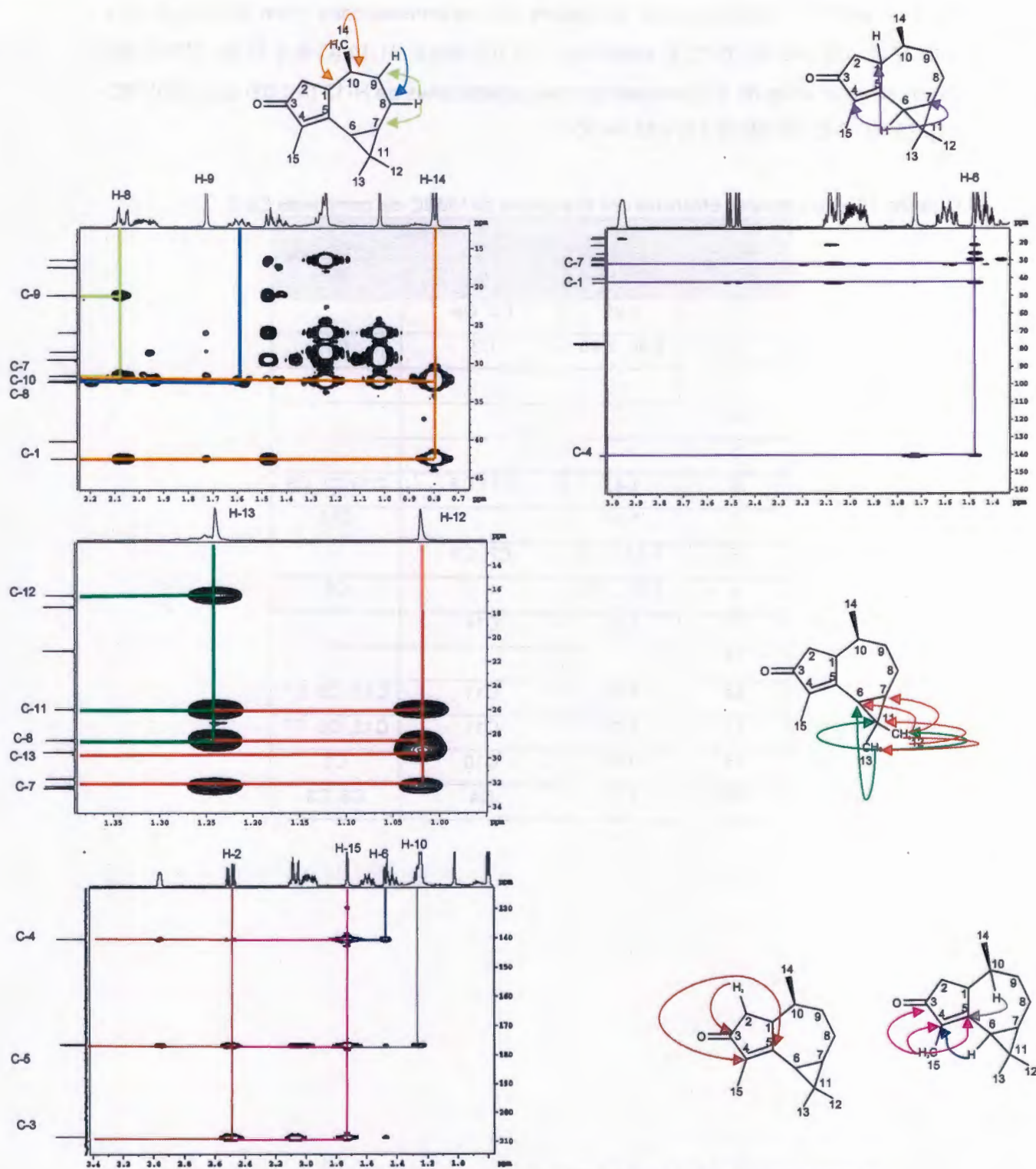


Figura 26. Correlaciones obtenidas con el espectro de HMBC de ciccolorenona.

Por lo anterior la estructura del compuesto C6-3 corresponde a la ciclocolorenona, una *ent*-sesquiterpen cetona previamente reportado del aceite esencial de *Ledum palustre*, el que también posee ledol y palustrol, moléculas que comparten el núcleo aromadendrano, como la ciclocolorenona (Mikhailova *et al.*, 1978). También se ha reportado la presencia de este compuesto en *Bazzania tridens*, especie abundante en el sureste de Asia, *Magnolia grandiflora*, un árbol distribuido en el sudeste de Estados Unidos y en el Atlántico medio (Jacyno *et al.*, 1991). La ciclocolorenona no sólo ha sido reportada en plantas con uso medicinal, también en el coral suave de indonesia *Nephtea chabrollei* entre otras especies del género (Handayani *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 2004).

Los esqueletos de los sesquiterpenoides, como en otros terpenos, son sintetizados por unidades de isopreno bioquímicamente activas, los cuales son el isopentenil pirofosfato (IPP, C₅) y su isómero altamente electrofílico, el dimetilalil pirofosfato (DMAPP, C₅). Son conocidas dos vías de biosíntesis que generan las unidades de isopreno, las cuales son la del mevalonato y la desoxixilulosa fosfato. A partir de los dos precursores básicos, IPP y DMAPP, un grupo de enzimas llamadas preniltransferasas pueden sintetizar prenil pirofosfatos lineales los cuales sirven como precursores para la biosíntesis de los distintos terpenos. En el caso de los sesquiterpenoides, durante su biosíntesis, la unidad de isopreno activa (IPP) es repetidamente adicionada a DMAPP en una condensación en secuencia cabeza-cola, hasta formar el precursor de sesquiterpeno, el farnesil pirofosfato (FPP, C₁₅), el cual puede ciclarse para generar diversas estructuras que pueden ser mono-, bi- y tricíclicas (Wang *et al.*, 2005; Dewick, 2001).

La ciclocolorenona y el palustrol presente en *C. aromatisans* son compuestos de núcleo aromadendrano. Schmidt y colaboradores (1999) han propuesto la biosíntesis de la ciclocolorenona, sugiriendo que ésta proviene de 2 α -gurjuneno, como el primer paso en la biosíntesis. Por lo tanto, el 2 α -gurjuneno sería oxidado en el alcohol correspondiente, el ciclocolorenol, seguido por una deshidrogenación a cetona (Figura 27).

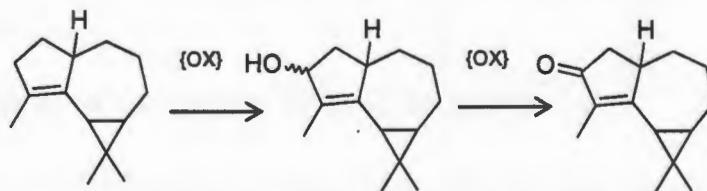


Figura 27. Biosíntesis de la ciclocolorenona a partir del 2 α -gurjuneno.

4.3.3 Análisis de la Fracción D: purificación de D1-B y D3-B

En cada una de las subfracciones de la fracción D se obtuvo un precipitado al añadirles éter etílico, a lo que se les denominó 1-B, 2-B y 3-B. La fracción 1-B formó cristales blancos, mostrando la presencia de un solo componente en CCF con un R_f de 0.75 (sistema DCM/An 98:02); el análisis de CG/EM confirmó la pureza del compuesto, indicando una sola señal con un t_R de 6.970 min (Figura 28).

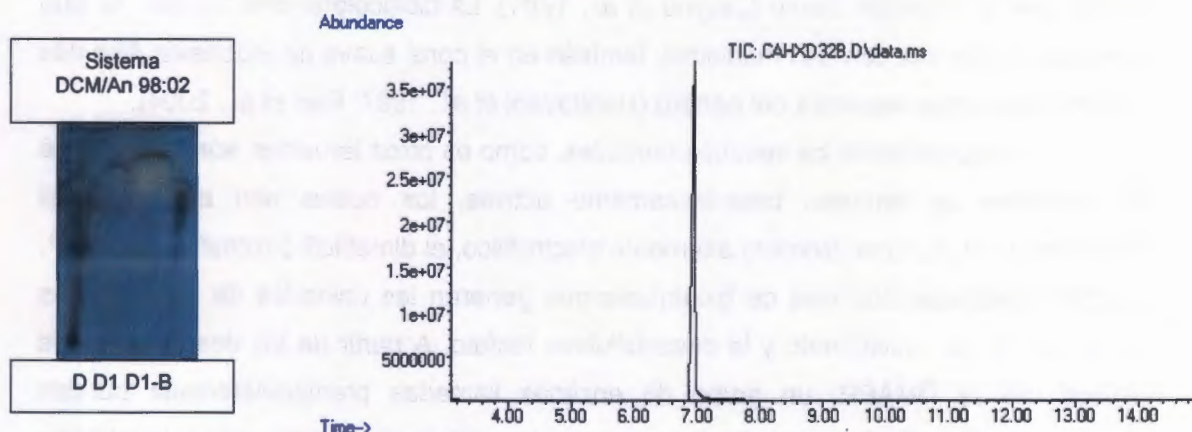


Figura 28. Perfil cromatográfico CCF de la fracción D1 y D1-B (A) y cromatograma del compuesto D1-B por CG-EM (B).

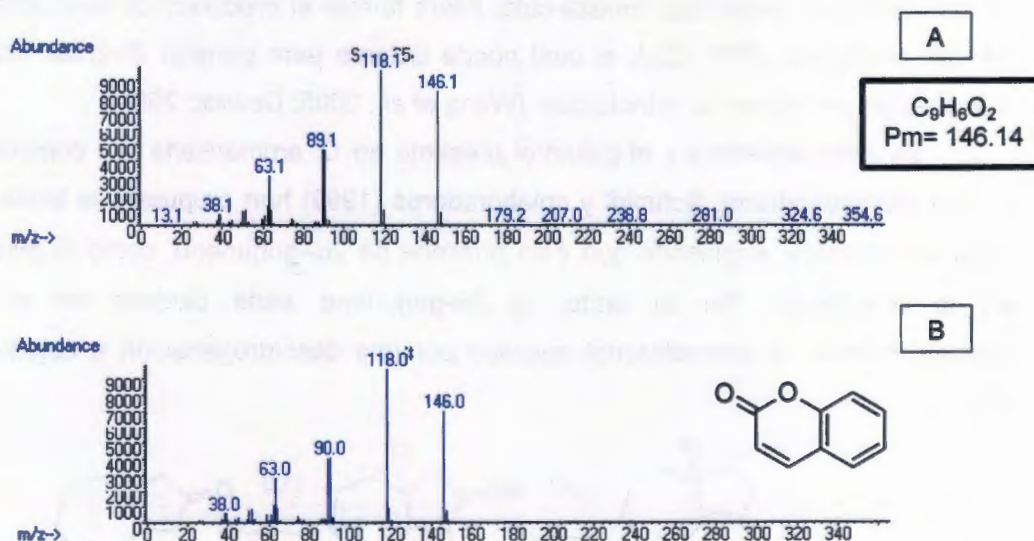


Figura 29. Espectro de masas del compuesto sugerido por la base de datos como "2H-1 cromo-2-ona" (A) y D1-B (B).

La comparación con la base de datos del equipo señala una semejanza de 98% con la cumarina, 2H-1 cromo-2-ona (PM 146.14) y el análisis de masas muestra un ion $[M^+]$ a m/z 146.1 indicando el peso molecular, el cual coincide con dicho compuesto (Figura 29). El análisis por RMN- H^1 de la fracción D2-B fue comparado con el de la literatura para la cumarina, el cual resultó similar a los datos obtenidos. La presencia de un compuesto aromático, se caracteriza por señales a campo bajo, por arriba de 6 ppm (Figura 30).

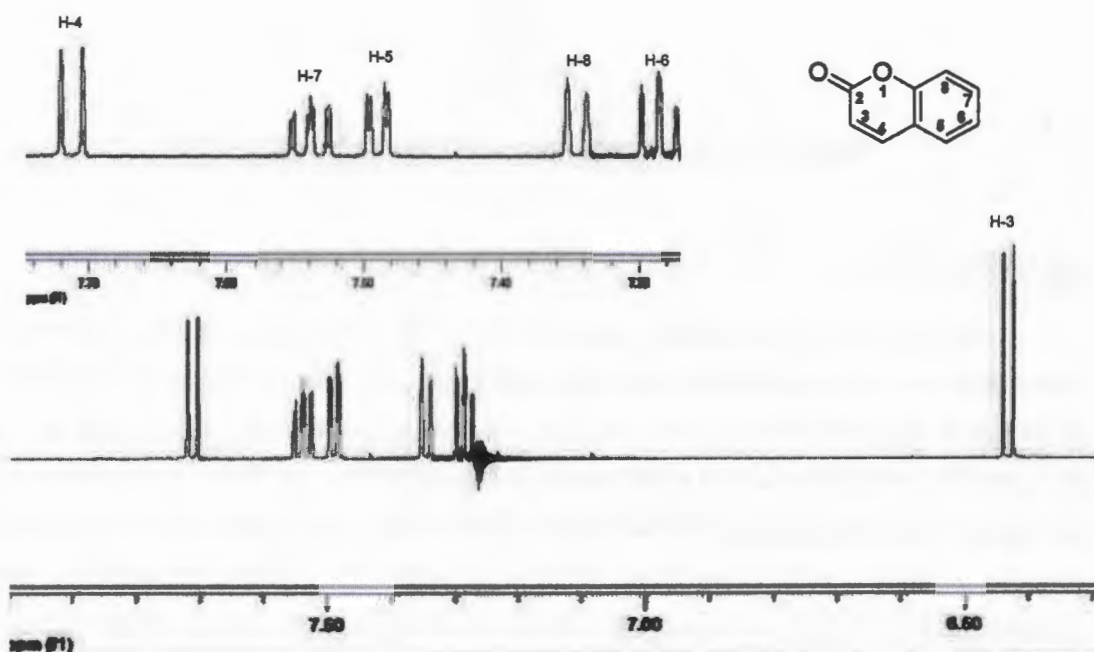


Figura 30. Espectro de RMN- H^1 del compuesto D1-B que corresponde a 2-H-cromo-2-ona.

La fracción D3-B es un polvo blanquecino con un R_f de 0.38. El resultado por CG-EM de la fracción señala cuatro picos muy cercanos, por lo que es difícil separarlos; el primer componente de D3-B presentó un t_R = 23.090 min y PM = 394.4, el segundo componente un t_R = 23.469 y PM = 397.4, el tercer componente t_R = 23.524 y PM = 396.4), y el cuarto componente un t_R = 23.967 min y PM = 399.4 (Figura 31), por lo que se le llamó mezcla de esteroides. Únicamente para el primer componente de la mezcla, la base

de datos encontró similitud del 95% con el compuesto colest-6,22,24-trieno, un esteroide de PM = 394.



Figura 31. Perfil cromatográfico CCF de la fracción D3 y D3-B.

4.4 DISCUSIÓN

Comparando las fracciones obtenidas del extracto Hx con los aceites esenciales, a pesar de que los tiempos de retención son diferentes por las variaciones en el método, se encontraron posibles coincidencias entre los resultados (de acuerdo con la base de datos) de la posible presencia de los compuestos o sus derivados de: 2H-1- benzopiran-2-ona, α -cadinol, 1H-cicloprop(e)azulen-7-ol y ciclocoloronona, esto sugiere que el extracto Hx contiene algunos aceites esenciales y dada la característica aceitosa del extracto, es muy probable que el extracto contenga además de AE, ácidos grasos, que también podrían ser los responsables de los efectos encontrados en los bioensayos antiinflamatorios y antimicrobianos. Algunos de estos compuestos ya han sido reportados previamente en otras especies, pero de confirmar su presencia, serían reportados por primera vez en el género *Critonia*.

Los aceites esenciales son de gran importancia en diversas industrias (farmacéutica, cosmetológica, alimenticia, etc.). Se sabe que poseen diversos efectos medicinales tales como insecticidas, antimicrobianos, relajantes, antihipertensivos, antiinflamatorios, etc., o proporcionan aromas a diversas fragancias. En cuanto a la actividad biológica de los aceites esenciales, como se mencionó anteriormente existe un gran número de referencias que indican la actividad antimicrobiana de la composición

total de aceites, pero pocos estudios relacionados a los componentes o componente específico que le da la actividad al aceite, ya que generalmente se evalúan a partir del aceite total, por lo que sería deseable como perspectiva evaluar los compuestos por separado.

En los aceites esenciales y algunas fracciones del extracto Hx, como la fracción C6-3, se confirmó la presencia de ciclocolorenona como componente mayoritario. La ciclocolorenona ha sido aislada de diversas especies vegetales y esponjas de mar, siendo la primera vez que se reporta para la especie *C. aromatisans*. Existe evidencia de la actividad antimicrobiana y fitotóxica de la ciclocolorenona; los resultados reportados por Jacyno y colaboradores (1991) muestran que este compuesto posee actividad inhibitoria del crecimiento en el modelo de brotes de trigo, además mostró un efecto fitotóxico al crecimiento en invernadero de maíz, frijol y tabaco. La ciclocolorenona también mostró actividad antimicrobiana contra *B. subtilis*, *B. cereus* y *M. thermosphactum* a 250 pg/disco; contra *E. coli*, *E. cloacae* y *C. freundii* a 500 pg/disc, *C. lunata*, *C. spinusum* y *C. cochliodes* a 250 pg/disco. Con la cepa *C. cochliodes* mostró una inhibición marginal a 50 pg/disco. A la fecha, no se han encontrado registros sobre su probable actividad antiinflamatoria y otros efectos biológicos. Para atribuir el efecto farmacológico observado a este componente mayoritario, es necesario obtener mayor cantidad del compuesto y llevar a cabo diversos experimentos.

En la fracción D1-B, el análisis por CG-EM señala un 98% de probabilidad que el compuesto purificado sea la cumarina 2-H-cromen-2-ona. Esta molécula ha sido encontrada en *Mikania glomerat*, y sus derivados son empleados para tratar las filariosis (Tripathi *et al.*, 2000; Cavral *et al.*, 2001).

La mezcla de esteroides de la fracción D3-B podría resultar con actividad antiinflamatoria, ya que otros esteroides, como por ejemplo el estigmasterol, obtenido de *E. ripartum* y *E. glotinosum* ya se ha reportado que posee efecto antinflamatorio (El-Seedi, 2002; Perez-Garcia *et al.*, 2005), por lo que el mecanismo de acción de la vía de los corticoesteroides podría estar involucrado en esa respuesta. Finalmente, se sugiere continuar con el estudio de esta mezcla, así como su caracterización final para confirmar dichas observaciones.

4.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cabral, L.M., dos Santos, T.C., Alhaique, F. (2001). Development of a profitable procedure for the extraction of 2-H-1-benzopyran-2-one (coumarin) from *Mikania glomerata*. Drug Dev Ind Pharm, 27, 103-106.
- Clavin, M., Gorzalczany, S., Machoc, A., Muñoz, E., Ferraro, G., Acevedo, C. and Martino, V. (2007). Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium amottianum*. J Ethnopharmacol, 112:585-589.
- Dewick P. M. (2001). Medicinal natural products a biosynthetic approach. 2a Ed. Jhon Wiley and Sons. pp. 191-202.
- Dominguez, X. (1988). Métodos de investigación fitoquímica. Ed Limusa. pp. 229.
- El-Seedi HR, Ohara T, Sata N, Nishiyama S. (2002). Antimicrobial diterpenoids from *Eupatorium glutinosum* (Asteraceae). J Ethnopharmacol, 81, 293-296.
- Failor, C. (2002). Jabones líquidos. Disfruto y hago, storey communications inc. Editorial paidotribo. pp. 1.
- Hall, J. B. (1973). Isolongifolene processes and product. US Patent No. 3. 718: 698.
- Harborne, J. B. 1998. Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis. 3 ed. Chapman and Hall. London, Uk. pp. 107 y 108.
- Handayani, D., Edrada, R.A., Proksch, P., Wray, V., Witte, L., Van-Ofwegen, L. Kunzmann A. (1997). New Oxygenated Sesquiterpenes from the Indonesian Soft Coral *Nephthea chabrolii*. J Nat Prod 60, 716-718.
- Hensel, A., Maas, M., Sendker, J., Lechtenberg, M., Petereit, F., Deters, A., Schmidt, T., Stark, T. (2011). *Eupatorium perfoliatum* L.: phytochemistry, traditional use and current applications. J Ethnopharmacol. 138, 641-51.
- Jacyno, M., Montemurro, N., Bates, A.D. and Cutler, H.G. (1991). Phytotoxic and Antimicrobial Properties of Cyclocolorone from *Magnolia grandiflora* L. J Agric Food Chem, 39, 1166-1168
- Maas, M., Petereit, F., Hensel, A. (2008). Caffeic acid derivatives from *Eupatorium perfoliatum* L. Molecules, 14, 36-45.
- Maas, M., Deters, A. M., Hensel, A. (2011). Anti-inflammatory activity of *Eupatorium perfoliatum* L. extracts, eupafolin, and dimeric guaianolide via iNOS inhibitory activity and modulation of inflammation-related cytokines and chemokines. J Ethnopharmacol, 137, 371-381.
-

- Mikhailova, N.S., Konovalova, O. A., Zakharov, P. I. and Rybalko, K. S. (1978). Isolation of Cyclocolorone from the Essential Oil of *Ledumpalustre*. Chem Not Cmpd (Engl. Transl.) 14.
- Patra, A., Mukhopadhyay, A.K., Mitra, A.K., (1981). Constituents of *Eupatorium riparium* Regel. Journal of the Indian Chemical Society 58, 1124–1125 (abstract in Chemical Abstracts).
- Perez-Garcia, F., Marin, E., Parella, T., Adzet, T., Canigual, S., (2005). Activity of taraxasteryl acetate on inflammation and heat shock protein synthesis. Phytomedicine, 12, 278–284.
- Rao, B., Sekhar, Ch., Sarvani, B., Rao, V. (2004). Ind Journ of Chem, 43B, 1329-1331.
- Schmidt, C.O., Bouwmeester, H.J., Bülow, N. and König, W.A. (1999). Isolation, Characterization, and Mechanistic Studies of (2)- α -Gurjunene Synthase from *Solidago Canadensis*. Arch of Biochem and Biophys, 364, 167-177.
- Wang, G., W. Tang y R.R. Bidigare (2005) Terpenoid as therapeutic drugs and pharmaceutical agents, en: Natural products: drug discovery and therapeutic medicine, Zhang, L. y A.L. Demain (ed) Humana Press, Totowa, NJ. pp. 197-206.
- Wiedenfeld H., Hösch, G., Roeder, E., Dingeramn, T. (2009). Lycopsamine and cumambrin B from *Eupatorium maculatum*. Pharmazie, 64, 415-6.
- Wu, C. L., Chen, C. L., (1992). Oxygenated sesquiterpenes from the liverwort *Bazzania Tridens*. Phytochemistry, 31, 4213-4217.

CAPITULO V

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

5.1 DISCUSIÓN

La inflamación es una reacción, tanto sistémica como local, de los tejidos y la microcirculación frente a una agresión patógena. Se caracteriza por la producción de mediadores inflamatorios y movimiento de líquidos y leucocitos desde la sangre a los tejidos extravasculares. Esta respuesta localiza y elimina células alteradas, partículas extrañas, microorganismos y antígenos y prepara el camino para el retorno de la normalidad estructural y funcional (Rubin y Strayer, 2012). Si las condiciones anormales son transitorias, entonces una respuesta inflamatoria aguda exitosa retorna al sistema a sus condiciones homeostáticas basales. Si, por el contrario, las condiciones anormales se prolongan, entonces la respuesta también se mantiene dando lugar a una respuesta inflamatoria crónica (Medzhitov, 2008), esto puede ocurrir debido a que no se resuelve la inflamación aguda o que no se elimine el agente causal. En estos casos, la respuesta inflamatoria puede causar más daño que la agresión desencadenante de la propia respuesta (Nathan, 2002).

La medicina greco-romana resumió el concepto de inflamación bajo los llamados signos cardinales de Celso, rubor, tumor, calor y dolor, a los que más tarde agregó Galeno "pérdida de la función" (Bullón-Ramírez, 1983). Estas características corresponden a los eventos relacionados con vasodilatación, aumento de la temperatura, edema y daño hístico (Rubin y Strayer, 2012). El rubor se refiere al enrojecimiento debido a los cambios de presión intravasculares que se dan en el proceso inflamatorio, el calor al aumento de temperatura en la zona afectada producida por alteraciones vasculares, el tumor a la hinchazón y que es provocado por el acumulamiento de exudado en la zona intersticial y dolor a la sensación desagradable producida por la estimulación nerviosa (Bullón-Ramírez, 1983).

La iniciación del proceso inflamatorio tiene como consecuencia la activación de mediadores solubles y el reclutamiento de células inflamatorias hacia el área lesionada. Se liberan moléculas desde el agente lesivo, las células dañadas y la matriz extracelular que alteran la permeabilidad de los vasos sanguíneos adyacentes al plasma, otras moléculas solubles y células inflamatorias circulantes. Esta respuesta estereotipada es

inmediata y conduce a una rápida inundación de los tejidos lesionados con líquidos, factores de la coagulación, citocinas, quimiocinas, plaquetas y células inflamatorias, en particular neutrófilos. El proceso completo se denomina inflamación aguda. La amplificación depende de la extensión de la lesión y de la activación de mediadores como las cininas y componentes del complemento. En el proceso se reclutan leucocitos y macrófagos adicionales en el área, lo que ocasiona la destrucción de los agentes lesivos colocando el proceso bajo control. La digestión enzimática y la fagocitosis reducen o eliminan el material extraño o los microorganismos infecciosos. Al mismo tiempo, los componentes del tejido dañado también se eliminan y desbridan, todo lo cual contribuye al inicio de la reparación. La finalización de la respuesta inflamatoria recibe la mediación de mecanismos antiinflamatorios intrínsecos que limitan el daño hístico y permiten la reparación y un retorno a la función fisiológica normal (Rubin y Strayer, 2012).

Durante el proceso inflamatorio, los leucocitos liberan mediadores inflamatorios como neuropéptidos, histamina, serotonina, iones de potasio, bradiquinina y metabolitos derivados del ácido araquidónico (Rang *et al.*, 1991). Además de estas, otras moléculas están relacionadas con la respuesta inflamatoria, entre ellas, podemos mencionar a las prostaglandinas (PG) y al óxido nítrico (NO), (Gallin y Snyderman, 1999), citocinas (también llamadas citoquinas), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (ILs), prostanoides y leucotrienos. (Hewett y Roth, 1993; Kubes y McCafferty, 2000). Cuando la inflamación aumenta, la producción masiva de citocinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α , IL-1 e IL-6 por los macrófagos puede causar daño tisular y falla o disfunción masiva de distintos órganos (Delgado *et al.*, 2003; Miyake 2004; Ahmed *et al.*, 2005). En particular TNF- α e IL-1 son importantes mediadores que contribuyen a los desórdenes inflamatorios crónicos tales como la artritis reumatoide (RA) (Bingham III, 2002). TNF- α , está también involucrada en la inducción de daño celular por promover estrés oxidativo en las mitocondrias (Sies, 1997).

Cuando la inflamación aguda no se resuelve, la inflamación se convierte en crónica; las sustancias liberadas potencian la respuesta inflamatoria activando más células inflamatorias y endoteliales en compartimentos vasculares remotos del sitio inicial de la inflamación. Esta respuesta inmune mal dirigida y sin regulación lleva a la inflamación generalizada del cuerpo, coagulopatías y daños en los tejidos. Si persiste, se logra ocasionar una disfunción en los órganos y eventualmente la muerte (Brenner *et al.*,

1989; Ahmed *et al.*, 1995). Otra de las complicaciones que puede causar un proceso inflamatorio crónico es que la célula del tejido dañado puede alterar su ciclo celular y convertirse en cáncer. La liberación constante de mediadores pro-inflamatorios puede producir este daño celular, por ejemplo, la producción en grandes cantidades de óxido nítrico. En el desarrollo del proceso inflamatorio, durante la última fase de una serie de eventos de señalización, los macrófagos inducen la expresión de genes proinflamatorios tales como los de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Esta enzima es regulada por la secreción de citocinas proinflamatorias, y produce óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina. Grandes cantidades de este mediador pueden causar un daño severo colateral en el tejido porque el NO puede formar peroxinitrito (ONOO⁻), una molécula citotóxica, ya que produce daño celular, lo cual produce un proceso inflamatorio y, además, puede producir daño directo a enzimas, proteínas, lípidos de membrana, y ADN. En consecuencia, estos eventos pueden desencadenar alteraciones irreversibles que conduzcan a la formación de células cancerosas. Por este motivo, la regulación de la producción del NO es un importante blanco para las enfermedades inflamatorias (Guzik *et al.*, 2003).

El ácido araquidónico es el sustrato de las enzimas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2. Estas enzimas producen prostaglandinas, que son responsables de causar dolor e inflamación, entre otros. Los medicamentos más empleados como antiinflamatorios son los AINEs (Anti-Inflamatorios No Esteroideos), entre ellos se encuentran el diclofenaco, sulindaco, naproxeno, paracetamol, metamizol sódico, ibuprofeno y, el más conocido, el ácido acetil salicílico, entre otros. Estos medicamentos actúan inhibiendo la producción de prostaglandinas, mediante la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2, por lo que se les conoce como no selectivos. Dado que estas enzimas no sólo producen compuestos proinflamatorios si no compuestos útiles en otros órganos o sistemas, se desarrolló un nuevo tipo de compuestos, los COXIBs (rofecoxib, celecoxib, parecoxib, etoricoxib, y valdecoxib), que actúan selectivamente sobre la enzima COX-2, disminuyendo así algunos efectos adversos. En general, los compuestos que inhiben y/o regulan los productos de las enzimas COX-2/iNOS, o que inhiben la liberación de las citocinas o demás mediadores podrían tener un efecto antiinflamatorio (Flores, 2005).

Las dolencias reumáticas inflamatorias (RRPS, por sus siglas en inglés) tienen una prevalencia nacional del 5%, y en el Estado de Yucatán la prevalencia es del 2.3% como lo señala el estudio realizado por Alvarez-Nemegyei y col. en el 2011. En el presente

trabajo se seleccionaron tres especies vegetales ampliamente usadas en la medicina tradicional Maya para el tratamiento de la inflamación y la artritis reumatoide. *Critonia aromatisans*, *Montanoa grandiflora* y *Thevetia ahouai* pueden emplearse solas o en mezcla con otras especies, y el modo de preparación consiste en pulverizar las hojas secas de las plantas y colocarlas al fuego con petrolato, mientras la mezcla es líquida, ésta es filtrada y colocada en recipientes, el petrolato al secarse toma una consistencia dura y el ungüento puede ser aplicado en la zona afectada de forma homogénea. El petrolato, por su naturaleza no polar, podría capturar componentes no polares tales como aceites esenciales de las plantas. Por este motivo en el presente trabajo se elaboraron extractos totales de las especies seleccionadas y posteriormente fueron particionadas en una fracción polar y otra no polar para iniciar el monitoreo preliminar. Para este monitoreo se emplearon metodologías útiles para seleccionar la especie vegetal que posea el mayor potencial antiinflamatorio para llevar a cabo estudios farmacológicos y fitoquímicos. Por otro lado, aunque la forma de aplicación de las especies seleccionadas en la medicina tradicional es tópica, en este proyecto se evaluó la toxicidad oral aguda al momento de administrarse; con esto, los resultados satisfactorios obtenidos brindarían otra posible alternativa de administración, además esto muestra el potencial que tiene la especie para convertirse en un medicamento antiinflamatorio. Para comenzar, se realizó una evaluación antiinflamatoria de extractos totales con los modelos de edema plantar inducido por carragenina en ratas Wistar, y evaluación de las fracciones polares y no polares sobre este mismo modelo con ratones BALB/c adicionalmente al modelo de edema del pabellón auricular inducido por TPA en los mismos ratones BALB/c. En los resultados se encontró que *T. ahouai* presenta una alta toxicidad, por lo que se descartó incluirla en evaluaciones subsecuentes. De *M. grandiflora* únicamente la fracción hexánica presentó actividad y *C. aromatisans* presentó un gran efecto antiinflamatorio. Estos dos modelos principales, empleados para el monitoreo antiinflamatorio *in vivo*, son modelos ampliamente utilizados para la evaluación de extractos y medicamentos antiinflamatorios, ya que se evalúa el proceso de inflamación aguda. Cuando el polisacárido carragenina es inyectado en el tejido subplantar de la pata trasera del animal, esto produce un edema mediado por leucocitos (tales como neutrófilos, monocitos y linfocitos) y mediadores proinflamatorios como NO, prostaglandina E₂ (PGE₂) y las citocinas TNF- α e IL-6. El TPA es un agente edematógeno tópico y causa irritación en la piel, además de promover la

formación de tumores, ya que estimula la enzima PKC, quien juega un rol crítico en la traducción de señales y regulación del crecimiento celular y diferenciación. El TPA afecta la membrana, resultando en una alteración de la adhesión celular y en la inducción del metabolismo del ácido araquidónico, específicamente causando la liberación de prostaglandinas, moléculas responsables del edema. En el caso de *T. ahouai* y *M. grandiflora*, que sólo mostraron efecto antiinflamatorio en el modelo de edema inducido por carragenina, los resultados pueden indicar que el posible mecanismo antiinflamatorio de estas especies no involucra la vía de PKC.

En el monitoreo preliminar después de haber descartado a *T. ahouai* por la toxicidad mostrada en ratones, se realizó la evaluación antiinflamatoria *in vitro* de las fracciones polares y no polares de *C. aromatisans* y *M. grandiflora*, resultados que fueron añadidos en la publicación realizada en la revista "Asian Pacific Journal of Tropical Medicine" (en prensa) y detallados en el capítulo III. En esta evaluación se realizó la determinación de óxido nítrico en un modelo *in vitro*, el cual emplea macrófagos peritoneales de ratón NIH. Los macrófagos participan activamente en la respuesta antiinflamatoria liberando citocinas y factores que reclutan otras células hacia los sitios de infección o donde surgió la alteración o el daño tisular. Adicionalmente, los macrófagos rápidamente activan la expresión de los genes responsables de la síntesis de lípidos bioactivos derivados del ácido araquidónico y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, como por ejemplo el NO. Los macrófagos inducen la expresión de enzimas proinflamatorias tales como la óxido nítrico sintasa (iNOS). Esta enzima es regulada por la secreción de citocinas proinflamatorias y produce NO a partir de L-arginina. Todas estas moléculas contribuyen a la regulación de la respuesta antiinflamatoria. En este experimento, los extractos polares y no polares de *C. aromatisans* presentaron una mayor disminución de la producción de NO. En el caso de *M. grandiflora* esta reducción fue menor siendo únicamente el extracto Hx el que presentó actividad. Por este motivo, *C. aromatisans* fue la especie seleccionada para continuar con su estudio farmacológico y fitoquímico.

Se realizó la evaluación de las particiones polares y no polares de *C. aromatisans* en el modelo *in vivo* de inducción de edema plantar con carragenina en ratones NIH, con la finalidad de evaluar los extractos en un modelo menos sensible que empleando ratones BALB/c; se encontró que el extracto activo fue principalmente el hexánico, por lo que se

decidió realizar la evaluación *in vitro* de inhibición de NO en macrófagos peritoneales de ratón NIH del extracto hexánico y sus fracciones (fracciones A-G), donde se encontró que el extracto Hx y las fracciones C y D presentaron altos porcentajes de inhibición de este mediador. Así mismo, las fracciones y el extracto Hx fueron evaluados a nivel molecular empleando la técnica de PCR, donde se encontró que el extracto Hx y las fracciones C y F, principalmente, inhiben la producción de los mediadores proinflamatorios TNF- α , IL-1 β e IL-6 y la enzima COX-2. En conjunto, podemos concluir que el bloqueo inhibitorio que ocasiona el extracto Hx y/o las fracciones se está llevando a cabo desde el núcleo celular, por este motivo se disminuye la expresión de los mediadores. Esta característica nos indica que *C. aromatisans* contiene metabolitos capaces de disminuir o inhibir los procesos inflamatorios. Estos mecanismos están relacionados con los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* con el ensayo de carragenina, donde se evalúan los procesos agudos que involucran estos mediadores estudiados. *C. aromatisans* es una planta con un excelente potencial para la elaboración de medicamentos antiinflamatorios y tal vez con otros fines relacionados a la disminución de TNF- α , como por ejemplo, algún efecto anticancerígeno, y como actúa a nivel de la enzima COX-2 es muy probable que tenga a su vez efecto analgésico y proapoptótico, por lo que es necesario realizar más experimentos que evalúen estos otros posibles efectos.

El extracto Hx activo de *C. aromatisans* fue evaluado en el ensayo de toxicidad oral aguda en rata, a dosis de 300 y 2,000 mg/Kg. Se observaron pólipos intestinales y también la dosis de 2,000 mg/Kg administrada por vía oral ocasionó somnolencia y letargo a las ratas Wistar administradas. Este efecto adverso podría sugerir un efecto similar al ocasionado por los antihistamínicos de primera generación que actúan sobre el receptor H1, ya que son empleados para el tratamiento de la inflamación crónica de las vías respiratorias superiores (para tratar los síntomas derivados de la liberación de histamina en procesos alérgicos exudativos) y, dado que atraviesan la barrera hematoencefálica, actúan también sobre el SNC, lo que explicaría los efectos adversos tales como sedación, somnolencia y debilidad observado en los roedores administrados con *C. aromatisans*. Algunos antihistamínicos H1 bloquean los canales de Na⁺ en las membranas excitables de modo como lo hacen los anestésicos locales (Flores, 2005). Para corroborar esta hipótesis se necesita realizar las evaluaciones farmacológicas correspondientes.

El extracto Hx mostró efectos similares que la fracción C, la diferencia radica en la concentración empleada; mientras el extracto Hx tuvo efecto a una concentración arriba de 100 $\mu\text{g/mL}$ a nivel transcripcional, la fracción C la tuvo a 50 $\mu\text{g/mL}$; esto indica que a una dosis menor aumenta su potencia, siendo este efecto el esperado para continuar con el fraccionamiento. El fraccionamiento de C llevó al aislamiento e identificación del compuesto mayoritario, la ciclocoloronona. La evaluación farmacológica de los componentes aislados podrá ofrecer un mayor conocimiento del o los principios activos responsables de los efectos observados.

Diferentes especies de la familia Asteraceae incluyendo especies del género *Eupatorium*, contienen terpenoides, tales como el estigmasterol y el acetato de teraxterilo. El estigmasterol es capaz de reducir los mediadores proinflamatorios como el NO y la PGE_2 en macrófagos murinos RAW 264.7 en experimentos *in vitro*. El acetato de teraxterilo reduce la inflamación en modelos *in vivo* como en el modelo de inducción de edema plantar con carragenina e inducción de edema del pabellón auricular por TPA. En la evaluación por CG-EM se encontró que el extracto Hx contiene estigmasterol, compuesto conocido por su efecto antiinflamatorio, por lo que este y otros componentes, ya sea individuales o de forma sinérgica, podrían contribuir o producir el efecto antiinflamatorio observado.

La posible presencia de compuestos terpenoides y ácidos grasos reafirma el hecho de que en la medicina tradicional esta especie se utilice en una base de petrolato, que puede retener los compuestos no polares y aceites esenciales para administrarse de forma tópica. Los resultados obtenidos del extracto Hx, que contiene compuestos principalmente de baja polaridad, dan sustento a esta teoría, por lo que se propone realizar la evaluación antiinflamatoria de los aceites esenciales con los modelos empleados y comparar los resultados, además de continuar con el estudio fitoquímico biodirigido del extracto Hx para encontrar los compuestos responsables de la actividad y estudiar su mecanismo de acción. Así mismo, la mezcla de esteroides de la fracción D3-B tiene un potencial antiinflamatorio, ya que se ha reportado que otros esteroides como por ejemplo el estigmasterol obtenido de *E. ripartum* y *E. glutinosum* posee efecto antiinflamatorio; con esto se sugiere realizar estudios antiinflamatorios posteriores a esta fracción y, de ser posible, la separación de los componentes.

5.2 CONCLUSIONES GENERALES

- Los extractos ACN/MeOH de *T. ahouai*, ACN/MeOH y Hx de *C. aromatisans* y Hx de *M. grandiflora* poseen efecto antiinflamatorio en el modelo de inducción de edema plantar con carragenina, arriba del 50%.
- *M. grandiflora* no muestra un efecto antiinflamatorio en el modelo de inducción de edema del pabellón auricular con TPA, lo que indica un mecanismo de acción diferente al relacionado con PKC, probablemente el efecto está relacionado a la inhibición de la liberación de mediadores proinflamatorios específicos.
- *T. ahouai* produce efectos adversos y tóxicos inmediatos en ratones BALB/c a una dosis de 200 mg/Kg, posiblemente por la presencia de saponinas reportadas en este género.
- El extracto hexánico de *C. aromatisans* inhibe el edema plantar inducido con carragenina arriba del 80% en una dosis de 100 y 200 mg/Kg, mayor efecto producido comparado con el control indometacina.
- El extracto hexánico administrado por vía oral, no produce toxicidad oral aguda, obteniéndose una DL_{50} mayor a 2,000 mg/Kg.
- El extracto hexánico causa efectos adversos como somnolencia y letargo a dosis superiores de 300 mg/Kg en ratones NIH y ratas Wistar.
- Las fracciones B, C y D obtenidas del extracto Hx disminuyen la producción de NO por macrófagos peritoneales de ratón NIH, y la presencia de terpenos y ácidos grasos en estas fracciones son posiblemente los responsables de dicha actividad.
- Uno de los mecanismos antiinflamatorios del extracto hexánico y las fracciones activas es la inhibición de la producción de NO celular.
- El extracto hexánico y las fracciones C, E y F principalmente disminuyen la producción de ARNm a nivel transcripcional, y por lo tanto la liberación de los mediadores $TNF-\alpha$, IL-1 β , IL-6.
- El extracto hexánico y la fracción C actúan inhibiendo la enzima ciclooxigenasa inducible COX-2, lo que convierte a esta especie en un potencial agente antiinflamatorio, analgésico y posiblemente proapoptótico.
- El extracto hexánico y los aceites esenciales de *C. aromatisans* contienen 2H-1-benzopiran-2-ona, α -cadinol, 1H-cicloprop(e)azulen-7-ol y el sesquiterpeno confirmado

por RMN ciccolorenona, por lo que el extracto hexánico contiene algunos aceites esenciales y, dada la característica aceitosa del extracto, es muy probable que el extracto contenga además de AE, ácidos grasos, que también podrían ser los responsables de los efectos encontrados en los bioensayos antiinflamatorios.

5.3 PERSPECTIVAS

- Realizar un estudio fitoquímico y farmacológico detallado sobre *T. ahouai* con el fin de encontrar la dosis óptima para su evaluación y de ser posible separar los metabolitos antiinflamatorios de los que producen los efectos tóxicos.
- Evaluar el mecanismo de acción del extracto hexánico de *M. grandiflora*.
- Continuar con la evaluación biológica de las fracciones del extracto hexánico de *C. aromatisans* y completar la determinación de los mecanismos de acción.
- Determinar si *C. aromatisans* posee actividad inmunomoduladora y si por su mecanismo de acción puede ser un coadyuvante en la terapéutica del cáncer.
- Evaluar la ciccolorenona y la mezcla de esteroides en modelos antiinflamatorios.
- Continuar con la purificación, aislamiento e identificación de compuestos activos de los extractos y fracciones de *C. aromatisans*.
- Realizar un perfil químico del producto empleado en la medicina tradicional y comparar dicho perfil con los obtenidos para el extracto y fracciones activas de *C. aromatisans*.
- Realizar la identificación de compuestos con fines quimiotaxonómicos de *C. aromatisans*.

5.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, N.A., Christou, N.V., Meakins, J.L. (1995). The systemic inflammatory response syndrome and the critically ill surgical patient. *Curr. Opin. Crit. Care*, 1, 209.
- Ahmed, S., Anuntiyo, J., Malemud, C.J. and Haqqi, T. M. 2005. Biological basis for the use of botanicals in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2. pp 301-308.
- Bingham III, C.O. 2002. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *Journal of Rheumatology*. 29:65. pp 3-9.
- Brenner, B.M., Troy, J.L., Baltermann, B.J. (1989). Endothelium-dependent vascular responses: mediators and mechanisms. *J Clin Invest*, 84, 1373.
- Bullón-Ramírez, A. (1983). Historia de la inflamación, instituto de España, Real academia Nacional de medicina. Madrid, España. 7 p.
- Delgado, A.V., McManus, A.T., Chambers, J.P. (2003). Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*, 37, 355-361.
- Flores, J. (2005). *Farmacología humana* 4 ed. Masoon. Barcelona, España. pp. 375-400.
- Gallin, J.I. and Snyderman, R. (eds). (1999). *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. 3rded Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia. pp. 1-4.
- Guzik, T.J., Korb, R., Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*, 54, 469-87.
- Kubes, P. and McCafferty, D.M. (2000). Nitric oxide and intestinal inflammation. *American Journal of Medicine*, 109, 150- 158.
- Medzhitov R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454, 428-435.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420, 846-852.
- Rang, H.P., Bevan, S., Dray, A. (1991). Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. *Br Med Bull*. 47, 534-48.
- Rubin, R. and Strayer, D. (2012). *Patología: Fundamentos clinicopatológicos en medicina*. 6ed, Lippincott Williams and Wilkins. Barcelona, España. pp. 47-82.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 82:2. pp. 291-295.

ANEXO

Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de *Critonia aromatisans*, *Thevetia ahouai* y *Montanoa grandiflora*

A1 INTRODUCCIÓN

Un patógeno es un organismo capaz de invadir el cuerpo y ocasionar enfermedad, por lo que una enfermedad infecciosa es una enfermedad causada por un patógeno que invade el tejido y le causa daño. Para prevenir la invasión y proliferación del patógeno el ser humano posee defensas contra las infecciones, las defensas locales son superficies protectoras tales como la piel y los epitelios. Además, también se tiene una respuesta inmune innata y una respuesta inmune adaptativa. Una vez establecida la infección el huésped puede ser portador asintomático o portador sintomático, y si la infección no es detenida, esta puede propagarse del sitio localizado a todo el organismo, causando desde daño a uno o varios tejidos y órganos o incluso puede causar la muerte del huésped (Bannister *et al.*, 2006). Dos microorganismos comunes causantes de infecciones son *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, microorganismos que no sólo son causantes de infecciones en la piel, sino que, dependiendo de la vía de entrada, pueden producir infecciones sistémicas y complicaciones severas en diversos órganos (Brooks, 2005). Existen diversos bioensayos para la evaluación del efecto antimicrobiano, los tres principales son: a) el método de difusión en agar, b) el método de dilución en agar (permite la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria CMI) y c) el método bioautográfico. Todos tienen en común el contacto directo de los extractos y/o compuestos vegetales con el agente infeccioso, y su medición cualitativa o cuantitativa del efecto antimicrobiano de los mismos (Hamburger, 1987; Rahman *et al.*, 2001).

Desde el descubrimiento de la penicilina (producto natural fúngico), una gran cantidad de compuestos de origen natural, semisintéticos y sintéticos se han producido hasta la fecha, debido al problema persistente de los microorganismos resistentes a los antibióticos (Flores, 2005). La búsqueda de nuevos compuestos para obtener medicamentos efectivos, específicos, con pocos efectos adversos y económicos ha llevado al estudio de compuestos derivados de los productos naturales, los cuales poseen

una gran variedad estructural que permite la elaboración de nuevos medicamentos (OMS 2 y 3, 2009). Entre los años 1983 y 1994 el 63% de los medicamentos antimicrobianos aprobados para su venta en el mundo fueron productos naturales, esto proporciona una idea del impacto que han tenido los productos naturales para la elaboración de nuevos medicamentos antimicrobianos (Newman *et al.*, 2003). Como ejemplo, se puede mencionar a dos de las especies más conocidas con actividad antimicrobiana, empleadas para el tratamiento de las infecciones, el ajo (*Allium sativum*) y el tomillo (*Thymus vulgaris*) entre otros (Goncagul y Ayaz, 2010; Zeghad y Merghem, 2013).

C. aromatisans y *M. grandiflora* pertenecen a la familia Compositae (Asteraceae); numerosas especies de esta familia son ricas en aceites esenciales y, también, poseen actividad antimicrobiana, tal es el caso de los aceites esenciales de *Eupatorium adenophorum*, los cuales posee actividad antibacterial contra *Arthrobacter protophormiae*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus rhodochrous* y *Staphylococcus aureus* con una concentración mínima bactericida de 200, 100, 100, 12.5 y 200 µg/mL, respectivamente (Kurade, 2010). Por otra parte, las propiedades antimicrobianas del extracto hexánico de hojas de *Eupatorium glutinosum* fueron evaluadas contra bacterias Gram negativas y Gram positivas. Un fraccionamiento biodirigido llevó al aislamiento de dos componentes activos: ácido 15-hidroxi-7-labden-17-oico y su derivado acetilado. Además, estos resultados validaron el uso tradicional de la especie. Adicionalmente, en esta especie han sido aislados los compuestos dammara-20,24-dien-3-acetato, estigmasterol, epi-friedelanona y palmitato de nepehinol (El-Seedi, 2002). En otro estudio, las propiedades antimicrobianas del exudado resinoso de las hojas de *Eupatorium salvia* fueron evaluadas contra cinco bacterias Gram-negativas y cinco Gram-positivas. La comparación de la actividad antimicrobiana del ácido 7-hidroxi-8(17)-labden-15-oico (ácido sálvico) y su acetato, ambos compuestos aislados de la planta, sugieren que el derivado acetilado es el componente más activo en el exudado, con lo que se validó el uso vernáculo de *E. salvia* como agente antiséptico (Urzua, 1998). En lo que respecta al género *Thevetia* (Apocynaceae), el extracto etanólico de hojas de *T. peruviana*, el extracto metanólico y el extracto clorofórmico de los aceites, demostraron ser eficaces contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, entre otros microorganismos como Gram positivos, Gram negativos y hongos (Reddy, 2009; Hammuel *et al.*, 2011).

Dado que no se encontraron reportes en la literatura sobre la actividad antimicrobiana de *Critonia aromatisans*, *Thevetia ahouai* y *Montanoa grandiflora*, se planteó la evaluación de estas especies con el objeto de contribuir al conocimiento biológico de estas especies.

A2 MATERIALES Y MÉTODOS

A2.1 Selección de extractos activos

A2.1.1 Recolección y preservación del material vegetal

Se recolectaron en la localidad de Yaxcabá, hojas provenientes de árboles y/o arbustos de *Critonia aromatisans* (A. Dorantes colecta 134, octubre de 2009), *Thevetia ahouai* y *Montanoa grandiflora* (M. Méndez colecta 1752 y 1754, junio de 2010). Las hojas fueron secadas en una estufa a 37 °C y una vez secas se procedió a su preservación mediante el empleo de bolsas con cierre hermético. Los ejemplares de referencia herborizados se depositaron en el herbario de la Unidad de Recursos Naturales del CICY. Para la identificación de las especies se contó con la participación de la Dra. Martha Méndez González de la Unidad de Recursos Naturales del CICY.

A2.1.2 Obtención de los extractos

Las hojas secas pulverizadas de las tres especies fueron maceradas con metanol (MeOH) a temperatura ambiente por tres días, separando el filtrado de la parte sólida mediante filtración. El filtrado fue secado a vacío por medio de un evaporador rotatorio, repitiendo el proceso tres veces. Los extractos metanólicos secos de cada especie fueron preservados en refrigeración hasta su uso. A partir del extracto metanólico, se pesó 1 g de material seco y se realizó una partición con acetonitrilo/metanol (3:1) y hexano en una proporción 3:1, con lo que se obtuvieron dos fracciones de distinta polaridad, la fracción ACN/ MeOH y la fracción hexánica.

A2.1.1 Obtención de aceites esenciales de *C. aromatisans* por arrastre de vapor

C. aromatisans es una planta que expide un aroma notable por lo que se decidió obtener sus aceites esenciales (AE). Esto se realizó colocando 40 g de material vegetal fresco en un matraz conectado a otro que contiene 600 mL de agua a 100 °C; el proceso

de extracción inicia cuando el vapor del agua destilada pasa al matraz que contiene las hojas frescas, extrayendo los aceites esenciales presentes en las hojas que, mediante un proceso de condensación, es colectado en un matraz a la salida del refrigerante. Los AE fueron recuperados mediante una partición con hexano (3:1) y el hexano fue secado a vacío. Posteriormente los aceites fueron pesados en el vial correspondiente.

A2.2 Cromatografía en capa fina (CCF)

Se pesó 1 mg de cada extracto o partición y se disolvió en 1 mL del disolvente correspondiente, con un capilar se aplicó en la placa de gel de sílice (placas de soporte de aluminio con película de gel de sílice de la marca Merck 60F₂₅₄), y se dejó eluir en los sistemas correspondientes. Los agentes reveladores utilizados fueron físicos (luz ultravioleta de 254 y 365 nm) y químicos (disolución al 4% de ácido fosfomolibdico en ácido sulfúrico). Se evaluaron diferentes sistemas de elución cromatográfica para lograr la mejor separación de los compuestos de cada extracto; siendo para la partición ACN/MeOH de *C. aromatisans* AcOEt/An/MeOH/H₂O 5.0: 1.5: 0.5: 0.1 y para la hexánica Hx/AcOEt/MeOH 7:3:0.5; para la partición ACN/MeOH de *T. ahouai* y *M. grandiflora* el sistema AcOEt/CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 4.5:4.5:2.0:0.3 y para la hexánica Hx/An 8:2. Se seleccionaron los sistemas de elución más apropiados para su empleo en el ensayo microbiológico por el método bioautográfico.

A2.3 Compuestos químicos y disolventes

Todos los disolventes y los reactivos empleados en los ensayos microbiológicos fueron adquiridos de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) o Sigma (St. Louis, MO, USA).

A2.4 Fraccionamiento y evaluación de extractos activos

Dado que *C. aromatisans* fue la especie que presentó mayor actividad, se realizó el fraccionamiento para continuar con su evaluación microbiológica.

A2.4.1 Obtención del extracto hexánico de *C. aromatisans*

A 3 Kg de hojas secas pulverizadas se les realizó una maceración con metanol (MeOH) durante 3 días (3×) a temperatura ambiente. El extracto metanólico obtenido por evaporación a presión reducida fue mezclado con acetonitrilo (ACN) para retirar el

precipitado, al cual se añadió hexano (3:1), las fracciones resultantes fueron la de ACN/MeOH (410 g) y la fracción hexánica (36 g).

A2.4.2 Cromatografía Líquida de Vacío (CLV) del extracto hexánico de *C. aromatisans*

Se emplearon 34 g de extracto hexánico, el cual fue aplicado en sólido a una columna de filtración empacada con gel de sílice para CCF con una altura de 7 cm y diámetro de 10 cm. La fase móvil empleada en un sistema por gradiente consistió en 100% Hx, Hx/AcOEt 98:2, 96:4, 94:6, 92: 8, 90: 10, 85:15, 80: 20, 75: 25, 70:30, 60:40, 50:50, 100% AcOEt, AcOEt/ MeOH 50:50 y MeOH 100%, obteniéndose 21 fracciones las cuales fueron analizadas por CCF, reuniéndose en 7 fracciones finales de acuerdo a su similitud cromatográfica. Los rendimientos para las fracciones A-G obtenidas de la CLV de 34 g de extracto hexánico son: A, 2.02 g (6%); B, 8.91 g (26%); C 3.37 g (10%); D 9.53 g (28%); E, 3.56 g (10%); F, 3.55 g (10%); G, 2.91 g (8%).

A2.5 Ensayos antimicrobianos

A2.5.1 Microorganismos de prueba

De los cinco microorganismos indicados en la farmacopea USP XXIII para evaluaciones microbiológicas preliminares, fueron utilizados dos de ellos como organismos de prueba para la valoración de los antibióticos (controles positivos) y extractos. Se emplearon cepas de la American Type Culture Collection (ATCC) de *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538) y *Candida albicans* (ATCC-10231). Estos microorganismos fueron multiplicados en Agar Soya Trypticaseína (TSA) para *S. aureus* y Agar Papa Dextrosa (PDA) para *C. albicans*, por 18-24 horas. A partir de cada uno de ellos se prepararon suspensiones en medio de Caldo de Soya Trypticaseína (TSB: en inglés Tryptic Soy Broth o Soybean-Casein Digest Medium) que se incubaron hasta alcanzar la fase de desarrollo logarítmica, ajustando la concentración al patrón 0.5 de la escala de McFarland (1×10^8 ufc/mL) (Guerra *et al.*, 2001).

A2.5.2 Método bioautográfico de detección

Se emplearon placas de CCF de gel de sílice de 6 × 6.5 cm y se aplicaron los extractos de las tres especies, diluidos a una concentración de 2.5 mg/mL con el

correspondiente disolvente. Las placas fueron desarrolladas en la fase móvil correspondiente al perfil cromatográfico de cada especie vegetal. Posteriormente, las placas fueron cubiertas con agar Agar soya tripticaseína (TSA) conteniendo 1×10^6 ufc/mL de cada suspensión de microorganismo por separado. Este procedimiento se realizó por triplicado. Las placas fueron incubadas por 24 horas a 37 °C y después de este tiempo cada bioautograma fue teñido con disolución acuosa al 1% de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) para observar las áreas de inhibición. En cada placa se aplicó como control positivo amicacina al 1% o nistatina al 1%, para bacterias o levaduras, respectivamente. Se desarrolló a la par una réplica de las placas cromatográficas para ser reveladas con ácido fosfomolibdico seguido por calentamiento en placa (Pereira *et al.*, 2005). En este método se esperó observar zonas de inhibición del crecimiento microbiano; las zonas se observan por las diferencias de tinción en el medio inoculado. *S. aureus* se tiñe de rojo en presencia de la sal de tetrazolio y *C. albicans* de rosa. Las zonas claras son consideradas zonas (halos) de inhibición, indicando un efecto similar al producido por el antibiótico, según la susceptibilidad del microorganismo.

A2.5.3 Método de microdilución y concentración mínima inhibitoria (CMI)

Los microorganismos de prueba fueron inoculados en Caldo Mueller-Hinton (CMH) recién preparado y se incubaron a 37 °C por 18 a 24 horas. Los cultivos se ajustaron en CMH por comparación visual con el tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland a una concentración final aproximada de 1×10^8 ufc/mL. Los extractos fueron disueltos en Tween 80 al 5% y se colocaron en una microplaca estéril de 96 pozos. Al primer pozo se le adicionaron 190 µL de medio CMH estéril y 10 µL de los extractos activos (40 µg). Posteriormente, 100 µL de esta mezcla homogénea se transfirieron al siguiente pozo y así sucesivamente hasta el pozo No. 7. Finalmente, todos los pozos se inocularon con 100 µL de la suspensión de la bacteria o levadura blanco. La concentración final de los extractos fue de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 y 1.56 µg /ml y de las bacterias y levaduras de 5×10^6 ufc/mL. Los ensayos fueron realizados por triplicado y se emplearon los antibióticos amicacina y nistatina como controles. Las microplacas se incubaron por 24 h a 37 °C, transcurrido este tiempo se observó visualmente la presencia o ausencia de bacterias de la siguiente manera: se adicionaron 50 µL de TTC al 1% a cada pozo, después de 1 h de la adición del TTC, se observó si hay presencia de bacterias en los pozos, mediante la

aparición de una coloración rosa (*C. albicans*) o roja (*S. aureus*), si no hay presencia de color el resultado se considera positivo al efecto inhibitorio de los extractos. La menor concentración donde no se observó crecimiento microbiano o que mostró ausencia de color se tomó como la CMI (Rojas *et al.*, 1992; Andrews, 2001; Guerra *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2003; De la Rosa, 2007).

A2.5.4 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)

A las 24 horas de incubación se transfirió una alícuota de cada pozo a cajas con TSA incubándose la placa a 37 °C por 24 h. Después de tomar la alícuota, se aplicaron 100 µL de TTC en cada pozo y se dejó reposar 1 h, posteriormente la concentración de los pozos que no presentaron crecimiento y/o no presentaron cambios en la coloración después de aplicar el TTC se consideró como la CMI, y si a las 24 horas se verifica la ausencia del crecimiento en las placas esto indica un efecto bactericida (CMB) causado por la presencia del extracto (Taylor *et al.*, 1983).

A3. RESULTADOS

A3.1 Rendimientos obtenidos de la extracción del material vegetal de las 3 especies

En el cuadro A1 y A2 se muestran los resultados de los rendimientos obtenidos en las extracciones de las hojas de las especies, donde se observa que el mayor rendimiento de la maceración metanólica y de la partición ACN/MeOH fue de *C. aromatisans*; de la partición hexánica el mayor rendimiento se obtuvo de *T. ahouai*.

A3.2 Método Bioautográfico

Las fracciones de ACN/MeOH y hexánicas eluidas de las hojas y los aceites esenciales de *C. aromatisans* mostraron un efecto antimicrobiano contra *S. aureus* y *C. albicans* a una concentración de 250 µg/mL. *M. grandiflora* mostró tener mayor actividad en la fracción hexánica que en la MeOH/ACN contra *S. aureus*. Sin embargo, contra *C. albicans* no se encontró actividad por lo que es selectivo para *S. aureus*. En lo que respecta a *T. ahouai*, no se encontró actividad contra los microorganismos evaluados (Cuadro A3 y Figura A1). En lo que respecta al efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de *C. aromatisans*, éstos mostraron una actividad marcada contra *S. aureus* y

C. albicans (zonas claras de inhibición) comparable con los controles positivos. Se sabe que los aceites esenciales poseen diversos efectos medicinales, entre ellos destaca el efecto antimicrobiano y sus propiedades como insecticidas, además poseen propiedades antiinflamatorias, entre otras (Nogueira *et al.*, 2001; Limberger *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2009).

Cuadro A1. Rendimientos de los extractos de hojas de *C. aromatisans*, *T. ahouai* y *M. grandiflora*.

Especie	Extracto	Peso del material vegetal seco (g)	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
<i>C. aromatisans</i>	Metanólico	871.2	242.9	27.9
<i>C. aromatisans</i>	Aceites	80.0	0.04	0.05
<i>T. ahouai</i>	Metanólico	183.9	24.5	13.3
<i>M. grandiflora</i>	Metanólico	127.3	21.0	16.5

Cuadro A2. Rendimientos de las particiones de *C. aromatisans*, *T. ahouai* y *M. grandiflora*.

Especie	Peso de extracto total (g)	Peso del extracto de ACN/MeOH (g)	Peso del extracto Hexánico (g)	Rendimiento ACN/MeOH (%)	Rendimiento Hexánico (%)
<i>C. aromatisans</i> Hoja	1.0582	0.7317	0.1150	69.1	10.9
<i>T. ahouai</i>	1.0050	0.2378	0.5744	23.7	57.1
<i>M. grandiflora</i>	1.0029	0.4856	0.4074	48.4	40.6

A3.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración mínima bactericida (CMB)

En el ensayo de CMI no se encontró inhibición del crecimiento antimicrobiano para *S. aureus* y *C. albicans*. Dado que algunos extractos mostraron actividad antimicrobiana en el método bioautográfico de detección, se puede señalar que los metabolitos al estar eluidos y separados, poseen un efecto antimicrobiano más potente que la mezcla de todos ellos, que por lo contrario, podrían estar inhibiéndose unos a otros (efecto antagónico).

Cuadro A3. Sistemas de elución y factores de retención de los extractos activos.

Especie y extracto	Sistema	<i>S. aureus</i> Rfs	<i>C. albicans</i> Rfs
<i>C. aromatisans</i> ACN/MeOH	AcOEt/An/MeOH/H ₂ O 5:1.5:0.5:0.1	0.88	0.88
<i>C. aromatisans</i> Hx	Hx/AcOEt/MeOH 7:3:0.5	0.35, 0.57, 0.67	0.75
<i>C. aromatisans</i> AE	Hx/AcOEt/MeOH 7:3:0.5	0.80	0.80
<i>M. grandiflora</i> ACN/MeOH	AcOEt/CH ₂ Cl ₂ /MeOH/H ₂ O 4.5:4.5:2:0.3	0.89	Sin presencia
<i>M. grandiflora</i> Hx	Hx/An 8:2	0.56	Sin presencia

**Figura A1.** Evaluación de extractos de *C. aromatisans*, por el método bioautográfico contra *S. aureus* y *C. albicans*.

Antes de revelar las placas con TTC, se realizó una réplica de los pozos en medio TSA para *S. aureus* y PDA para *C. albicans*. Los microorganismos crecieron tras la incubación a 37 °C por 24 h, lo que confirma el resultado obtenido por CMI; por otra parte, los controles de ampicilina y nistatina al 1%, inhibieron el crecimiento microbiano.

Con estos datos se puede decir que la concentración de 1,000 $\mu\text{g/mL}$ no es suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano de estos dos microorganismos, sin embargo, los resultados de bioautografía indican la presencia de componentes antimicrobianos en los extractos de *C. aromatisans* y *M. grandiflora* contra *S. aureus* y *C. albicans* (Figura A1).

A3.4 Actividad antimicrobiana de las fracciones del extracto hexánico de *C. aromatisans*

Los resultados obtenidos (Figura A2 y Cuadro A4) muestran que las fracciones A, B, C, F y G en el método bioautográfico presentaron halo de inhibición a una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus*, comparable con el halo de inhibición del control amicacina al 1%. Los microorganismos que no fueron inhibidos por los compuestos mostraron una tinción rojiza al añadir el TTC, lo que indica la reducción de la sal de tetrazolio y por ende, revela la presencia de las bacterias. En lo que respecta a *C. albicans* las fracciones A, B, C, D, E, F y G, fueron activas, esto se observó con la presencia de un halo de inhibición. El crecimiento de las levaduras se observa de color rosa en los espacios donde no hay compuestos o el control de nistatina. En lo que respecta a la CMI, el extracto hexánico y las fracciones D, E y F poseen actividad inhibitoria del crecimiento a 1,000 $\mu\text{g/mL}$ y la fracción C a 500 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus*. No se observó inhibición del crecimiento de *C. albicans* a ninguna de las concentraciones evaluadas.

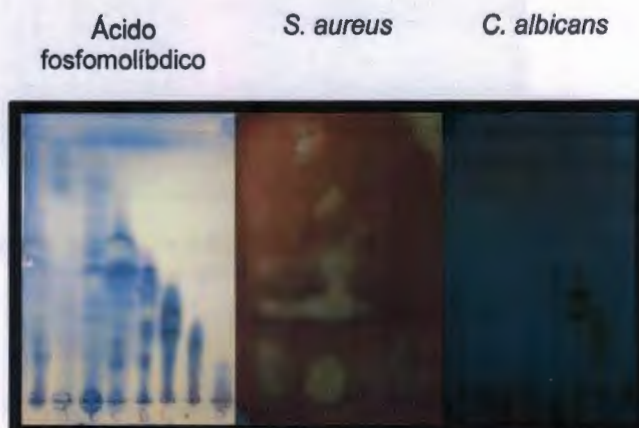


Figura A2. Resultados de la bioautografía de las fracciones del extracto hexánico de *C. aromatisans* (sistema de elución Hx/An 80:20).

Cuadro A4. Factores de retención de los componentes activos de las fracciones del extracto hexánico.

Fracción	Sistema	<i>S. aureus</i> Rfs	<i>C. albicans</i> Rfs
A	Hx/An 8:2	0.27	0.48
B		0.27	0.48
C		0.12, 0.27, 0.48	0.48
D		0.27	0.48
E		Sin presencia	0.48
F		0.19	0.48
G		Sin presencia	0.48

A4 DISCUSIÓN

Los AE y los extractos hexánicos de hojas de *C. aromatisans* y *M. grandiflora* poseen metabolitos con actividad antimicrobiana contra *S. aureus*. Únicamente los aceites esenciales y el extracto hexánico de hojas de *C. aromatisans* posee efecto contra *C. albicans*. El efecto más marcado se observó para los AE de *C. aromatisans*. Los AE y extractos orgánicos no polares de las hojas de esta especie han mostrado actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (bacteria Gram positiva) y *C. albicans* (levadura) por lo que en el presente estudio se realizó un fraccionamiento biodirigido del extracto hexánico con el fin de conocer cuáles fracciones contienen los principios activos para su posterior purificación.

Los extractos hexánicos por su naturaleza no polar arrastran componentes que forman parte de los aceites esenciales, como lo son algunos terpenos y grasas. Sobre los aceites esenciales, numerosos estudios reportan que son componentes de las plantas con una capacidad antimicrobiana reconocida; los aceites esenciales tienen aplicaciones en la medicina tradicional, en la conservación de alimentos y como aditivos alimenticios novedosos. Los AE son mezclas de un número de sustancias orgánicas de bajo peso molecular y reconocidas por sus propiedades aromáticas. Por lo general se obtienen por arrastre de vapor, extracción con grasas, con disolventes orgánicos o por extrusión. Los hidrocarburos más frecuentes encontrados en los AE derivan del ácido mevalónico

(monoterpenoides C10, sesquiterpenoides C15 y fenilpropanoides) y son responsables de los aromas característicos de muchas plantas (Domínguez, 1988; Harborne, 1998).

En lo que respecta al fraccionamiento del extracto hexánico, los resultados del bioensayo de la Concentración Mínima Inhibitoria sugieren que la fracción C contiene compuestos capaces de inhibir a *S. aureus* hasta una concentración de 500 µg/mL. Sin embargo, no se observó inhibición en la evaluación de *C. albicans*, siendo que por la técnica bioautográfica, al separarse los compuestos mediante la elución, las fracciones mostraron componentes que formaron halos de inhibición contra el microorganismo, esto puede deberse a que la carga microbiana presente en la superficie de la placa bioautográfica es menor comparando con la carga microbiana presente en el caldo de cultivo. Así mismo, es posible que la mezcla de componentes, al ser evaluada como tal, antagoniza el efecto antimicrobiano del componente activo, y/o la concentración de este componente activo es muy pequeña en la mezcla por lo que el efecto no es observado.

Por otro lado, se encontró que las especies activas frente a *S. aureus* fueron *C. aromatisans* (hoja y aceite esenciales) y *M. grandiflora*, y contra *Candida albicans* únicamente *C. aromatisans*. El fraccionamiento del extracto Hx activo evaluado contra *S. aureus* mostró que la fracción C posee actividad inhibitoria del crecimiento a 500 µg/mL. Por lo tanto, se concluye que el extracto hexánico y los aceites esenciales de *C. aromatisans*, poseen actividad antimicrobiana moderada, sin embargo, mostraron mayor actividad contra *S. aureus* y *C. albicans* que los extractos hexánicos y MeOH de *T. ahouai* y *M. grandiflora*.

Con estos resultados se observó un incremento moderado en la actividad antimicrobiana de las fracciones con respecto al extracto Hx de *C. aromatisans*, en especial por el método bioautográfico, siendo posible que al aislar los compuestos responsables de esta actividad la concentración mínima inhibitoria disminuya y se continúe encontrando una mayor actividad de éstos. En estudios realizados en colaboración CICY-Fundación Medina España, se observó el efecto antimicrobiano de *C. aromatisans* en una cepa de *E.coli*, tanto del extracto total como de la fracción hexánica, encontrándose una MIC de 40 µg/mL. *E.coli* es una bacteria Gram negativa; se sabe que las bacterias responden a la tinción de Gram, por lo que taxonómicamente se clasifican en Gram positivas y Gram negativas. La base de la reacción diferencial de Gram es la estructura de la pared celular. En las bacterias, la pared celular está constituida

principalmente por peptidoglucano y ácido teicoico; en las Gram negativas, la pared celular incluye al peptidoglucano y a la membrana externa. El lipopolisacárido (LPS) de las paredes celulares Gram negativas, es el responsable de la actividad inespecífica de endotoxina de la bacteria Gram negativa. Los antimicrobianos actúan por medio de la inhibición de la síntesis de la pared celular, alteración de la permeabilidad celular, inhibición de la síntesis proteica e inhibición de la síntesis de ADN y ARN (Brooks, 2005). Dado que *C. aromatisans* muestra buena actividad antimicrobiana contra *E. coli*, se sugiere realizar más experimentos contra otras bacterias Gram negativas y así determinar el espectro de acción de esta especie; también se sugiere investigar el mecanismo de acción en las especies sensibles.

A5 CONCLUSIONES

- El extracto hexánico y los aceites esenciales de hojas de *C. aromatisans* poseen metabolitos con actividad antimicrobiana en el modelo bioautográfico de detección contra *S. aureus* y *C. albicans*. El extracto hexánico tiene una CMI de 500 mg/mL con efecto bacteriostático.
- *M. grandiflora* posee bajo efecto antimicrobiano contra *S. aureus*.
- *T. ahouai* no posee actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *C. albicans*.

A6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrews, J.M., (2001). Determination of minimum inhibitory concentration. *Antimicrobial Agent. Chemother*, 48, 5-16.
- Banister, B., S. Gillespie and J. Jones (2006). *Infection, Microbiology and Management* 3d ed, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, United Kingdom. pp. 3-11.
- Brooks, G. F., Butel, J.S. and Morse, S.A. (2005). *Microbiología medica de Jawetz Melnick y Adelberg*. 18ed. Manual Moderno. México. pp. 22-37.
- De la Rosa-García, S. (2007). Evaluación del potencial antimicrobiano de microorganismos aislados de cenotes de la península de Yucatán. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Hamburger, M.O. and Cordell G.A., (1987). A direct bioautographic tlc assay for compounds possessing antibacterial activity. *J Nat Prod*, 50, 19-22.
- Martínez, J., Sulbarán B. y Ojeda, G. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Rev Fac Agron*, 20, 502-512.
- Guerrath, M., Torres, D. y Martínez, L. (2001). Validación del uso tradicional de plantas medicinales cultivadas en Cuba. *Rev Cubana Plant Med*, 2, 48-51.
- Limberger, R.P., Scopel, M., Sobral, M., and Henriques, A.T. (2007). Comparative analysis of volatiles from *Drimys brasiliensis* Miers and *D. angustifolia* Miers (Winteraceae) from Southern Brazil. *Biochem Syst Ecol*, 35, 130-137.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. & Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J Nat Prod*, 66, 1022–1037.
- Nogueira, P.C. de L., Bittrich, V., Shepherd, G.J., Lopes, A.V. and Marsaiolia, A.J. (2001). The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae). *Phytochem*, 56, 443-452.
- Pereira, J.V., Bergamo, D.C., Pereira, J.O., França, S. de C., Pietro, R.C., Silva-Sousa Y.T. (2005). Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. *Braz Dent J*, 16, 192-196.
- Rahman, A., Choudhary, M.I. and Thomsen, W.J. (2001). *Bioassay techniques for drug development* Harwood academic publishers. The Netherlands. Preface xiii, pp. 15-16.

- Rojas, A., Hernández, L., Pereda, R. and Mata, R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, 38, 31-38.
- Taylor, P.C., Schoenknecht, F.D., Sherris, J.C. and Linner, E. C. (1983). Determination of Minimum Bactericidal Concentrations of oxacillin for *Staphylococcus aureus*: Influence and Significance of Technical Factors. *Antimicrob Agents Chemother*, 23, 142-150.
- Urrestarazu-Gavilán, M. (2003). Tratado de cultivo sin suelo. 3ª ed. Mundi-prensa, Madrid, España, 150 p.
- Yuan, W., Ruimin, M., Xiangrong, W., Sixiu L., Zhengqiu, F. (2009). Chemical composition of volatile constituents of *Magnolia grandiflora*. *Chem Nat Comp*, 45, 257-258.

