



Universidad Veracruzana

Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica

Estudio Biodirigido de la Actividad Antiinflamatoria y Antioxidante de *Ternstroemia sylvatica*

Tesis

Que para obtener el título de:
Maestro en Ciencias en Química Bioorgánica

Presenta:

Q.F.B. Claudia Verónica Moreno Quirós

Directores:

Dra. Maribel Vázquez Hernández
Dra. Rosa Virginia García Rodríguez

Xalapa, Veracruz

Febrero 2013



Este trabajo se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA) y en el Bioterio de la Facultad de Química Farmacéutica Biológica de la Universidad Veracruzana.

AGRADECIMIENTOS

A las **Doctoras Maribel Vázquez Hernández y Rosa Virginia García Rodríguez**, por compartir esta experiencia conmigo y por brindarme apoyo, comprensión, paciencia y amistad. Gracias.

Agradezco al **Dr. Samuel Cruz Sánchez** por todo su apoyo siempre. Mil Gracias.

Al **Dr. Rafael Ramos Morales**, por su apoyo, su comprensión y por sus observaciones realizadas a este trabajo. Gracias.

A mis amigas **Edna y Verónica**. Por vivir conmigo esta etapa, siempre acompañándome, por escucharme, aconsejarme y aguantarme, pero sobre todo porque por ustedes ni estuve ni me sentí sola. Sin su ayuda no hubiera podido realizar este trabajo, las quiero mucho y espero seguir siendo bendecida con su amistad. Muchas Gracias.

Al **Q.F.B. Rafael Hernández Bello**. Por ayudarme en la traducción del resumen y por darme “ánimo” en todo momento. Gracias Rafa.

Al **Ing. Rafael Claudio Moreno Quirós**. Por su apoyo informático en la realización de este trabajo. Gracias Hermano. Te quiero mucho.

Y a todas las personas que vivieron y recorrieron conmigo este tramo del camino, a veces tranquilo, a veces cansado, a veces frustrante, a veces desafiante pero todas las veces aleccionador. GRACIAS.



A MIS PADRES:

Roberto y Rosa María

POR SU AMOR Y APOYO INFINITO.

LOS AMO MUCHISIMO



INDICE

	Página
Abreviaturas	III
Índice de Figuras	IV
Índice de Tablas	V
Resumen	VII
Abstract	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Plantas con Propiedades Inflamatorias	3
2.2 <i>Ternstroemia sylvatica</i>	4
2.2.1 Familia <i>Theaceae</i>	4
2.2.2 Género <i>Ternstroemia</i>	5
2.2.3 Descripción botánica	5
2.2.4 Nombre común y usos en la medicina popular	6
2.2.5 Composición química	6
2.2.6 Actividad biológica	7
2.3 Proceso inflamatorio	8
2.3.1 Mediadores químicos de la inflamación	10
2.3.2 Componentes celulares	14
2.4 Especies Reactivas de Oxígeno	16
2.4.1 Generación de Especies Reactivas	17
2.4.2 Estrés oxidativo	20
2.5 Modelos experimentales para evaluar actividad antiinflamatoria	23
2.5.1 Edema auricular inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato	23
2.5.2 Ensayo de la Enzima Mieloperoxidasa	24
2.6 Métodos empleados para determinar la actividad antioxidante	25
2.6.1 Reacción con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	25
2.6.2 Capacidad antioxidante mediante el poder reductor de hierro	26
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	30
6. METODOLOGÍA	31
6.1 Material vegetal y preparación del extracto	32

6.2 Tamiz fitoquímico	32
6.3 Determinación del extracto activo de <i>Ternstroemia sylvatica</i>	33
6.3.1 Modelo de edema inducido auricular en dosis única por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)	33
6.4 Fraccionamiento cromatográfico de los extractos clorofórmico y etanólico	33
6.5 Determinación del potencial antioxidante	34
6.5.1 Captura de radicales libres con el uso de 2,2-difenil-1picrilhidrazilo (DPPH)	34
6.5.2 Método del poder reductor de hierro (FRAP)	35
6.5.3 Determinación del contenido total de polifenoles	36
6.6 Determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa en el modelo agudo del edema auricular inducido por TPA	36
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7.1 Obtención de extractos crudos	38
7.2 Tamiz fitoquímico	38
7.3 Determinación del extracto activo de <i>Ternstroemia sylvatica</i>	39
7.3.1 Modelo de edema auricular inducido en dosis única de 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA).	39
7.4 Fraccionamiento cromatográfico de los extractos clorofórmicos y etanólico	40
7.4.1 Análisis espectroscópico	42
7.5 Determinación del potencial antioxidante de los extractos.	45
7.5.1 Determinación del potencial antioxidante a las fracciones clorofórmicas y etanólicas.	47
7.6 Determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa en el modelo agudo inducido por TPA	49
8. CONCLUSIONES	57
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

Abreviaturas

5-LOX	5-lipoxigenasa
5-HPETE	ácido-5 hidroperoxieicosatetraenoico
AA	Ácido Araquidónico
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
CAT	Catalasa
COX	Ciclooxigenasa
DPPH	2,2-Difenil-1-picril hidrazilo
EtOH	Etanol
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GPx	Glutación peroxidasa
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC	Cromatografía líquida de alta precisión
IC ₅₀	Concentración inhibitoria-50
IFN- γ	Interferón gamma
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LT's	Leucotrienos
MCP	Proteína atractante de monocitos
MeOH	Metanol
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
NF- κ B	Factor de transcripción nuclear
NO	Óxido nítrico
PAF	Factor Activador de Plaquetas
PKC	Proteína quinasa C
PGI	Prostaciclina
PG's	Prostaglandinas
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
ROS	Reactive Oxygen Species
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido dismutasa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TPA	12-O-tetradecanoílforbol-13-acetato
TXA ₂	Tromboxano A ₂

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Hojas y Flores de Ternstroemia sylvatica</i>	5
Figura 2. <i>Algunos compuestos encontrados en el género Ternstroemia</i>	7
Figura 3. <i>Metabolismo del ácido araquidónico</i>	12
Figura 4. <i>Radicales Libres en Sistemas Biológicos</i>	18
Figura 5. <i>Relación Inflamación-Estrés Oxidativo</i>	22
Figura 6. <i>Estructura de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)</i>	23
Figura 7. <i>Estructura del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo</i>	26
Figura 8. <i>Mecanismo del ensayo FRAP</i>	26

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. <i>Mediadores que participan en el proceso inflamatorio</i>	9
Tabla 2. <i>Enzimas Antioxidantes.</i>	21
Tabla 3. <i>Pruebas para la identificación de familias de metabolitos presentes en los extractos.</i>	32
Tabla 4. <i>Fase Móvil utilizada para el fraccionamiento del Extracto Clorofórmico (EC).</i>	34
Tabla 5. <i>Fase Móvil utilizada para el fraccionamiento del Extracto Etanólico (EE).</i>	34
Tabla 6. <i>Rendimiento y Peso Seco de los Extractos de Ternstroemia sylvatica</i>	38
Tabla 7. <i>Tamiz fitoquímico de los extractos de Ternstroemia sylvatica.</i>	39
Tabla 8. <i>Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos clorofórmico y etanólico de Ternstroemia sylvatica en el modelo de edema auricular inducido con TPA.</i>	40
Tabla 9. <i>Fracciones primarias obtenidas del extracto clorofórmico de Ternstroemia sylvatica.</i>	40
Tabla 10. <i>Fracciones primarias obtenidas del extracto etanólico de Ternstroemia sylvatica.</i>	41
Tabla 11. <i>Composición química del extracto hexánico de Ternstroemia sylvatica por análisis cromatográfico GC-MS</i>	43
Tabla 12. <i>Composición química del extracto clorofórmico de Ternstroemia sylvatica por análisis cromatográfico GC-MS</i>	44
Tabla 13. <i>Capacidad Antioxidante mediante la Captura de Radicales Libres (DPPH) de los extractos de Ternstroemia sylvatica</i>	45
Tabla 14. <i>Capacidad reductora (FRAP) y Contenido Total de Polifenoles de los extractos de Ternstroemia sylvatica</i>	46
Tabla 15. <i>Capacidad Antioxidante y Contenido Total de Polifenoles de las fracciones clorofórmicas de Ternstroemia sylvatica.</i>	47
Tabla 16. <i>Capacidad Antioxidante y Contenido Total de Polifenoles de las fracciones etanólicas de Ternstroemia sylvatica</i>	48
Tabla 17. <i>Actividad antiinflamatoria de T. sylvatica sobre el edema de oreja inducido con TPA.</i>	49
Tabla 18. <i>Actividad antiinflamatoria de las fracciones clorofórmicas de T. sylvatica sobre el edema de oreja inducido con TPA.</i>	50
Tabla 19. <i>Actividad antiinflamatoria de las fracciones etanólicas de T. sylvatica sobre el edema de oreja inducido con TPA.</i>	52

Tabla 20. <i>Efecto antiedematoso de extractos de T. sylvatica sobre el edema auricular inducido con TPA.</i>	53
Tabla 21. <i>Efecto antiedematoso de las fracciones clorofórmicas de T. sylvatica sobre el edema auricular inducido con TPA.</i>	54
Tabla 22. <i>Efecto antiedematoso de las fracciones etanólicas de T. sylvatica sobre el edema auricular inducido con TPA.</i>	55
Tabla 23. <i>Efecto de los extractos en la infiltración leucocitaria medida como % de inhibición de la actividad de MPO.</i>	56
Tabla 24. <i>Efecto de las fracciones clorofórmicas en la infiltración leucocitaria medida como % de inhibición en la actividad de MPO.</i>	56
Tabla 25. <i>Efecto de las fracciones etanólicas en la infiltración leucocitaria medida como % de inhibición en la actividad de MPO.</i>	56

RESUMEN

En la naturaleza existe una gran diversidad de plantas cuyos metabolitos secundarios tienen la propiedad de disminuir el daño ocasionado por las especies oxidantes relacionadas con procesos inflamatorios; por lo anterior resulta importante la realización de estudios que apoyen el uso de estas plantas dentro de la medicina tradicional. *Ternstroemia sylvatica* es una especie usada por la población del Estado de Veracruz en el tratamiento de procesos inflamatorios. En el presente trabajo se determinó la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* en los extractos orgánicos (Hexánico, Clorofórmico y Etanólico) de esta especie, así como su actividad antiinflamatoria en modelos animales. El potencial antioxidante se determinó a través de métodos analíticos espectrofotométricos: captura de radicales libres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y poder reductor de hierro (FRAP). La inhibición de la actividad de la enzima MPO se evaluó en el modelo del edema auricular inducido con TPA, administrando el extracto por vía tópica; el ensayo analítico para la determinación enzimática se realizó 24 hrs después de la aplicación del tratamiento. De los resultados obtenidos se desprende que el extracto etanólico de *T. sylvatica* mostró una actividad significativa (68.7%) en la prueba de DPPH⁺. Esta misma tendencia se observó en el caso del ensayo FRAP donde los resultados obtenidos evidenciaron una buena capacidad antioxidante de 2431.3 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$. Los extractos hexánico y clorofórmico presentaron una baja capacidad antioxidante en todos los ensayos. Los resultados de la actividad antiinflamatoria mostraron una disminución del edema auricular a las 24 h (inducido por TPA por vía tópica) en los extractos clorofórmico y etanólico (75.5 y 72% respectivamente) similar al efecto del fármaco de referencia (indometacina 78%). En las muestras de tejido obtenidas se observó que el extracto etanólico inhibió la actividad enzimática de la mieloperoxidasa en 91%. En el análisis espectroscópico realizado se determinó que el extracto hexánico está compuesto principalmente por ácidos grasos y sus ésteres, mientras que en el extracto clorofórmico se logró identificar adicionalmente la presencia del compuesto fitona y de la escopoletina. Esta cumarina también logró identificarse en el extracto etanólico. Los resultados obtenidos mostraron que el extracto etanólico de *Ternstroemia sylvatica* aplicado tópicamente posee una buena capacidad antioxidante, antiinflamatoria y de inhibición de la actividad de la enzima mieloperoxidasa en este modelo *in vivo*.

ABSTRACT

In nature there is a great diversity of plants whose contains secondary metabolites which have the property of low down the damage caused by oxidizing species related to inflammatory processes; it is for this that it is important conduct studies to support the use of plants in traditional medicine. In State of Veracruz, *Ternstroemia sylvatica*, is a kind of plant used by the population in the treatment of inflammatory process. In order to probe these effects, we investigated the antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* in organic extracts (Hex, CHCl₃ and EtOH) of this species and its anti-inflammatory activity in animal models. Antioxidant potential was performed using spectrophotometric methods: capturing free radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP). Inhibition of the activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO) was assessed by the model of ear edema induced by TPA, extracts was administering topically and the enzymatic assay was carried out 24 hours later after the administration. The results obtained suggest that the ethanolic extract of *T. sylvatica* showed significant activity, 68.7% of inhibition, in the DPPH⁺ assay. The same trend was observed in the FRAP assay, which showed a great antioxidant capacity of 2431.3 μmol Fe²⁺/L. Hexane and chloroform extracts showed low antioxidant capacity in all tests. The results shows that the ethanolic and chloroform extracts ear edema induced by TPA, 75.5 and 72% respectively, similar to the effect of indomethacin, as reference drug (78%). In tissue samples we observed that the ethanolic extract inhibited the enzymatic activity of the myeloperoxidase in 91%. Finally, the spectroscopic analysis shows that the hexane extract is mainly composed by fatty acids and their esters, while the chloroform extract was further able to identify the presence of the compound like phytone and scopoletin. This same coumarin, scopoletin, also managed to identify in the ethanol extract. The results demonstrated that the ethanolic extract of *T. sylvatica* topically administrated show a good antioxidant, antiinflammatory and inhibition of myeloperoxidase enzyme activity.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los problemas de salud con alta incidencia que se presentan en México se encuentran las enfermedades que involucran procesos inflamatorios; sí bien la inflamación es una reacción de defensa del organismo como respuesta ante un trauma de cualquier naturaleza y que se encuentra como síntoma en el 75% de las patologías, la prolongación de este proceso puede provocar daños a nivel celular y tisular en el organismo; enfermedades como la artritis reumatoide, gota o fibrosis quística implican reacciones inflamatorias severas, en algunos casos incapacitantes, dolorosas y costosas para los pacientes, que demeritan en mucho su calidad de vida (Mould-Quevedo *et al.* 2008).

Debido a lo anterior, se hace necesario desarrollar nuevos medicamentos, más seguros y eficaces para este problema de salud. La búsqueda de alternativas naturales que sustituyan o disminuyan el consumo de fármacos alópatas y sus efectos adversos resulta de gran interés como una estrategia viable para aliviar y/o mitigar los síntomas y consecuencias de estas patologías.

Existen una gran variedad de especies vegetales que la población ocupa para aliviar los síntomas del proceso inflamatorio; pero estos remedios populares carecen de estudios que avalen su efectividad terapéutica o los riesgos implicados en su utilización. El reconocimiento de esta realidad no supone dejar de usarlos, sino de conducir más investigaciones que permitan conocer sobre la eficacia y seguridad de estas plantas, logrando que con el conocimiento obtenido de estos estudios estas especies puedan ser usadas no solo como una alternativa médica, sino como una terapia complementaria para resolver problemas de salud.

Entre estas plantas de uso popular se encuentra *Ternstroemia sylvatica* perteneciente a la familia Theaceae, que comúnmente es conocida como trompillo es utilizada en la zona centro del Estado de Veracruz para tratar golpes, torceduras y diarreas, padecimientos todos que involucran un proceso inflamatorio (Carranza 1999).

A pesar de su extendido uso, a la fecha no existen estudios químicos que proporcionen de manera general su composición ni evaluaciones biológicas de su actividad antiinflamatoria.

En estudios químicos realizados a especies asiáticas del mismo género, se han descrito la presencia de saponinas y terpenos en extractos polares en *Ternstroemia gymnanthera* (Shinbo *et al.* 2008; Tori *et al.* 2005), triterpenos como el ácido oleanólico, primulagenina A, cameliagenina A y A-barrigenol en hojas y frutos de *Ternstroemia japonica* (Shin *et al.* 2003; Yoshioka *et al.* 1972) y un carotenoide llamado ternstroemia-xantina aislado de las semillas de la misma planta (Kikuchi 1974). En las especies americanas de *Ternstroemia* se han reportado la presencia del compuesto jacaranona en flores de *T. pringlei* (Lozada *et al.* 2010) así como del efecto sedante de su extracto en ratas (Balderas *et al.* 1996). En el caso de *T. sylvatica* se ha informado también un efecto sedante del extracto acuoso de las hojas administrado por vía intraperitoneal en modelos biológicos con ratas (Molina *et al.* 1999)

En el presente trabajo se pretende evaluar el potencial antioxidante y la actividad antiinflamatoria de los extractos orgánicos de las partes aéreas de *Ternstroemia sylvatica*, buscando verificar el uso popular que esta especie tiene mediante modelos científicos experimentales.

2. ANTECEDENTES

2.1 Plantas con Propiedades Antiinflamatorias

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde hace cientos de años para el tratamiento de enfermedades, las personas usan estos remedios por tradición, eficacia y bajo costo y han jugado un papel importante en la obtención de nuevas entidades químicas por ser una fuente de compuestos base para los fármacos actuales, pues cerca del 25% de los medicamentos prescritos provienen de los productos naturales (Cerecero *et al.* 2004).

En México existen más de 23,400 especies vegetales y alrededor de 5,000 se utilizan con fines medicinales. Más del 90% de los mexicanos han usado plantas medicinales para el tratamiento empírico de varias enfermedades; dentro de las más comunes están epazote (*Chenopodium ambrosioides*), limón (*Citrus limón*), gordolobo (*Gnaphalium sp.*), manzanilla (*Matricaria recutita*), árnica (*Arnica montana L.*), yerbabuena (*Mentha citrata*) y nopal (*Opuntia ficus*) (Alonso-Castro *et al.* 2012).

Generalmente más de dos tercios de las patologías que sufre el organismo existe un proceso inflamatorio, que bien puede presentarse durante todo el desarrollo de la enfermedad o en alguna etapa de esta. Los agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son los fármacos que habitualmente se prescriben para ayudar y mitigar los síntomas de la inflamación, pero la ingesta de estos medicamentos también conlleva reacciones adversas como náuseas, vómitos, dolor epigástrico, prurito e hipercalcemia. El riesgo de un uso prolongado de AINES provoca mareos, cefaleas, problemas gastrointestinales severos como úlcera péptica y hemorragias, problemas renales, alteraciones en el SNC como agitación, somnolencia, letargia y ataxia, problemas cardiovasculares como hipertensión arterial o hipotensión y taquicardia (Kalant 1998).

Por lo anterior; la búsqueda de nuevos agentes dentro de los productos naturales como fuente de compuestos más eficaces que muestren actividad antiinflamatoria y menores efectos secundarios constituye un recurso que es importante explorar.

En México, las bases de datos con información etnobotánica señalan un número importante de plantas medicinales utilizadas para tratar afecciones que se acompañan de inflamación y dolor; entre ellas destacan especies como *Heterotheca inuloides* (Segura *et al.* 2000); *Psidium guajava* (Pérez *et al.* 2008), *Salvia officinalis* (Baricevic *et al.* 2001), *Solanum nigrum* (Ravi *et al.* 2009); *Uncaria tomentosa* (Concalves *et al.* 2005), *Oenothera rosea* (Márquez-Flores *et al.* 2009), *Aloe vera* (Vázquez *et al.* 1996); *Ruta graveolens* (Ratheesh *et al.* 2009) entre muchas otras.

Específicamente en el Estado de Veracruz; se emplean diversas plantas como *Bougainvillea spp* (bugambilia), *Peumus boldus* (boldo), *Rhizophora mangle* (mangle), entre muchas otras para este mismo fin (Ortega 1988).

Ternstroemia sylvatica conocida comúnmente como trompillo, es una de estas especies utilizada por la población en la zona centro del estado para el dolor de cabeza y los “golpes”, pero hasta la fecha no existen estudios desde el punto de vista farmacológico sobre sus propiedades antiinflamatorias; inclusive el número de estudios de otras especies pertenecientes a este género son limitados.

2.2 *Ternstroemia sylvatica*.

2.2.1 Familia Theaceae

Theaceae es una familia que consta de aproximadamente 20 géneros, que agrupa de 660 a 760 especies, se distribuyen principalmente en regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. El principal centro de riqueza y diversificación de esta familia se encuentra en Asia, donde están la mayoría de los géneros, algunas de ellas de gran importancia económica, como *Camellia sinensis*, (Té verde) originaria de China e India, al igual que *Camellia japonica* (camelia) que por sus flores de aroma agradable es muy apreciada en la horticultura. *Ternstroemia* es el género más ampliamente extendido de esta familia con especies ubicadas en ambos hemisferios (Luna *et al.* 2004).

2.2.2. Género *Ternstroemia*.

Las especies de este género son arbustos o árboles, de hojas perennes dispuestas en espiral con frecuencia en la punta de las ramas, simples, enteras o serradas (cuando son jóvenes), las flores son generalmente de color blanco o rosa, solitarias o en grupos axilares principalmente con 5 pétalos y con frecuencia de olor fuerte, el fruto es una cápsula generalmente loculicida, indehisciente como una pepita; en algunas especies las semillas son aladas, en otras están cubiertas por un tejido carnoso, el embrión puede tener una forma de herradura o ser recta. En América están distribuidas cerca de 85 especies, la mayoría en Centroamérica, nueve de ellas se encuentran en México; varias especies de *Ternstroemia* que crecen en el país (*T. pringlie* y *T. sylvatica*) comúnmente son conocidas como "Flor de Tila" y tienen fama de poseer efectos sedantes, ansiolíticos y anticonvulsivos (Balderas *et al.* 2008).

2.2.3 Descripción Botánica.

Ternstroemia sylvatica es un arbusto o árbol de 1.5 a 5 m de alto, que crece entre los 1,200 a 2,700 metros sobre el nivel del mar, muy común en las zonas boscosas, bosques de pinares, encinares y mesófilo de montaña (Figura 1). Sus hojas dispuestas en espiral, a menudo apiñadas o verticiladas, simples y pecioladas. Sus flores son axilares, blancas, usualmente de 5 sépalos, imbricados, coriáceos de 5 pétalos; que florece entre agosto y febrero, su fruto se observa entre abril y octubre. Se distribuye principalmente hacia la vertiente del Golfo de México, sobre la Sierra Madre Oriental en los estados de San Luis Potosí, Puebla, Veracruz, Hidalgo y Oaxaca (Calderón *et al.* 2010).



Figura 1. *Ternstroemia sylvatica*: a) fruto y hojas, b) hojas, c) hojas y flor.

Clasificación Taxonómica.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Theales

Familia: Theaceae

Género: *Ternstroemia*

Especie: *Ternstroemia sylvatica*

Con frecuencia se encuentra en los herbarios ejemplares de esta especie, con el nombre de *Ternstroemia pringlie* o *Ternstroemia lineata*, con la cual mantiene algunas semejanzas; sin embargo, se diferencian por los pedúnculos más largos en *T. lineata* y por la lamina foliar, que es oblanceolada con la parte más ancha arriba de la mitad, mientras que en *T. sylvatica* es elíptica y con la parte más ancha en la porción media (Calderón *et al.* 2010).

2.2.4. Nombre común y usos en la medicina popular.

Existen varios nombres comunes según la zona en la que se encuentre; por ejemplo, en Oaxaca se conoce como flor de tila, hierba del cura o zapotillo, limoncillo en Hidalgo y en Veracruz trompillo o tila. Los frutos se utilizan comúnmente en la medicina tradicional mexicana para aliviar la ansiedad, trastornos del sueño y convulsiones. En Oaxaca es usada para el dolor de cabeza, en Michoacán para dolores reumáticos y en Jalisco se recomienda contra la tos. (Carranza *et al.* 1999). En la zona montañosa central de Veracruz es usada para los “golpes” en cataplasmas alcohólicas de las hojas frescas (Cano 1997).

2.2.5. Composición química.

En estudios realizados a las especies asiáticas, se han descrito la presencia de terpenos y compuestos aromáticos del extracto metanólico de hojas de *Ternstroemia gymnanthera* (Tori 2005) y triterpenos tipo ursano y oleanano así como *A₁-barrigenol*, *ácido ursólico*, *ácido corosólico*, *sitosterol*, *estigmasterol* del tallo de esta planta (Shinbo

et al. 2008; Ikuta *et al.* 2003). Por otra parte, de los extractos con butanol y acetato de etilo de frutos de *Ternstroemia japonica* se han obtenido respectivamente saponinas triterpenoides y derivados de jacaranona (Shin *et al.* 2003. y Jo *et al.* 2005). En las especies americanas también se ha demostrado la presencia del compuesto jacaranona en extractos metanólicos de la flor de *Ternstroemia pringle*.

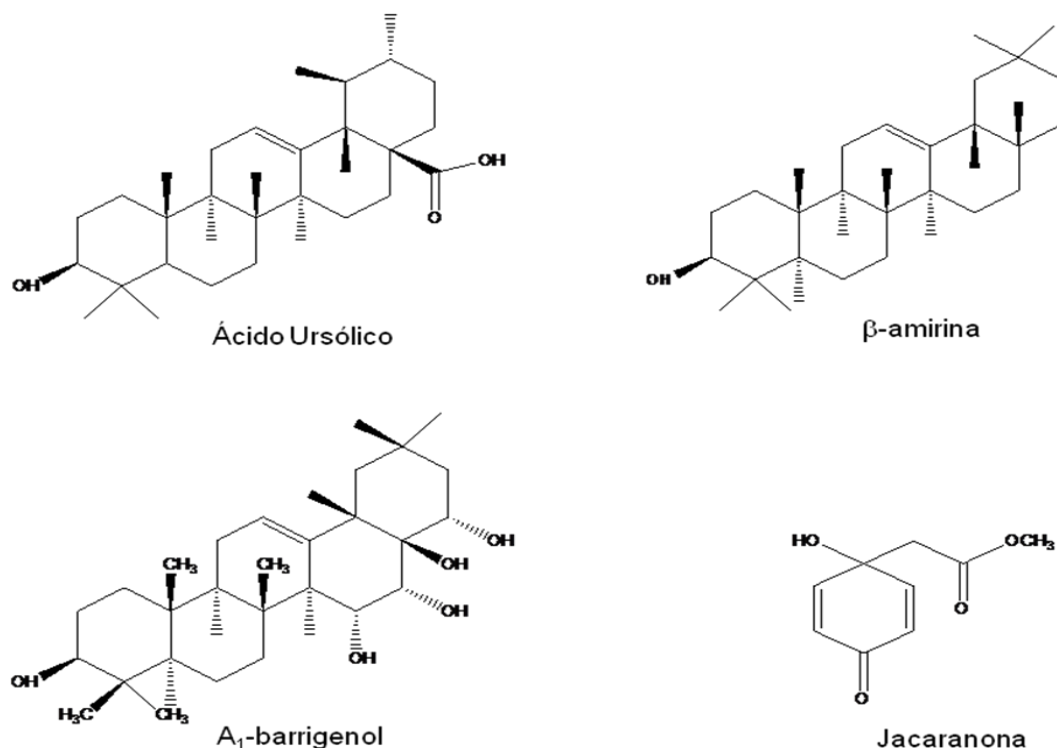


Figura 2. Algunos compuestos encontrados en el género *Ternstroemia*

2.2.6. Actividad biológica.

En *Ternstroemia pringlei* se demostró que los extractos metanólico y acuoso de los frutos tienen efecto sedante en modelos murinos, además de potencializar la actividad del diazepam y producir una atenuación del efecto de etanol (Balderas *et al.* 2008).

En un estudio similar se concluyó que el extracto acuoso de las hojas y flores de *Ternstroemia sylvatica* produce efectos sedantes en modelos de comportamiento con ratas en dosis 7.1mg/Kg por vía intraperitoneal (Molina *et al.* 1999).

En el trabajo realizado por Jo y colaboradores (2005) se determinó la actividad antioxidante mediante la Captura de Radicales Libres (DPPH) de las fracciones del extracto metanólico de los frutos de *T. japonica*, mostrando una débil actividad captadora de radicales DPPH con una IC₅₀ de 86 µg/ml comparado con quercetina usado como control positivo que mostró una IC₅₀ de 4.5 µg/ml.

Recientemente Balderas y colaboradores (2012) describieron un estudio neurofarmacológico realizado a los frutos de *Ternstroemia sylvatica* mostrando efectos ansiolíticos y una disminución de la actividad locomotora. El extracto acuoso de sus semillas disminuyó significativamente el recuento de plaquetas en ratas y se logró identificar un nuevo componente llamado 28-O-[β-L-6-ramnopiranosil]-A₁-barrigenol.

2.3 Proceso Inflamatorio

La inflamación es el signo más frecuente en la mayoría de las enfermedades y se puede definir como una reacción defensiva desencadenada por estímulos de muy diversa naturaleza (física, química o microbiológica), el objetivo de esta respuesta biológica fundamental de carácter protector es eliminar del organismo el agente o la causa que lo lesiona y conducir a la restauración de la estructura y la función del tejido normal (Kulinsky 2007).

La vasodilatación localizada, el aumento de la permeabilidad, la extravasación de proteínas plasmáticas y la migración de leucocitos hacia el tejido afectado produce los signos clásicos de la inflamación que son; calor y rubor que se explican por la hiperemia activa; tumoración, por el exudado; dolor por la irritación de las terminaciones nerviosas producida por la alteración y el descenso del pH que acompaña al exudado; y pérdida de la función cuando el dolor y la tumoración son importantes (García de Lorenzo *et al.* 2000).

Este proceso es regulado e implica la producción y liberación de un importante número de mediadores que inician, mantienen, agravan y modulan el curso de la inflamación, pueden provenir de diversos puntos del tejido endotelial, vascular y/o nervioso y pertenecen a diferentes clases químicas como son las aminas vasoactivas (histamina, serotonina), proteínas y péptidos (enzimas hidrolíticas, citocinas, factores activadores de colonia, factores de complemento, quininas), especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, hidroperóxido, radicales hidroxilos) y lípidos (factores activadores de plaquetas, eicosanoides) (Gómez-Estrada *et al.* 2011). La respuesta es compleja, tomando en cuenta que son numerosos los mediadores (tabla 1) y muchos de éstos tienen por igual acciones fisiológicas de estimulación o de inhibición del proceso (Ley 2001).

Tabla 1. Componentes principales que participan en el proceso inflamatorio

Componentes	Principales Funciones
Neutrófilos y Macrófagos	Fagocitosis inicial y destrucción de microorganismos. Secreción de citocinas
TNF-α, IL-1	Inicio del proceso de inflamación, activador de células fagocíticas y endotelial
Prostaglandinas	Vasodilatación, dolor y fiebre
Óxido nítrico	Vasodilatación y citotoxicidad
Factores de Coagulación	Tabicación de los tejidos intactos
Linfocitos NK	Lisis de las células infectadas, activación de macrófagos
INF-γ	Resistencia a las infecciones víricas
Quimiocinas	Activación leucocitaria
Complemento	Destrucción de microorganismos, activación de leucocitos y opsonización de microorganismos
IL-10 y TGF-β	Control del proceso de inflamación
Bradicinina	Dolor

De acuerdo con su duración este proceso se divide en agudo y crónico. La inflamación aguda de duración relativamente corta (minutos, horas o unos pocos días) es por lo general beneficiosa para el huésped, se inicia muy rápidamente y es mediada

a través de la activación del sistema inmune (Gallia *et al.* 2012), se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos, proteínas plasmáticas y leucocitos predominantemente neutrófilos que forman en conjunto un edema (Ley 2001). Presenta tres eventos principales; a) modificación en el calibre de los vasos sanguíneos, b) alteraciones en la estructura de los vasos que permite el paso de proteínas plasmáticas y leucocitos y c) migración leucocitaria hasta el punto de la lesión (Kulinsky 2007).

La inflamación crónica puede durar semanas, meses o años, se caracteriza histológicamente por el infiltrado de linfocitos y macrófagos con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo (Abbas *et al.* 2004); se manifiesta cuando el daño es persistente sobre el tejido o como resultado de un desequilibrio de los señaldadores químicos que indican el término del proceso inflamatorio inicial, volviéndose perjudicial para los tejidos y que puede predisponer al anfitrión a varias enfermedades crónicas degenerativas inclusive cáncer, ejemplo de este fenómeno se ha observado en enfermedades inflamatorias intestinales como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa que se asocia con un mayor riesgo de adenocarcinoma de colon, así como la pancreatitis crónica se ha relacionado con una mayor tasa de cáncer de páncreas. Los mecanismos por los que la inflamación crónica contribuye a la carcinogénesis incluyen: (a) inducción de inestabilidad cromosómica, (b) alteraciones por eventos epigenéticos, (c) estimulación de la neovascularización intratumoral (d) apoptosis. La causa de estos procesos bioquímicos alterados es la sobreexpresión o la activación anormal de diversos mediadores proinflamatorios, que incluyen pero no se limitan a citocinas, quimiocinas, a la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), las prostaglandinas (PGs), la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y óxido nítrico (NO) (Kundu *et al.* 2012).

2.3.1. Mediadores químicos de la inflamación

En la inflamación la activación de los leucocitos infiltrados produce citocinas inflamatorias; estas proteínas de bajo peso molecular son especialmente importantes como factores estimuladores. Su papel es la iniciación y regulación del proceso; entre sus funciones están activar la comunicación intercelular, inducir la activación de receptores específicos en la membrana, cumplir funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis y modular la secreción de inmunoglobulinas. El

mecanismo de acción de las citocinas puede ser paracrino o autocrino, no se acumulan en el organismo pero pueden ser sintetizadas rápidamente. Actúan formando una red donde sus funciones pueden solaparse, es decir, que citocinas diferentes pueden dar los mismos efectos sean pro o antiinflamatorios. Son producidas fundamentalmente por linfocitos y macrófagos aunque también por leucocitos polimorfonucleares, células endoteliales, epiteliales y adipocitos (Hanada *et al.* 2002).

Las principales citocinas que actúan como mediadores inflamatorios son las interleucinas IL-1, IL-8 e IL-6, el Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α) y el interferón γ (IFN- γ) que son producidos por los macrófagos activados. Las IL-1, IL-8 y IL-6 incrementan la permeabilidad vascular e inducen la coagulación; aumentan la expresión de moléculas de adhesión en las células del endotelio vascular, provocan respuestas consistentes en fiebre, pérdida de apetito, aumento de la frecuencia cardiaca, disminución del pH de la sangre e induce la quimiotaxis de neutrófilos y linfocitos T (Kulinsky 2007).

El TNF- α se produce fundamentalmente en monocitos y macrófagos como respuesta a antígenos bacterianos, induce la producción de la IL-6 que a su vez promueve la diferenciación de los linfocitos T y B y estimula la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B (Lefkowitz *et al.* 2001). El TNF- α en conjunto con la IL-1 está implicado en respuestas derivadas de los procesos infecciosos, elevando la temperatura corporal y el sueño al actuar sobre el sistema nervioso central (SNC). Por otra parte este factor es un potente estimulador de la iNOS que produce altas concentraciones de óxido nítrico (Zhao *et al.* 2007).

El óxido nítrico (NO) tiene diversas funciones fisiológicas como la vasodilatación que incrementa la permeabilidad y regula el tono vascular relajando la musculatura lisa, actúa como inhibidor de la agregación plaquetaria y realiza funciones de neurotransmisor, posee propiedades citotóxicas contra los microorganismos patógenos. El NO tiene una vida media muy corta (3 a 15 segundos) pero también puede tener efectos dañinos en los tejidos del huésped (Zhao *et al.* 2007).

El interferón γ (IFN- γ) es otra citosina que incrementa la síntesis del TNF- α y la acción sinergista de ambas citocinas inician la respuesta inflamatoria crónica. Induce la producción de óxido nítrico, además los datos sugieren que el IFN- γ también es capaz de activar el factor de transcripción nuclear kappa (NF- κ B) (Mühl *et al.* 2003). La regulación de esta intrincada red de citocinas está controlada por otras interleucinas que interfieren principalmente en la síntesis; entre ellas están IL-10, TNF- β , IL-4 y IL-13 (Kulinsky 2007).

Por otro lado cuando los tejidos se lesionan, los lípidos de la membrana celular se remodelan para generar mediadores lipídicos inflamatorios, esta acción es iniciada por la fosfolipasa A₂ que actúa sobre los fosfolípidos de la pared celular liberando ácidos grasos. El más importante de ellos es el ácido araquidónico (AA) y su hidrólisis por esta enzima es la etapa inicial de la biosíntesis de eicosanoides y del factor activador de plaquetas (PAF). Los eicosanoides son sintetizados por dos rutas metabólicas importantes en la inflamación (Triggiani *et al.* 2006, Figura 2).

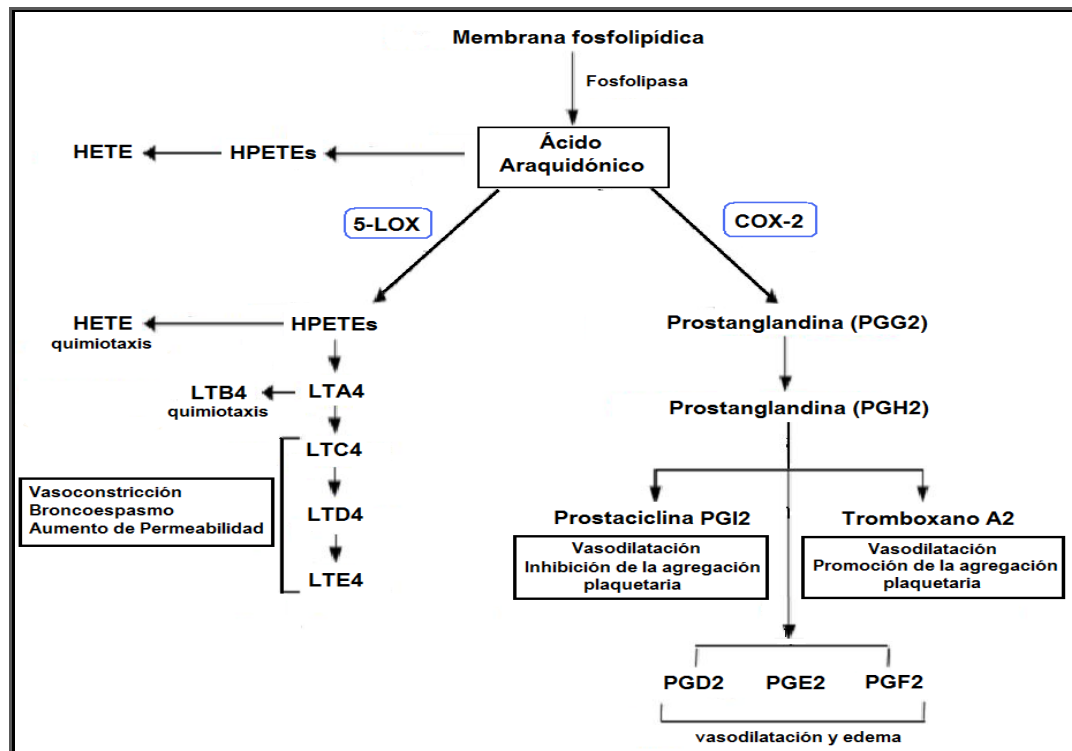


Figura 3. Metabolismo del ácido araquidónico y sus efectos en el proceso inflamatorio (Ortiz-Pereda *et al.* 2007).

La primera ruta bajo la acción de la 5-lipoxigenasa (5-LOX), donde el AA se convierte en ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE), que a su vez se transforman en leucotrienos (LT), estos metabolitos actúan de forma inmediata, tienen una vida media de alrededor de 4 horas y se degradan más rápidamente que las prostaglandinas, reciben denominaciones como: A₄, B₄, C₄, D₄ y E₄.

Los LTC₄, D₄ y E₄ favorecen la vasoconstricción y la contracción lenta del músculo liso. El LTB₄ es un potente estimulador de las respuestas de leucocitos como son la quimiotaxis, la adhesión celular y la producción de anión superóxido (Greene *et al.* 2011).

La segunda ruta se lleva a cabo cuando la enzima cicloxigenasa-2 (COX-2) conduce a la formación de las prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) y prostaciclina (PGI), la COX-2 una enzima bifuncional que produce primeramente a la prostaglandina PGG₂ por oxidación del AA y en una reacción de peroxidación esta transforma la PGG₂ a PGH₂. A partir de la PGH₂ y debido a la actividad de las isomerasas presentes en cada uno de los diversos tejidos y células, se forman las distintas prostaglandinas (PGE₂, PGD₂, PGF₂α), la prostaciclina (PGI₂) y el tromboxano A₂ (TXA₂) (Cerella *et al.* 2010).

Cuando la COX-2 es estimulada, su expresión suele ser elevada y transitoria pero estrechamente regulada; sin embargo, si la expresión supera el control fisiológico normal puede resultar en enfermedades autoinmunes, (artritis reumatoide, lupus eritematoso, etc.) y estar asociada a cáncer, la progresión tumoral y la metástasis, se ha observado que en pacientes con tumores cancerígenos existe un aumento en la expresión de la COX-2 y que conlleva a una disminución de sus tasas de supervivencia (Greene *et al.* 2011). La sobreexpresión de esta enzima es el resultado de varios mediadores de inflamación como interleucinas (IL-1, IL-6 y TNF-α) (Cerella *et al.* 2010) y puede ser afectada directamente en su actividad por el óxido nítrico (Pinheiro *et al.* 2002).

Las prostaglandinas (PGs) ejercen efectos sobre la presión sanguínea, la estimulación de la contracción del músculo liso, aumentan la permeabilidad y la

dilatación vascular, inducen la quimiotaxis de los neutrófilos e inhiben la proliferación de los linfocitos T. Estos agentes son liberados por distintas células, por ejemplo, los neutrófilos producen PGE₂, que regula la producción del edema y dolor en el área inflamada, los monocitos y macrófagos producen PGE₁ y PGF₂, la primera induce fiebre y dolor, la segunda es responsable de la vaso y broncoconstricción. Las combinaciones específicas de PGs pueden promover diferentes cascadas de señalización intracelular y por consecuencia diversas respuestas (Mbalaviele *et al.* 2010).

A su vez, los tromboxanos (TXs) son mediadores que inducen la agregación plaquetaria y son potentes vasoconstrictores. La prostaciclina (PGI₂) se encuentra en las células endoteliales y se comporta como un antiplaquetario y vasodilatador.

Además de los mediadores químicos que interactúan entre sí, existen otros factores en la inflamación muy importantes que son los componentes celulares con funciones específicas durante este proceso: fagocitos (eosinófilos, neutrófilos y macrófagos); células auxiliares (células cebadas, plaquetas, basófilos, fibroblastos) y linfocitos (linfocitos B y T).

2.3.2. Componentes celulares

Una vez iniciada la inflamación, los primeros leucocitos atraídos hacia el sitio lesionado son los neutrófilos, seguidos por monocitos, que se pueden diferenciar hacia macrófagos. Estos últimos al ser activados secretan IL-1, IL-6 y TNF- α que incrementan la permeabilidad vascular e inducen la coagulación. También inician una respuesta inmunitaria específica con la activación del IFN- γ que es capaz de estimular otras células del sistema inmune como linfocitos B y células NK (Natural Killer) (Wang *et al.* 2007). Este proceso trae un flujo no solo de linfocitos, también de granulocitos, monocitos y mastocitos al sitio del daño que conduce a la cicatrización de los tejidos y a la eliminación de agentes infecciosos.

Los neutrófilos son componentes centrales del proceso inflamatorio, tienen una variedad de funciones incluyendo la quimiotaxis, la adhesión al endotelio, la fagocitosis y la actividad microbicida, migran al sitio de la lesión y liberan productos, tales como enzimas proteolíticas (elastasa), especies reactivas de oxígeno (ROS) y proteínas como

las defensinas capaces de matar los patógenos invasores; su infiltración en el tejido lesionado ocurre dentro de las primeras 6 horas después del estímulo (Witko-Sarsat 2000). Las funciones de los neutrófilos son iniciadas por activación de receptores de la superficie celular en respuesta a productos bacterianos, eicosanoides como el PAF y el LTB₄ y citocinas como la IL-8. Los neutrófilos contienen gránulos azurófilos y vesículas secretoras que contienen diversas enzimas de degradación. Su función primaria es la fagocitosis de partículas extrañas, agentes patógenos y residuos celulares, que se lleva a cabo a través de tres pasos; 1) reconocimiento y fijación del agente 2) englobamiento y 3) destrucción o degradación (Johansson *et al.* 2002).

En el paso final de la fagocitosis la destrucción de las partículas extrañas se logra a través de la producción de especies reactivas de oxígeno. La mieloperoxidasa (MPO) que se encuentra localizada a nivel lisosomal en los gránulos azurófilos, es la principal enzima responsable de esta acción (Rosso *et al.* 2006). La MPO es un miembro del grupo de las peroxidases que se expresa principalmente en los neutrófilos y en menor medida en monocitos; esta enzima participa en el mecanismo de defensa inmune innata a través de la formación de microbicidas oxidantes (Malle *et al.* 2007). La MPO reacciona con el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) formando un complejo enzima-sustrato que se combina con haluros plasmáticos, generalmente cloruro para formar ácido hipocloroso (HOCl) (Zeraik 2011).

La MPO es la única enzima humana que produce HOCl en condiciones fisiológicas y este complejo H₂O₂-MPO-haluro es el sistema bactericida más eficaz de los neutrófilos. El HOCl generado es un fuerte oxidante que si bien contribuye al mecanismo de defensa (Deby-Dupont *et al.* 1999) también puede actuar sobre las células del huésped reaccionando con aminos o el ion amonio para formar cloraminas, con tioles, nucleótidos, ADN y ácidos grasos insaturados. Las N-cloroaminas formadas son altamente reactivas porque pueden desestabilizar las membranas celulares (Witko-Sarsat 2000). Uno de los blancos más importantes del HOCl *in vivo* es la α1-antiproteinasa, proteína circulante inhibidora de proteasas de mayor relevancia, que protege a los tejidos de la acción de la elastasa.

La activación descontrolada de los neutrófilos por estímulos inflamatorios eleva la liberación de MPO y por consiguiente la producción de compuestos oxidantes como HOCl, se ha demostrado que estos elementos están implicados en una amplia variedad de enfermedades inflamatorias (Bachoual *et al.* 2011). Como ejemplo, se encuentra la participación de la MPO en el desarrollo de la aterosclerosis donde esta reportada como responsable de la modificación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) produciendo derivados oxidados que se acumulan en la pared vascular, además la MPO consume el óxido nítrico reduciendo su biodisponibilidad y disminuyendo sus propiedades vasodilatadores, contribuyendo a la disfunción del tejido endotelial vascular (Kohnen *et al.* 2007). También existe evidencia de la inducción en la lesión pulmonar pues se ha encontrado que en el recubrimiento epitelial alveolar de los pacientes con fibrosis quística contiene niveles elevados de células inflamatorias y de MPO que libera espontáneamente una mayor cantidad de H₂O₂ contribuyendo al daño de los alveolos (Klebanoff 2005).

2.4 Especies Reactivas de Oxígeno

Los radicales libres pueden ser definidos como moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones no apareados en sus orbitales atómicos externos, se pueden formar por medio de dos mecanismos:

- a) Ruptura homolítica de un enlace covalente en el que cada fragmento de la molécula retiene un electrón del enlace.



- b) Por transferencia de electrones donde una molécula gana un electrón.



Los radicales libres son especies muy reactivas que afectan a las moléculas adyacentes con el fin de alcanzar su estabilidad química. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, una molécula estable puede cederlo y

convertirse a su vez en un radical libre, iniciándose así una reacción en cadena (Quintanar *et al.* 2009)

Dentro de este concepto genérico existe un término que incluye a otras especies parcialmente reducidas de oxígeno, que se forman como productos del metabolismo de los radicales libres en el organismo y se denominan Especies Reactivas de Oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) (Pala *et al.* 2008). Aunque no todas se consideran como radicales son catalogadas como moléculas oxidantes (Gutiérrez 2006). En concentraciones fisiológicas las ROS son beneficiosas, pues son utilizados por el sistema inmunológico para defenderse de agentes externos. En concentraciones mayores y debido a su alta reactividad pueden ser muy perjudiciales para células y tejidos causando daños a la membrana celular o a moléculas biológicas (ácido desoxirribonucleico (DNA), lípidos, proteínas) (Kulinsky 2007).

2.4.1. Generación de Especies Reactivas.

En el organismo su generación puede ocurrir por fuentes endógenas durante el curso normal del metabolismo en la mitocondria, los peroxisomas, en el citoplasma y por la activación de células inflamatorias; o por vía exógena por contaminantes ambientales, radiación UV, agentes terapéuticos, humo de tabaco entre otros (Klaunig *et al.* 2011).

Los ROS se generan durante el complejo proceso llamado “estallido oxidativo” (aumento súbito del consumo de oxígeno de las células fagocitarias), durante el cual el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) se forma inmediatamente después de la reducción del oxígeno molecular a través del sistema nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH). El $O_2^{\bullet-}$ se transforma rápidamente por la actividad enzimática (superóxido dismutasa, catalasa, mieloperoxidasa) en otros ROS, que incluyen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo (HO^{\bullet}), radical peroxilo (RO_2^{\bullet}), radical alcoxilo (RO^{\bullet}) y el ácido hipocloroso (HOCl) (Apel *et al.* 2004).

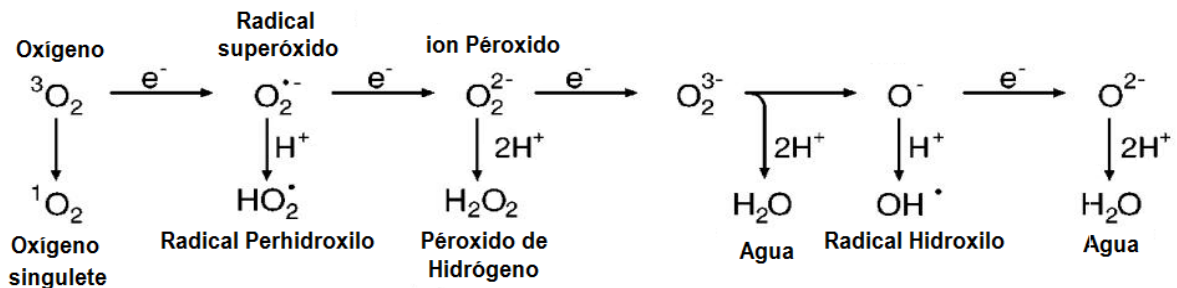


Figura 4. Radicales Libres en Sistemas Biológicos (Tomado de Apel et al. 2004).

Dentro de las especies radicalarias de mayor interés, desde el punto de vista biológico se encuentran:

- Radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) se forma como producto de muchas reacciones catalizadas enzimáticamente por ejemplo, en reacciones de las deshidrogenasas, de oxidasas e hidroxilasas como la xantina oxidasa o galactosa oxidasa o también en la cadena respiratoria mitocondrial; considerado un ROS “primario” y puede interactuar de nuevo con otras moléculas para generar otras especies oxidantes; está involucrado en la patogénesis del daño isquémico celular. La reactividad del $\text{O}_2^{\bullet-}$ es débil, pero puede penetrar las membranas biológicas y causar daños a blancos específicos, está involucrado en la patogénesis del daño isquémico celular.
- Radical hidroxilo (HO^{\bullet}) es una de las especies químicas más reactivas, inicia reacciones en cadena por abstracción de un átomo de hidrogeno. También puede añadirse a anillos aromáticos y olefinas o se puede dimerizar para formar H_2O_2 . Los sitios diana de este radical en sistemas biológicos son los ácidos nucleicos, las proteínas y los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, siendo estos últimos y las lipoproteínas particularmente susceptibles al ataque de este radical.
- Radicales peróxido y alcoxilo (RO_2^{\bullet} , RO^{\bullet}) se forman típicamente como intermediarios durante la peroxidación lipídica. La formación de RO_2^{\bullet} es el paso más importante de las reacciones de propagación en cadena este proceso puede desencadenar una reacción inflamatoria y quimiotaxis al

estimular a la fosfolipasa A₂ e inducir la liberación del ácido araquidónico con la subsiguiente formación de eicosanoides.

- Peróxido de Hidrogeno (H₂O₂) se forma *in vivo* por dismutación del O₂^{•-} espontánea o enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) o de la glucosa oxidasa; es metabolizado por la catalasa o bien por las peroxidases. Atraviesa con facilidad las membranas celulares, a bajas concentraciones es poco reactivo pero tóxico para la mayoría de las células a una concentración de 10 a 100 μM. El H₂O₂ está implicado en la regulación de la transducción de la señal de expresión de genes a través del NF-κB, factor de transcripción capaz de inducir la transcripción de IL-2 y del TNF-α. Es un oxidante débil que puede oxidar grupos tiol (-SH) en proteínas o grupos acilo poliinsaturados en lípidos (Wang *et al.* 2011).

Las especies reactivas inducen daño en la célula debido a que pueden reaccionar con las biomoléculas e inactivar o alterar su función. Sobre los lípidos el efecto tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos insaturados provocando su peroxidación, afectando la permeabilidad de la membrana, pérdida de la flexibilidad y de las funciones secretoras, así como la ruptura de los gradientes iónicos transmembrana (Pala *et al.* 2008). En las proteínas puede dar lugar a un cambio conformacional y derivarse en una pérdida o modificación de su función, pueden reaccionar directamente con el ligando metálico de muchas metaloproteínas. Los aminoácidos que tienen dobles enlaces o que tienen azufre en su estructura como la tirosina, cisteína o la metionina son especialmente susceptibles a estas especies por ejemplo, en el caso de los residuos de cisteína estos pueden favorecer la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares. (Pala *et al.* 2007). En la molécula de ADN las especies reactivas pueden atacar a las bases púricas y pirimidínicas así como a la desoxirribosa. Si el daño ocasionado del ADN no es reparado antes de o durante la replicación, puede resultar en muerte celular, mutación o la inducción de la transcripción y de las vías de señalización, errores de replicación y la inestabilidad genómica que se han asociado con el proceso de carcinogénesis (Klaunig *et al.* 2011). Estudios demuestran que a pesar de que las cuatro bases pueden ser modificadas por ROS, las

mutaciones suelen estar relacionados con los efectos de estos sobre la guanina y la citosina (Waris *et al.* 2006).

2.4.2. Estrés oxidativo

El cuerpo humano mantiene un balance constante de la influencia de los radicales libres y especies reactivas generados como resultado del metabolismo celular, los sistemas de defensa y el medio ambiente. La pérdida en este balance ya sea por un déficit de los sistemas de defensa antioxidantes o por un incremento exagerado de la cantidad de ROS lleva al organismo a un estado de estrés oxidativo (Venereo 2002). El estrés oxidativo tiene como consecuencia alteraciones en la estructura y función de cualquier órgano o sistema y puede entre otras cosas derivar en respuestas inflamatorias que contribuyen o retroalimentan el desarrollo de patologías como: obesidad, diabetes, síndrome metabólico, asma, cardiomiopatías, insuficiencia cardíaca, EPOC, fibrosis pulmonar, artritis, enfermedades intestinales, hepatopatías crónicas, psoriasis, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Quintanar *et al.* 2009).

Los mecanismos homeostáticos antioxidantes con los que el organismo enfrenta el daño oxidativo son específicos y se pueden clasificar de diferentes grupos:

- Macromoléculas que acomplejan especies reactivas y evitan su acción; por ejemplo, proteínas que transportan metales de transición, como la hemoglobina y la mioglobina.
- Enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT) (tabla 2).
- Antioxidantes endógenos, ejemplos, el glutatión, el NADPH, la albúmina, el ácido úrico, la coenzima Q, la bilirrubina y la melatonina.
- Antioxidantes exógenos que provienen de la dieta, tales como la vitamina E y A, que actúan previniendo la peroxidación lipídica principalmente; la vitamina C, los polifenoles, los flavonoides, las catequinas y los taninos (Quintanar *et al.* 2009).

Tabla 2. Enzimas Antioxidantes

Enzima	Reacción	Características
Superóxido dismutasa (SOD)	$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$	Existen tres isoformas con cofactores y localizaciones distintas: SOD₁ (Cu, Zn) en citoplasma y núcleo. SOD₂ (Mn) en mitocondrias. SOD₃ extracelular (Kwon <i>et al.</i> 2012).
Catalasa (CAT)	$H_2O_2 \longrightarrow H_2O + O_2$	Amplia distribución en el organismo humano, a nivel celular en las mitocondrias, peroxisomas y citosol, presenta dos funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa, forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 (Céspedes <i>et al.</i> 1996).
Glutatión peroxidasa (GPx)	Reducción de hidroperóxidos (H_2O_2 o lipoperóxido (LOOH))	Utiliza en ambos casos el glutatión reducido (GSH) como donante de electrones, es una enzima selenio dependiente. Algunas citoquinas como el TNF- α , el IFN- γ y la IL-1 son capaces de inhibir su actividad (Cisneros <i>et al.</i> 1997).

Estrés oxidativo e inflamación

La presencia de especies reactivas contribuyen en diferentes pasos del proceso inflamatorio, a pesar de que se creía que su papel en la inflamación era solo como agentes citotóxicos, durante las dos últimas décadas se ha puesto de manifiesto su importante rol como señaladores químicos intra y extracelulares del proceso inflamatorio. Se ha descubierto que un continuo estado de estrés oxidativo puede conducir a un proceso de inflamación crónica presente en enfermedades como cáncer y otras (Reuter *et al.* 2011).

Durante la inflamación, mastocitos y leucocitos son reclutados en el sitio del daño, provocando un "estallido respiratorio" debido a un aumento de la captación de oxígeno y por lo tanto, un aumento de la liberación y acumulación de ROS en el sitio del daño. Por otro lado, estas células también producen mediadores, como los metabolitos del ácido araquidónico, citocinas (TNF- α y la IL-1b) y quimiocinas, que reclutan células

inflamatorias adicionales para el sitio de la lesión y la producción de más especies reactivas (Reuter *et al.* 2010).

Aparte del daño celular que de por sí ocasionan, las ROS directa o indirectamente producen a su vez mediadores proinflamatorios generando un “círculo vicioso” donde se mantiene este estado de estrés oxidativo. Este fenómeno está implicado en diversas patologías, por ejemplo, en enfermedades pulmonares se ha demostrado que las células alveolares liberan citocinas y quimiocinas como IL-1b, IL-6, IL-8 y TNF- α en respuesta al estrés oxidativo. Además estos ROS presentes pueden iniciar respuestas inflamatorias a través de la activación de factores de transcripción como la proteína-1 (AP1) y el factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Figura 5); estas moléculas actúan regulando y estimulando la transcripción de genes proinflamatorios favoreciendo de esta forma la génesis de citocinas que contribuyen a perpetuar el proceso inflamatorio. El estrés oxidativo provoca la inactivación de I κ B y translocación de NF- κ B en el núcleo donde se regula la transcripción de IL-6 e IL-1 β , que participan de la producción de ROS. NF- κ B promueve la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), produciendo óxido nítrico, que actúa como molécula de señalización en la inflamación. (Lee *et al.* 2012)

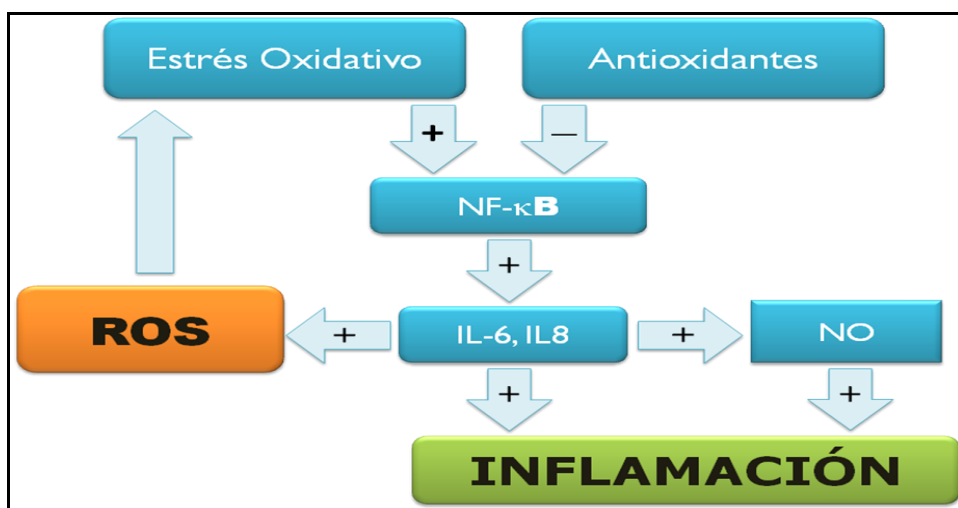


Figura 5. Relación Inflamación-Estrés Oxidativo. El estrés oxidativo induce la expresión de factor nuclear kappa (NF- κ B), que modula la transcripción de mediadores proinflamatorios (Interleucinas y Oxido Nítrico) generando una respuesta inflamatoria que se vuelve continua por una constante estimulación (Modificado de Galli 2012).

2.5 Modelos experimentales para evaluar la actividad antiinflamatoria

El empleo de modelos experimentales en animales es importante en la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios pues los resultados obtenidos pueden en parte extrapolarse al posible comportamiento de estos agentes en los seres humanos. Existen muchos tipos de protocolos en función de la forma de aplicación, agente irritante utilizado o duración del proceso inducido. En la actualidad uno de los modelos más utilizados para procesos de inflamación aguda es el de la formación del edema auricular en ratón por acción del agente inflamatorio 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Young *et al.* 1989).

2.5.1 Edema auricular inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato.

El 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) es uno de los constituyentes activos que se encuentra en el aceite de *Croton tiglium* L. Su aplicación tópica induce inflamación en la piel y una respuesta hiperproliferativa en los animales. Tiene las ventajas de ser un modelo que requiere pequeñas cantidades de sustancias, proporciona resultados reproducibles y rápidos (Gábor 2003). La administración tópica de TPA provoca un edema agudo con infiltración leucocitaria, actúa por la activación de la proteína quinasa C (PKC) que desempeña un papel importante en la transducción de señales de una gran variedad de sustancias, activando funciones celulares y de proliferación como la fosfolipasa A₂ (PLA₂) y el incremento de radicales libres (Patel *et al.* 2012).

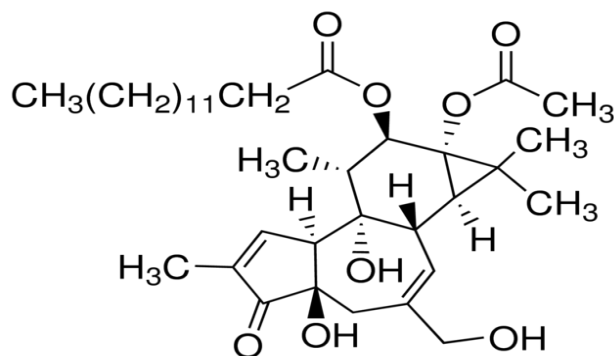


Figura 6. Estructura de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)

La enzima PKC es activada por diacilglicerol (DAG), un mediador liberado a partir de inositol-fosfolípido de la membrana. El TPA y otros ésteres del forbol cuando se intercalan en la membrana pueden actuar como sustitutos del DAG, activando la PKC de forma más permanente que el mediador endógeno. Esta cascada de acontecimientos estimula la permeabilidad vascular, vasodilatación, la migración de leucocitos polimorfonucleares, la liberación de histamina y serotonina y la síntesis de eicosanoides inflamatorios (Patel *et al.* 2012).

Tras la aplicación tópica de este compuesto en la oreja del ratón se induce en las primeras dos horas eritema, vasodilatación, edema y agregación plaquetaria; en un periodo de tres a cuatro horas aumenta el grosor por la extravasación de líquido. Entre las cuatro y seis horas aumenta la agregación plaquetaria y la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales y migración hacia el tejido y desgranulación de mastocitos a partir de las seis horas, también en este periodo el edema llega a su punto máximo. La acumulación de leucocitos en la dermis se manifiesta entre las seis y veinticuatro horas después de la aplicación del TPA, es a partir de este tiempo que se incrementa el proceso de la división celular en la epidermis y el eritema persiste hasta las 48 horas (Young *et al.* 1989).

El mecanismo de acción se ha asociado con la liberación de eicosanoides, en la respuesta inflamatoria aguda el TPA estimula a la PLA₂ liberando ácido araquidónico (AA) y síntesis de prostaglandinas y de leucotrienos siendo PGE₂ el mediador relevante. La inflamación provocada también está asociada a una marcada afluencia celular principalmente de neutrófilos, el edema puede ser regulado por la generación de H₂O₂ lo que aumenta gradualmente los niveles de MPO persistiendo hasta las 24 horas (Rao *et al.* 1993).

2.5.2 Ensayo de la Enzima Mieloperoxidasa.

A medida que el edema inducido por el TPA se desarrolla, los leucocitos (neutrófilos y monocitos) se acumulan en la microcirculación de la oreja y migran hacia el tejido irritado. La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima localizada en los gránulos azurófilos de los leucocitos principalmente neutrófilos, cuya función es generar ácido

hipocloroso un agente oxidante que contribuye al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos. La valoración de esta enzima se emplea como un marcador del contenido de neutrófilos y permite obtener una estimación semicuantitativa de la infiltración celular en una respuesta inflamatoria (Suzuki *et al.* 1983). La valoración de la infiltración celular se realiza comparando la presencia de MPO en la oreja del grupo problema y de una sustancia inhibitoria respecto al grupo control. Se han reportado que diferentes drogas como la benzocaína, indometacina y salicilatos inhiben a la MPO (Bralley *et al.* 2008).

2.6 Métodos empleados para Determinar la Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante es ampliamente utilizada como parámetro para caracterizar diferentes materiales vegetales. Esta actividad se relaciona con la capacidad de las moléculas para comportarse como estabilizadores de radicales libres, protegiendo a los sistemas biológicos del efecto potencialmente dañino de procesos oxidativos. Existen diversos métodos *in vitro* para la evaluación de la capacidad antioxidante de muestras naturales o sintéticas. Algunos de ellos utilizan la producción de un radical orgánico o especies reactivas del oxígeno y otros se basan en la oxidación-reducción de iones metálicos. Se sugieren que el protocolo de ensayo debe probar diversas condiciones de oxidación y ser comparado con antioxidantes conocidos en las mismas concentraciones molares de los componentes activos (Huang *et al.* 2005).

2.6.1 Reacción con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Esta técnica consiste en la medición a 517 nm de la reducción del radical estable DPPH. La absorbancia característica de este radical que posee un color violeta intenso, disminuye en presencia de un antioxidante u otro radical al captar un electrón que lo estabiliza. La solución entonces cambia de violeta a un color amarillo. Por tanto, es posible cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que poseen determinados compuestos mediante la determinación del grado de decoloración que provocan a una disolución metanólica de DPPH (Brand-Williams *et al.* 1995).

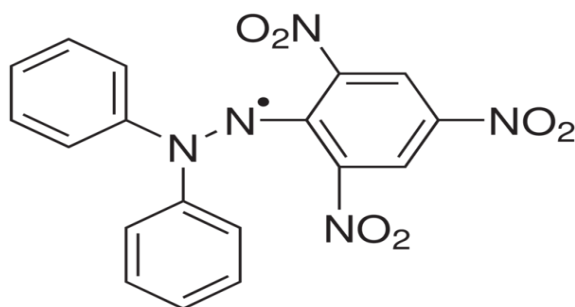


Figura 7. Estructura del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (Tomado de Huang et al. 2005).

2.6.2 Capacidad Antioxidante mediante el Poder Reductor de Hierro FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

Este método evalúa la actividad antioxidante de una muestra biológica de acuerdo a su capacidad para reducir un determinado compuesto o mezcla de compuestos sobre el Fe^{3+} presente en el compuesto orgánico tripiridil-triazina (TPTZ). Cuando el hierro del complejo es reducido a Fe^{+2} toma un color azul que presenta un máximo de absorción a 593 nm y cuya intensidad de color es proporcional a la capacidad reductora del compuesto o compuestos ensayados, se cree que este poder reductor está correlacionado con el grado de hidroxilación y conjugación en polifenoles (Benzie et al. 1996).

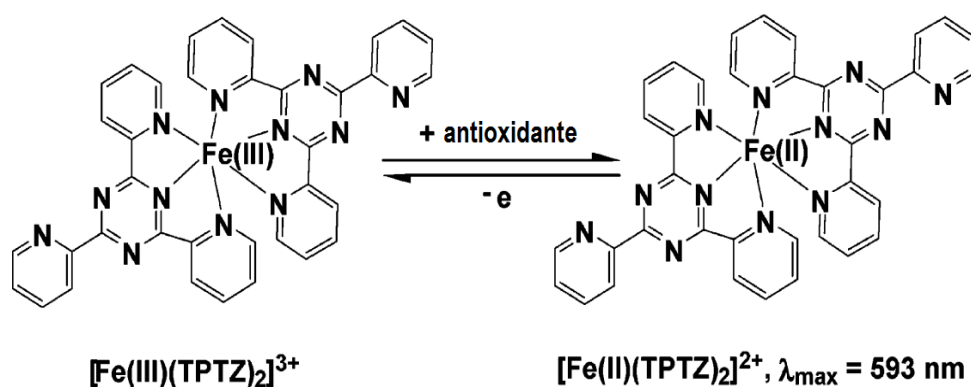


Figura 8. Mecanismo del ensayo FRAP (Tomado de Huang et al. 2005).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El uso de plantas medicinales para aliviar y/o curar problemas la salud es una práctica muy común en muchos países. En México, de acuerdo con cifras de la Secretaría de Salud, al menos el 80% de la población usa algún remedio natural; de este porcentaje, la mitad usa las plantas de manera exclusiva para atender sus problemas de salud y el otro 50%, además de las plantas medicinales, hace uso también de la medicina alópata (Taddei *et al.* 2008).

Desde el punto de vista taxonómico, México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas con 4500 plantas, sólo después de China. A pesar de la riqueza y variedad de la flora medicinal, el porcentaje de especies que poseen estudios fitoquímicos y farmacológicos es muy escaso (Mata 1993).

El interés por la identificación de nuevos metabolitos biológicamente activos provenientes de las plantas se ha incrementado notablemente. El objetivo principal de estas búsquedas de nuevas alternativas de tratamiento, está basada en identificar compuestos que presenten una actividad farmacológica igual o mayor a la de los fármacos empleados en la clínica actualmente pero con menores efectos adversos. En este sentido las plantas medicinales han jugado un papel fundamental ya que de ellas se han aislado moléculas que han servido de base para la síntesis de nuevos fármacos.

En la actualidad, numerosas investigaciones están encaminadas por una parte, a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas de las fuentes naturales; mientras que otras están destinadas a verificar las propiedades que se les atribuyen; y muchos de estos trabajos han permitido validar la eficacia médica de las especies vegetales que son empleadas en la medicina tradicional.

Dentro de este ámbito la *Ternstroemia sylvatica* es una especie utilizada en la zona centro del Estado de Veracruz para tratar padecimientos relacionados con procesos inflamatorios, como golpes, torceduras o diarreas. Considerando su uso dado por la población y careciendo de evidencias que sustenten científicamente su efecto

farmacológico, es de interés para este proyecto, realizar estudios científicos que proporcionen de manera general su composición química; mediante un fraccionamiento de extractos obtenidos de esta planta y su actividad antiinflamatoria en modelos biológicos además de la realización del potencial antioxidante por medio de técnicas analíticas.

4. HIPOTESIS

Los extractos orgánicos obtenidos de *Ternstroemia sylvatica*, presentan la capacidad de inhibir procesos inflamatorios en modelos experimentales *in vivo*; así como una capacidad antioxidante significativa.

5. OBJETIVOS

◆ OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antiinflamatoria y antioxidante de *Ternstroemia sylvatica* mediante un fraccionamiento biodirigido.

◆ OBJETIVOS PARTICULARES

- Colectar el material vegetal y obtener los extractos orgánicos (hexano, cloroformo, etanol).
- Determinar la actividad antiinflamatoria de los extractos en el modelo biológico murino de edema inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA).
- Determinar el potencial antioxidante de los extractos mediante las técnicas de *1,1-difenil-2-picrilhidrazil* (DPPH) y ensayo de FRAP (*ferric reducing antioxidant power*).
- Realizar el fraccionamiento biodirigido del o los extractos con mayor actividad antiinflamatoria y antioxidante.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas.
- Determinar el potencial antioxidante de las fracciones mediante DPPH y ensayo de FRAP.
- Evaluar la actividad de la enzima antioxidante mieloperoxidasa (MPO) en el modelo biológico murino de inflamación auricular inducida por TPA.

6. METODOLOGÍA.

Consideraciones generales.

Los disolventes empleados en la obtención de los extractos fueron grado reactivo. Para el fraccionamiento realizado en columna los disolventes utilizados fueron QP y se sometieron a destilación fraccionada antes de usarse.

El monitoreo del fraccionamiento y las pruebas del tamiz fitoquímico se llevó a cabo a través de cromatografía en capa fina sobre cromatofolios *Sigma-Aldrich DC F₂₅₄* de gel sílice sobre aluminio, utilizando soluciones reveladoras y luz ultravioleta.

Los espectros de resonancia magnética nuclear ¹H fueron determinados en un espectrómetro Varian modelo *Mercury Plus* a 300 MegaHertz (MHz), respectivamente. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) a campo bajo respecto a la referencia interna de tetrametilsilano (TMS). El análisis por espectrometría de masas se llevo a cabo mediante un equipo Agilent Technologies modelo 5975 inert XL operando en el modo de impacto electrónico a 70 eV.

Las lecturas espectrofotométricas de la evaluación enzimática se realizaron en un lector de microplacas BIORAD iMark y centrifuga Hermle modelo Z326K. Para la determinación del potencial antioxidante se empleó un espectrofotómetro UV-VIS Varian modelo Cary-100.

Para los modelos biológicos se utilizaron ratones macho de la cepa CD-1 de 3 meses de edad y peso entre 20-30 g. Condiciones de alojamiento: temperatura $25 \pm 3^\circ\text{C}$, los fotoperiodos fueron ajustados 12/12 horas de luz/oscuridad; alimentación artificial y agua *ad libitum*. Todos los animales utilizados en estos estudios fueron manejados tomando en cuenta los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

6.1 Material vegetal y preparación del extracto

La colecta de la planta *Ternstroemia sylvatica* (partes aéreas en floración) se realizó en la localidad de Landero y Coss, municipio del mismo nombre, en el Estado de Veracruz con ubicación 19°44'18.89"N 96°51'05.58"O a 2032 m.s.n.m. Un ejemplar fue depositado para su identificación en el herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Veracruzana (CIB-UV No. de herbario CIB8905). Una vez obtenido el material vegetal se sometió a un proceso de secado a temperatura ambiente por siete días resguardado de la luz directa del sol. El material vegetal seco (2.043 Kg) se molió y se procedió a la extracción por maceración sucesiva y exhaustivamente (1 Kg X 5 L X 3 veces) con disolventes orgánicos de polaridades crecientes (hexano, cloroformo y etanol). El disolvente de cada extracto se eliminó con la ayuda de un rotavapor a presión reducida.

6.2 Tamiz fitoquímico

El análisis de los extractos y las fracciones fueron realizados tomando como base métodos cualitativos (pruebas colorimétricas y cromatografía en capa fina) de acuerdo a la metodología propuesta por Domínguez (1973). Se utilizaron cromatofolios de sílica soportados en aluminio de 2.5 x 7 cm y agentes cromogénicos (tabla 3) para identificar la presencia de familias de metabolitos. Las soluciones y técnicas utilizadas para la realización del tamiz fitoquímico se encuentran en el Anexo 1.

Tabla 3. Pruebas para la identificación de familias de metabolitos presentes en los extractos.

Metabolitos	Prueba	Coloración
Terpenos	Cloruro de cobalto	Rojo-Rosa
	Sol. Vainillina	Morado-lila
Esteroles	Anhídrido acético y H ₂ SO ₄	Verde
	Cloruro de cobalto	Morado
Alcaloides	Reactivo de Dragendorff	Café o Naranja
Flavonoides	Cloruro férrico	Verde o azul
	Cloruro de aluminio	Fluorescencia Amarilla
Cumarinas	Hidróxido de potasio	Fluorescencia amarilla o azul
Quinonas	Hidróxido de amonio	Roja
Lignanos	Cloruro férrico	Rojiza

6.3 Determinación del extracto activo de *Ternstroemia sylvatica*

6.3.1 Modelo de edema inducido auricular en dosis única por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA).

Este modelo se empleó como prueba monitora para determinar los extractos con mayor actividad antiinflamatoria. El edema auricular (Young *et al.* 1989, Hauge *et al.* 2012) se realizó con los extractos hexánico, clorofórmico y etanólico; la aplicación de TPA y del fármaco de referencia (indometacina) fue por vía tópica. En el grupo control, se aplicó en la oreja izquierda 2.5 µg de TPA disueltos en 25 µL de acetona (vehículo) y en la oreja derecha únicamente el vehículo (acetona). La aplicación de la indometacina y de los extractos hexánico y clorofórmico se realizó a dosis de 2 mg/oreja disuelto en 50 µL de acetona y el extracto etanólico se aplicó a la misma dosis disuelto en 50 µL de etanol 30 min después de la aplicación del TPA. Seis horas después de la aplicación del TPA, se sacrificaron a los animales por dislocación cervical y se determinó el peso del tejido auricular realizando perforaciones en ambas orejas con cortes de 6 mm de diámetro. El porcentaje de inhibición se calculó con la diferencia del peso entre ambas orejas tratadas con respecto al grupo control. La inflamación fue comprobada como el incremento en el peso de la oreja en donde se aplicó el TPA.

$$\% \text{ inh del edema} = \frac{W_m \times 100}{W_c} - 100$$

donde:

W_m = diferencia del peso entre la oreja tratada con indometacina o bien con el extracto y el peso de la oreja tratada con la solución de TPA

W_c = diferencia del peso entre la oreja con la solución de TPA y la oreja con el vehículo.

6.4 Fraccionamiento cromatográfico de los extractos clorofórmico y etanólico.

Los extractos que mostraron una mejor actividad antiinflamatoria en la prueba monitora descrita en 6.3.1 se fraccionaron por cromatografía en columna abierta utilizando gel de sílice (Sigma-Aldrich Silica-Gel 60Å 63-200 µm) como fase estacionaria y disolventes orgánicos de polaridad creciente: hexano, acetato de etilo y metanol. La proporción para ambos extractos fue de 1 g x 50 g de gel de sílice en columna de vidrio de 4.5 cm de diámetro por 80 cm de longitud. Las fracciones colectadas se agruparon de acuerdo con el perfil cromatográfico. Una vez realizado lo anterior, fueron evaporadas, se guardaron en frascos ámbar, se etiquetaron y se determinó el rendimiento en peso. Los gradientes utilizados para los extractos crudos se detallan en las tablas 4 y 5 mostrando volúmenes empleados y proporciones.

Tabla.4 Fase Móvil utilizada para el fraccionamiento del Extracto Clorofórmico (EC)

No.	Disolventes	Proporciones	Volumen (L)
1	Hex-AcOEt	95:5	1
2	Hex-AcOEt	9:1	1
3	Hex-AcOEt	7:3	1.5
4	Hex-AcOEt	1:1	1.5
5	AcOEt		1
6	AcOEt-MeOH	1:1	0.5
7	MeOH		0.5

Abreviaturas: Hexano (Hex) Acetato de Etilo (AcoEt) Metanol (MeOH)

Tabla.5 Fase Móvil utilizada para el fraccionamiento del Extracto Etanólico (EE).

No.	Disolventes	Proporciones	Volumen (L)
1	Hex- AcOEt	9:1	1.5
2	Hex- AcOEt	7:3	2
3	Hex- AcOEt	1:1	2
4	AcOEt		2.5
5	AcOEt -MeOH	9:1	1
6	AcOEt -MeOH	1:1	1
7	MeOH		1
8	MeOH-H ₂ O	1:1	2

Abreviaturas: Hexano (Hex) Acetato de Etilo (AcOEt) Metanol (MeOH) Agua (H₂O)

6.5 Determinación del potencial antioxidante

6.5.1 Captura de Radicales Libres con el uso de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

La capacidad de captura del radical libre (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) de cada extracto se determinó de acuerdo al método de Brand-Williams modificado por Domínguez-Ortiz (Brand-Williams et al., 1995; Domínguez-Ortiz et al., 2009). La solución de radicales del DPPH en metanol (9×10^{-5} M) fue preparada justo antes de usarse, se tomaron 2.9 ml de esta solución y se mezclaron con 100 μ L de las soluciones metanólicas de los extractos y de las fracciones obtenidas en concentración de 1 mg/ml. Las muestras fueron incubadas por 30 min a 37°C en un baño de agua protegidos de la luz, se midió la absorbancia a 517 nm (AM) en un espectrofotómetro de UV-VIS. Un blanco se preparó con 100 μ L de metanol en 2.9 ml de la solución de DPPH, su absorbancia (AC) se midió en cada ensayo. El experimento se llevó a cabo por triplicado y en el caso de los extractos crudos en tres concentraciones diferentes (33, 16.5 y 8.125 μ g/ml). Como control positivo se usó una solución de ácido ascórbico en concentración de 5 mM. La actividad de captura de radicales libres se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{AC - AM}{AC} \times 100$$

donde:

AM = Promedio de las absorbancias de las soluciones de la muestra

AC = Absorbancia de la solución control.

6.5.2 Método del Poder Reductor de Hierro FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

Este método determina la capacidad de la muestra para reducir un complejo férrico con la molécula tripiridil-s-triazina (TPTZ); cada muestra se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Benzie-Strain con modificación hecha por Domínguez-Ortiz, (Benzie et al. 1996; Domínguez et al. 2009). Esta actividad se determinó por triplicado mezclando 150 μ l de las fracciones y extractos (solución en concentración de 1 mg/ml), 150 μ l de agua destilada y 2.7 ml de solución FRAP. La solución FRAP se preparó

mezclando 100 ml de tampón de acetato (300 mM, pH 3,6), 10 ml de solución 10 mM de TPTZ disuelto en una solución 40 mM de ácido clorhídrico y 10 ml de solución de cloruro férrico 20 mM. Las soluciones se incubaron a 37°C durante cuatro minutos. La absorbancia de la muestra se leyó inmediatamente a 593 nm contra blanco de reactivo. La capacidad de reducción férrica se calculó en base a una curva de calibración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 a 750 mmol/L R= 0.9989). Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol Fe}^{2+}\text{L}^{-1}$.

6.5.3 Determinación del Contenido Total de Polifenoles.

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas que se caracterizan por tener un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo y grupos carboxilo, capaces de unirse al hierro y cobre particularmente, inhiben también la peroxidación lipídica al atrapar el radical alcoxilo. Esta actividad depende de la estructura de las moléculas y del número y la posición del grupo hidroxilo (Michalak 2006). Para corroborar si parte de la actividad antioxidante mostrada por *Ternstroemia sylvatica* tiene que ver con el contenido de estos compuestos se utilizó este ensayo.

El contenido de fenoles totales se estimó utilizando el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo con Cai y Luo (2004) con modificaciones. Todas las muestras se realizaron por triplicado. A 50 μL de cada muestra, se le adicionaron 2.5 ml de una solución diluida a proporción de 1:10 del reactivo de Folin-Ciocalteu y 2 ml de solución de Na_2CO_3 (7.5 % w/v), las muestras se incubaron a 45°C durante 15 min. La absorbancia se midió a 765 nm usando un espectrofotómetro de UV-VIS. La cuantificación se realizó con base en una curva estándar de ácido gálico (10-1000 $\mu\text{g/ml}$ R= 0.9965). Los resultados se expresan como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco de la muestra (mgGAE/g dw).

6.6 Determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa en el modelo agudo de edema auricular inducido por TPA

Esta prueba se realizó a los extractos (clorofórmico y etanólico) que mostraron mayor actividad en la prueba monitora y a sus fracciones correspondientes. Se sigue la técnica descrita en el inciso 6.3.1 con modificaciones. En este modelo el edema se

indujo administrando en todos los grupos 2.5 µg de TPA disueltos en acetona en ambas orejas. Treinta minutos después se aplicó el fármaco de referencia (indometacina en dosis de 2 mg/oreja), los extractos crudos (dosis de 1 y 2 mg/oreja) y las fracciones (dosis de 1 mg/oreja). El grosor de cada oreja se midió usando un micrómetro digital a los tiempos 0, 4 y 24 horas después de la aplicación del TPA. Cumplidas las 24 horas se sacrificaron a los animales por dislocación cervical y se obtuvo tejido auricular de ambas orejas realizando cortes de 6 mm de diámetro. Cada oreja se pesó y se colocó en un tubo Eppendorf con 0.75 ml de una solución de buffer salino de fosfato (PBS) pH 5.4 que contenía 0.5% de bromuro de hexadeciltrimetil-amonio (HTAB) y se almacenaron a -80°C para determinar posteriormente la actividad de la mieloperoxidasa (MPO).

Ensayo de la enzima Mieloperoxidasa (MPO)

Para la determinación cada muestra fue homogenizada por 45 segundos a 4°C, se le agregaron 0.75 ml PBS pH 5.4 y se centrifugaron a 10,000 r.p.m. a 4°C durante 20 minutos. Se tomaron 24 µl del sobrenadante y se adicionaron 80 µl de PBS, 68 µl de tampón Na₂PO₄ 220 mM, 12 µl de solución de H₂O₂ 0,017% y 16 µl de una solución acuosa de 18.4 mM clorhidrato de tetrametilbenzidina (TMB), dejándose incubar por espacio de 3 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con la adición de 24 µl de solución de acetato de sodio 1.46 M a un pH de 3.0. La actividad de la enzima MPO se evaluó colorimétricamente a una longitud de onda de 650 nm (Bralley *et al.* 2008). Todas las soluciones tampón empleadas se realizaron justo antes de emplearse.

El porcentaje de inhibición de esta actividad se calcula según la expresión matemática:

$$\% \text{ inh MPO} = \frac{\Delta \text{Ac} - \Delta \text{Ap}}{\Delta \text{Ac}} \times 100$$

donde:

ΔAc = media aritmética de la absorbancia del grupo control.

ΔAp = media aritmética de la absorbancia del grupo problema o de la sustancia control.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención de extractos crudos

Los pesos y rendimientos de los tres extractos orgánicos obtenidos de la extracción de las partes aéreas de *Ternstroemia sylvatica* (Hexánico, Clorofórmico y Etanólico) se presentan en la tabla 6, pudiéndose observar que el extracto etanólico es el que presentó mejor rendimiento crudo con 3.37% sobre el material vegetal seco macerado.

Tabla 6. Rendimiento y Peso Seco de los Extractos de *Ternstroemia sylvatica*

Extracto	Peso seco (g)	Rendimiento %
Hexánico	25.2	1.2
Clorofórmico	42.3	2.1
Etanólico	69.0	3.4

Rendimiento con respecto al peso total de material vegetal seco (2.043Kg)

7.2 Tamiz fitoquímico

Los extractos obtenidos se sometieron a análisis fitoquímico cualitativo con la intención de identificar grupos de metabolitos secundarios presentes en ellos. Por medio de estas técnicas se logró la identificación de esteroides en el extracto hexánico. El extracto clorofórmico también mostró la presencia de estos metabolitos además de resultar positivo para las pruebas de identificación de cumarinas y de terpenos. Por su parte el extracto etanólico mostró el mismo perfil que el extracto clorofórmico, sin la presencia de esteroides (tabla 7).

Los grupos de compuestos identificados en los extractos evaluados, concuerdan con lo publicado previamente en el estudio de otras especies del género, donde se han reportado la presencia de terpenos y esteroides (Shinbo *et al.* 2008; Ikuta *et al.* 2003; Tori *et al.* 2005) en extractos polares de las partes aéreas.

Tabla 7. Tamiz fitoquímico de los extractos de Ternstroemia sylvatica

Metabolitos	Prueba	Extracto		
		Hexánico	Clorofórmico	Etanólico
Terpenos	Cloruro de Cobalto	(-)	(+)	(+)
	Solución Vainillina	(-)	(+)	(+)
Alcaloides	Reactivo de Dragendorff	(-)	(-)	(-)
Cumarinas	Hidróxido de Potasio 10%	(-)	(+)	(+)
Esteroles	Anhídrido Acético y H ₂ SO ₄	(+)	(+)	(-)
	Cloruro de Cobalto	(+)	(+)	(-)
Flavonoides	Cloruro Férrico	(-)	(-)	(-)
	Cloruro de Aluminio	(-)	(-)	(-)
Quinonas	Hidróxido de amonio	(-)	(-)	(-)
Lignanós	Cloruro férrico	(-)	(-)	(-)

Los resultados se muestran como: Prueba Positiva (+) o Prueba Negativa (-)

7.3 Determinación del extracto activo de Ternstroemia sylvatica

7.3.1 Modelo de edema auricular inducido en dosis única de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA).

El edema auricular inducido por aplicación única de TPA por vía tópica disminuyó significativamente después de la administración de los extractos a dosis 2 mg/oreja en los tres grupos de estudio (tabla 8). El efecto antiinflamatorio observado en los extractos clorofórmico y etanólico fue mayor al 60% y no presentan una diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

A pesar de la considerable disminución del edema ninguno superó el potencial antiinflamatorio del fármaco de referencia indometacina (89.6%) incluso cuando la administración fue a la misma dosis. Con los resultados obtenidos se seleccionaron los extractos de mediana y mayor polaridad (clorofórmico y etanólico) para continuar con el fraccionamiento cromatográfico.

Tabla 8. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos orgánicos de Ternstroemia sylvatica en el modelo de edema auricular inducido con TPA.

Tratamiento	Edema Formado 6 hrs (mg)	% de Inhibición
Control	11.0 ± 0.1	
Extracto Hexánico	5.9 ± 0.9*	46.8
Extracto Clorofórmico	4.0 ± 0.5*	63.6
Extracto Etanólico	4.2 ± 0.5*	61.8
Indometacina	1.1 ± 0.2*	89.6

Los resultados se expresan como la media ± e.e.m. Extractos aplicado tópicamente a dosis de 2 mg/oreja, el TPA en dosis de 2.5 µg/oreja. One way ANOVA-Dunnett, *p<0.05 con respecto al control. n=7

7.4 Fraccionamiento cromatográfico de los extractos clorofórmico y etanólico

- **Extracto Clorofórmico (EC).**

Del extracto **EC** se obtuvieron 22 fracciones primarias de 300 ml cada una que se reunificaron por similitud cromatográfica en un total de 7 fracciones denominadas como I-C a VII-C. El peso, rendimiento, análisis fitoquímico y Rf de estas fracciones se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 9. Fracciones primarias obtenidas por separación cromatográfica del extracto clorofórmico de Ternstroemia sylvatica.

F _x	f _x	Rendimiento			Grupo Metabolitos	Rf
		g	E (%)	V (%)		
I-C	f ₁ -f ₃	0.540	10.8	1.3	Esteroles	0.90
II-C	f ₄ -f ₅	1.214	24.2	2.8		
III-C	f ₆ -f ₈	1.118	22.3	2.6	Terpenos	0.80
IV-C	f ₉ -f ₁₁	0.692	13.8	1.6	Terpenos	0.75
V-C	f ₁₂ -f ₁₃	0.691	13.8	1.6	Cumarinas	0.60
VI-C	f ₁₄ -f ₁₇	0.438	8.7	1.0		
VII-C	f ₁₈ -f ₂₂	0.243	4.9	0.6		

El rendimiento se expresa con respecto al peso del extracto utilizado en la cromatografía (E = 5g) y del peso total del extracto obtenido (V = 42.3g) y se exponen los probables componentes identificados por cromatografía en placa fina y Rf correspondientes.

Las pruebas fitoquímicas realizadas a las fracciones obtenidas concuerdan con los grupos de metabolitos encontrados en el extracto crudo **EC**; pese a que en las fracciones II-C, VI-C y VII-C no se identificaron grupos específicos de metabolitos con las soluciones reveladoras empleadas, las demás fracciones dieron positivo para las pruebas de terpenos (III-C y IV-C) y esteroides (I-C). En la fracción V-C se reveló la presencia de una cumarina con una mancha fluorescente azul visiblemente característica que coincidió en el Rf del estándar de escopoletina empleado como sustancia control para esta prueba.

- **Extracto Etanólico (EE).**

Del extracto **EE** se obtuvieron 47 fracciones primarias de 90 ml cada una que se reunificaron por cromatografía en capa fina en 7 fracciones denominadas como I-E a VII-E. El peso, rendimiento, análisis fitoquímico y Rf se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 10. Fracciones primarias obtenidas por separación cromatográfica del extracto etanólico de Ternstroemia sylvatica.

F _x	f _x	Rendimiento			Grupo Metabolitos	Rf
		g	E (%)	V (%)		
I-E	f ₁ -f ₅	0.039	0.39	0.06	Esteroides	0.90
II-E	f ₆ -f ₁₆	0.077	0.77	1.1	Terpenos	0.80
III-E	f ₁₇ -f ₂₇	0.816	8.16	1.2		
IV-E	f ₂₈ -f ₃₂	0.499	4.99	0.7	Terpenos	0.80
V-E	f ₃₃ -f ₃₅	0.433	4.33	0.6	Cumarinas	0.50
VI-E	f ₃₆ -f ₃₈	0.643	6.43	0.8		
VII-E	f ₃₉ -f ₄₇	4.310	43.10	6.2		

El rendimiento se expresa en relación al peso del extracto utilizado en la cromatografía (E = 10 g) y del peso total del extracto obtenido (V = 69 g) y se exponen los probables componentes identificados por cromatografía en placa fina y Rf correspondientes.

De igual manera que **EC** los metabolitos encontrados en las fracciones de **EE** concuerdan con los resultados obtenidos del tamiz fitoquímico al extracto crudo. Con la excepción en I-E donde las pruebas fitoquímicas dan débilmente positivo a esteroides, este grupo de compuestos no se había detectado. Igualmente la fracción V-E mostró

una mancha azul característica con Rf similar al control usado que para este caso fue escopoletina. De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada no se ha reportado la presencia de cumarinas en otras especies de este género.

7.4.1 Análisis espectroscópico

Para identificación espectroscópica de los componentes se utilizaron las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC-MS) y cromatografía de líquidos de alta resolución. Los cromatogramas y espectros obtenidos se encuentran en el Anexo 2.

- ***Extracto Hexánico.***

El perfil de los compuestos de este extracto obtenido por GC-MS (tabla 11) mostró la presencia de ácidos grasos, hidrocarburos, cetonas y ésteres. Los compuestos se identificaron comparando con la base de datos NIST-05 y fueron considerados solo aquellos compuestos que tuvieron un porcentaje de similitud arriba del 95%.

En su mayor parte son hidrocarburos y compuestos volátiles en aproximadamente 85% (Cromatograma A2.1). Los componentes principales son: nonacosano (32.12%), hexacosano (27.07%), heptacosano (8.77%), ácido n-hexadecanoico (7.21%), palmitato de metilo (4.06%), además la presencia del compuesto 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (1.7%).

Tabla 11. Composición química del extracto hexánico de *Ternstroemia sylvatica* por análisis cromatográfico GC-MS

Compuesto	Tiempo retención min	Proporción relativa %
4,4,7a-Trimetil-5,6,7,7a-tetrahydro-1-benzofuran-2(4H)-ona (<i>dihydroactinidiolida</i>)	15.77	1.31
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (<i>fitona</i>)	17.20	1.70
Palmitato de metilo	17.60	4.06
Ácido n-hexadecanoico	17.89	7.21
Palmitato de propilo	18.53	1.63
10,13-Octadecadienato de metilo	18.63	1.94
9,12,15-Octadecatrienato de metilo	18.68	1.61
Heptacosano	24.20	8.77
Octacosano	25.87	2.01
Nonacosano	28.11	32.12
Eicosano	30.55	1.98
Hexacosano	34.01	27.07

Con el espectro de ^1H RMN se corroboró la presencia de hidrocarburos de cadena larga con una señal intensa a 1.25 consistente con las señales esperadas para metilenos de las cadenas hidrocarbonadas (Espectro A2.8).

- **Extracto Clorofórmico.**

Al realizar el tamiz fitoquímico del extracto clorofórmico se observó una mancha fluorescente azul en la prueba para identificación de cumarinas con una similitud en el R_f con la sustancia de referencia empleada para este caso que fue escopoletina.

Para corroborar este resultados se realizó el análisis del extracto para obtener su perfil cromatográfico mediante cromatografía de líquidos de alta resolución bajo metodología propuesta por Hernández y colaboradores en 2007. El extracto se inyectó a una concentración de 1 mg/ml, observándose un pico en el cromatograma obtenido con tiempo de retención 8.25 min mismo que presenta el estándar de Escopoletina. Se corroboró este dato haciendo una coinyección posterior de una mezcla del extracto clorofórmico con el estándar de escopoletina, donde se observó que el pico a 8.30 min crece en intensidad (Cromatogramas A2.6 y A2.7)

El extracto y las fracciones obtenidas se analizaron también por espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (Cromatogramas A2.2 al 5). El perfil de los compuestos de este extracto mostró de manera general la presencia de ácidos grasos, cetonas y ésteres. Se destaca la presencia del compuesto 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (fitona) en el extracto en la mayoría de las fracciones así como de ácido palmítico en varias de ellas. Los componentes principales encontrados en cada una de las muestras se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 12. Composición química del extracto clorofórmico de *Ternstroemia sylvatica* por análisis cromatográfico GC-MS

Muestra	Componentes
EC	Fitona (17.19 min), Ácido palmítico (17.87 min)
I	Fitona (17.19 min), Ácido palmítico (17.87 min)
II	Fitona (17.20 min)
III	Fitona (17.20 min)
IV	Fitona (17.20 min)
V	Fitona (17.19 min), 3-isopropil-7a-metil-1,4,5,6,7,7a-hexahidro-2H-inden-2-ona (18.65 min)
VI	Palmitato de metilo (17.60 min)
VII	Palmitato de metilo (17.60 min), Octadecanoato de metilo (18.76 min)

- **Extracto Etanólico.**

Debido a las propiedades del extracto (alta viscosidad y coloración intensa) fue más complicado realizar el mismo tipo de análisis empleados para los dos anteriores extractos. Se realizó espectroscopia por resonancia magnética nuclear con metanol deuterado como disolvente. El espectro de obtenido ^1H RMN mostró la posible presencia de aldehídos con señal a 9.4 ppm aproximadamente, además señales de dobles enlaces conjugados entre 6.6 y 8.2 ppm, señales entre 1 y 2.5 ppm propios de cadenas hidrocarbonadas; y también una gran cantidad de señales entre 2.5 y 4.4 ppm debida a la presencia de glicósidos (Espectro A2.10)

Desafortunadamente los espectros de RMN de las fracciones mostraron que el fraccionamiento de la columna no fue del todo eficiente, por lo que se plantea en fases posteriores realizar nuevamente este paso con una diferente fase estacionaria que permita mejorar la separación de los componentes.

7.5 Determinación del potencial antioxidante a los extractos

Los extractos orgánicos de *Ternstroemia sylvatica* se evaluaron para determinar su eficacia como antioxidantes, ya que esta propiedad se puede relacionar con compuestos presentes capaces de proteger al organismo del efecto dañino causado por radicales libres o especies reactivas de oxígeno que se generan dentro del proceso inflamatorio. Se utilizaron dos parámetros que fueron la captura del radical libre DPPH (tabla 13) y la capacidad reductora (FRAP).

Actualmente se sabe que los compuestos del tipo fenólico juegan un papel importante como antioxidantes, por ello se realizó también la cuantificación del contenido total de polifenoles para saber si el potencial antioxidante de los extractos se puede atribuir en parte a la presencia de este grupo de compuestos.

Tabla 13. Capacidad Antioxidante mediante la Captura de Radicales Libres (DPPH)

Extractos	% Inhibición DPPH		
	33 µg/ml	16.5 µg/ml	8.25 µg/ml
Hexánico	8.9±2.8	2.5±0.6	1.9±0.3
EC	7.3±0.9	4.3±1.2	2.7±0.9
EE	68.7±3.2	41.7±0.9	22.2±0.4
Ácido ascórbico	93±0.3		

Datos expresados como media ± SD (n = 3). Solución del radical DPPH en metanol (9×10^{-5} M) y ácido ascórbico (5 µg/mL).

El **EE** presentó una mayor capacidad de captura del radical DPPH con un porcentaje de 68.7% en una concentración de 33 µg/ml (IC_{50} 2.2 µg/ml). Los demás extractos presentaron una actividad baja menor al 10% respecto a la referencia usada de ácido ascórbico.

De acuerdo a los resultados de la prueba FRAP realizada a los extractos orgánicos de *T. sylvatica*, descritos en la Tabla 14, podemos establecer que el extracto más activo es el etanólico. Este extracto al presentar poder reductor tienen la capacidad de donar electrones al Fe^{3+} para convertirlo en Fe^{2+} es decir que **EE** tiene capacidad antioxidante. Los extractos hexánico y clorofórmico no fueron activos en el ensayo FRAP.

Esto se puede correlacionar muy bien con la cuantificación de compuestos polifenólicos donde se observa que los extractos hexánico y clorofórmico presentan una concentración baja de este tipo de compuestos (2.81 y 27.8 mgAG/gM respectivamente) por lo que su potencial antioxidante no es significativo y se encuentra muy por debajo del mostrado por **EE**.

Tabla 14. Capacidad reductora (FRAP) y Contenido Total de Polifenoles de los extractos Ternstroemia sylvatica

Extracto	FRAP $\mu\text{mol Fe}^{2+}\text{L}$	Contenido Total de Polifenoles mgAG/gM
Hexánico	206.9 \pm 20.0	2.81 \pm 0.4
EC	317.9 \pm 6.0	27.8 \pm 1.6
EE	2431.3 \pm 102.1	215.8 \pm 8.5
Ácido ascórbico	3276.5 \pm 40.6	

Datos expresados como media \pm SD (n = 3). Ácido ascórbico (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para el FRAP los resultados se expresaron en $\mu\text{mol Fe}^{2+}$. Para el contenido total de polifenoles los resultados se expresan como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco de la muestra.

La presencia de radicales libres en el organismo puede traer muchas reacciones adversas como lesiones tisulares, sobre-estimulación de mediadores inflamatorios y daños a biomoléculas (Pala *et al.* 2008). Por lo que estas evaluaciones mostraron que el extracto etanólico de *T. sylvatica* podría ofrecer una mejor protección contra el estrés oxidativo generado en un proceso inflamatorio.

7.5.1 Determinación del potencial antioxidante a las fracciones clorofórmicas y etanólicas.

Los mismos ensayos de actividad antioxidante le fueron realizados a las fracciones correspondientes de cada extracto. Las siguientes tablas muestran el potencial antioxidante de las fracciones Clorofórmicas y Etanólicas comparadas con su extracto correspondiente (tabla 15 y 16).

Tabla 15. Capacidad Antioxidante y Contenido Total de Polifenoles de las fracciones clorofórmicas de *Ternstroemia sylvatica*.

Fracciones	% Inhibición DPPH	FRAP $\mu\text{mol Fe}^{2+}\text{L}^{-1}$	Contenido Total de Polifenoles mgAG/gM
IC	3.2±0.5	97.8 ± 6.2	0
IIC	0.4±0.8	96.3 ± 12.0	0
IIIC	1.3±0.9	34.3 ± 6.8	0
IVC	9.4±0.7	181.3 ± 12.3	5.9 ± 0.1
VC	11.7±0.7	303.4 ± 20.0	17.9 ± 4.2
VIC	12.7±1.5	427.1 ± 42.1	25.0 ± 2.7
VIIC	10.1±2.7	314.7 ± 30.0	18.4 ± 4.5
EC	7.3±0.9	317.9 ± 6.0	27.8 ± 1.6

Datos expresados como media \pm SD (n = 3). Solución del radical DPPH en metanol (9×10^{-5} M) y ácido ascórbico (5 $\mu\text{g/mL}$). Para el contenido total de polifenoles los resultados se expresan como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco de la muestra.

En los datos obtenidos de la evaluación destacan que en las fracciones **IC**, **IIC** y **IIIC** no se detectaron compuestos polifenólicos con la metodología usada, además los porcentajes de inhibición de DPPH expresados por estas mismas fracciones son demasiado bajos (3.2, 0.35 y 1.3% respectivamente).

Se ha comprobado que existe una relación directa entre el ensayo FRAP y el contenido fenólico total en estudios de plantas medicinales lo que ha permitido aseverar que a mayor contenido de polifenoles tiene lugar una mayor capacidad reductora (Cai *et al.* 2004). En este extracto y sus fracciones respectivas la relación entre la cantidad de compuestos polifenólicos y el ensayo FRAP tiene un valor de $R=0.8919$. Esto es que ninguna de las fracciones clorofórmicas muestra un potencial antioxidante destacable,

muy probablemente por la escasa presencia de compuestos que podrían tener esta capacidad.

Por el contrario, las fracciones del extracto etanólico mostraron una mayor capacidad respecto a las fracciones clorofórmicas sobre todo **IVE, VE, VIE** y **VIIIE** (Tabla 16) que tuvieron una actividad significativa en los tres ensayos propuestos y mostrando una tendencia de mayor capacidad al aumentar la naturaleza polar de la muestra.

Tabla 16. Capacidad Antioxidante y Contenido Total de Polifenoles de fracciones Etanólicas de Ternstroemia sylvatica

Fracciones	% Inhibición DPPH	FRAP $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{L}$	Contenido Total de Polifenoles mgAG/gM
IE	5.5±1.8	82.6 ± 16.0	3.9 ± 0.2
IIIE	6.2±0.6	122.4 ± 14.0	6.4 ± 0.5
IIIIE	27.1±4.4	707.7 ± 10.0	62.5 ± 5.4
IVE	86.8±3.5	2888.4 ± 9.3	385.7 ± 9.3
VE	84.4±4.0	2920 ± 14.1	417.2 ± 4.5
VIE	88.7±0.6	2799 ± 152.0	263.6 ± 8.0
VIIIE	66.5±2.9	2198.5 ± 98.0	200.3 ± 3.1
EE	68.7±3.2	2431.3 ± 102.0	215.8 ± 8.5

Datos expresados como media ± SD (n = 3). Solución del radical DPPH en metanol (9×10^{-5} M) y ácido ascórbico (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Estas fracciones superaron incluso los valores mostrados por su respectivo extracto crudo. Al realizar la correlación entre los ensayos de capacidad antioxidante FRAP y el contenido total de polifenoles se demuestra su relación directa un valor de $R=0.8958$. Los resultados obtenidos sugieren que la cantidad de compuestos de tipo fenólico contribuyen de manera significativa a la capacidad antioxidante de las fracciones y del extracto etanólico.

7.6 Determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa en el modelo agudo de edema auricular inducido por TPA

a) Actividad antiinflamatoria de los extractos crudos de *T. sylvatica*.

La aplicación tópica de los extractos orgánicos disminuyeron el edema auricular formado por el TPA y este efecto se vio reflejado aun 24 horas después de su aplicación. Al igual que en el modelo monitor los extractos clorofórmico y etanólico fueron los que presentaron un mejor efecto antiinflamatorio con 72 y 79% respectivamente a dosis de 1 mg/oreja. El efecto observado fue similar al del fármaco de referencia indometacina aplicado a la misma dosis disminuyendo 78% la formación del edema auricular (Tabla 17).

Tabla 17. Actividad antiinflamatoria de *T. sylvatica* sobre el edema de oreja inducido con TPA.

TRATAMIENTO	DOSIS mg/oreja	OREJA IZQ mg	OREJA DER mg	EDEMA	% INHIBICIÓN
Control		13.6 ± 1.2	7.9 ± 0.6	5.8 ± 1.0	
Indometacina	2	10.5 ± 0.7	9.5 ± 0.8	1.0 ± 0.3*	78
EXTRACTOS					
Hexánico	1	11.0 ± 0.5	9.0 ± 0.4	2.0 ± 0.5*	65.0
	2	11.2 ± 0.6	9.0 ± 0.6	2.2 ± 0.4*	61.5
Clorofórmico	1	10.4 ± 0.5	8.8 ± 0.6	1.6 ± 0.2*	72.0
	2	9.2 ± 0.4	7.8 ± 0.2	1.4 ± 0.4*	75.5
Etanólico	1	9.8 ± 0.7	8.6 ± 0.4	1.2 ± 0.6*	79.0
	2	10.8 ± 0.9	9.5 ± 1.0	1.6 ± 0.5*	72.0

Los resultados se expresan como la media ± e.e.m. Extractos aplicado tópicamente, el TPA en dosis de 2.5 µg/oreja. One way ANOVA-Dunnett, *p<0.05 con respecto al control. n=5

Con la aplicación tópica del extracto etanólico no se observó un efecto dosis-respuesta ya que la mayor actividad se presentó a la menor dosis. El patrón de actividad observado en este extracto es muy común en la evaluación de extractos de plantas, debido principalmente a la presencia de una mezcla de compuestos químicos no totalmente homogénea que puede cambiar la proporción entre compuestos y que pueden ser responsables en mayor o menor medida a la actividad evaluada por lo que dependiendo de la dosis empleada se favorece el efecto de algunos de ellos. En general los tres extractos orgánicos presentan una actividad antiinflamatoria destacable

y presentan la misma tendencia en la actividad observada en la prueba monitora con la diferencia de que el efecto se hasta las 24 horas después de la aplicación tópica del tratamiento.

b) Actividad antiinflamatoria de las fracciones clorofórmicas de T. sylvatica

De las fracciones obtenidas del extracto clorofórmico de *Ternstroemia sylvatica*, destacan que las fracciones primarias IIC y IVC poseen una actividad antiinflamatoria igual al extracto crudo aplicado a la misma dosis (1 mg/oreja) (Tabla 18). En estas fracciones se identificaron terpenos, este grupo de metabolitos ha sido reportado en diversos estudios como inhibidores del factor nuclear kappa (NF-κB) que tiene un papel clave en la regulación de la respuesta inflamatoria (Salminen *et al.* 2008).

Tabla 18. Actividad antiinflamatoria de las fracciones clorofórmicas de T. sylvatica sobre el edema de oreja inducido con TPA.

TRATAMIENTO	OREJA IZQ mg	OREJA DER mg	EDEMA FORMADO	% INHIBICIÓN
Control	13.6 ± 1.2	7.9 ± 0.6	5.8 ± 1.0	
IC	11.4 ± 0.5	9.0 ± 0.5	2.4 ± 0.4*	58.0
IIC	9.4 ± 0.8	7.0 ± 0.3	2.4 ± 0.7*	58.0
IIIC	10.2 ± 0.7	8.6 ± 0.5	1.6 ± 0.4*	72.0
IVC	10.6 ± 0.7	9.0 ± 0.5	1.6 ± 0.4*	72.0
VC	10.4 ± 0.7	8.4 ± 0.5	2.0 ± 0.1*	65.0
VIC	11.2 ± 0.4	9.4 ± 0.2	1.8 ± 0.5*	69.0
VIIC	10.2 ± 0.6	9.2 ± 0.6	1.0 ± 0.3*	83.0
EC	10.4 ± 0.5	8.8 ± 0.6	1.6 ± 0.2*	72.0

Los resultados se expresan como la media ± e.e.m. Fracciones aplicadas tópicamente a dosis de 1 mg/oreja, el TPA se aplicó a dosis 2.5 µg/oreja. One way ANOVA-Dunnett, p<0.05 con respecto al control. n=5

En la fracción VC se identificó una cumarina determinada como escopoletina, el porcentaje de inhibición del edema fue del 65% mayor a lo reportado por García-Rodríguez y colaboradores en 2012 donde el estándar de escopoletina inhibió el edema en un 52% aplicado en las mismas condiciones. Una posible causa del comportamiento observado con esta fracción es la presencia de otras moléculas que pueden favorecer el efecto antiinflamatorio aun cuando la dosis neta de la escopoletina fue mayor

(2mg/oreja). La fracción VIIC mostró una mayor actividad antiinflamatoria (83%) que el extracto crudo (72%) a la misma dosis, en el análisis químico por GC-MS se determinó que esta fracción contiene ácidos grasos como palmitato de metilo.

Cabe mencionar que en la mayoría de las fracciones de este extracto se encontró un compuesto llamado *fitona* (6,10,14-trimetil-pentadecan-2-ona) en el análisis espectroscópico realizado en GC-MS; sobre todo en IIIC y IVC donde la proporción relativa fue arriba del 60%; este compuesto fue reportado como componente antiinflamatorio en las hojas de *Aucuba japonica* por Shimuzu y colaboradores en 1994, por lo que se sugiere que parte de la actividad antiinflamatoria mostrada por las fracciones se pueda deber a la presencia de este compuesto.

Aunque en la composición química de este extracto se encuentran ácidos grasos lo que hace suponer que tendría un efecto similar al mostrado por el extracto hexánico, también se encuentran compuestos como la fitona antes mencionada que podría influir en otro tipo de mediadores inflamatorios, una explicación de este efecto podría ejemplificarse con un compuesto estructuralmente parecido a la fitona llamado fitol (3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol) reportado por Hultqvist y colaboradores en 2006 que disminuyó la respuesta autoinmune y mejoró tanto las fases aguda y crónica en modelos la artritis en ratones participando en la modulación de leucocitos, es decir, tiene un efecto sobre la migración leucocitaria dentro del proceso inflamatorio.

c) Actividad antiinflamatoria de las fracciones etanólicas de T. sylvatica.

La determinación de la actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico (tabla 19) mostró que sólo la fracción VIE presenta un efecto antiinflamatorio ligeramente mayor (83%) al extracto etanólico completo (79%). Una de las limitantes que presenta el modelo empleado en este estudio es que los vehículos permitidos son acetona y etanol; por lo que compuestos poco solubles en estos solventes no pueden ser totalmente absorbidos por la piel del animal, hecho que se puede ver reflejado en los bajos porcentajes de inhibición obtenidos en estas pruebas.

Tabla 19. Actividad antiinflamatoria de las fracciones etanólicas de *T. sylvatica* sobre el edema de oreja inducido con TPA.

TRATAMIENTO	OREJA IZQ mg	OREJA DER mg	EDEMA FORMADO	% INHIBICIÓN
Control	13.6 ± 1.2	7.9 ± 0.6	5.8 ± 1.0	
IE	10.8 ± 0.5	7.8 ± 0.2	3.0 ± 0.5*	47
IIE	10.4 ± 0.5	8.4 ± 0.6	2.0 ± 0.5*	65
IIIE	9.4 ± 0.9	7.4 ± 0.9	2.0 ± 0.3*	65
IVE	11.8 ± 0.8	8.2 ± 0.7	3.6 ± 0.7*	37
VE	11.4 ± 0.7	9.0 ± 0.4	2.4 ± 0.9*	58
VIE	9.8 ± 0.2	8.8 ± 0.2	1.0 ± 0.01*	83
VIIE	10.4 ± 0.9	8.2 ± 0.7	2.2 ± 0.7*	62
EE	9.8 ± 0.7	8.6 ± 0.4	1.2 ± 0.6*	79

Los resultados se expresan como la media ± e.e.m. Fracciones aplicadas tópicamente a dosis de 1 mg/oreja, el TPA se aplicó a dosis 2.5 µg/oreja. One way ANOVA-Dunnett, p<0.05 con respecto al control. n=5

Considerando que algunas de estas fracciones presentaron características físicas como alta viscosidad, el etanol como vehículo no disolvió en su totalidad estas fracciones (IVE, VE, y VIIE) por consecuencia la absorción por vía tópica fue más lenta y no se puede asegurar que todos los componentes hayan sido absorbidas por la piel del animal, lo que podría explicar de cierta manera los bajos porcentajes de inhibición obtenidos.

d) Efecto Antiedematoso

Uno de los signos característicos visibles del proceso inflamatorio es el tumor o edema, acompañado regularmente por la coloración o eritema. Estos dos signos específicos de la inflamación se observan claramente en la fase aguda en el modelo empleado sobre todo en la fase inicial del proceso (4 h) y disminuye considerablemente 24 h después. La administración tópica de los extractos orgánicos de *Ternstroemia sylvatica* inhibió la formación del edema auricular (tabla 20) presentándose el mayor efecto a las 4 h con el extracto hexánico (96%), esta inhibición de la formación del edema fue muy superior al mostrado por la indometacina a la misma dosis (42%). A

pesar de que el comportamiento inhibitorio de la indometacina incremento a las 24 h (67%), el extracto hexánico disminuyó el edema a este tiempo (78%).

Tabla 20. Efecto antiedematoso de extractos de *T. sylvatica* sobre el edema de auricular inducido con TPA.

TRATAMIENTO	DOSIS mg/oreja	EDEMA FORMADO		% INHIBICIÓN	
		4 h	24 h	4 h	24 h
Control		0.26 ± 0.02	0.18 ± 0.02		
Indometacina	2	0.15 ± 0.03*	0.06 ± 0.01*	42.3	66.7
EXTRACTOS					
Hexánico	1	0.05 ± 0.02*	0.06 ± 0.02*	80.7	66.7
	2	0.01 ± 0.01*	0.04 ± 0.01*	96.1	77.8
Clorofórmico	1	0.16 ± 0.03*	0.08 ± 0.03*	38.5	55.5
	2	0.16 ± 0.05*	0.11 ± 0.05*	38.5	45.5
Etanólico	1	0.13 ± 0.03*	0.07 ± 0.05*	50.0	61.0
	2	0.16 ± 0.03*	0.09 ± 0.03*	38.5	50.0

Los resultados se expresan como la media ± e.e.m. Extractos aplicados tópicamente, el TPA se aplicó a dosis 2.5 µg/oreja. One way ANOVA-Dunnett, p<0.05 con respecto al control. n=5

Caso contrario mostraron los extractos clorofórmico y etanólico en las dos dosis empleadas (2 y 1 mg/oreja) donde el mayor efecto se presentó a las 24 h aunque no presentan un efecto dosis-respuesta. De acuerdo con el mecanismo de acción del irritante TPA los productos del metabolismo del ácido araquidónico como la PGI₂ y la LTB₄ incrementan la permeabilidad vascular en la respuesta inflamatoria en las primeras horas (García-Rodríguez *et al.* 2012).

La composición química del extracto hexánico comprende en su mayoría ácidos grasos, estos compuestos han sido descritos como inhibidores de la enzima COX-2 (Miguel M. 2010) y por consecuencia tienen efectos sobre la producción de prostaglandinas y la formación del edema. Esto es consistente con el efecto mostrado por este extracto (tabla 20) que podría inhibir a la COX-2, pero con un efecto limitado pues no parece ser capaz de interferir con los demás mediadores que se expresan en el proceso.

El efecto mostrado por el extracto clorofórmico se sostuvo durante las 24 hrs aunque su efecto antiedematoso no es alto (38 y 55% a las 4 y 24 hrs) comparado con el fármaco de referencia a la misma dosis (42.3 y 66.7% respectivamente). La determinación del efecto antiedematoso de las fracciones clorofórmicas permite observar una baja actividad en la mayoría de las fracciones comparado con el extracto crudo a la misma concentración a de las fracciones I y VII (tabla 21). Las fracciones IC y VIIC fueron las únicas que mostraron además de un mayor potencial antiedematoso estadísticamente significativo, un comportamiento similar al del extracto crudo, siendo mayor el efecto a las 24 h.

Tabla 21. Efecto antiedematoso de las fracciones clorofórmicas de T. sylvatica sobre el edema auricular inducido con TPA.

TRATAMIENTO	EDEMA FORMADO		% INHIBICIÓN	
	4 h	24 h	4 h	24 h
Control	0.26 ± 0.02	0.18 ± 0.02		
IC	0.14 ± 0.03	0.08 ± 0.02*	46	56
IIC	0.20 ± 0.01	0.15 ± 0.04*	23	17
IIIC	0.17 ± 0.04	0.14 ± 0.03*	35	22
IVC	0.22 ± 0.03	0.14 ± 0.03*	15	22
VC	0.17 ± 0.04	0.15 ± 0.04*	35	17
VIC	0.19 ± 0.04	0.16 ± 0.03*	27	11
VIIC	0.12 ± 0.03	0.03 ± 0.01*	54	83
EC	0.16 ± 0.03	0.08 ± 0.03*	39	55

Los resultados se expresan como la media ± e.e.m. Fracciones aplicadas tópicamente a dosis de 1 mg/oreja, el TPA se aplicó a dosis 2.5 µg/oreja. One way ANOVA-Dunnett, p<0.05 con respecto al control. n=5

Las fracciones obtenidas del extracto etanólico disminuyen mejor el edema auricular que las obtenidas con el extracto clorofórmico (tabla 22) a las 24 hrs siendo principalmente las de mayor efecto las fracciones V y VIIE (72%), la actividad de estas fracciones solo es estadísticamente significativa a este tiempo. El resto de las fracciones, presentan un efecto similar tanto a las 4 h como a las 24 h (entre 40-60% aproximadamente) las fracciones IE, IIIE y IVE muestran un comportamiento diferente al extracto crudo etanólico ya que en estas fracciones se presenta una mayor inhibición del edema a las 4 h y ligeramente menor a las 24 h.

Tabla 22. Efecto antiedematoso de las fracciones etanólicas de *T. sylvatica* sobre el edema auricular inducido con TPA.

TRATAMIENTO	EDEMA FORMADO		% INHIBICIÓN	
	4 h	24 h	4 h	24 h
Control	0.26 ± 0.02	0.18 ± 0.02		
IE	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.02*	58	44
IIE	0.15 ± 0.01	0.10 ± 0.03*	42	44
IIIE	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.02*	62	56
IVIE	0.16 ± 0.06	0.08 ± 0.02*	39	56
VE	0.16 ± 0.03	0.05 ± 0.01*	39	72
VIE	0.22 ± 0.02	0.05 ± 0.01*	15	72
VIIIE	0.25 ± 0.04	0.08 ± 0.04*	4	56
EE	0.13 ± 0.03	0.07 ± 0.03*	50	61

Los resultados se expresan como la media ± e.e.m. Fracciones aplicadas tópicamente a dosis de 1 mg/oreja, el TPA se aplicó a dosis 2.5 µg/oreja. ANOVA-Dunnett, p<0.05 con respecto al control. n=5

El extracto etanólico no mostró nuevamente una relación dosis-respuesta, el efecto es sostenido y aumenta al transcurrir el tiempo. Este extracto podría tener similitud con el mecanismo de acción de la indometacina como inhibidora de la enzima ciclooxigenasa y la migración leucocitaria a las zonas inflamadas.

e) Actividad de la enzima mieloperoxidasa.

El proceso inflamatorio provocado por el TPA también está asociado a una marcada afluencia celular, promueve la infiltración de las células cebadas, mastocitos, las cuales liberan mediadores que aumentarán la permeabilidad vascular y la influencia de neutrófilos, el edema puede ser regulado por la generación de H₂O₂ lo que aumenta gradualmente los niveles de MPO persistiendo hasta las 24 h (Rosso *et al.* 2006), por lo que la actividad de la mieloperoxidasa es utilizada como un marcador de la acumulación de neutrófilos en el tejido dérmico inflamado y por consiguiente la producción de compuestos oxidantes (Bachoual *et al.* 2011). Los extractos demostraron poseer un valor alto del poder inhibitorio sobre la infiltración celular (tabla 23). El extracto etanólico tanto a dosis baja (1 mg/oreja) como a dosis alta (2 mg/oreja) muestra una mejor inhibición comparada con los porcentajes del extracto clorofórmico mostrando valores muy cercanos a la sustancia de referencia. La indometacina mostró un 97% a las 24 hrs consistente con el mecanismo de acción descrito para este fármaco en cuanto a su efecto en la migración leucocitaria.

Tabla 23. Efecto de los extractos en la infiltración leucocitaria medida como % de inhibición de la actividad de MPO

Indometacina 2 mg/oreja	Extracto Clorofórmico (mg/oreja)		Extracto Etanólico (mg/oreja)	
	1	2	1	2
97%	58%	79%	93%	91%

Por otro lado, las fracciones clorofórmicas inhibieron significativamente la actividad de la enzima mieloperoxidasa (tabla 24), siendo la menos activa la fracción VIIC (48 %) y las más activas la IIIC y VC (88 %). Se observa que no existe una relación directa entre la inhibición de esta enzima y el efecto antiedematoso que presentaron las fracciones; es decir, que el proceso inflamatorio no se ve disminuido por la acción directa de estas fracciones pero su efecto sí se ve reflejado sobre esta enzima.

Tabla 24. Efecto de las fracciones clorofórmicas en la infiltración leucocitaria medida como % de inhibición de la actividad de MPO.

EC	IC	IIC	IIIC	IVC	VC	VIC	VIIC
58±5	85±2	77±6	88±2	85±3	88±4	86±8	49±5

Datos expresados en porcentaje media ± SD. Fracciones aplicadas tópicamente 1 mg/oreja comparadas contra el extracto crudo correspondiente a la misma dosis. n=5

En el caso de las fracciones etanólicas la actividad mostrada es particularmente baja en VE y VIE. El resto de las fracciones mostraron una relación entre la inhibición de la inflamación y de la mieloperoxidasa por lo que se supone que uno de los mecanismos de acción de estas fracciones es su efecto sobre la expresión leucocitaria.

Tabla 25. Efecto de las fracciones etanólicas en la infiltración leucocitaria medida como % de inhibición de la actividad de MPO.

EE	IE	IIE	IIIE	IVE	VE	VIE	VIIE
93±3	67±4	73±2	78±2	62±5	36±2	57±2	75±7

Datos expresados en porcentaje media ± SD. Fracciones aplicadas tópicamente 1 mg/oreja comparadas contra el extracto crudo correspondiente a la misma dosis. n=5

8. CONCLUSIONES

El extracto etanólico mostró la mejor capacidad antioxidante con valores de 68.5% y 2431.3 $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{L}$, en los ensayos de captura del radical DPPH y capacidad reductora respectivamente. Esta actividad guarda relación directa con el contenido total de polifenoles.

El extracto hexánico está constituido en su mayoría por ácidos grasos y sus ésteres, hidrocarburos de cadena larga y una benzofuranona en muy pequeña cantidad.

Por GC-MS se logró la identificación de fitona en las fracciones del extracto clorofórmico, molécula que ha sido descrita como un compuesto antiinflamatorio. En este mismo extracto se logró identificar también mediante RMN ^1H y HPLC la presencia de escopoletina, una cumarina con actividad antiinflamatoria moderada.

Al evaluar los extractos orgánicos obtenidos en el modelo del edema auricular inducido por TPA se observó que el conjunto de metabolitos con mejor actividad antiinflamatoria se encuentra en los extractos clorofórmico y etanólico.

Al evaluar la actividad antiinflamatoria tópica de las fracciones obtenidas del extracto etanólico se puede suponer un efecto sinérgico en el extracto completo, pues con excepción de la fracción VIE las demás tienen un menor efecto.

Las fracciones clorofórmicas muestran una inhibición de la actividad de la enzima mieloperoxidasa por lo que se sugiere que parte de su efecto antiinflamatorio podría estar relacionado con la migración de leucocitos al sitio de acción.

Los resultados apoyan el uso de esta planta como antiinflamatorio tópico en la medicina tradicional.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.**, Lichtman, A. 2004 *Inmunología Celular y Molecular*. Editorial Elsevier. Quinta Edición. Madrid, España.
- Ala Y. I.** Suresh R. 2006 The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19:405–419.
- Alonso-Castro J.** Maldonado-Miranda J. 2012 Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. *Journal of Ethnopharmacology*. 143:292–298.
- Andersen J.** 2004 Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Natural Reviews Neuroscience*. 5:18-25
- Apel K.** Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373–399
- Bachoual R.** Talmoudi W. 2011. An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase *in vitro* and attenuates lung inflammation in mice. *Food and Chemical Toxicology* 49:1224–1228.
- Balderas J.L.** Alfaro-Romero A. 2012. Identification of 28-O-[[β -L-6-rhamnopyranosyl]-R1-barrigenol from *Ternstroemia sylvatica* Schlttdl. Cham. (Theaceae) as a New Compound with Toxic Effects in Rodents. *Planta Medica* 78 DOI: 10.1055/s-0032-1307555
- Balderas J.L.** Reza V. 2008. Pharmacodynamic interaction of the sedative effects of *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl. with six central nervous system depressant drugs in mice. *Journal of ethnopharmacology* 119(1):47-52.
- Balkwill F.** Mantovani A. 2012. Cancer-related inflammation: Common themes and therapeutic opportunities. *Seminars in Cancer Biology* 22:33–40.
- Baricevic D.** Sosa S. 2001. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. 75(23):125-132
- Benzie, I.** Strain, J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239(1):70–76
- Boersma B.** D'Alessandro T. 2003 Neutrophil Myeloperoxidase Chlorinates and Nitrates Soy Isoflavones and enhances their Antioxidant Properties. *Free Radical Biology & Medicine*, 35(11):1417–1430.
- Bralley E.** Greenspan P, Hargrove J. 2008. Topical anti-inflammatory activity of *Polygonum cuspidatum* extract in the TPA model of mouse ear inflammation. *Journal of Inflammation*. 5:1-5
- Brand-Williams W.** Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant capacity. *Food Science and Technologic*. 28(1):25-30.
- Brandley P.** Priebat D. 1982. Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker. *Journal of Investigative Dermatology*. 78 (3):206-209.
- Cai Y.** Luo Q. 2004 Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 74:2157–2184
- Calderón R.G.** Rzedowsky J. 2010 *Flora fanerogámica del Valle de México*. Instituto de Ecología A.C. Edición Digital.
- Cano A. Leticia.** 1997. *Flora Medicinal de Veracruz*. I. Inventario etnobotánico. 1ª. Edición. Universidad Veracruzana. México. Pág. 324-325
- Carranza G.E.** 1999. Theaceae. *Flora del Bajío y regiones adyacentes*. Instituto de Ecología A.C. Fascículo 73.
- Cerecero O.** Reyes H. 2005 Conocimiento sobre fitofármacos en médicos de atención primaria del Estado de Morelos. *Revista Médica IMSS*; Vol. 43(4): 281-286
- Cerella C.** Sobolewski C. Dicato M. 2010. Targeting COX-2 expression by natural compounds: A promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy. *Biochemical Pharmacology* 80:1801–1815.
- Céspedes E.** Hernández-Lantigua I. 1996 Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Revista Cubana Investigación Biomédicas* [online]. <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403001996000200001&lng=es&nrm=iso>. ISSN N 1561-3011.

- Chu W.** Lim Y. 2010. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10:53. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/10/53>.
- Cisneros-Prego E.** Pupo-Balboa J. 1997. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutación peroxidasa. *Revista Cubana Investigación Biomédicas* [online]. <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403001997000100002&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1561-3011.
- Concalves C.** Dinis T. 2005. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry*. 2005. 66 (1):89-98.
- Cruse J M,** Lewis R E. *Illustrated Dictionary of Immunology*. 1995. CRC Press, Boca Ratón, NY.
- D'Acquisto F.** Maione F. 2010. From IL-15 to IL-33: the never -ending list of new players in inflammation. Is it time to forget the humble aspirin and move ahead? *Biochemical Pharmacology* 79:525–534.
- Deby-Dupont G.** Deby C. 1999. Neutrophil myeloperoxidase revisited: it's role in health and disease. *Intensivmed*. 36 (6):500–513
- Dominguez-Ortiz M,** 2009. Muñoz O, García R, Vázquez M. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Moussonia deppeana*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 9(1):13-19.
- Domínguez X. A.** *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Limusa, México. 1973.
- Gabor M.** 2003. Models of Acute Inflammation in the Ear. Cap. 15. *Inflammation Protocols. Methods in Molecular Biology*. Edit. Humana Press. 1^a ed. Pp. 1223-1235
- Gallia F.** Battistoni A. 2012. Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1822:690–713
- García de Lorenzo A.** 2000. López Martínez J. Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Medicina Intensiva* 24 (8):353-360
- García-Rodríguez R.** 2012. Chamorro G. *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.)G.Don extract, a potential phytomedicine to treat chronic inflammation. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 11(5):454 - 463
- Greene ER,** Huang S. 2011. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediators* doi:10.1016/j.prostaglandins.2011.08.004.
- Gutiérrez S. J.** 2006. ¿Qué sabe usted acerca de los radicales libres? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37(4):69-73.
- Hanada T.** Yoshimura A. 2002. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine & Growth Factor*. 13:413-421.
- Hauge E.** Christiansen C. 2012. Topical valrubicin application reduces skin inflammation in murine models. *British Journal of Dermatology*. 167:288–295
- Hernández J.** Goycoolea F. 2007. Sonoran Propolis: Chemical Composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. 73:1469-1474.
- Hultqvist M.** Olofsson P. 2006. A new arthritis therapy with oxidative burst inducers. *PLoS Medicine*. 3(9):e348.
- Huang D.** Ou B. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:1841–1856.
- Ikuta A.** Tomiyasu H. 2003. Ursane and Oleanane Type Triterpenes from *Ternstroemia gymnanthera* Callus Tissues *Journal Natural Products*. 66:1051-1054
- Jeong S.** Koh W. 2011. Are there new therapeutic options for treating lung cancer based on herbal medicines and their metabolites? *Journal of Ethnopharmacology* 138:652–661.
- Jo Y;** Kim M. 2006. Antioxidative Phenolics from the Fresh Leaves of *Ternstroemia japonica*. *Journal of Natural Products* 69:1399-1403
- Jo Y;** Suh J. 2005. Jacaranone and Related Compounds from the Fresh Fruits of *Ternstroemia japonica* and their Antioxidative Activity. *Arch Pharm Res* 28:885-888.
- Johansson S.** Goransson U. 2002. A Neutrophil Multitarget Functional Bioassay to Detect Anti-inflammatory Natural Products. *Journal of Natural Products*. 65(1):32-41.
- Kalant H.** *Principios de Farmacología Médica*. Edit. Oxford University Press. Sexta Edición. España.
- Kanterman J.** Baniyash M. 2012. New insight into chronic inflammation-induced immunosuppression. *Seminars in Cancer Biology*. 22:307–318.
- Kikuchi, K;** Yamaguchi M. 1974. Structure of *ternstroemioxanthin*, a new aldehydic C40-carotenoid. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 47(4):885-887.

- Klaunig J.** Wang Z. 2011. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 254:86–99.
- Klebanoff S.J.** 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology* 77:598-625
- Kohnen S.** Franck T. 2007. Resveratrol Inhibits the Activity of Equine Neutrophil Myeloperoxidase by a Direct Interaction with the Enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:8080–8087
- Kubala L.** Schmelzer K. 2010. Modulation of arachidonic and linoleic acid metabolites in myeloperoxidase-deficient mice during acute inflammation. *Free Radical Biology & Medicine* 48:1311– 1320.
- Kulinsky V.I.** 2007. Biochemical Aspects of Inflammation. *Biochemistry* 72(6):595-607.
- Kundu J.K.,** Surh Y.J. 2008. Inflammation: Gearing the journey to cancer. *Mutation Research* 659:15–30.
- Kundu J.K.,** Surh Y.J. 2012. Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radical Biology & Medicine* 52:2013–2037.
- Kwon M.** Kim B. 2012. Role of superoxide dismutase 3 in skin inflammation. *Journal of Dermatological Science* 67:81–87.
- Lau D.** Baldus S. 2006. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & Therapeutics* 111:16–26
- Lee I.** Yang C. 2012. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators induced airway and pulmonary diseases. *Biochemical Pharmacology* 84:581–590
- Lefkowitz D.** and Lefkowitz S. 2001. Macrophage–neutrophil interaction: A paradigm for chronic inflammation revisited. *Immunology and Cell Biology* 79:502–506.
- Ley, K.** 2001. *Physiology of Inflammation*. Editorial Oxford University Press. United States of America.
- López-Herranz P,** Arroyo-Valerio G. 2008. Consumo de Hierbas Medicinales en Pacientes Prequirúrgicos en el Hospital General de México. *Revista Médica del Hospital General de México* 71(1):6-10.
- Lozada-Lechuga J.** Villarreal M.L. 2010. Fliniaux M.A. Isolation of jacaranone, a sedative constituent extracted from the flowers of the Mexican tree *Ternstroemia pringlei*. *Journal of Ethnopharmacology* 127:551–554.
- Luna I,** Ochoterena H. 2004. Phylogenetic relationships of the genera of *Theaceae* based on morphology. *Cladistics* 20:223–270.
- Malle E.** Furtmüller P. 2007. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *British Journal of Pharmacology* 152:838–854.
- Márquez-Flores J.** Montellano-Rosales H. 2009. Anti-inflammatory activity of aqueous and methanolic extracts of *Oenothera rosea* in the rat. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 40(3):11-16.
- Mata, R.** 1993. Estudios químicos y aspectos biológicos de algunas plantas usadas en la medicina tradicional de México. *La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana*. Secretaría de Salud. México Pp.143-156.
- Mbalaviele G.** Pauley A.M. 2010. Distinction of microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) inhibition from cyclooxygenase-2 inhibition in cells using a novel, selective mPGES -1 inhibitor. *Biochemical Pharmacology* 79:1445–1454.
- Michalak A.** 2006. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. Review. *Polish Journal of Environment Studies*. 15(4):523-530
- Miguel M.** 2010. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review.. *Molecules* 15:9252-9287; doi:10.3390/molecules15129252
- Mirshafiey A.** Mohsenzadegan M. 2008. The Role of Reactive Oxygen Species in Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Journal of Allergy, Asthma and Immunology*. 7(4):195-202
- Molina M.** 1999. Contreras C. Sedative actions of *Ternstroemia sylvatica* in the male rat. *Phytomedicine* 1999,6(2):115-118.
- Morgan M.** Zheng-Gang L. 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Research* 21:103-115.
- Mühl H.** Pfeilschifter J. 2003. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-γ. *International Immunopharmacology* 3:1247–1255.
- Mould-Quevedo J.** Peláez-Ballestas I. 2008. El costo de las principales enfermedades reumáticas inflamatorias desde la perspectiva del paciente en México. *Gaceta Médica de México*. 144(3):225-231
- NOM-062-ZOO-1999.** Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Olajide, O. A.;** Makinde, J. M.; Awe, S.O. 1999. Effects of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced edema and granuloma tissue formation in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 66:113

- Organización Mundial de la Salud.** Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra 2002.
- Ortega Carlos.** 1988. Uso de plantas medicinales. México: Editorial Cántaro. Hierbas Mexicanas.
- Ortiz-Pereda V,** López M. 2007. Antiinflamatorios no esteroideos y paracetamol en el tratamiento del dolor. *Gaceta Medica Bilbao.* 104:148-155.
- Pala F.** Gürkan H. 2008. The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. *Advances in Molecular Biology* 1:1-9.
- Pala F.** Tabakcioglu K. 2007 Free radicals: Our enemies or friends? *Advances in Molecular Biology* 1:63-69
- Park C.** Park J. 2011 Taraxacum officinale Weber extracts inhibit LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production via the NF- κ B modulation in RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology* 133:834–842.
- Patel M.** 2012 *In Vivo* Animal Models in Preclinical Evaluation of Anti-Inflammatory Activity. A Review. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences.* 1(2):01-05
- Perez M.** Mitchell S. 2008 *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology.* 117:1-27.
- Pérez-Ruiz A.** Padrón L. 1998 Biosíntesis de los Productos del Ácido Araquidónico y su repercusión sobre la Inflamación. *Revista Cubana Estomatología* 35(2):56-61
- Pillai S.** Oresajo C. 2005 Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation. *International Journal of Cosmetic Science* 27:17–34
- Pinheiro R.M.** 2002 Calixto J.B. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. *Inflammation Research.* 51:603–610.
- Quintanar E.M.,** 2009 Calderón S.J., La Capacidad Antioxidante Total. Bases y Aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica. UNAM.* 28(3):89-101.
- Rao T.** Currie J. 1993 Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA) induced dermal inflammation. *Inflammation.* 17(6):723-741
- Ratheesh M.** Shyni G. 2009 Methanolic extract of *Ruta graveolens* L. inhibits inflammation and oxidative stress in adjuvant induced model of arthritis in rats. *Inflammopharmacology.* 17(2) doi: 10.1007/s10787-009-8044-0.
- Ravi V.** Salem T. 2009 Anti-Inflammatory Effect of Methanolic Extract of *Solanum nigrum* Linn Berries. *International Journal of Applied Research in Natural Products.* 2 (2):33-36.
- Reuter S.** Gupta S. 2010 Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology & Medicine* 49:1603–1616
- Roberts C.** Sindhu K. 2009 Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences.* 84:705–712
- Rosso R.** Vieira T.O. 2006 Relationship between the lipophilicity of gallic acid n-alkyl esters derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 14:6409–6413.
- Salminen A.** Lehtonen M. 2008 Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 65:2979–2999
- Santos C.** 2011 Passos A. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* in rodents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 21(6):1077-1083.
- Sefi M.** Fetoui H. 2011 *Centaurium erythraea* (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Journal of Ethnopharmacology* 135:243–250
- Segura L.** Freixa B. 2000 Anti-Inflammatory Activity of Dichloromethane Extract of *Heterotheca inuloides* in vivo and in vitro. *Planta Medica* 66(6):553-555
- Shimizu M.** Tomoo T. 1994 Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. V. Constituents and anti-inflammatory effect of Aoki, *Aucuba japonica* Thunb. *Biol. Pharm Bull* 17(5):665-7.
- Shin M.** Wang, W. 2003 Triterpenoid Saponins from the Fruits of *Ternstroemia japonica*. *Journal of Natural Products* 66(10):1351-1355.
- Shinbo D.** Tamura K. 2008 Novel saponin, its manufacture, and use for antifungal agents, skin cosmetics, foods, and beverages. *Japan Kokai Tokkyo.*
- Solomons Graham.** 1999. Química Orgánica. Ed. Limusa Wiley 2ª edición. México
- Suzuki K.** Ota H. 1983 Assay Method for Myeloperoxidase in Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Analytical Biochemistry* 132:345-352.

- Taddei-Bringas G.** Santillana M. 1999 Aceptación y Uso de Herbolaria en Medicina Familiar. Salud Pública de México. 41(3):216-220.
- Tak P.** Firestein G. 2001 NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. Journal Clinical Investigation. 107 (1):7–11 doi:10.1172/JCI11830
- Tori M.** Fukuyama H; 2005 Degraded terpenoids and aromatic compounds from *Ternstroemia gymnanthera*. Letters in Organic Chemistry, 2(3):262-264.
- Triggiani M.** Granata F. 2006 Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A2. Biochimica et Biophysica Acta 1761:1289–1300
- Vazquez B.** Avila G. 1996 Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. Journal of Ethnopharmacology. 55 (1):69–75
- Venereo** Gutierrez J. 2002 Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. Revista Cubana Medicina Militar 31(2):126-133
- Wang Q.** Tang X. 2007. The inflammatory response in stroke. Journal Neuroimmunology 184(2):53–68.
- Wang S.** Meckling K. 2011 Can phytochemical antioxidant rich foods act as anti-cancer agents? Review. Food Research International doi:10.1016/j.foodres.2011.05.021
- Waris G.** Ahsan H. 2006 Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. Journal of Carcinogenesis 5:14 doi:10.1186/1477-3163-5-14
- Witko-Sarsat V.** 2000 Rieu P. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. Laboratory Investigation 80(5):617-653.
- Yoshioka, I.** Takeda, R. 1972 Saponin and sapogenol. V. Sapogenol constituents of seeds of *Camellia sasanqua* and leaves of *Ternstroemia japonica*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 20(6):1237-1242.
- Young J.** De Young L. Cutaneous models of inflammation from the evaluation of topical and systemic pharmacological agents. Pharmacological methods in the control of inflammation. Ed. Chang JY, Lewis AJ. 215-231.
- Zeraik M.L.** Serteyn D. 2011 Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. Food Chemistry. 128:259–265
- Zhao L.** Tao J. 2007 Inner Anti-inflammatory Mechanisms of Petroleum Ether Extract from *Melilotus suaveolens* Ledeb. Inflammation. 30(6):213-223.

ANEXOS

A1. Soluciones y Técnicas para la identificación de metabolitos secundarios.

- **Prueba de cloruro de cobalto**

Para la identificación de esteroides, cumarinas y terpenoides. Se aplica el reactivo con un algodón o un hisopo estéril sobre el cromatofolio en el sentido del recorrido del disolvente de manera homogénea cuidando de no tener un exceso del reactivo sobre la placa. Posteriormente se colocará a poco calor para poder observar las distintas coloraciones que se manifestaran dependiendo de la naturaleza de los metabolitos presentes en el extracto. Coloraciones rojizas indican la presencia de terpenoides, moradas de esteroides y azules de ciertas coumarinas.

- **Prueba anhídrido acético y ácido sulfúrico.**

Se utiliza una solución de anhídrido acético y ácido sulfúrico que se prepara de la siguiente manera: se mezclan 3 partes de anhídrido acético se mezclan con 1 parte de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente se coloca en el cromatofolio y se calienta 110 – 120 °C durante unos minutos. Coloraciones que van del azul, verde, violeta, amarillo hasta el café o negro son positivas para esteroides.

- **Prueba para alcaloides**

Reactivo de Dragendorff:

Solución A (0.85 gramos de bismuto básico en una solución de 10 ml de ácido acético y 40 ml de agua destilada)

Solución B (8 gr de yoduro de potasio en 20 ml de agua destilada)

Se preparará una solución stock con volúmenes iguales de las soluciones A y B, 2 ml de ácido acético y 10 ml de agua destilada, se aplica de esta solución sobre el cromatofolio con un algodón o un hisopo estéril y posteriormente se coloca a 60 °C durante 10 minutos. Coloraciones naranjas indican la presencia de alcaloides en el extracto.

- **Prueba para cumarinas**

Se preparará una solución de hidróxido de potasio al 10% para lo cual se pesarán 5 gr de hidróxido de potasio y se disolverán en 100 ml de metanol. Para la prueba se colocará esta solución usando un algodón o hisopo estéril sobre el cromatofolio y se observará inmediatamente bajo luz ultravioleta. Una fluorescencia amarilla o azul intensa indica la presencia de cumarinas y sus agliconas.

- **Prueba de Cloruro férrico**

Se prepara una solución de cloruro férrico en etanol al 3% (w/v).

Una coloración verde o azul indica la presencia de flavonoides mientras que coloraciones rojizas indica la existencia de lignanos o metabolitos con propiedades reductoras.

- **Prueba de Cloruro de Aluminio**

Se prepara una solución al 10% en etanol (w/v). Florescencia amarilla con luz ultravioleta de onda larga indica una prueba positiva.

- **Prueba para Quinonas**

Se utiliza Hidróxido de amonio o de sodio como agente rociador. Una coloración roja indica una prueba positiva.

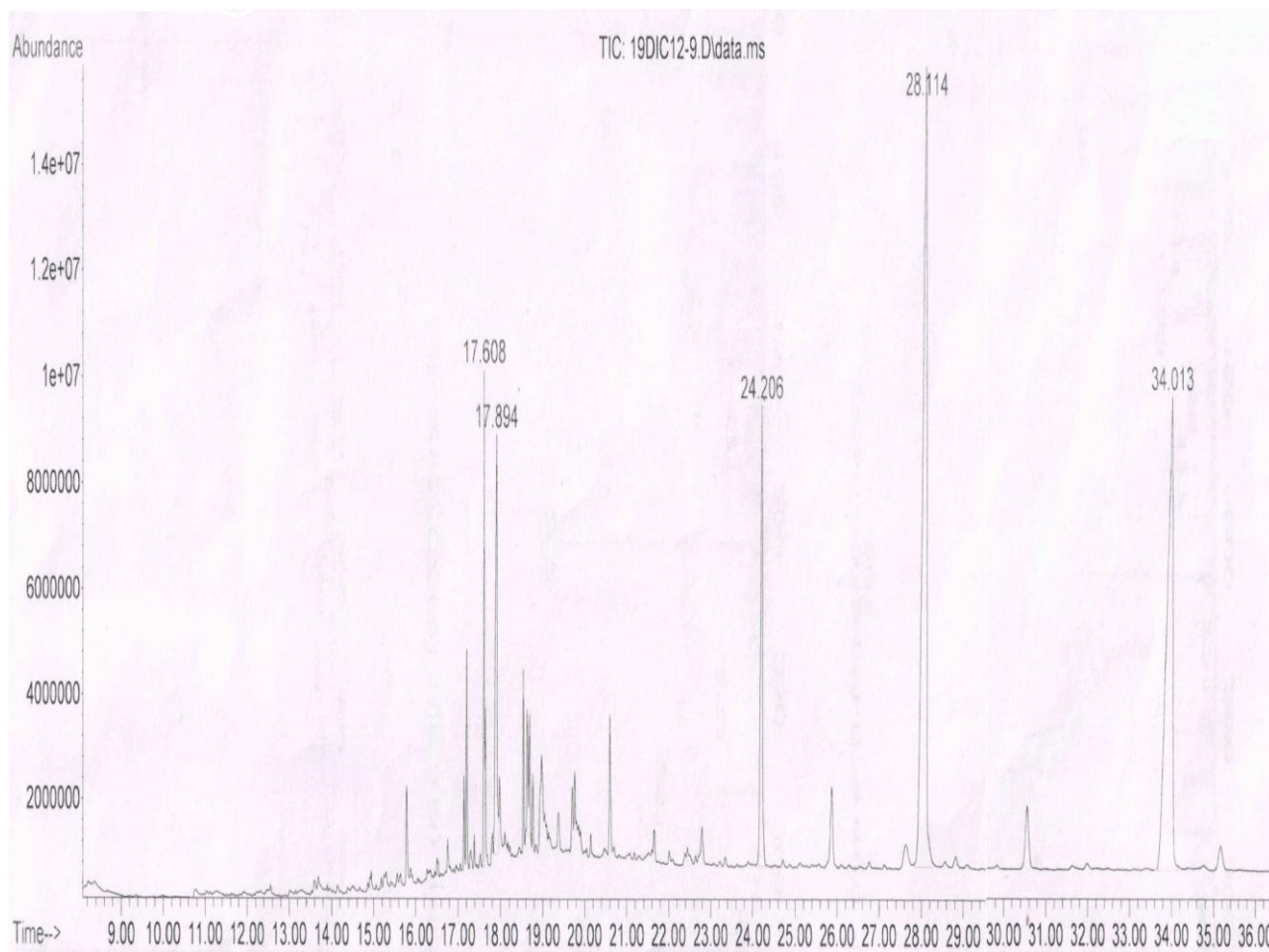
- **Prueba para Lignanos**

Se utiliza como agente rociador una solución de cloruro férrico en etanol al 3%, coloraciones rojizas indica una prueba positiva para compuestos con propiedades reductoras.

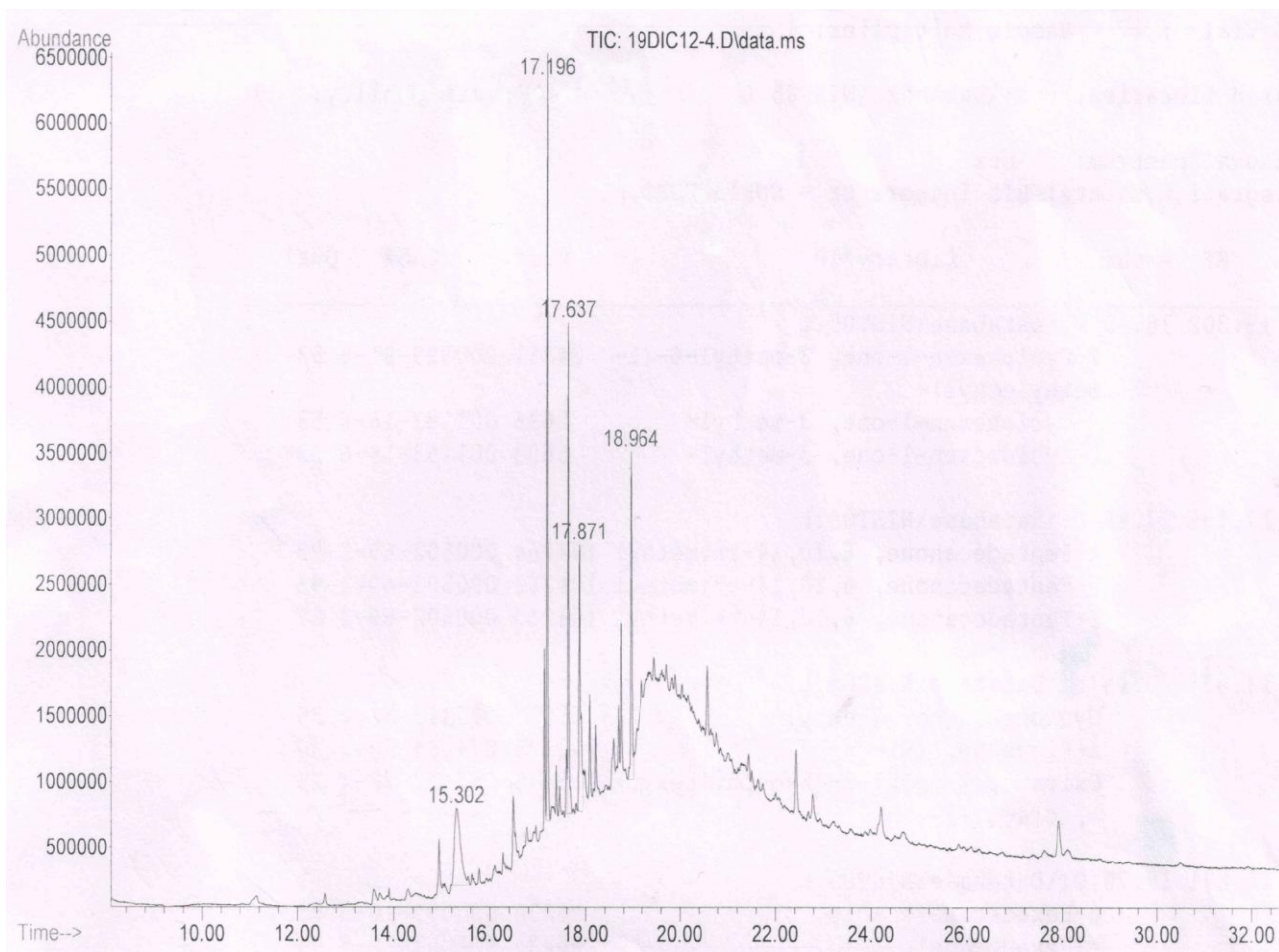
- **Prueba para Terpenos**

Se prepara una solución de Vainillina con ácido sulfúrico (1% vainillina y 10% de ácido sulfúrico en etanol). Una coloración ligeramente morado o lila indica prueba positiva

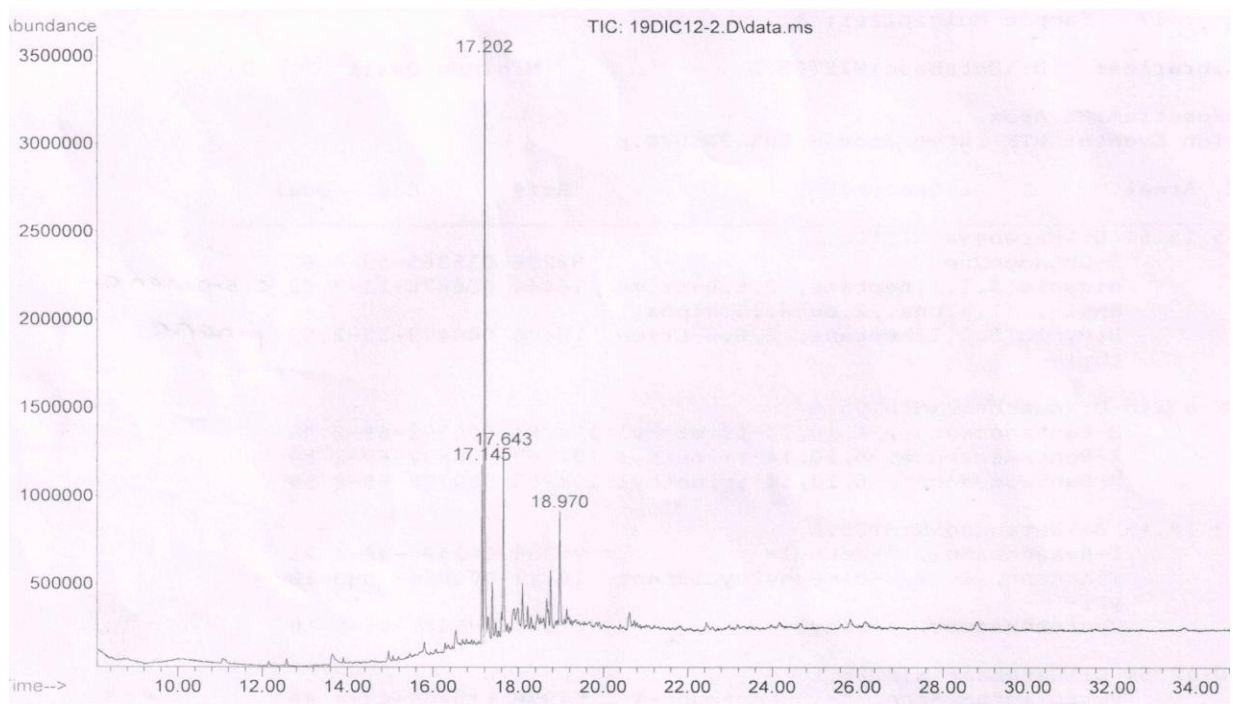
A2. Análisis espectroscópico de los extractos.



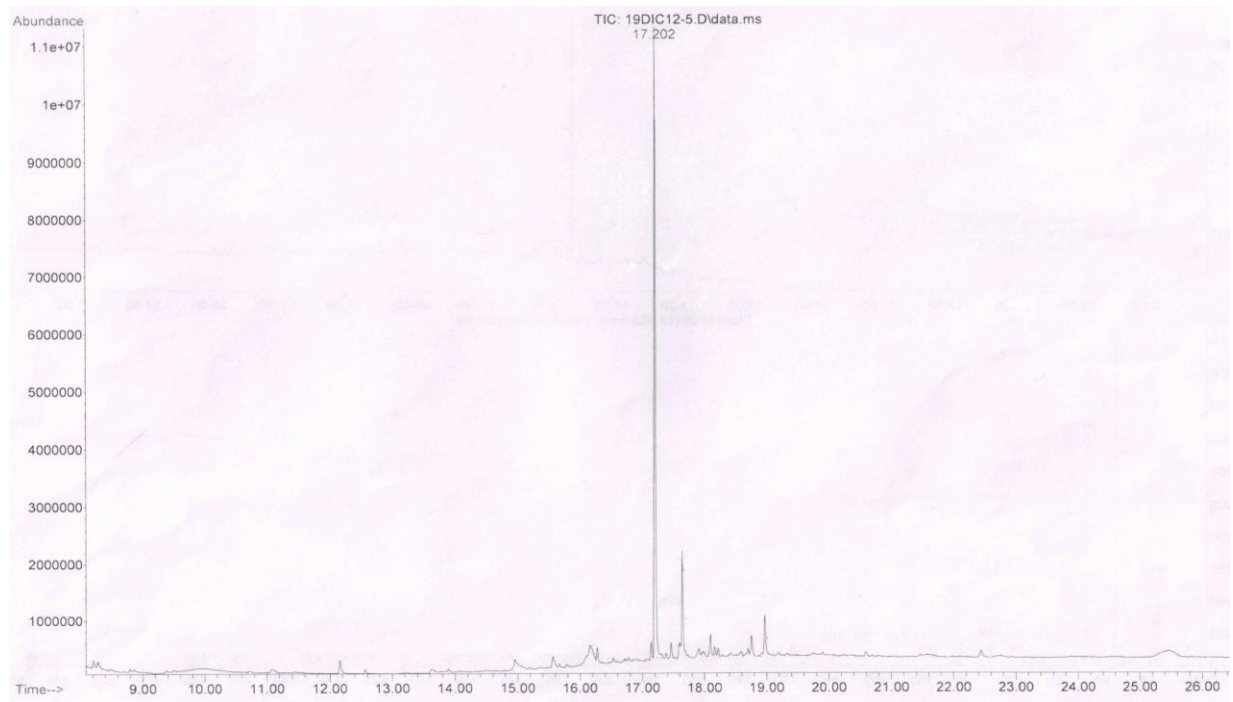
A2.1 Cromatograma GC-MS Extracto Hexánico



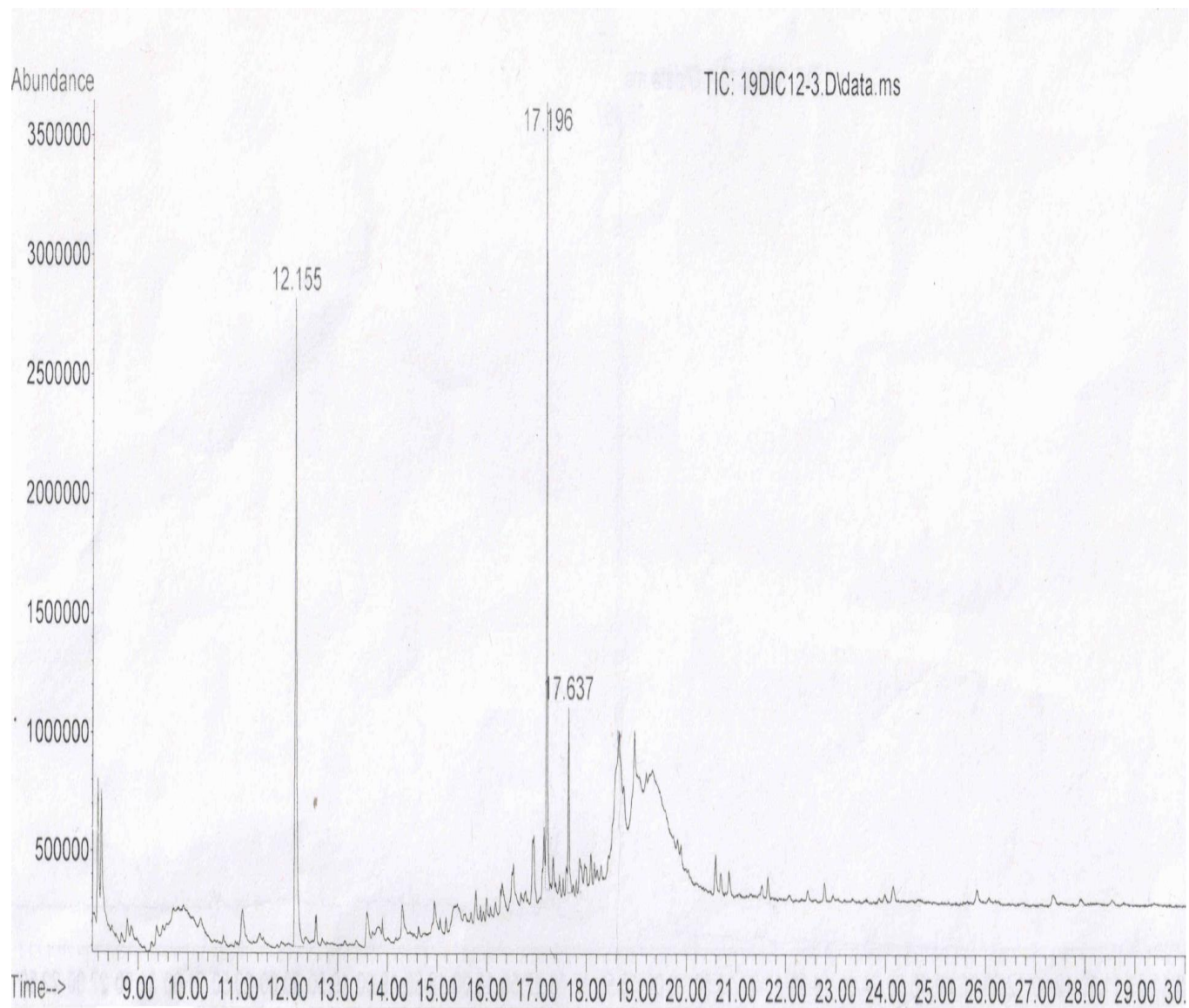
A2.2 Cromatograma GC-MS Extracto Clorofórmico



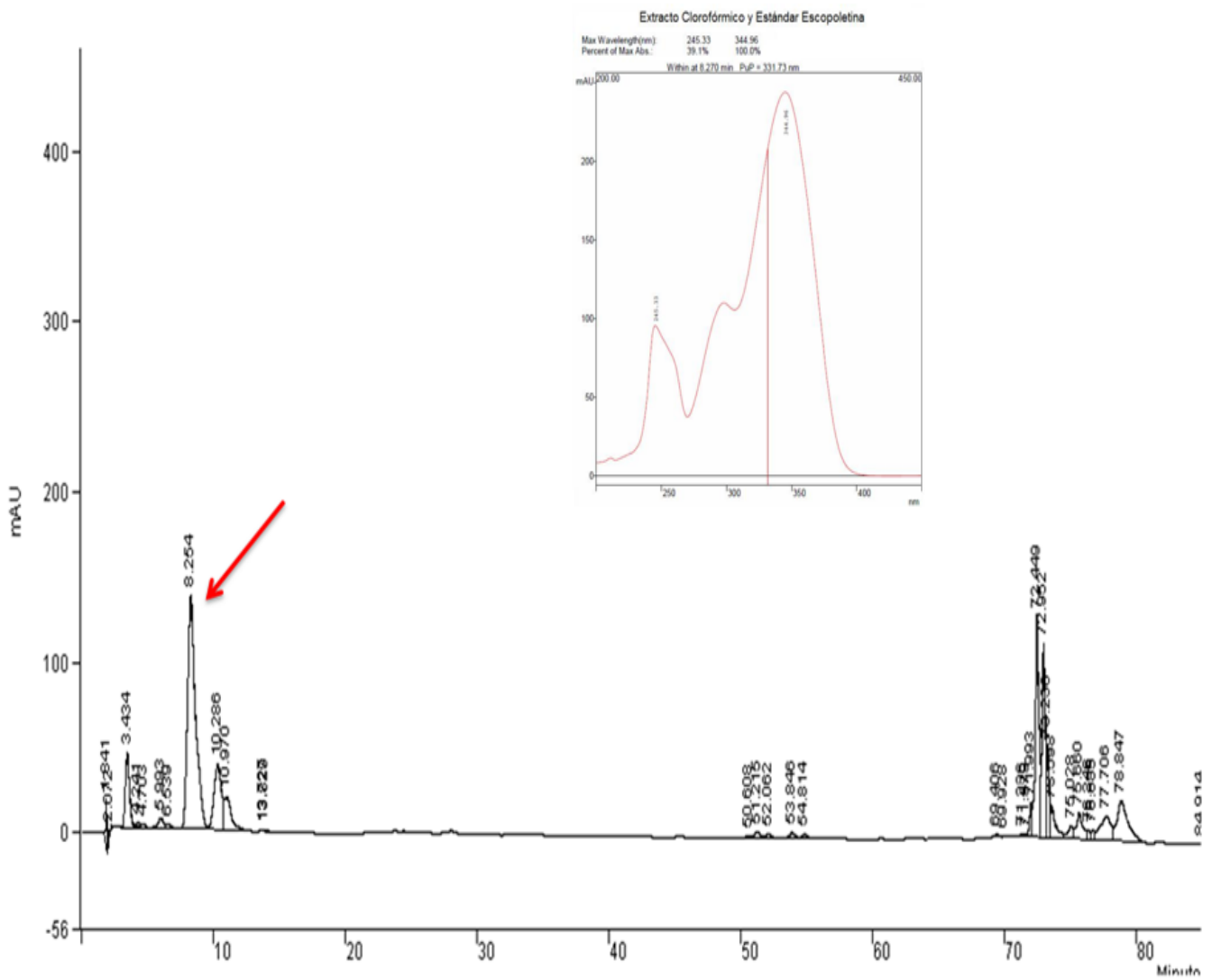
A2.3 Cromatograma GC-MS Fracción IIC del Extracto Clorofórmico



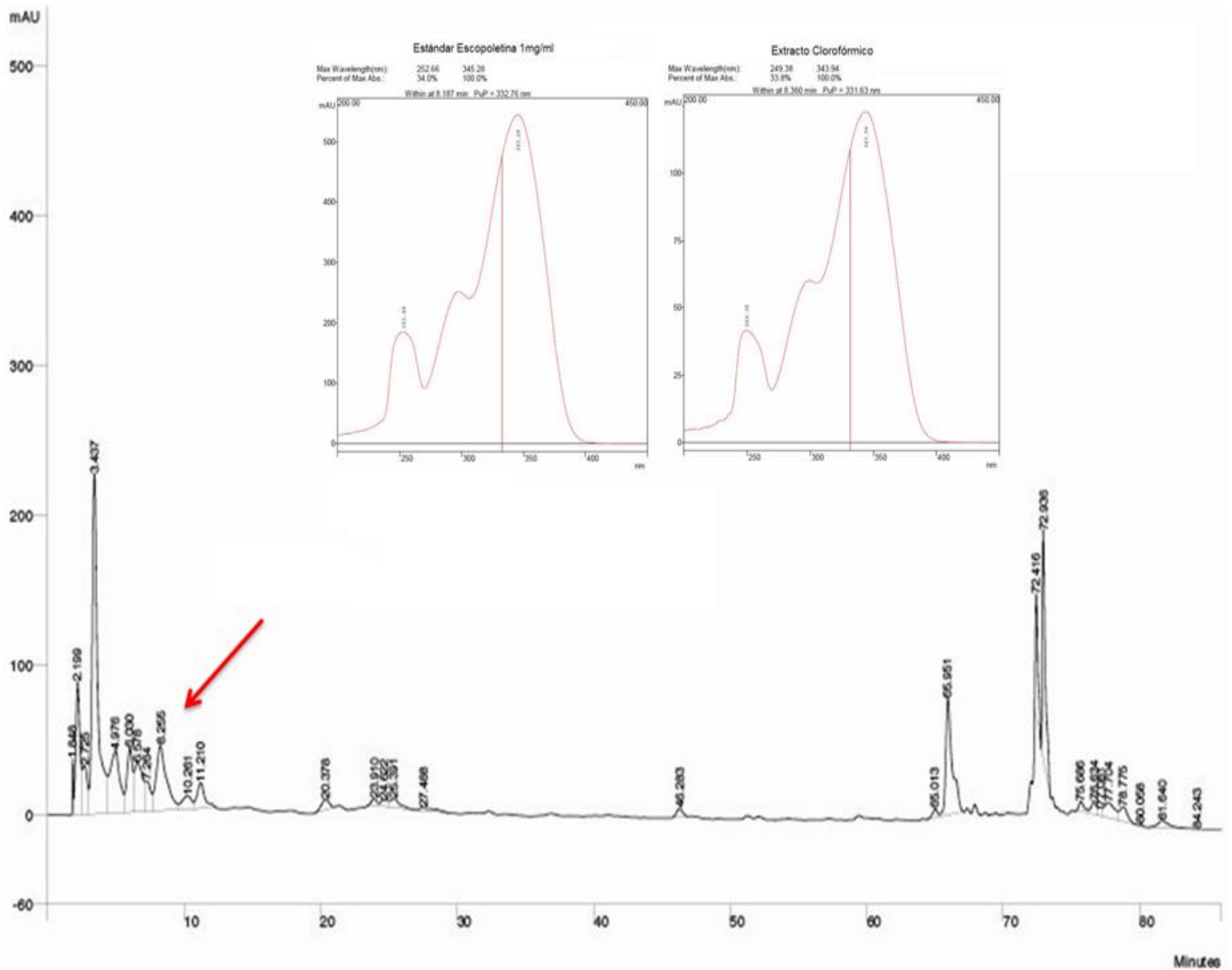
A2.4 Cromatograma GC-MS Fracción IIIC del Extracto Clorofórmico



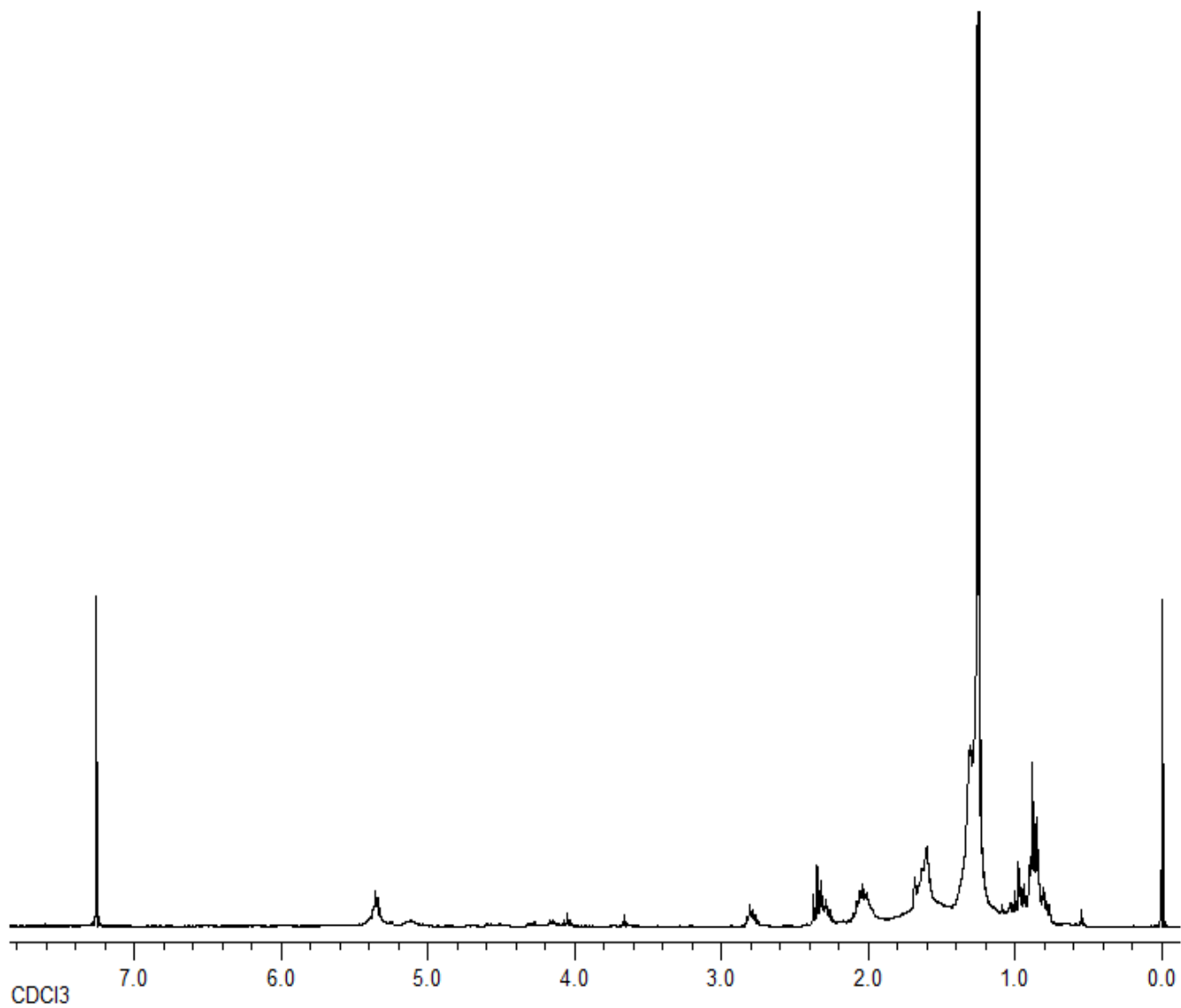
A2.5 Cromatograma GC-MS Fracción VC del Extracto Clorofórmico



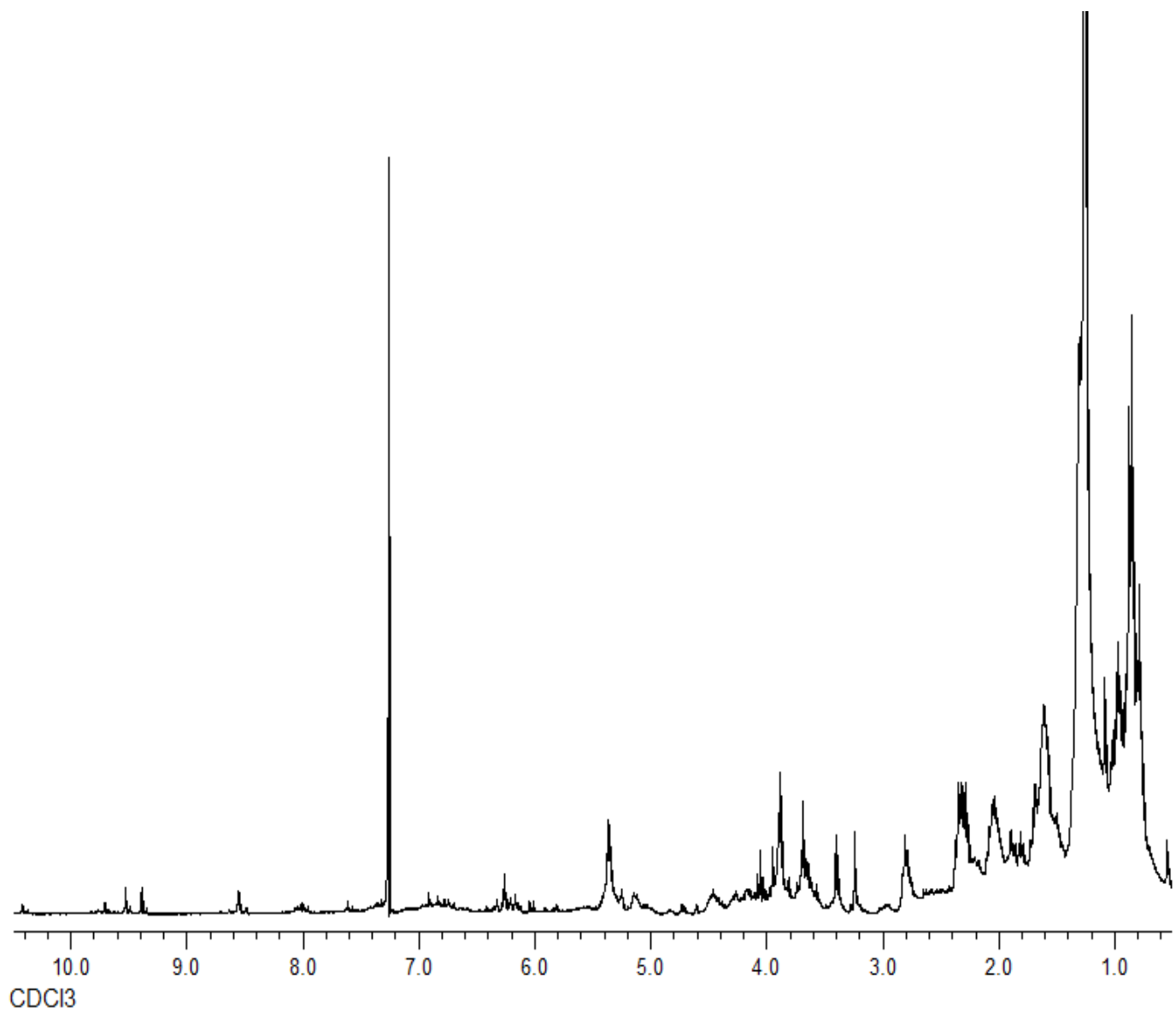
A2.6 Cromatograma HPLC Extracto Clorofórmico enriquecido con estándar de escopoletina (1mg/ml) lectura a 340nm y espectro UV de la coinyección.



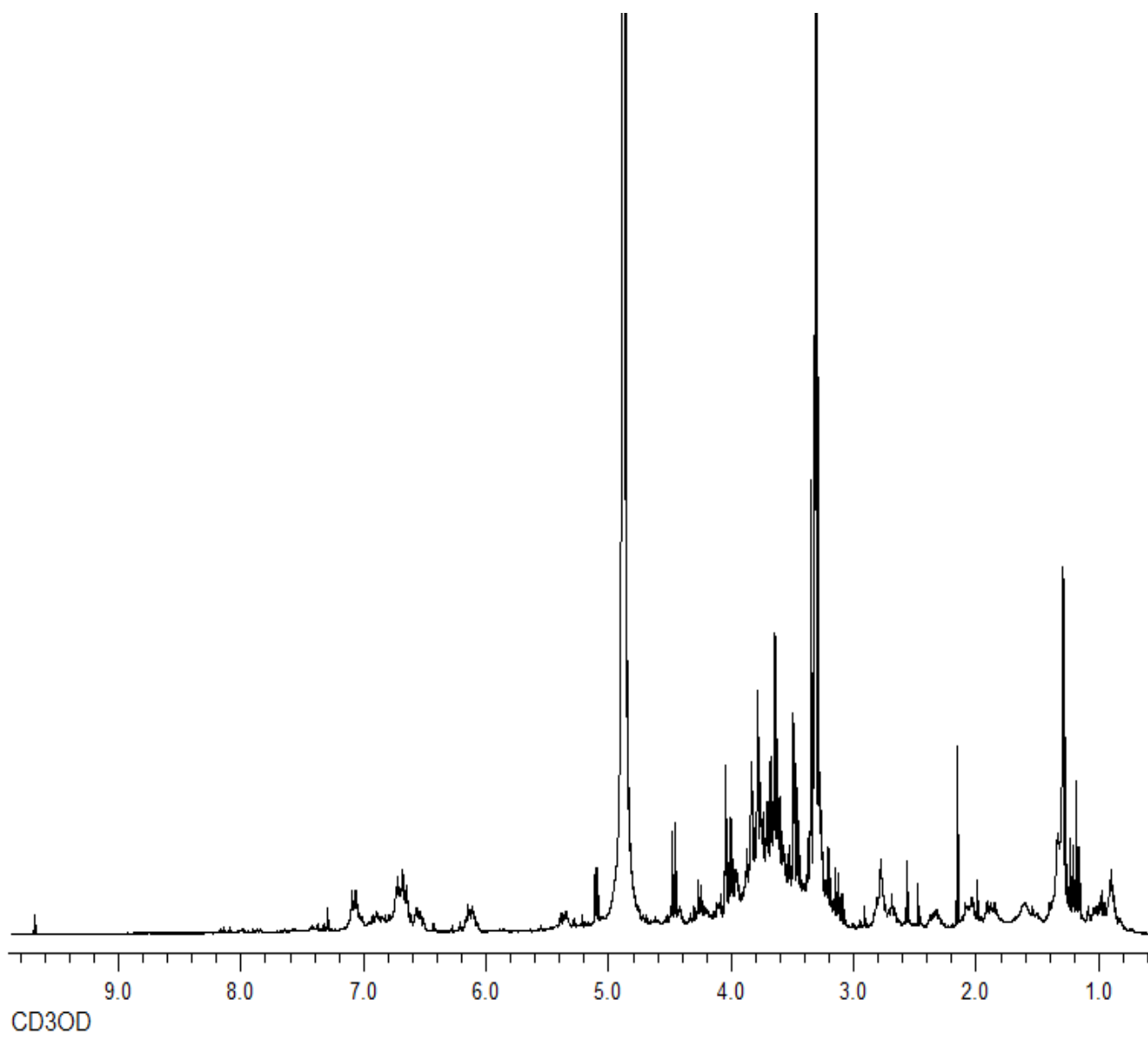
A2.7 Cromatograma HPLC Extracto Clorofórmico (1mg/ml) lectura a 340nm y espectro UV del extracto y del estándar de escopoletina.



A2.8 Espectro ^1H RMN Extracto Hexánico



A2.9 Espectro ^1H RMN Extracto Clorofórmico



A2.10 Espectro ^1H RMN Extracto Etanólico